

## 5 Diskussion

Die pathologisch-anatomische Diagnostik lymphoproliferativer Erkrankungen wirft nicht selten Probleme hinsichtlich der Abgrenzung zwischen reaktiven und neoplastischen Prozessen auf. Durch die Generierung monoklonaler Antikörper gegen lymphozytäre Oberflächenantigene gelingt es zwar häufig die Linienzugehörigkeit sowie die Differenzierungsstufe der Lymphozyten zu bestimmen, eine Unterscheidung zwischen reaktiven und malignen proliferierenden Zellen ist mittels der Immunphänotypisierung allein selten möglich. Dies gilt insbesondere für T-Zellinfiltrate. Ein entscheidendes Merkmal maligner lymphatischer Zellen ist ihr klonales Wachstum, das sich in der identischen Konfiguration ihrer Antigenrezeptorgene widerspiegelt. Zum Nachweis dieser klonalen Antigenrezeptorgenumlagerungen wurden in den letzten 15 Jahren enorme Anstrengungen unternommen. Anfangs stand die Southern-Blot-Hybridisierungstechnik<sup>23</sup> im Vordergrund, mit deren Hilfe sich klonale B- und T-Zellpopulationen aus DNA-Extrakten aus schockgefrorenem Gewebe nachweisen ließen. Obwohl sich die Southern-Blot-Analyse als zuverlässig erwies, hat sie eine Reihe von Nachteilen, die sie als routinemäßig durchführbares diagnostisches Verfahren nur sehr eingeschränkt nutzbar macht.

Mit der Einführung der PCR-Technik<sup>30,31</sup> schien es zunächst, daß die Nachteile der Southern-Blot-Analyse komplett umgangen werden könnten. Dies hat sich für den Nachweis klonaler B-Zellpopulationen der umgelagerten Immunglobulingene weitgehend bewahrheitet, während die Aufdeckung klonaler T-Zellpopulationen auch mit der PCR in vielen Fällen nicht gelang. Für den Nachweis klonaler T-Zellen bieten sich zwei Strukturen an: die umgelagerten Gene des TCR- $\beta$  und TCR- $\gamma$ . Aufgrund des komplexen Aufbaus des Genlokus der TCR- $\beta$ -Kette scheiterten bisherige Bemühungen eine PCR-Methode zu entwickeln, die in der Lage ist, klonale T-Zellpopulationen zuverlässig zu erfassen. Deshalb wurde das wesentlich einfachere aufgebaute TCR- $\gamma$  Gen als Ziel für den PCR Nachweis ausgewählt. Obwohl sich bis zu 50 % der malignen T-NHL<sup>45</sup> mit diesem Ansatz nicht klonal darstellen ließ, hielt diese Methode aufgrund seiner Einfachheit Einzug in die Routinediagnostik.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer neuen PCR-Methode zum Nachweis monoklonaler Umlagerungen der TCR- $\beta$ -Kette, mit der klonale T-Zellpopulationen zuverlässig detektierbar sind und die sich für die Anwendung von degradiertem DNA aus Formalin-fixiertem Untersuchungsmaterial eignet.

## 5.1 Methodische Aspekte

### 5.1.1 Vergleich bisher publizierter TCR- $\beta$ PCRs

Bisherige PCR-Methoden zum Nachweis klonal umgelagerter TCR- $\beta$  Gene erwiesen sich als äußerst komplex und kaum handhabbar<sup>61</sup>, eigneten sich nur zum Nachweis großer T-Zellpopulationen<sup>62,63,64</sup> in ausschließlich frischem oder gefrorenem Gewebe oder benötigten nicht-degradierte RNA<sup>65,66</sup>.

*Mc Carthy et al.*<sup>62</sup> publizierten 1991 eine Methode zum Nachweis klonaler TCR- $\beta$  Umlagerungen in DNA-Extrakten, die auf der Verwendung von V $\beta$ - und J $\beta$ -Konsensusprimern basierte. Die Homologie der J $\beta$ -Primer zu den korrespondierenden J $\beta$ -Segmenten war mit 72 - 88 % jedoch gering und erforderte wenig stringente PCR-Bedingungen. Damit war eine starke Neigung zur Bildung unspezifischer PCR-Produkte verbunden. *Mc Carthy et al.* untersuchten mit dieser Technik 17 schockgefrorene Gewebeproben verschiedener T-NHL. In nur 14 dieser Proben (76 %) konnte eine klonale Umlagerung des TCR- $\beta$  Gens beschrieben werden, obwohl alle Proben einen hohen Tumoranteil aufwiesen. Damit handelt es sich bei den 4 PCR-negativen Fällen um falsch-negative Ergebnisse (24 %). Andere Untersuchungsergebnisse<sup>67</sup>, basierend auf dieser Methode, zeigten sogar eine Rate von falsch-negativen Ergebnissen bis zu 46 %. Formalin-fixierte Proben wurden mit dieser Methode bisher nicht untersucht

1995 unternahmen *Kneba et al.*<sup>34</sup> einen weiteren Versuch mit Hilfe von Konsensusprimern eine Klonalitätsanalyse der TCR- $\beta$ -Kette durchzuführen. Grundlage für diese PCR waren 4 hoch-degenerierte Primer für die 13 J $\beta$ -Segmente, die in einer geschachtelten (semi-nested) PCR mit einem Konsensus-Primer<sup>50</sup> für die V $\beta$ -Region kombiniert wurden (jeweils ein Primer für die Primär- und Reamplifikation für die J $\beta$ 1- und J $\beta$ 2-Gruppe). Die verwendeten J $\beta$ -Primer enthalten jeweils bis zu 4 Konsensusstellen und zusätzlich bis zu 4 Inosin-Basen. Diese Inosin-Basen sind in der Lage mit unterschiedlicher Affinität jede der vier DNA-Basen zu binden (Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin).

Mit dieser Technik konnten *Kneba et al.* in 87,5 % der untersuchten wenigen T-Zell-Neoplasien (7/8) klonal umgelagerte TCR- $\beta$  Gene detektieren. Allerdings wurde

ausschließlich Gefriermaterial eingesetzt, das jeweils einen sehr hohen Tumorzellanteil aufwies (4 T-Zell Leukämien und 4 nodale T-NHL)<sup>34</sup>.

Aufgrund der technisch einfachen Durchführbarkeit (eine Primär- und eine Reamplifikation, alle Primer in einem Ansatz) war es zunächst Ziel unserer Arbeit diese Methode auf die Anwendung von Paraffinmaterial zu adaptieren. Die Untersuchung einer Vielzahl verschiedener Lymphomentitäten zeigte jedoch, daß dieses Primersystem nur in der Lage ist, die Klonalität der T-Zellen in T-NHL mit einem großen Tumoranteil zu detektieren<sup>54</sup>. In T-NHL mit einem geringen Anteil klonaler neoplastischer T-Zellen (kutane T-Zell-Lymphome, minimale bzw. residuelle Lymphommanifestationen in Lymphknoten oder Blut etc.) ließ sich keine Klonalität der TCR- $\beta$  Gene nachweisen. Die PCR-Analyse an Formalin-fixierten Gewebeproben verschiedener T-NHL zeigten in den meisten Fällen keine klonalen TCR- $\beta$  Genumlagerungen. Zusätzlich entstanden häufig unspezifische Primer-Primer bzw. Primer-DNA-Produkte, die sich als starkes Hintergrundsignal darstellten. Dies verhinderte in vielen Fällen eine eindeutige Interpretation der PCR-Ergebnisse und führte zu nicht verwertbaren Daten.

Einen völlig neuen Weg zur Klonalitätsanalyse der TCR- $\beta$  Umlagerungen entwickelten *Zemlin et al.*<sup>67,68</sup>. Diese TCR- $\beta$  PCR erfolgt in zwei Schritten: Im 1. Schritt, der sog. "screening-PCR" (12 PCR-Ansätze, 4 V-Primergemische + 3 J-Primergemische), entstehen unterschiedlich lange Amplifikationsprodukte (110-1200 bp), welche auf das klonal umgelagerte J-Segment hinweisen. Im 2. Schritt, der sog. "J-spezifischen PCR" (mind. 1 PCR-Ansatz), entsteht ein kurzes Amplifikationsprodukt (70-110 bp), welches den Verdacht der "screening-PCR" auf die klonale Umlagerung bestätigt bzw. widerlegt.

Trotz hoher Detektionsraten ist diese Technik dennoch mit einigen Einschränkungen behaftet:

1. Formalin-fixiertes Material kann aufgrund der häufig großen Länge der Amplifikationsprodukte (bis 1200 bp) nicht mittels der "screening-PCR" analysiert werden. Nur wenn das umgelagerte J $\beta$ -Segment durch Voranalysen von schockgefrorenem Material bereits bekannt ist, sind Folgeanalysen der Formalin-fixierten Proben mittels "J-spezifischer PCR" möglich.
2. Die Vielzahl der PCR-Ansätze (insgesamt mind. 13 Ansätze!) macht diese Methode für den Routineeinsatz zeitlich und finanziell unattraktiv.

### 5.1.2 Vergleich mit der familienspezifischen TCR- $\beta$ PCR

Um die sehr einschränkenden Nachteile vorheriger TCR- $\beta$  PCR-Methoden zu überwinden und damit eine sensitive und für die Routinediagnostik praktikable Methode zu entwickeln, etablierten wir familienspezifische J $\beta$ -Primer. Diese bestehen im Gegensatz zu Konsensus- oder hochdegenerierten Primern ausschließlich aus Oligonukleotiden, die eine komplette Homologie (100 %) zu ihrer Zielsequenz haben. Die überlegende Brauchbarkeit von familienspezifischen Primern konnte bereits für die PCR-Analyse zum Nachweis klonaler Immunglobulingenumlagerungen gezeigt werden, die sich neben einer hohen Sensitivität und geringen Hintergrund auszeichnen<sup>69</sup>.

Ferner werden familienspezifische Primer einzeln synthetisiert und können somit in einer äquimolaren Mischung verwendet werden, während Konsensusprimer aus einem heterogenen Gemisch von Oligonukleotiden bestehen, deren exakte Zusammensetzung nicht bestimmt werden kann.

Die von uns im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Kombination der familienspezifischen J $\beta$ -Primer<sup>70</sup> mit einem zuvor publizierten und im Verlauf der Arbeit optimierten V $\beta$ -Primer<sup>50</sup> in einer semi-nested PCR, führt zu Amplifikationsprodukten mit geringem Hintergrund bei einer Produktgröße von ca. 250 Basenpaaren. Damit ist auch die Analyse von Formalin-fixierten Gewebeproben möglich.

Mit dieser Technik konnten wir in 101/103 der untersuchten malignen T-Zell-Lymphome/Leukämien (98 %) eine klonale Umlagerung der TCR- $\beta$  Gene nachweisen<sup>70</sup>. Dies ist im Vergleich zu bisher beschriebenen TCR- $\beta$  Methoden eine äußerst große Anzahl von untersuchten T-Zellneoplasien mit einer hohen Sensitivität und Spezifität.

Damit steht mit der Entwicklung der familienspezifischen TCR- $\beta$  PCR erstmals ein für die Routinediagnostik geeignetes und praktikables PCR-System zur Verfügung, welches auch die Untersuchung von Formalin-fixiertem Gewebe mit einer hohen Detektionsrate erlaubt.

### 5.1.3 Vergleich der familienspezifischen TCR- $\beta$ PCR mit TCR- $\gamma$ PCRs

Mit Einführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden die verschiedenen PCR-Assays zuerst zum Nachweis des Gens der TCR- $\gamma$ -Kette entwickelt<sup>37,38</sup>. Aufgrund der simplen Struktur des TCR- $\gamma$ -Genlokus (12 V- und 5 J-Segmente) und den hohen Homologien innerhalb der einzelnen V- und J-Segmente, war die Etablierung eines PCR-Systems relativ einfach möglich. Da mit dieser PCR auch die Analyse von DNA aus Formalin-fixiertem Gewebe möglich war, entwickelte sich die TCR- $\gamma$  PCR rasch zum derzeit häufigsten Verfahren für den Nachweis klonaler T-Zellpopulationen<sup>39-46</sup>. Allerdings wird mit diesem Verfahren in Kauf genommen, daß ca. 10-50 % der histologisch klaren T-NHL einer Detektion entgehen<sup>39-46</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit haben wir die neu entwickelte TCR- $\beta$  PCR mit der TCR- $\gamma$  PCR verglichen, die in dieser oder ähnlichen Version in vielen Laboratorien routinemäßig angewendet wird. Das Untersuchungsgut bestand aus Gewebeproben von 62 Patienten mit histologisch/immunhistologisch und klinisch gesichertem T-NHL. Dabei konnte mit unserer TCR- $\beta$  PCR in 98 % (61/62) der T-NHL eine Klonalität nachgewiesen werden, während mit der TCR- $\gamma$  PCR nur in 80 % (50/62) eine Klonalität gefunden werden konnte. Diese Ergebnisse demonstrieren deutlich, daß die familienspezifische TCR- $\beta$  PCR aufgrund der höheren Detektionsrate im Vergleich zur TCR- $\gamma$  PCR eine für den Routineeinsatz neue und hochsensitive Methode darstellt.

Die mögliche Ursache der niedrigeren Detektionsrate mittels TCR- $\gamma$  PCR scheint zumindest in unserem Untersuchungsgut nicht von der Entität, der Lokalisation oder dem Anteil der Tumorzellen im Infiltrat abzuhängen. Da beide Methoden eine Sensitivität von ca. 1 % aufweisen, müssen andere Faktoren eine Rolle spielen, die erklären, daß bei 12 Patienten mit T-NHL mittels TCR- $\gamma$  PCR keine Klonalität gefunden werden konnte. Daß in diesen Fällen keine TCR- $\gamma$  Genumlagerung stattgefunden hat, also eine Keimbahnkonfiguration vorliegt, ist unwahrscheinlich, da die TCR- $\gamma$ -Genumlagerung ein essentieller Vorgang in den frühen Schritten der T-Zell Entwicklung ist und außerdem zeitlich vor den Umlagerungen der anderen TCR-Gene stattfindet<sup>19</sup>. Eine Erklärung des fehlenden Nachweises klonaler TCR- $\gamma$  Genumlagerungen könnte vielmehr aus der Beobachtung abgeleitet werden, daß in diesem Lokus häufig eine inkomplette oder mit einer Deletion versehene Umlagerung stattfindet<sup>71</sup>.

Ein anderer Grund könnte das relativ häufige Vorkommen von sog. “Trans-Rearrangements” sein. Dies sind Umlagerungen zwischen verschiedenen TCRs, die in der Regel zwischen der V-Region des TCR- $\gamma$  Gens und der J-Region des TCR- $\delta$  Gens stattfinden<sup>72</sup>. All diese Veränderungen können dazu führen, daß diese veränderten TCR- $\gamma$  Gene von den verwendeten Primern nicht mehr erkannt werden und somit keine TCR- $\gamma$  spezifischen PCR-Produkte generiert werden können.

#### **5.1.4 Klonalitätsanalyse mittels GENESCAN-Technik**

Die richtige Wahl der Detektionsmethode zum Nachweis von PCR-Produkten ist für die sichere und eindeutige Interpretation der Ergebnisse essentiell. Aus diesem Grund war die Entwicklung eines neuen automatisierten Verfahrens zum Nachweis der TCR- $\beta$  PCR-Produkte ein wichtiges Ziel dieser Arbeit. Dieses bestand in der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte in einem hochauflösenden Polyacrylamid-Sequenziergel, das die zuverlässige Unterscheidung von DNA-Fragmenten mit einem einzigen Basenpaar Größenunterschied erlaubt. Die Größenbestimmung der mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe der Laserdetektion in einem automatischen DNA-Sequenzierer und die Analyse der Daten durch die “GENESCAN-Software”. Durch die parallele Auftragung eines internen Standards mit jeder Probe ergeben sich im Vergleich zu herkömmlichen Polyacrylamid- oder Agarosegelen mehrere Vorteile: 1.) Es ist eine präzise Größenbestimmung der Amplifikate unabhängig von Gel-zu-Gel Variationen oder Gelartefakten möglich. 2.) Die GENESCAN-Technik ist aufgrund einer höheren Sensitivität und geringeren Detektionsgrenze in der Lage, PCR-Produkte, die im Polyacrylamidgel nicht mehr sichtbar sind, mit einer hohen Zuverlässigkeit zu detektieren<sup>73,74</sup>.

Die resultierenden Ergebnisse dokumentieren, daß sich das PCR-“GENESCAN”-Verfahren besonders gut zur Unterscheidung von mono- und polyklonalen TCR- $\beta$  PCR-Produkten eignet. Zusätzlich ist es möglich, durch die genaue Bestimmung der PCR-Produktgröße verschiedene Gewebeproben von gleichen Patienten, z. B. im Rahmen der Ausbreitungsdiagnostik, zu vergleichen (Monitoring) und ggf. eine minimale Infiltration nach Therapie nachzuweisen (minimal residual disease).

## **5.2 Klinische Aspekte**

### **5.2.1 Untersuchung von normalem und reaktiven Gewebe**

Die Analyse von lymphozytenreichen Proben wie normale Blutproben (10) oder reaktive Lymphknoten (11) mittels der TCR- $\beta$  PCR zeigte erwartungsgemäß ein polyklonales Bild in der GENESCAN-Analyse, ähnlich einer Gauß'schen-Verteilungskurve. Interessanterweise ließ sich bei der Untersuchung von reaktivem nicht-lymphatischem Gewebe, wie Hautproben bei Psoriasis vulgaris oder chronischem Ekzem, ein betont oligoklonales Bild, teilweise mit einer Dominanz einzelner Produktgrößen darstellen. Die dominanten Banden können jedoch im Gegensatz zu den T-Zell-Lymphomen bei wiederholter Untersuchung nicht reproduziert werden, so daß wir diese als pseudoklonal gewertet haben. Solche Befunde sind auch bei der Arbeitsgruppe Wood et al.<sup>40</sup> beschrieben. Sie fanden in 6 % der untersuchten reaktiven Hautproben eine klonale Umlagerung. Wood et al. interpretierten dies als sog. "klonale Dermatitis", mit der Möglichkeit, daß diese zu einem späteren Zeitpunkt in ein malignes kutanes Lymphom übergehen könnte. Die Tatsache, daß diese PCR-Resultate in wiederholten Untersuchungen eine unterschiedliche Bandengröße und Sequenz zeigen, läßt allerdings weniger an einen biologischen Prozeß denken. Vielmehr können die dominanten PCR-Amplifikate in Hautproben von Patienten mit Psoriasis und Ekzem durch die hohe Sensitivität der PCR-Technik erklärt werden, die auch geringe reaktive T-Zellklone darstellen kann<sup>46,70</sup>. Als ein Ergebnis dieser Arbeit ist daher die Reproduzierbarkeit der klonalen Amplifikate in verschiedenen, unabhängig durchgeführten Amplifikationen als Charakteristikum einer "echten" malignen T-Zellproliferation zu fordern.

### **5.2.2 Maligne T-Zellproliferationen**

In den folgenden Abschnitten werden Anwendungsmöglichkeiten dieser neuen PCR-Methode bei verschiedenen Lymphomentitäten diskutiert und einzelne Patienten vorgestellt, deren Krankengeschichten angesichts der molekularpathologischen Untersuchungen besonders interessant erscheinen.

### 5.2.3 Vorläufer-T-Zell lymphoblastische Lymphome

Die Vorläuferzellneoplasien der T-Zellreihe entsprechen in ihrer Differenzierung pro-Thymozyten oder verschiedenen Differenzierungsstufen von Thymozyten<sup>75,76</sup>. Immunphänotypisch sind sie durch die Expression des Enzyms terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) und dem Nachweis von CD34 von peripheren, reifen T-NHL zu unterscheiden. Vorläufer-T-Zell-Lymphome treten vor allem bei Kindern oder jungen erwachsenen Männern auf und manifestieren sich klinisch häufig als schnell wachsende Mediastinaltumoren. Unbehandelt verläuft diese Erkrankung in einem kurzen Zeitraum tödlich; sie ist allerdings mit den heutigen Chemotherapie-Protokollen in einem großen Teil der Fälle heilbar<sup>75,76</sup>. In unserem Kollektiv haben wir in 9/9 Fällen eine monoklonale Umlagerung der TCR- $\beta$ -Kette gefunden<sup>70</sup>. Damit ist die Methode nicht nur dazu geeignet in peripheren T-NHL, sondern auch in unreifen T-Zellneoplasien T-Zellklonalitäten nachzuweisen, da die meisten neoplastischen T-Zellen in einem Stadium entartet sind, in dem der TCR- $\beta$ -Genlocus bereits umgelagert ist.

### 5.2.4 Peripheres T-Zell-Lymphom, unspezifiziert

Diese Tumorgruppe stellt eine provisorische Einteilung nach der Zellgröße (mittelgroßzellig, gemischt mittelgroßzellig und großzellig, oder großzellig) dar<sup>6,7</sup>. Es ist allerdings unklar, ob diese Tumoren, die sich lediglich in ihrer Zellgröße unterscheiden, tatsächlich unterschiedliche Entitäten repräsentieren oder nur morphologische Varianten derselben Entität darstellen. Allen gemeinsam ist aber, daß sie genotypisch monoklonale TCR-Umlagerungen aufweisen, die sich mittels der von uns entwickelten TCR- $\beta$  PCR nachweisen ließen. Besonders hilfreich war diese Methode in Fällen, in denen die Linienzugehörigkeit immunhistologisch nicht eindeutig gezeigt werden konnte. So zeigte ein Fall gleichzeitig die Expression des CD4- und des CD56-Antigens. Es war nicht klar, ob dieses Lymphom seinen Ursprung von T-Helferzellen oder von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) nahm. Diese Unterscheidung ist von prognostischer Bedeutung, da NK-Zell-Lymphome einen wesentlich aggressiveren Verlauf zeigen (s. Kap. NK-Zell-Lymphome)<sup>77</sup>. NK-Zellen haben keine Umlagerung der TCR-Gene (Keimbahnkonfiguration), so daß eine monoklonale TCR- $\beta$ -

Umlagerungen nicht nachweisbar ist<sup>77,78</sup>. Im Fall 34 ließ sich eine klonale TCR- $\beta$  Umlagerung nachweisen; damit kann in diesem Fall von einer Abstammung von T-Helferzellen ausgegangen werden.

### 5.2.5 Kutane T-Zell-Lymphome

Kutane T-Zell-Lymphome (CTCL) stellen eine heterogene Gruppe lymphoproliferativer Hauterkrankungen dar, die durch eine klonale Akkumulation von T-Lymphozyten charakterisiert sind. Die häufigsten Formen sind die Mycosis fungoides (MF)<sup>79</sup>, sowie deren leukämische Variante, das Sézary-Syndrom<sup>80</sup>. Zu den CTCL gehört auch das primär-kutane anaplastisch großzellige T-Zell-Lymphom, das heutzutage zusammen mit der lymphomatoiden Papulose unter dem Oberbegriff "CD30-positive lymphoproliferative Erkrankungen der Haut" zusammengefaßt wird<sup>81</sup>. Die CTCL leiten sich von spezialisierten kutanen T-Lymphozyten ab und sind in frühen Stadien, im Gegensatz zu anderen peripheren T-Zell-Lymphomen, meist eine indolente Erkrankung.

Histologisch ist im Falle einer Mycosis fungoides ein ausgeprägter Epidermotropismus der neoplastischen T-Zellen charakteristisch. Es existiert jedoch ein breites Spektrum klinischer und histologischer Erscheinungsformen, das häufig eine zuverlässige Unterscheidung zwischen benignen und malignen kutanen T-Zell-Proliferationen erschwert. Dies gilt insbesondere für die frühen MF-Stadien, die nur schwer von entzündlichen Hauterkrankungen abzugrenzen sind. In diesen Fällen erwies sich für die Diagnosestellung der Nachweis identischer TCR-Umlagerungen von klonal proliferierenden T-Zellen hilfreich.

In den bisherigen Klonalitätsstudien von CTCL wurde hauptsächlich die TCR- $\gamma$  PCR verwendet. Mit dieser Technik gelang der Nachweis einer monoklonalen T-Zell Population in 53-90 % der CTCL-Fälle<sup>39,40,42,43,82,83,84</sup>. Dabei ist unklar, ob diese große Spannweite der Detektionsrate eher methodisch oder aufgrund des unterschiedlichen Patientenkollektivs bedingt ist. Einige veröffentlichte Untersuchungen sprechen auch von oligoklonalen T-Zell-Proliferationen in CTCL<sup>42,85</sup>.

Um diese diagnostischen Unsicherheiten bei den Frühformen der CTCL auszuschließen, untersuchten wir zunächst 21 Patienten in fortgeschrittenen Stadien (II-IV) mit einer optimierten TCR- $\gamma$  PCR und nachfolgender GENESCAN-Analyse<sup>46,70,86</sup>. Dabei konnte bei 16

Patienten (76 %) eine klonale Umlagerung des TCR- $\gamma$  Gens gefunden werden. Bei 5 Patienten (24 %) mit klinisch und histologisch gesichertem T-Zell-Lymphom konnte hingegen keine TCR- $\gamma$  Klonalität nachgewiesen werden. Diese Detektionsrate, die im Einklang mit den bisher publizierten Daten steht, deutet auf die im vorigen Abschnitt besprochenen methodischen Ursachen hin (s. Vgl. TCR- $\beta$  mit TCR- $\gamma$ ). Die Klonalitätsanalyse mittels der TCR- $\gamma$  PCR ist somit für die Diagnostik von CTCL nur eingeschränkt geeignet. Es war daher insbesondere die Frage interessant, ob mittels der von uns entwickelten TCR- $\beta$  PCR eine höhere Detektionsrate gerade in dieser diagnostisch schweren Entität erreicht werden kann. Wir untersuchten mittels unserer TCR- $\beta$  PCR in einer größeren Studie 96 DNA-Proben (Haut, Blut und Lymphknoten) von 23 Patienten mit fortgeschrittenem CTCL (Stadium II-IV). Dabei konnten wir in allen 23 Primärläsionen (Haut) eine monoklonale TCR- $\beta$  Umlagerung nachweisen, sowie in 15/18 (83 %) korrespondierenden Lymphknoten und in 7/11 (64 %) Blutproben den gleichen malignen T-Zellklon identifizieren. Somit konnte mittels TCR- $\beta$  in allen CTCL eine klonale T-Zellpopulation detektiert werden.

Insgesamt belegen diese Ergebnisse, daß die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte TCR- $\beta$  PCR für die Analyse der CTCL sowohl für die Primärläsionen als auch für die Ausbreitungsdiagnostik im Vergleich zu bisher beschriebenen TCR- $\gamma$  PCR-Methoden eine wesentliche Verbesserung darstellt.

Korreliert man die PCR-Ergebnisse der untersuchten Lymphknotenbiopsien und Blutproben mit immunhistologischen bzw. zytologischen Befunden, so finden sich in einigen Proben Diskrepanzen. Zwei der TCR- $\beta$  positiven Lymphknoten ergaben histologisch und immunhistologisch keinen Hinweis auf eine Infiltration durch ein T-Zell-Lymphom. Das Auffinden des identischen T-Zellklons, wie in der Primärläsion, deutet allerdings auf eine höhere Sensitivität molekularbiologischer Methoden im Vergleich zur histomorphologischen Diagnostik hin. Bereits Weiss et al.<sup>87</sup> konnte 1985 mittels TCR- $\beta$  Southern-Blot-Hybridisierungstechnik zeigen, daß Lymphknoten mit Veränderungen im Sinne einer dermatopathischen Lymphadenopathie bei Patienten mit einer Mycosis fungoides häufig den gleichen malignen T-Zellklon wie in der primären Hautläsion enthalten. Weitere Studien überprüften die klinische Relevanz von dermatopathisch veränderten Lymphknoten mit molekularbiologisch nachweisbarem T-Zellklon<sup>88,89,90</sup>. Hierbei kamen die genannten Studien übereinstimmend zu der Schlußfolgerung, daß Patienten mit einem Southern-Blot-positiven

Lymphknoten einen aggressiveren klinischen Verlauf und eine wesentlich kürzere Überlebensrate zeigen. Studien dermatopathischer Lymphadenopathien bei CTCL mittels der PCR-Technik existieren bisher nicht. Dennoch weist die ungünstige prognostische Bedeutung einer mit der Southern-Blot-Hybridisierungstechnik nachgewiesenen Lymphknoten-Infiltration daraufhin, daß die PCR-Resultate beim Staging und der davon abhängigen Therapie des Patienten berücksichtigt werden sollten.

Für die Klonalitätsanalysen standen bei 11 Patienten zusätzlich zu den Hautbiopsien Blutproben zur Verfügung. Dabei konnten wir bei 7/11 Patienten mittels TCR- $\beta$  PCR einen T-Zellklon im peripheren Blut nachweisen. Hierbei zeigte sich erwartungsgemäß bei allen 4 Patienten mit einem Sézary-Syndrom der gleiche neoplastische T-Zellklon wie in der primären Hautläsion. Bei den restlichen Patienten, bei denen im Blut zytologisch *kein* Nachweis atypischer Zellen vorlag, konnte überraschenderweise bei 3 Patienten der gleiche Klon wie in der Primärläsion detektiert werden. Die klinische Bedeutung dieser positiven PCR-Ergebnisse im Blut konnte noch nicht gewertet werden. In früheren Southern-Blot-Untersuchungen war die Detektion von T-Zell-Klonalitäten bei initialen Stadien ein seltenes Ereignis (Bakels et al.<sup>91</sup>: 4 % in Stadium I-II) und in der Regel mit einer schlechten Prognose assoziiert<sup>92</sup>. Aktuellere Studien, die auf der sensitiveren TCR- $\gamma$  PCR Technik basieren, konnten in ca. 30-50 % der initialen Mycosis fungoides-Patienten (Stadium I-II) klonale TCR-Umlagerungen nachweisen<sup>42,82,93</sup>. Die große Diskrepanz zwischen diesen Daten beruht wahrscheinlich auf dem großen Sensitivitätsunterschied zwischen der früheren Southern-Blot-Hybridisierungs- und der PCR-Technik. Die PCR-Ergebnisse deuten auf eine frühe Beteiligung des peripheren Blutes im Verlauf einer Mycosis fungoides hin. Die klinische Bedeutung dieser Befunde müßte jedoch noch in Longitudinal-Studien überprüft werden.

### 5.2.6 Anaplastisch großzellige Lymphome

Das anaplastisch großzellige Non-Hodgkin-Lymphom (anaplastic large cell lymphoma, ALCL) war früher nicht als eigene Entität erkannt und wurde dementsprechend mit verschiedenen Namen und Diagnosen wie “maligne Histozytosen” oder “Hodgkin-Sarkom” bzw. “undifferenziertes Sarkom” belegt. Erst 1985 wurde es von Stein et al.<sup>94</sup> als eine von aktivierten Lymphozyten abstammende eigene Tumorentität beschrieben. Immunphänotypisches Charakteristikum dieses Lymphoms ist die konstante Expression des CD30-Moleküls, ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie<sup>94,95</sup>. Ein Großteil der ALCL-Fälle exprimiert T-Zell-Antigene, während ein kleinerer Teil B-Zell-Antigene exprimiert. Jedoch stellt das anaplastisch großzellige Lymphom insofern einen ungewöhnlichen Tumor dar, als daß ein Teil der Fälle weder T- noch B-zellspezifische Antigene exprimiert (ALC-Lymphom vom Null-Zell-Typ).

Ein entscheidender Fortschritt in der Charakterisierung des ALCL war die Identifizierung der (2;5) Translokation<sup>96</sup> sowie die daran beteiligten Gene Nucleophosmin (NPM) und Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)<sup>97</sup>. Die in den folgenden Jahren gegen das ALK-Protein hergestellten Antikörper machten deshalb den immunhistologischen Nachweis der (2;5) Translokation möglich<sup>98,99,100</sup>. Die Korrelation der ALK-Expression mit klinischen Befunden ergab, daß sich das ALK-positive ALCL vom ALK-negativen ALCL durch bevorzugten Befall jüngerer männlicher Individuen und eine bessere Prognose bzw. therapeutische Ansprechbarkeit unterscheidet<sup>98,101,102</sup>. Das primär kutane ALCL, welches in der Regel keine ALK-Expression zeigt, besitzt im Vergleich zu den systemischen ALCL-Formen eine exzellente Prognose<sup>103</sup>.

Aufgrund der genetischen und klinischen Unterschiede werden deshalb heute drei distinkte Entitäten innerhalb des ALC-Lymphoms unterschieden: 1.) das primär systemische ALK-positive ALCL, 2.) das primär systemische ALK-negative ALCL und 3.) das primär kutane ALCL.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die überwiegende Mehrheit der ALCL vom Null-Zell-Typ (10/11) und T-Zell-Typ (21/22), selten jedoch vom B-Zell-Typ (1/9), monoklonale TCR- $\beta$  Umlagerungen aufweisen. Dieses Ergebnis war nicht nur für die systemische, sondern auch für die primär kutane ALCL vom Null- und T-Zell-Typ repräsentativ<sup>54,104</sup>. Die Daten früherer TCR- $\beta$  Southern-Blot-Untersuchungen stimmen, wenn

auch nur in einem niedrigerem Prozentsatz, der wahrscheinlich methodisch bedingt ist, mit unseren Ergebnissen überein<sup>105,106</sup>.

Der Nachweis monoklonaler TCR- $\beta$  Umlagerungen sowohl in ALCL vom Null- als auch vom T-Zell Typ unterstützen weiter die Annahme, daß es sich hierbei um immunphänotypische Varianten einer Erkrankung und nicht um unterschiedliche Erkrankungen handelt. Darüberhinaus spricht die häufige Expression zytotoxischer Moleküle wie Perforin und Granzym B in ALCL vom Null- und T-Zell-Typ dafür, daß sich diese Tumoren in der Mehrzahl der Fälle von zytotoxischen T-Zellen ableiten<sup>54</sup>.

### **5.2.7 Angioimmunoblastische T-Zell-Lymphome**

Das angioimmunoblastische T-Zell-Lymphom zeigt histologisch typischerweise reichlich verzweigte hoch-endotheliale Venolen mit PAS-positiven verbreiterten Basalmembranen sowie eine Beimischung von großen Blasten (vor allem der B-Zellreihe) und auch eosinophilen Granulozyten und Plasmazellen neben den eigentlichen neoplastischen Zellen, die teilweise ein helles Zytoplasma aufweisen. Immunhistologisch stellt der Nachweis von irregulär gestalteten Maschenwerken follikulär dendritischer Retikulumzellen, teils in der Umgebung von kapillären Gefäßen, ein wichtiges diagnostisches Merkmal dar. In nahezu allen Fällen dieser Erkrankung ist eine Epstein-Barr-Virus-Infektion von reaktiven B-Zellen und/oder neoplastischen T-Zellen zu beobachten<sup>107</sup>. Klinisch liegt in den meisten Fällen eine systemische Erkrankung mit generalisierter Lymphadenopathie sowie Fieber, Nachtschweiß und eine polyklonale Hyperglobulinämie vor. Sie tritt wie die meisten peripheren T-Zell-Lymphome vor allem bei Erwachsenen auf und zeigt einen mäßig aggressiven Verlauf<sup>108</sup>. Aufgrund dieses morphologischen Bildes wurde das angioimmunoblastische T-Zell-Lymphom als eine abnorme Immunreaktion aufgefaßt und daher ursprünglich als "angioimmunoblastische Lymphadenopathie mit Dysproteinämie" (AILD) beschrieben<sup>109</sup>. Der Nachweis monoklonaler Umlagerungen der TCR- $\beta$ -Kette mit Southern-Blot-Untersuchungen, die in nahezu allen Fällen einen hohen Anteil neoplastischer Zellen aufwiesen, gab den Hinweis auf eine T-lymphozytäre Abstammung<sup>110,111</sup>. Dies konnten wir mit der von uns entwickelten TCR- $\beta$  Methode bei 9/9 (100 %) Patienten bestätigen.

### 5.2.8 Enteropathie assoziierte T-Zell-Lymphome

Das Enteropathie assoziierte T-Zell-Lymphom (EATCL), auch intestinales T-Zell-Lymphom genannt, ist eine vergleichsweise seltene Erkrankung. Wie der Name bereits sagt, tritt dieses maligne Lymphom vor allem im Darm, insbesondere im jejunalen Abschnitt des Dünndarms, auf. Vorläufer des EATCL ist häufig eine therapierefraktäre Sprue (fehlendes Ansprechen auf glutenfreie Diät)<sup>112,113</sup>, deren histologische und klinische Abgrenzung zu einem EATCL jedoch ein schwieriges Problem ist. Typische klinische Symptome sind Malabsorption sowie Zeichen einer intestinalen Perforation. Der klinische Verlauf dieses Lymphoms ist in der Regel aggressiv und zeigt nur ein geringes Ansprechen auf bestehende Therapieschemata<sup>114</sup>. Histologisch zeigen die Tumorzellen häufig einen ausgeprägten Epithelotropismus und eine Vermehrung von intraepithelialen T-Lymphozyten in der angrenzenden Mukosa. Immunhistologisch charakteristisch ist neben einer Expression von T-Zell-Antigenen<sup>115</sup> häufig eine Expression des mukosa-assoziierten Antigens MLA (CD103), das von nahezu allen intraepithelialen aber nicht von anderen T-Lymphozyten exprimiert wird<sup>116</sup>.

Um den Zusammenhang zwischen therapierefraktärer Sprue und EACTL zu untersuchen führten wir Klonalitätsanalysen an DNA von Darmbiopsien verschiedener EATCL-Patienten durch. Dabei konnten wir in Übereinstimmung mit bisher publizierten Ergebnissen in 8/8 (100 %) Resektaten bzw. Biopsien eines manifesten EATCL eine monoklonale TCR- $\beta$  Umlagerung nachweisen, während mit der TCR- $\gamma$  PCR nur in 75 % (6/8) der Fälle eine Monoklonalität dargestellt ließ<sup>117,118</sup>. Interessanterweise konnten wir bei 4 Patienten mit einer therapierefraktären Sprue in Vorbiopsien dieselbe klonale T-Zellpopulation nachweisen wie im späteren invasiven Tumor, ohne das histologisch eine atypische Zellpopulation nachgewiesen werden konnte<sup>119</sup>. Diese Ergebnisse decken sich mit den Befunden von Cellier et al.<sup>112</sup> und legen nahe, daß viele Fälle von therapierefraktärer Sprue bereits eine frühe intraepitheliale Form eines intestinalen T-Zell-Lymphoms darstellen. Hier stellt die Analyse der TCR-Umlagerung eine praktikable Methode in der Differentialdiagnose des unklaren Spruesyndroms dar<sup>120</sup>.

### 5.2.9 Nasale NK/T-Zell-Lymphome

Das nasale NK-/T-Zell-Lymphom (früher angiozentrisches T-Zell-Lymphom) tritt, wie der Name sagt, vor allem im Bereich der Nase oder des Gaumens auf. Häufig infiltrieren die neoplastischen Zellen Gefäßwände, und führen nach Verschuß der Gefäße sekundär zu umfangreichen ischämischen Nekrosen. Klinisch hat diese Entität ohne Behandlung eine infauste Prognose. Immunphänotypisch exprimieren diese Tumoren nahezu konstant das für NK-Zellen typische Antigen CD56 und zeigen in fast allen Fällen eine Infektion der neoplastischen Zellen mit dem Epstein-Barr-Virus<sup>77,78</sup>. Diese Erkrankung ist in Europa und den USA selten, tritt jedoch in Asien vergleichsweise häufig auf. Die genaue zelluläre Abstammung von T-Zellen oder NK-Zellen wird kontrovers diskutiert. In 33 % (3/9) der Fälle (Patientenmaterial aus Hong Kong, Prof. JK. Chan) konnten wir sowohl monoklonale TCR- $\beta$ - als auch TCR- $\gamma$ -Umlagerungen finden. In den verbleibenden 66 % (6/9) konnten wir trotz hoher Tumorzellzahl dieser Lymphome keine T-Zellklonalität nachweisen. Daraus ist zu schließen, daß zwei Drittel dieser Fälle keine TCR- $\beta$  oder - $\gamma$  Umlagerung haben. Diese Ergebnisse weisen in Übereinstimmung mit den Daten von Jaffe et al.<sup>121</sup> darauf hin, daß nasale T-Zell-Lymphome in den meisten Fällen nicht von T-Zellen abstammen, sondern sich von NK-Zellen ableiten. Der fehlende Nachweis einer TCR- $\beta$  oder TCR- $\gamma$  Umlagerung in 6 der 9 Fälle deutet somit auf eine Abstammung von NK-Zellen hin und hat wegen des aggressiven Verlaufs somit eine ungünstige Prognose.

### 5.2.10 Morbus Hodgkin

Beim Morbus Hodgkin (MH), erstmals 1832 von Thomas Hodgkin beschrieben, handelt es sich um das am häufigsten vorkommende maligne Lymphom<sup>1</sup>. Das histologische Bild weist die Eigentümlichkeit auf, daß die neoplastischen Zellen, die sogenannten Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen (H/RS) einen geringen Prozentsatz von etwa 0,5-5% der gesamten Zellpopulation im Hodgkin-Infiltrat darstellen. Diese Zellen sind in einem reaktivem Infiltrat von überwiegend T-Lymphozyten, Plasmazellen, Granulozyten und Epitheloidzellen eingebettet. Wegen der geringen Anzahl der H/RS-Zellen ist ihre Klonalität und die Abstammung lange Zeit rätselhaft geblieben. Hierbei wurden nahezu alle Zellen des

lymphatischen- und hämatopoetischen Systems als potentielle Ursprungszelle herangezogen. Inzwischen gilt eine häufige B-Zell Abstammung als gesichert, da die überwiegende Mehrzahl der Fälle (mehr als 95 %) eine klonale Umlagerungen der schweren Immunglobulin-Kettengene<sup>122,123,124,125,126,127</sup> und auch eine Expression von B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren<sup>128</sup> aufweist. Allerdings sprechen einige Befunde in der Literatur für eine mögliche T-Zell-Abstammung des klassischen MH in einigen Fällen.

Diese Befunde umfassen den Nachweis von T-Zell-spezifischen Antigenen<sup>129,130</sup> sowie die Expression von zytotoxischen Molekülen wie Perforin und Granzym B<sup>54,131</sup>. Ferner konnte in einigen Fällen eine klonale Umlagerung der TCR-Gene insbesondere in MH-abgeleiteten Zelllinien gezeigt werden<sup>132</sup>. Auch über das gleichzeitige Auftreten von kutanen CD30<sup>+</sup>-T-Zell-Lymphoproliferationen wie eine lymphomatoide Papulose und ein MH bei demselben Patienten wurde berichtet<sup>133</sup>.

Mittels familienspezifischer TCR- $\beta$  PCR konnten wir an Gesamtextrakt-DNA in 2/11 MH-Fällen vom T-Zell Phänotyp mit gleichzeitiger Perforin- sowie Granzym-B Expression klonale TCR- $\beta$  Umlagerungen demonstrieren. Dennoch blieb die Frage offen, ob diese Hinweise auf eine T-Zell Abstammung direkt von den H/RS-Zellen oder von den umgebenden T-Zellen deuten. Weiterhin blieb der Ursprung der TCR-negativen MH-Fälle vom T-Typ ungeklärt.

Um eine direkte Korrelation zwischen den neoplastischen H/RS-Zellen und klonalen Umlagerungen zu beweisen, konnten wir zwischenzeitlich mittels der Einzelzelltechnik (TCR- $\gamma$  Single-Cell-PCR) einzelne H/RS-Zellen mit T-Zellantigenmuster isolieren und amplifizieren. Hierbei konnten wir in 2/13 MH-Fällen vom T-Zell Phänotyp eine monoklonale TCR- $\gamma$  Umlagerung einzelner H/RS-Zellen demonstrieren. In den übrigen 11/13 Fällen konnten wir überraschenderweise monoklonale Umlagerungen der schweren und leichten Immunglobulinkettengene nachweisen<sup>134</sup>.

Diese Ergebnisse beweisen in Übereinstimmung mit einer weiteren Studie<sup>135</sup>, daß sich eine kleiner Teil der Fälle des MH tatsächlich von T-Zellen ableiten läßt. Allerdings zeigen die meisten MH-Fälle mit einem T-Zell Phänotyp H/RS-Zellen umgelagerte Immunglobulingene, so daß die Expression von T-Zellantigenen in der Regel keinen Rückschluß auf den Genotyp der Tumorzellen zuläßt.