

Aus der Klinik für Dermatologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Komparative T-Zell-Rezeptor Genumlagerungs-  
und Expressionsanalysen in Haut- und  
Blutkompartimenten bei Patienten mit CD30<sup>+</sup>  
kutanen T-Zell-Lymphomen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von

Daniel Humme  
aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. C. Assaf

2. Prof. Dr. med. R. Stadler

3. Prof. Dr. med. E. Dippel

Datum der Promotion: 18.11.2011

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>i</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>iii</b>
<b>1. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Zusammenfassung .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Einleitung .....</b>	<b>4</b>
3.1 Definition und Epidemiologie kutaner Lymphome .....	4
3.2 Klassifikation kutaner Lymphome.....	5
3.3 Die Bedeutung des CD30-Antigens .....	7
3.4 Spektrum primär kutaner CD30 <sup>+</sup> lymphoproliferativer Erkrankungen (CLPD).....	8
3.5 Lymphomatoide Papulose (LyP) .....	9
3.6 Systemisches und primär kutanes anaplastisches großzelliges Lymphom (sALCL, cALCL).....	15
3.7 Molekulargenetische Klonalitätsdiagnostik.....	17
3.7.1 T-Zell-Rezeptor: Aufbau und Funktion .....	18
3.7.2 Genetische Rekombination der TCR-Gene.....	19
3.7.3 Klonalitätsanalyse mittels PCR .....	22
3.7.4 CDR3-Spectratyping und TcLandscape Analyse .....	23
3.8 Fragestellung und Ziele der Arbeit .....	24
<b>4. Material und Methodik.....</b>	<b>26</b>
4.1 Bezugsquellen für verwendete Geräte und Chemikalien .....	26
4.1.1 Geräte .....	26
4.1.2 Chemikalien.....	26
4.2 Patienten und Proben.....	27
4.2.1 Patientenkollektiv, Klinik, Histologie und Immunhistologie .....	27
4.3 Kontrollproben .....	30
4.4 Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut (Ficollgradient).....	30
4.5 DNA-Extraktion aus PBMC .....	30
4.6 DNA-Extraktion aus Paraffinblöcken .....	31
4.7 Bestimmung der DNA-Konzentration .....	31
4.8 TCR- $\gamma$ -PCR .....	32
4.8.1 Primerauswahl.....	32
4.8.2 PCR-Protokoll.....	33
4.8.3 Mögliche Amplifikatgrößen .....	35
4.9 Agarosegelelektrophorese und Fotodokumentation.....	35
4.10 Fragmentlängenanalyse der PCR-Produkte (Genescan).....	36

4.11	Etablierung einer Verdünnungsreihe zur Sensitivitätsbestimmung .....	37
4.12	CDR3-Spectratyping und TcLandscape Analyse .....	38
4.12.1	Material für die TCR-Repertoire Analyse .....	39
4.12.2	Durchführung der TCR-Repertoire Analyse (Immunoscopeverfahren) .....	39
4.12.3	3D-Darstellung der TCR-Repertoire Analyse (TcLandscape) .....	41
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
5.1	Bestimmung der Spezifität der Biomed-2 TCR- $\gamma$ -PCR.....	44
5.2	Bestimmung der Sensitivität.....	47
5.3	Klonalität in läsionaler Haut von Patienten mit CLPD .....	48
5.4	Klonalität in PBMC bei Patienten mit CLPD .....	50
5.5	Vergleich der klonalen PBMC- und Hautproben von Patienten mit CLPD .....	53
5.6	Zusammenfassende Ergebnisse und Darstellung der Klonalitäts- analyse aus der läsionalen Haut und dem peripheren Blut bei Patienten mit CLPD.....	55
5.7	Altersverteilung der Patienten mit bzw. ohne klonalen T-Zellpopulationen im peripheren Blut .....	56
5.8	TCR-Repertoireveränderungen der peripheren Blutlymphozyten bei Patienten mit CLPD .....	57
5.8.1	Ergebnisse der CDR3-Spectratyping Analyse .....	58
5.8.2	Quantitative Daten.....	58
5.8.3	Qualitative Daten.....	61
5.8.3.1	Grad der Reproduzierbarkeit.....	62
5.8.4	Anteil des Störeinflusses „percentage of perturbation“ .....	63
5.9	Ergebnisse der TCR-Repertoire Analyse .....	64
5.10	Vergleich der TCR- $\gamma$ -Genumlagerung mit der CDR3-Analyse der V $\beta$ -Kettentranskripte .....	67
<b>6.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>69</b>
6.1	Methodik .....	70
6.1.1	Auswahl des Primersystems .....	71
6.1.2	Auftrennung der PCR Amplifikate mittels Genescan.....	72
6.2	Detektionsrate klonaler T-Zellpopulationen in der Haut von Patienten mit LyP .....	73
6.3	Detektionsrate klonaler T-Zellpopulationen in der Haut von Patienten mit cALCL und sALCL.....	75
6.4	Klonale T-Zellpopulationen in PBMC von Patienten mit LyP .....	76
6.5	Klonale T-Zellpopulationen in PBMC von Patienten mit cALCL und sALCL.....	77
6.6	Pseudoklonalität .....	78
6.7	Persistenz der klonalen T-Zellpopulation im peripheren Blut.....	79

6.8	T-Zell-Klonalität im peripheren Blut bei MF, Autoimmun- erkrankungen und anderen Malignomen.....	80
6.9	TCR-Repertoire Analyse .....	80
6.10	Altersverteilung bei Patienten mit nicht tumorassozierten klonalen T-Zellproliferationen im peripheren Blut.....	82
6.11	Bedeutung der nicht tumoridentischen klonalen T-Zellpopulationen im peripheren Blut .....	83
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>86</b>
	<b>Erklärung .....</b>	<b>94</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>95</b>
	<b>Curriculum Vitae.....</b>	<b>96</b>

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1:	Lymphomatoide Papulose.....	13
Abb. 2:	Schematische Darstellung des T-Zell-Rezeptors bestehend aus der $\alpha$ - und $\beta$ -Peptidkette.....	18
Abb. 3:	Schematische Darstellung des TCR- $\gamma$ - und TCR- $\beta$ -Genkomplexes auf Keimbahnebene und nach Rekombination. ....	21
Abb. 4:	Schematische Darstellung des TCR- $\gamma$ -Genkomplexes (a) und der daraus entwickelten Primer mit ihren Sequenzen und der Verteilung auf die zwei Tubes A und B (b). ....	33
Abb. 5:	Schematische Darstellung der Genescan Analyse anhand einer polyklonalen (a) und klonalen (b) T-Zellpopulation. ....	37
Abb. 6:	Schematische Darstellung des Immunoscopeverfahrens und der Signalprozessierung.....	40
Abb. 7:	Schematische Darstellung der Bestimmung der „percentage of perturbation“.....	42
Abb. 8:	Beispiel eines TcLandscape Histogramms. ....	43
Abb. 9:	Gelelektrophorese (a) und Genescan Profil (b) der klonalen T-Zelllinie SeAx. ....	45
Abb. 10:	Genescan Analyse einer Hautläsion eines kutanen T-Zell Lymphoms. ....	46
Abb. 11:	Gelelektrophorese (a) und Genscanprofil (b) aus PBMC eines gesunden Probanden. ....	46
Abb. 12:	Oligoklonale TCR- $\gamma$ T-Zellpopulation im peripheren Blut von Patient 11 mit LyP. ....	47
Abb. 13:	Verdünnungsreihe der klonalen T-Zelllinie MyLa in gepoolten PBMC von zehn gesunden Probanden (Genescan). ....	48
Abb. 14:	Genescan Analyse dreier unterschiedlicher Hautläsionen (a, b und c) von Pat. 9 mit Lyp. ....	49
Abb. 15:	Genescan Analyse (Tube A) dreier unterschiedlicher Blutproben (a, b und c) von Pat. 9 mit Lyp. ....	51
Abb. 16:	Genescan Analyse (Tube A) des peripheren Blutes von Pat. 3 mit LyP. ....	52
Abb. 17:	Genescan Analyse (Tube A) des peripheren Blutes von Pat. 29 mit sALCL. ....	53
Abb. 18:	Vergleich der klonalen T-Zellpopulationen aus läSIONALER Haut und dem peripheren Blut von Pat. 9 mit LyP (Tube A). ....	54
Abb. 19:	Klonalitätsvergleich aus der läSIONALen Haut und dem peripheren Blut von Pat. 15 mit LyP (Tube A). ....	54
Abb. 20:	CDR3-Spectratyping Profile der 26 verschiedenen V $\beta$ -Gensegmente von Pat. 5 mit LyP. ....	61

Abb. 21:	CDR3-Spectratyping Profile der 26 verschiedenen V $\beta$ -Gensegmente von Pat. 8 mit LyP.....	62
Abb. 22:	Grad der Reproduzierbarkeit des V $\beta$ 23-Segments bei Patient 24 mit cALCL.....	63
Abb. 23:	TcLandscape Analyse aus PBMC.....	66
Abb. 24:	Korrelation der Immunoscope Analyse mit der TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen.....	68

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	WHO-Klassifikation kutaner Lymphome.....	6
Tabelle 2:	Histologische Sub-Klassifikation der LyP.....	12
Tabelle 3:	Anzahl der untersuchten Blut- und Hautproben der 31 Patienten mit CLPD. ....	28
Tabelle 4:	Klinischer Verlauf der 31 Patienten mit CD30 <sup>+</sup> Lymphoproliferationen. ....	29
Tabelle 5:	Biomed-2 TCR- $\gamma$ -PCR Protokoll für Tube A.....	34
Tabelle 6:	Biomed-2 TCR- $\gamma$ -PCR Protokoll für Tube B.....	34
Tabelle 7:	Mögliche Fragmentlängen der TCR- $\gamma$ -PCR Amplifikate.....	35
Tabelle 8:	Vergleich der Proben mit Klonalität in der Haut und im peripheren Blut in Bezug auf die Entitäten LyP, cALCL und sALCL .....	55
Tabelle 10:	Patienten- und Probenübersicht.....	56
Tabelle 12:	Altersverteilung der Patienten mit CLPD in Bezug auf die Klonalitätsdetektion in PBMC.....	57
Tabelle 13:	Anzahl der V $\beta$ -familienspezifischen Amplifikate in cDNA Kopien. ....	59
Tabelle 15:	V $\beta$ -familienspezifische quantitative Ratios in V $\beta$ / HPRT.....	60
Tabelle 16:	Percentage of perturbation aller V $\beta$ -Familien.....	63

## 1. Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
ALCL	Anaplastisches großzelliges Lymphom
ALK	Anaplastische Lymphom Kinase
bp	Basenpaare
C-Segment	Constant-Segment des T-Zell-Rezeptors
cALCL	Primär kutanes anaplastisches großzelliges Lymphom
CBCL	Kutanes B-Zell-Lymphom
CD	Cluster of differentiation
CD30L	CD30-Ligand
CDR3	Complementary Determining Region 3
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CLPD	Kutane CD30 <sup>+</sup> lymphoproliferative Erkrankungen
CTCL	Kutanes T-Zell-Lymphom
D-Segment	Diversity-Segment des T-Zell-Rezeptors
cDNA	Copy-desoxyribonucleid acid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleid acid
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FAM	6-Carboxyfluorescein
FFA	Fluorescent Fragment Analysis
H.E.	Hematoxylin-Eosin
HD	Hodgkin Lymphom
HPRT	Hypoxanthinephosphoribosyltransferase
HTLV	Humanes T-Lymphozyten Virus
J-Segment	Joining-Segment des T-Zell-Rezeptors
JÜR	Jahres-Überlebensrate
LyP	Lymphomatoide Papulose
MF	Mycosis fungoides
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	Messenger ribonucleic acid

NFκB	Nuclear transcription factor-κB
NIK	Nuclear transcription factor-κB inducing kinase
IKK	Kinasen Komplex
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NPM	Nucleophosmin
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerasekettenreaktion
POP 6	Performance optimized Polymer 6
PUVA	Psoralen plus UVA
sALCL	Systemisches anaplastisches großzelliges Lymphom
SS	Sézary Syndrom
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TCR-α	T-Zell-Rezeptor α-Kette
TCR-β	T-Zell-Rezeptor β-Kette
TCR-γ	T-Zell-Rezeptor γ-Kette
TCR-δ	T-Zell-Rezeptor δ-Kette
TGGE	Temperaturgradientengelelektrophorese
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TRAF-1	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor assoziierter Faktor 1
TREC	T-cell receptor excision circle
V-Segment	Variable-Segment des T-Zell-Rezeptors
WHO	World Health Organisation

## 2. Zusammenfassung

Die Lymphomatoide Papulose (LyP) und das primär kutane anaplastische großzellige Lymphom (cALCL) gehören zum Spektrum der CD30<sup>+</sup> lymphoproliferativen Erkrankungen (CLPD). Klinisch sind beide Entitäten, insbesondere die LyP, durch das ungewöhnliche Phänomen der spontanen klinischen Remissionen einzelner Hautläsionen gekennzeichnet. Besonders die LyP nimmt dabei oft einen chronisch rezidivierenden Verlauf über Jahrzehnte. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass dieser Gruppe der kutanen Lymphome eine klonale T-Zellpopulation zugrunde liegt. Auch nach mehreren Jahren der klinischen Remission konnte der zuvor bereits nachgewiesene T-Zell-Klon in neu auftretenden Hautveränderungen erneut detektiert werden. Bisher ist jedoch unklar, in welchem Kompartiment die klonalen T-Zellen persistieren. Eine mögliche Hypothese ist, dass die malignen Zellen im peripheren Blut zirkulieren und sich von dort immer wieder neu in der Haut manifestieren.

Um der Frage nachzugehen, ob die krankheitsverursachenden Zellen im peripheren Blut persistieren und von dort immer wieder in die Haut streuen, wurde eine systematische Analyse von insgesamt 126 Proben aus läsionaler Haut und korrespondierenden Blutproben von 31 Patienten durchgeführt. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Entität der LyP gelegt.

Neben einer hohen Detektionsrate klonaler TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen in der läsionalen Haut (84 %) zeigten die Daten einen unterschiedlichen T-Zell-Klon im peripheren Blut von 35 % und 86 % der Patienten mit LyP und ALCL. Bei keinem der 31 Patienten konnte der identische T-Zell-Klon in beiden Kompartimenten nachgewiesen werden. Die Immunoscope/TcLandscape Analyse zeigte weiterhin, dass die klonalen Expansionen im peripheren Blut mit einer Verschiebung der CDR3-Längenverteilung assoziiert sind. Die Abweichungen des TCR-Repertoires traten ferner früher und häufiger in Erscheinung als man es bei gesunden Individuen erwarten würde. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die unerwartet hohe Detektionsrate einer klonalen T-Zellpopulation im peripheren Blut von Patienten mit LyP evt. in Zusammenhang mit einer tumorantigenspezifischen T-Zellproliferation steht. Die genaue Bedeutung dieser nicht tumoridentischen klonalen T-Zellen bleibt jedoch zunächst ungeklärt.

### **3. Einleitung**

#### **3.1 *Definition und Epidemiologie kutaner Lymphome***

Lymphome werden in zwei Hauptgruppen untergliedert. Die Hodgkin Lymphome (HL), gekennzeichnet durch ihr histologisches Merkmal der Hodgkin und Reed-Sternberg-Zelle, sowie den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). Als Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) werden alle malignen Lymphome zusammengefasst, die nicht die Diagnosekriterien des Hodgkin Lymphoms erfüllen.

Auch die kutanen Lymphome zählen zu der Gruppe der NHL. Die kutanen Lymphome sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die durch klonale Akkumulation von neoplastischen B- oder T-Lymphozyten in der Haut entstehen. Dabei unterscheidet man zwischen primären und sekundären kutanen Lymphomen. Die primären kutanen Lymphome manifestieren sich zuerst in der Haut und bleiben in der Regel über längere Zeit ohne zusätzliche extrakutane Krankheitsmanifestation auf das Hautorgan beschränkt. Definitionsgemäß liegen bei Erstdiagnose keine extrakutanen Manifestationen vor. Die sekundären kutanen Lymphome stellen kutane Manifestationen von primär systemischen, nodalen oder extranodalen Lymphomen dar, wie z. B. die Hautmanifestationen bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) (Willemze et al. 2005).

Die verschiedenen Entitäten zeigen dabei erhebliche Variationen bezüglich ihrer Klinik, Histologie, Immunophenotyp und Prognose. Nach den primären gastrointestinalen Lymphomen stellen die primär kutanen Lymphome – mit einer jährlich geschätzten Inzidenz von 0.5 bis 1/100.000 – die zweithäufigste Gruppe der extranodalen Non-Hodgkin-Lymphome dar (Groves et al. 2000). Ferner konnte für die CTCL in den vergangenen Jahrzehnten eine kontinuierlich steigende Inzidenz beobachtet werden (Crisclone und Weinstock 2007). Ca. 80 % der kutanen Lymphome werden den T-Zell-Lymphomen (CTCL) und ca. 20 % den B-Zell-Lymphomen (CBCL) zugeordnet (Willemze et al. 2005).

### **3.2 Klassifikation kutaner Lymphome**

Lange Zeit wurde unter den primären und sekundären kutanen Lymphomen hinsichtlich ihrer Klassifikation kein Unterschied gemacht. Die primären kutanen Lymphome zeigen jedoch oft ein unterschiedliches klinisches Verhalten, sowie eine unterschiedliche Prognose im Vergleich zu den histologisch ähnlichen systemischen Lymphomen.

Aufgrund der unterschiedlichen klinischen Charakteristika und Verläufe sind daher auch unterschiedliche Therapieregime bezüglich der einzelnen Entitäten erforderlich. In der Vergangenheit hat es viele Versuche gegeben, die kutanen Lymphome zu klassifizieren und dabei den vielen unterschiedlichen klinischen, histopathologischen, therapeutischen und prognostischen Aspekten gerecht zu werden. Dabei koexistierten mehrere Jahre zwei unterschiedliche Klassifikationen; die der "European Organisation for Research and Treatment of Cancer" (EORTC) für die primär kutanen Lymphome sowie die World Health Organisation (WHO) Klassifikation für Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes (Willemze et al. 1997, Jaffe et al. 2001).

Jedoch wurden in beiden Klassifikationen signifikante Differenzen gegenüber bestimmten Entitäten deutlich. Erst 2005 entstand im Zusammentreffen der Repräsentanten beider Klassifikationen eine einheitliche und vervollständigte Klassifikation, die sog. WHO-EORTC-Klassifikation (Willemze et al. 2005). Hierin wurden nun erstmals auch die primär kutanen CD30<sup>+</sup> lymphoproliferativen Erkrankungen als eigenständige Entität aufgeführt. Die neue Klassifikation berücksichtigte neben den phänotypischen und genotypischen Charakteristika nun auch erstmalig das klinische Verhalten. Eine geringfügige Modifikation wurde 2008 als WHO-Klassifikation publiziert (Swerdlow et al. 2008). Eine detaillierte Auflistung der einzelnen Entitäten ist in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1: WHO-Klassifikation kutaner Lymphome**

<b>Kutane T-Zell- und NK-Zell-Lymphome</b>
Mycosis fungoides (MF)
Mycosis fungoides Varianten und Subtypen <ul style="list-style-type: none"> <li>Follikulotrope MF</li> <li>Pagetoide Retikulose</li> <li>Granulomatous slack skin</li> </ul>
Sézary Syndrom
Adulte T-Zell Leukämie/ Lymphom
<b>Primär kutane CD30+ lymphoproliferative Erkrankungen</b> <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Primär kutanes anaplastisches großzelliges Lymphom</b></li> <li><b>Lymphomatoide Papulose</b></li> </ul>
Subkutanes Pannikulitis-artiges T-Zell-Lymphom
Extranodales NK/T-Zell-Lymphom, nasaler Typ
Primär kutanes peripheres T-Zell-Lymphom, nicht spezifiziert <ul style="list-style-type: none"> <li>Primär kutanes aggressives epidermotropes CD8+ T-Zell-Lymphom (provisorisch)</li> <li>Kutanes <math>\gamma/\delta</math> T-Zell-Lymphom (provisorisch)</li> <li>Primär kutanes CD4+ klein- und mittelzellgroßes pleomorphes T-Zell-Lymphom (provisorisch)</li> </ul>
<b>Kutane B-Zell-Lymphome</b>
Primär kutanes Marginalzonen B-Zell-Lymphom
Primär kutanes Keimzentrumslymphom
Primär kutanes diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom des Unterschenkels
Primär kutanes diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom (andere Typen)
Primär kutanes intravaskuläres großzelliges B-Zell-Lymphom
<b>Hämatologische Vorläuferneoplasien</b>
CD4+ /CD56+ hämatodermische Neoplasie (früher: blastische NK-Zell-Lymphome)

### 3.3 Die Bedeutung des CD30-Antigens

Das CD30-Antigen ist ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Superfamilie. Es stellt einen Rezeptor dar, der an der Zelloberfläche exprimiert wird (CD30<sup>+</sup>), und wurde zuerst auf Hodgkin und Reed-Sternberg-Zellen mittels des monoklonalen Antikörpers Ki-1 entdeckt (Stein et al. 1982). Erstmals diente das CD30-Antigen als immunhistologischer Marker des Hodgkin Lymphoms (Stein et al. 1985). Kurze Zeit später konnte der CD30-Zellmarker auch in unterschiedlichen Non-Hodgkin-Lymphomen (z. B. auf den T-Lymphozyten der LyP, des cALCL und des sALCL nachgewiesen werden (Stein et al. 1985, Kadin et al. 1985, Piris et al. 1990).

Die biologische Bedeutung dieses Moleküls basiert auf der Interaktion mit dem CD30-Liganden (CD30L). Dieser Ligand gehört zu der TNF-Liganden Superfamilie. Die CD30/CD30L-Interaktion aktiviert eine Signalkaskade über die TNF-Rezeptor-Assoziierten-Faktoren (TRAFs), die sich an der zytoplasmatischen Seite des CD30-Rezeptors befinden. In Analogie zu anderen TNF-Rezeptoren kommt es in folgenden Schritten zur Aktivierung der nuclear-transcription-factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B)- inducing Kinase (NIK), die wiederum den Kinasekomplex IKK aktiviert. IKK phosphoryliert I $\kappa$ B, das daraufhin seinen gebundenen NF- $\kappa$ B freisetzt, der in den Zellkern an den entsprechenden Promotoren der Zielgene bindet (Kucharczak et al. 2003, Hirsch et al. 2008). Die physiologische Auswirkung der CD30-Signaltransduktion hat bisher widersprüchliche Ergebnisse erbracht, die von einer Induktion der Proliferation (Wendtner et al. 1995) bis hin zu einer Apoptoseeinleitung reichen (Gruss et al. 1994, Levi et al. 2001).

Mori et al. untersuchten erstmals die Bedeutung der CD30/CD30L-Interaktion in primär kutanen CD30<sup>+</sup> T-Zell-Lymphomen. Sie analysierten die immunphänotypische sowie genotypische Expression dieser Moleküle im Vergleich von wachsenden und spontan abheilenden Hautläsionen. Dabei konnte eine Überexpression des CD30L in den abheilenden Hautläsionen der CD30<sup>+</sup> Lymphoproliferationen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse deuteten somit zunächst darauf hin, dass der Aktivierung des CD30-Rezeptors eine entscheidende Rolle bei der Spontanheilung der Hautläsionen zukommen könnte (Mori et al 1999).

Im darauffolgenden Jahr wurde die CD30-Aktivierung mit dem agonistisch wirkenden Antikörper HeFi1 an drei verschiedenen Zellreihen von kutanen CD30<sup>+</sup> Lymphomen

untersucht (Mac1, Mac2 und JK) (Levi et al. 2000). Die Zellreihen wurden aus Hautläsionen von zwei Patienten gewonnen, die zunächst an LyP erkrankt waren und später eine Progression in ein cALCL entwickelten (Kadin et al, 1994, Schiemann et al. 1999).

Im Gegensatz zu der Studie von Mori et al. zeigte die CD30-Stimulation in Mac-1 und in Mac-2 eine Wachstumszunahme. Diese widersprüchlichen Ergebnisse trugen schließlich zu der Hypothese bei, dass die Resistenz der Zellen – auf die ursprüngliche Wirkung der CD30 abhängigen Wachstumsinhibition – als ein möglicher Mechanismus der Tumorprogression gesehen werden kann (Levi et al. 2000).

### **3.4 Spektrum primär kutaner CD30<sup>+</sup> lymphoproliferativer Erkrankungen (CLPD)**

Die Bezeichnung „primär kutane CD30<sup>+</sup> lymphoproliferative Erkrankungen“ entstammt einer Gruppe von sehr eng verwandten Krankheitsbildern, die phänotypisch das CD30 Molekül exprimieren. Nach der Mycosis Fungoides (MF) und dem Sézary Syndrom (SS) stellen die CD30<sup>+</sup> kutanen Lymphoproliferationen mit ungefähr 30 % aller primär kutanen Lymphome die zweithäufigste Gruppe unter den CTCL dar (Willemze et al., 1997, Willemze und Meijer, 2003). Hierzu zählt die LyP (12 %), das cALCL (8 %), sowie die Borderlinefälle (20 %) (Willemze und Beljaards 1993, Slater 2005). Zu den Borderlinefällen werden dabei Krankheitsbilder gezählt, die in ihren klinischen und histologischen Merkmalen sowohl Charakteristika der LyP als auch des cALCL aufzeigen und somit nicht eindeutig diesen Entitäten zugeordnet werden können.

Das besondere und kennzeichnende klinische Charakteristikum der LyP liegt in den spontanen klinischen Remissionen der Hautläsionen, die definitionsgemäß bei allen Patienten mit LyP auftreten (Bekkenk et al. 2000). Aber auch bei ca. 20-25 % der Patienten mit cALCL können spontane Abheilungen der Hautläsionen beobachtet werden (Bekkenk et al. 2000, Willemze und Meijer 2003).

Um eine definitive Diagnose stellen zu können, bedarf es daher immer der gemeinsamen Evaluation von Histologie und klinischen Merkmalen (Willemze et al. 1997). Die überlappenden klinischen, histologischen sowie immunophänotypischen Merkmale, sowie die Koexistenz beider Entitäten in einem Patienten haben schließlich dazu geführt, die Gruppe der CD30<sup>+</sup> lymphoproliferativen Erkrankungen eher als ein

breites Spektrum einer einzigen Erkrankung zu betrachten (Willemze und Beljaards 1993, Willemze und Meijer 2003). Dieses wird durch die LyP und das cALCL gebildet, die als Endpunkte des Spektrums die Borderlinefälle umsäumen. Eine eindeutige Entitätszuweisung ist jedoch für die adäquate Therapie und somit für die Prognose von essenzieller Bedeutung.

Erst durch den kürzlich entwickelten monoklonalen Antikörper gegen den Tumornekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR) assoziierten Faktor-1 (TRAF-1) konnte anhand der Färbungen histologischer Schnitte eine signifikante Unterscheidung zwischen LyP und ALCL gezeigt werden (Assaf et al. 2007). Bei dem TRAF-1 handelt es sich um ein Molekül, das bei der Signaltransduktion des CD30-Rezeptors auf dem Weg von der Zelloberfläche zum Zellkern eingeordnet ist (siehe unten). Die hohe TRAF-1 Expression in den CD30<sup>+</sup> Zellen der LyP steht dabei der niedrigen oder fehlenden Expression sowohl des cALCL als auch des sALCL gegenüber. Die Bestimmung der TRAF-1 Expression kann somit für die korrekte Diagnose von hoher Relevanz sein und die Auswahl der richtigen Therapie beeinflussen.

### **3.5 Lymphomatoide Papulose (LyP)**

#### Geschichte:

Die Erstbeschreibung der LyP erfolgte 1968 durch Warren Macaulay (1915-2006) (Macaulay 1968). Im Frühjahr 1964 sah Macaulay eine 38-jährige Patientin in seiner Praxis, bei der sich ein damals unbekanntes dermatologisches Krankheitsbild zeigte. Es bestand aus Papeln und Knoten, die zu spontaner Regression neigten und gleichzeitig an anderen Körperstellen erneut auftraten. Im Gegensatz zu dem klinisch gutartigen Erscheinungsbild zeigten sich mikroskopisch große atypische Zellen mit einer anaplastischen Morphologie, wie sie ursprünglich nur in hochgradig bösartigen Lymphomen beobachtet wurden. Um die Diskrepanz zwischen dem klinisch benignen und dem histologisch eher malignen Phänotyp hervorzuheben, benannte Macaulay 1968 diese neue Entität als „Lymphomatoide Papulose“ (Macaulay 1968, Burgdorf und Kempf 2006). Schließlich folgen bis heute zahlreiche Studien und immunhistologische Charakterisierungen, die die CD30<sup>+</sup> Zellen zeigten und zu einem besseren Verständnis des Krankheitsbildes LyP beigetragen haben (siehe unten).

Epidemiologie und Klinik:

Heute gehört die LyP der Gruppe der primär kutanen CD30<sup>+</sup> lymphoproliferativen T-Zell Erkrankungen an. Es handelt sich um eine eher seltene Hauterkrankung mit einer Inzidenz von 1,2 – 1,9 Fällen/ 1.000.000 (Bekkenk et al. 2000, Assaf et al. 2006).

Klinisch ist die LyP durch ihre nebeneinander bestehenden erythematösen, zum Teil zentral nekrotischen Papeln charakterisiert (Abb. 1A). Meist sind die Extremitäten oder der Stamm betroffen (Tomaszewski et al. 1995). Nur selten besteht Juckreiz. Bemerkenswerterweise zeigen diese Hautveränderungen das für diese Entität typische Phänomen der spontanen Selbstheilung auf (innerhalb 3 bis 8 Wochen). Jedoch können die Hautläsionen, auch nach Jahren der klinischen Remission, an anatomisch identischen oder separaten Körperstellen erneut auftreten. Somit nimmt die LyP nicht selten einen chronisch- rezidivierenden Verlauf über Jahrzehnte. Die LyP tritt in den meisten Fällen im Erwachsenenalter auf, mit einem Altersmedian von 45 Jahren. Aber auch Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen sind beschrieben (Nijesten et al. 2004, Bekkenk et al. 2000). Die Fünfjahres-Überlebensrate (5 JÜR) von 95-100 % ist trotz der nosologischen Zuordnung als malignes Lymphom typisch für die LyP (Willemze et al. 1997, Bekkenk et al. 2000, Rosen und Querfeld 2006). Die Verteilung von Männern zu Frauen ist in der Literatur mit einem Verhältnis von 1,5:1 aufgeführt (Willemze et al. 2005, Burg et al. 2005).

Trotz der Fünfjahres-Überlebensrate von 95-100 % (Willemze et al. 1997, Willemze und Meijer 2003, Bekkenk et al. 2000) stellt die LyP eine ernsthafte Erkrankung für die Betroffenen dar, da in 10-20 % der Fälle die LyP mit dem Auftreten weiterer maligner kutaner oder nodaler Lymphome assoziiert ist, welche eine schlechtere Prognose aufzeigen (El-Azhary et al. 1994, Steinhoff 2004). Eine Metaanalyse der LyP Fälle deutete weiterhin an, dass das Risiko der Progression mit der Länge des klinischen Verlaufes steigt (Gruber et al. 2006). In der Literatur ist die Assoziation mit ALCL, MF und Morbus Hodgkin beschrieben. Dabei kann LyP diesen Entitäten vorausgehen, nachfolgen oder mit ihnen koexistieren (Kaudewitz et al. 1990, Kaudewitz et al. 1991, Beljaards et al. 1992, McCarty et al. 1994). Diese Tatsache gab bereits früh einen ersten Hinweis darauf, dass es sich bei der LyP um ein malignes Lymphom handeln könnte.

Ätiologie:

Die Ätiologie, die zur Entstehung der LyP führt, ist derzeit noch ungeklärt. Bisher konnte kein Agens identifiziert werden, das zum Ausbruch der Erkrankung beiträgt. Aufgrund der Erkenntnis, dass Viren bestimmte Lymphome induzieren können – wie z. B. das Epstein Bar Virus (EBV) das Burkittlymphom – hat man auch bei der LyP eine virale Genese vermutet. Jedoch konnten Studien im Hinblick auf diverse Viren (Humanes T-Lymphozyten Virus (HTLV), EBV, Herpesviren) diese Hypothese nicht bestätigen bzw. das virale Agens nicht identifizieren (Sangüeza et al. 1996, Wood et al. 1997, Kempf et al. 2001). In zwei Fällen konnte die identische T-Zell-Rezeptor (TCR) Genumlagerung bereits Jahre vor den ersten Hautveränderungen in Zellen des Knochenmarks nachgewiesen werden. Diese Beobachtung ließ vermuten, dass die initiale maligne Transformation möglicherweise in den Stammzellen des Knochenmarks – und nicht in der Haut – auftritt (Gniadecki et al 2003).

Histologie/ Immunhistologie:

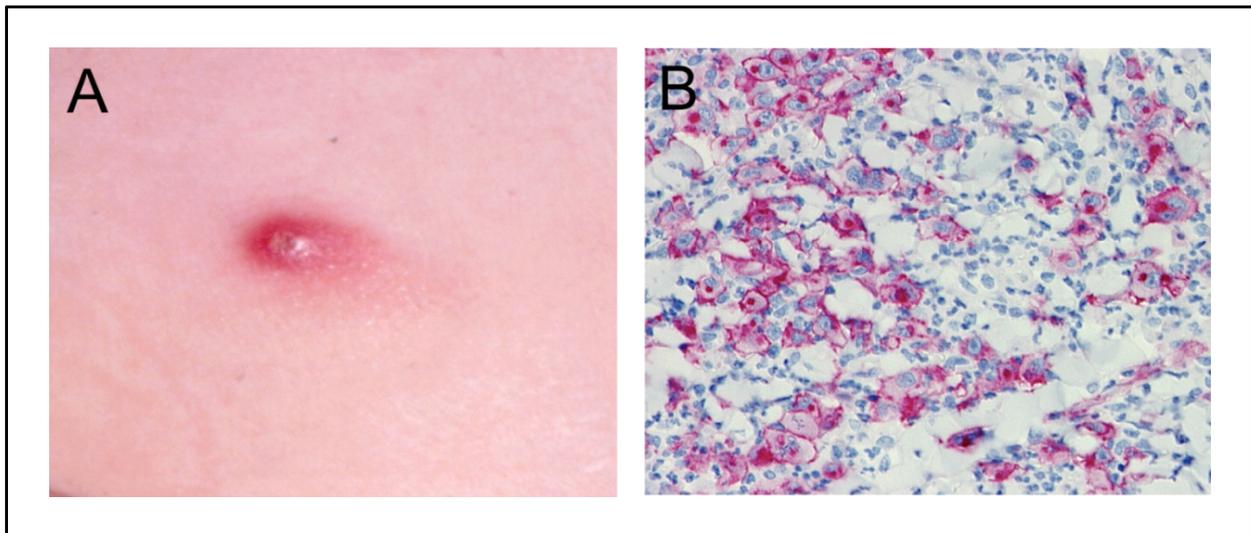
Das histologische Bild der LyP ist weiterhin durch eine große Variabilität geprägt, so dass man heute, in Abhängigkeit von der Anzahl der CD30<sup>+</sup> Zellen, drei histologische Subtypen unterscheidet: LyP Typ A, B und C (Willemze et al. 1982, Willemze und Beljaards 1993, El Shabrawi-Caelen et al. 2004). Eine detaillierte Aufführung der unterschiedlichen histologischen Subtypen wird in Tabelle 2 gezeigt.

Durch die genaue Immunophänotypisierung ist heute weiterhin bekannt, dass die Tumorzellen der LyP Marker von reifen T-Lymphozyten exprimieren. Die atypischen Zellen der histologischen Typen A und C zeigen dabei denselben Phänotyp wie die großen Tumorzellen des cALCL. Sie sind CD2<sup>+/-</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+/-</sup>, CD8<sup>-</sup> und CD30<sup>+</sup>. CD15, ein typischer Marker für Reed-Sternberg-Zellen des Morbus Hodgkin, wird nicht von den neoplastischen Zellen der LyP exprimiert. Die atypischen cerebriformen Zellen des histologischen Typ B sind hingegen negativ für das CD30-Antigen (Willemze et al. 1997, Willemze et al. 2005).

**Tabelle 2: Histologische Sub-Klassifikation der LyP**

<b>Typ A</b>	Stark entzündliches, mischzelliges Infiltrat aus großen atypischen Lymphozyten, kleinen Lymphozyten, Neutrophilen, Eosionophilen und Histozyten. Die großen atypischen Zellen ähneln Reed-Sternberg-Zellen, die an Morbus Hodgkin denken lassen. Sie stellen Nester aus CD30 <sup>+</sup> T-Lymphozyten dar, die sich jedoch nicht in Strängen anordnen und nicht mehr als 50 % des Infiltrates ausmachen (Abb. 1B).
<b>Typ B</b>	Das monomorphe Infiltrat ist durch kleine bis mittelgroße Lymphozyten mit cerebriformen Kernen gekennzeichnet. Die Expression des CD30-Markers fehlt. Des Weiteren wird die LyP Typ B meist von Epidermotropismus begleitet. Sie zeigt sehr große Ähnlichkeit mit der Plaqueläsion der MF und wird daher in der Literatur gelegentlich auch als „MF-like type of LyP“ bezeichnet.
<b>Typ C</b>	Die histologischen Merkmale ähneln denen von Typ A. Die großen Kluster der CD30 <sup>+</sup> großen T-Zellen sind umgeben von relativ wenigen inflammatorischen Zellen und zeigen oft große Ähnlichkeit mit dem Befund des großzelligen CD30 <sup>+</sup> T-Zell-Lymphoms (ALCL). Die CD30 <sup>+</sup> T-Lymphozyten finden sich in mehr als 50 % des Infiltrates.

Da die Histomorphologie auch mit dem Alter der Probeentnahmen korreliert, können die unterschiedlichen histologischen Typen auch gleichzeitig an einem Patienten in Erscheinung treten (Willemze et al. 1997, Assaf et al. 2006). Jedoch existieren auch diverse Mischformen, die sich nicht immer eindeutig einer histologischen Subklasse zuordnen lassen (Willemze et al. 1997, El Shabrawi-Caelen et al. 2004, Burg et al. 2005, Assaf et al. 2006).



**Abb. 1: Lymphomatoide Papulose.**

**A:** Erythematöse Papel mit zentraler Nekrose. **B:** Histologisches Bild der LyP Typ A mit großen atypischen CD30+ gefärbten Lymphozyten umgeben von einem mischzelligen entzündlichen Infiltrat.

*Molekulargenetik:*

Erst durch die molekulargenetischen Analysen der (TCR) Genumlagerungen im Verlauf der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass den Hautveränderungen der LyP eine klonale T-Zellpopulation zugrunde liegt (Weiss et al. 1986, Davis et al. 1992, Steinhoff et al. 2002, Gellrich et al. 2004). Dies wies darauf hin, dass es sich bei der LyP um eine neoplastische Lymphoproliferation handelt.

Ferner konnte der identische T-Zell-Klon auch in anatomisch und zeitlich unterschiedlichen Hautläsionen nachgewiesen werden (Kadin et al. 1987, Chott et al. 1996).

Sogar nach einem mehrere Jahre andauernden Intervall der klinischen Remission wurde der identische T-Zell-Klon in neu auftretenden Hautveränderungen detektiert (Chott et al. 1996).

Den Beweis, dass es sich bei der LyP definitiv um eine klonale Lymphoproliferation der CD30<sup>+</sup> Zellen handelt, erbrachten schließlich Steinhoff et al. 2002, die erstmals auf Einzelzellebene Klonalität bei neun von elf Patienten nachwies. Die Analyse der TCR-Genumlagerung einzelner mikrodissezierter CD30<sup>+</sup> und CD30<sup>-</sup> T-Lymphozyten zeigte, dass die LyP unumgänglich eine monoklonale CD30<sup>+</sup> T-Zell Erkrankung repräsentiert (Steinhoff et al. 2002). Dem gegenüber stehen jedoch die Ergebnisse von Gellrich et al., die ebenfalls bei vier Patienten auf Einzelzellebene das Vorhandensein eines T-Zell-Klons demonstrierten, jedoch hier in den CD30 negativen T-Zellen (Gellrich

et al. 2004). Die Diskrepanz der Ergebnisse kann möglicherweise auf unterschiedlichen Fällen oder Analysemethoden basieren.

Der Nachweis der Monoklonalität auf Einzelzellebene erfüllte jedoch somit ein wichtiges Malignitätskriterium und bestätigte die Eingliederung der LyP unter die niedrigmalignen kutanen T-Zell-Lymphome.

Interessanterweise wurde in vielen Fällen ein identisches klonales Rearrangement des TCR sowohl in den Hautveränderungen der LyP als auch in den assoziierten Lymphomen (MF, Hodgkin Lymphom, cALCL) nachgewiesen, was die Hypothese unterstützt, dass die unterschiedlichen Entitäten aus einem gemeinsamen klonalen Ursprung hervorgehen (Davis et al. 1992, Wood et al. 1995, Chott et al. 1996, Kadin et al. 2006).

#### Therapie:

Bis heute existiert keine kurative Therapie für die LyP. Da keine der heute zur Verfügung stehenden Therapien den Langzeitverlauf der Krankheit beeinflussen kann, sollten die kurzzeitigen Behandlungseffekte gut mit den potenziellen Therapienebenwirkungen abgewogen werden und die Therapie nach den Leitlinien der „Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie“ (ADO) erfolgen (Stadler et al. 2008). Bei Patienten mit solitären oder lokalisierten Hautläsionen wird die alleinige weitere klinische Beobachtung empfohlen. Bei multifokalen oder rezidivierenden Hauterscheinungen stellt die MTX-Therapie mit bis zu 20mg /Woche sowie eine PUVA-Bestrahlung die Therapie der ersten Wahl dar. Bei Nichtansprechen kommen des Weiteren eine Monotherapie mit Interferon  $\alpha$  (INF $\alpha$ ), die Kombinationstherapie aus INF $\alpha$  und Retinoiden und eine Behandlung mit Bexaroten in Betracht (Stadler et al. 2008, Rosen und Querfeld 2006).

Erst bei Patienten mit extrakutanem Befall der assoziierten Lymphome sollte eine Chemotherapie abgewogen werden. Nach Beendigung der Therapie kommt es jedoch meist binnen weniger Monate zu Rezidiven der LyP (Williemze und Meijer 2003).

### **3.6 Systemisches und primär kutanes anaplastisches großzelliges Lymphom (sALCL, cALCL)**

#### Geschichte:

1985 entdeckten Stein und seine Mitarbeiter eine neue Untergruppe eines Non-Hodgkin-Lymphoms, das durch große anaplastische lymphoide Zellen und der Expression des CD30-Markers charakterisiert war (Stein et al. 1985). Aufgrund dieser histomorphologischen Gegebenheiten wurde diese Entität zunächst als anaplastisches großzelliges Lymphom (ALCL) oder auch CD30<sup>+</sup> (bzw. Ki-1) großzelliges Lymphom bezeichnet (Stein et al. 1985, Stein et al. 2000). Obwohl nicht alle Fälle die anaplastische Zellmorphologie (80 %) aufzeigen, sondern auch weitere Unterformen wie z. B. kleinzellige und immunoblastische Varianten beschrieben sind, wurde die Bezeichnung ALCL von der WHO und später auch von der WHO-EORTC-Klassifikation übernommen.

Das ALCL wird klinisch in eine primäre (de novo) und eine sekundäre Entität (die sich aus anderen Lymphomen entwickelt) unterteilt. Die primären ALCL werden wiederum in das primär systemische (sALCL) und das auf das Hautorgan beschränkte primär kutane ALCL (cALCL) untergliedert.

In Bezug auf das sALCL zeigten Morris et al. 1994, dass eine Translokation t(2;5) dazu führt, dass das Nucleophosmin (NPM) Gen auf Chromosom 5q35 mit einem Gen auf Chromosom 2p23 fusioniert, welches für die Tyrosinkinase anaplastic lymphoma kinase (ALK) kodiert (Morris et al. 1994). Die Fusion der Gene bewirkt, dass das ALK Gen unter die Kontrolle des MPN-Promoters gerät, was zu einer permanenten Transkription des ALK-Gens führt (ALK<sup>+</sup>) (Morris et al. 1994). Darauf folgende klinische Studien verdeutlichten die Relevanz dieses Fusionsproteins. Es wurde gezeigt, dass die ALK<sup>+</sup> Fälle deutlich mehr von einer Chemotherapie profitieren als die ALK<sup>-</sup> (Shiota et al. 1995, Gascoyne et al. 1999, Falini et al. 1999). Insgesamt findet sich in etwa 60-85 % der sALCLs eine ALK-Überexpression mit einem relativ höheren Auftreten bei jüngeren männlichen Patienten (Falini et al 1999, Stein et al. 2000).

Für die kutane Form (cALCL) des anaplastisch großzelligen Lymphoms konnte dieser Zusammenhang jedoch nicht gezeigt werden; fast alle Fälle sind ALK<sup>-</sup> (Su et al. 1997, Beylot-Barry et al. 1998, Bekkenk 2000). Ein ALK<sup>+</sup> Hautinfiltrat ist daher auf ein sALCL hinweisend.

Epidemiologie und Klinik:

Das cALCL entsteht de novo in der Haut und befällt nur selten sekundär andere Organe. In der Regel tritt das cALCL nur im Erwachsenenalter auf und macht ca. 9 % der kutanen Lymphome aus (Willemze et al. 1997). Der Befall von Kindern ist hingegen eine Rarität (Beljaards et al. 1993). Das Verhältnis von Männern zu Frauen ist in der Literatur mit 3:2 aufgeführt (Willemze und Meijer 2003).

Klinisch tritt das cALCL durch solitäre, oft livide und ulzerierende Tumorknoten bis hin zu mehreren gruppierten Knötchen oder Papeln in Erscheinung. Im Gegensatz zur LyP treten die Hautläsionen meist solitär auf oder sind auf eine Hautregion beschränkt (Krishnan et al. 1993, Bekkenk et al. 2000, Willemze et al. 2005). Nur in sehr seltenen Fällen kann es zu einem generalisierten Hautbefall kommen. Die extrakutane Dissimination der Tumorzellen tritt bei ungefähr 10 % der Patienten auf und geht in erster Linie mit einer regionalen Lymphknotenbeteiligung einher. Diese ist aber nicht mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet (Beljaards et al. 1993, Bekkenk et al. 2000). Auch bei dieser Entität können in ca. 25 % klinische spontane Remissionen beobachtet werden (Willemze und Beljaards 1993, Stein et al. 2000, Rosen und Querfeld 2006).

Histologie/ Immunhistologie:

Histologisch besteht das cALCL aus auffälligen und großen anaplastischen, pleomorphischen oder immunoblastischen Tumorzellen. Sie sind als Stränge in einem diffusen dermalen Infiltrat eingebettet und durch ovale, runde oder irreguläre prominente Nuclei sowie ausgiebig Zytoplasma gekennzeichnet. Die Tumorzellen exprimieren per Definition in mehr als 75 % das CD30-Antigen (Willemze et al. 2005, Assaf et al. 2006). Die Detektion nur vereinzelter CD30<sup>+</sup> T-Zellen geht daher nicht mit der Diagnose cALCL konform. Des Weiteren bedarf es zur Diagnosestellung des cALCL den Ausschluss von extrakutanen Manifestationen über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten bei Erstdiagnose sowie ferner den Ausschluss von LyP, MF oder eines anderen CTCL in der Anamnese (Willemze et al. 2005).

Klinisch ist es wichtig, zwischen dem cALCL und dem sALCL, das sich zu einem späteren Zeitpunkt in der Haut manifestieren kann, zu unterscheiden. Denn trotz ihrer ähnlichen Histologie und Immunophänotypisierung haben diese Entitäten vollkommen unterschiedliche klinische und pathologische Eigenschaften und fordern unterschiedliche Therapien (De Bruin et al. 1993, Willemze et al. 1997). Im Vergleich zu

der systemischen Variante (sALCL) mit einer 5 JÜR von 24 % hat das cALCL eine ähnlich gute Prognose wie die LyP mit einer 10 JÜR von ca. 95 % (Bekkenk et al. 2000, Willemze und Meijer 2003).

Neben der Klinik, der Histologie und dem Alter kann die Immunhistochemie oft hilfreich sein, zwischen den verschiedenen Formen des ALCL zu unterscheiden. Im Gegensatz zur systemischen Form ist das cALCL in der Regel negativ für das epitheliale Membran Antigen (EMA) und für das ALK-Protein (Droc et al. 2007). Auch die Expression von CD15 fehlt in den meisten Fällen von cALCL (Medeiros und Elenitoba-Johnson 2007).

Molekulargenetische Untersuchungen der TCR-Genumlagerungen bestätigten ferner klonale TCR-Genumlagerungen in den meisten Hautläsionen des ALCL (Greisser et al. 2006).

#### Therapie:

Die Auswahl der therapeutischen Intervention sollte anhand der Größe, der Ausbreitung und Klinik sowie in Anlehnung an die Leitlinien der ADO erfolgen (Stadler et al. 2008). Bei Patienten mit solitären oder lokalisierten Hautläsionen ist die vollständige Exzision oder eine Bestrahlungstherapie die Methode der ersten Wahl. Bei Ineffektivität kommen weiterhin Therapien mit Methotrexat oder  $INF\alpha$  in Betracht. Wurde die Hautläsion bereits zu diagnostischen Zwecken exzidiert oder trat bereits eine spontane Remission ein, ist keine weitere Therapie erforderlich. Multifokale Läsionen ohne spontane Regression sollten mit Methotrexat als Methode der ersten Wahl therapiert werden. Als Methode der zweiten Wahl kann eine Radiatio oder eine Therapie mit  $INF\alpha$  in Betracht gezogen werden (Stadler et al. 2008).

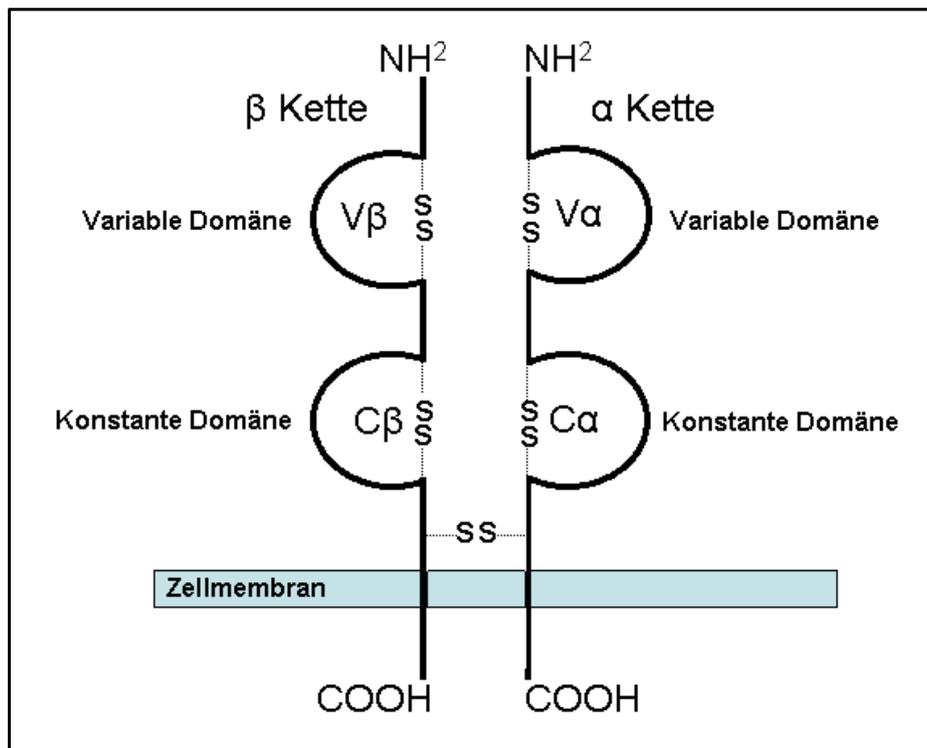
### **3.7 Molekulargenetische Klonalitätsdiagnostik**

Jeder T-Lymphozyt durchläuft während seiner Reifeentwicklung im Thymus eine einzigartige Rekombination seiner Gene. Da die primär kutanen T-Zell-Lymphome klonale Expansionen von T-Zellen darstellen, zeigen somit alle T-Lymphozyten der Neoplasie identisch umgelagerte Gene auf. Die Analyse der Genumlagerungen findet daher als Klonalitätsmarker Anwendung. Der Nachweis identischer Genumlagerungen in mehreren T-Lymphozyten fungiert somit als Hinweis auf eine maligne Proliferation und trägt somit wesentlich zur Diagnose der T-Zell-Lymphome bei. Aufgrund der hohen

rekombinatorischen Vielfalt wird bei T-Zell-Lymphoproliferation die Analyse der für den TCR-kodierenden Gene genutzt.

### 3.7.1 T-Zell-Rezeptor: Aufbau und Funktion

T-Lymphozyten verfügen über einen in der Plasmamembran lokalisierten Glykoproteinkomplex, der als TCR bezeichnet wird. Er besteht aus zwei Peptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, und bildet somit ein heterodimeres Transmembranprotein. Insgesamt existieren vier verschiedene Peptidketten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ ), die entweder als TCR- $\alpha$ - und TCR- $\beta$ -Kette oder als TCR- $\gamma$ - und TCR- $\delta$ -Kette kombiniert werden (Abb. 2). In der Mehrheit (85 %) besitzen die T-Lymphozyten eine  $\alpha/\beta$ -Konfiguration.



**Abb. 2: Schematische Darstellung des T-Zell-Rezeptors bestehend aus der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptidkette.**  
SS: Disulfidbrücke.

Der TCR besitzt die Fähigkeit, Antigene mit Hilfe des Histokompatibilitätsmoleküls (MHC) zu erkennen und zu binden und trägt somit entscheidend zur Immunantwort bei (Davis und Bjorkman 1988). Über den benachbarten CD3-Komplex werden die Signale durch eine Signalkaskade schließlich an das Zellinnere weitergeleitet. Der aktivierte TCR löst somit eine komplexe intrazelluläre Signaltransduktion aus, die schließlich zur

Änderung der Transkription verschiedener Gene sowie zur Produktion verschiedener Zytokine, wie z. B. dem Interleukin 2, führt.

Im Zusammenhang mit den MHC-Molekülen lassen sich zwei T-Zell Subpopulationen unterteilen: die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. T-Zellen, die den CD8-Rezeptor (CD8<sup>+</sup>) tragen, treten mit ihrem TCR mit den Zellen in Wechselwirkung, die die Antigenpeptide mit Hilfe der MHC-I Proteine präsentieren. Es handelt sich dabei in der Regel um alle körpereigenen Zellen, die von sich selbst synthetisierte, aber als „nicht selbst“ erkannte Peptide präsentieren, wie dies z. B. bei virusinfizierten oder transformierten Zellen der Fall ist. Die CD8<sup>+</sup> Zellen werden auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet.

T-Lymphozyten, die den Corezeptor 4 (CD4<sup>+</sup>) tragen, treten hingegen mit den Antigenpräsentierenden Zellen in Kontakt, die MHC-II Proteine an ihrer Zelloberfläche exprimieren (Dendritische Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten). Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen bezeichnet man auch als T-Helferzellen.

### **3.7.2 Genetische Rekombination der TCR-Gene**

Zur Erkennung der zahlreichen Antigene von z. B. viralen, bakteriellen oder mykotischen Erregern mit denen das Immunsystem im Laufe des Lebens in Kontakt tritt bedarf es einer mindestens ebenso großen Vielfalt der Antigenrezeptoren der T-Zellen. Zur Entstehung der sehr großen Vielfalt ( $>10^{12}$ ) der TCR trägt die somatische Rekombination einzelner Genelemente (Genrearrangement) während der frühen lymphatischen Reifung bei.

Die einzelnen Peptidketten des TCR sind, wie in Abbildung 2 dargestellt, aus einer variablen und einer konstanten Region aufgebaut. Die einzelnen TCR-Genloci, die die Peptidketten kodieren, sind wiederum aus verschiedenen variablen (V), joining (J), und konstanten (C) Gensegmenten zusammengesetzt. Die  $\beta$  und  $\delta$  Ketten besitzen als Besonderheit zusätzliche diversity (D) Gensegmente.

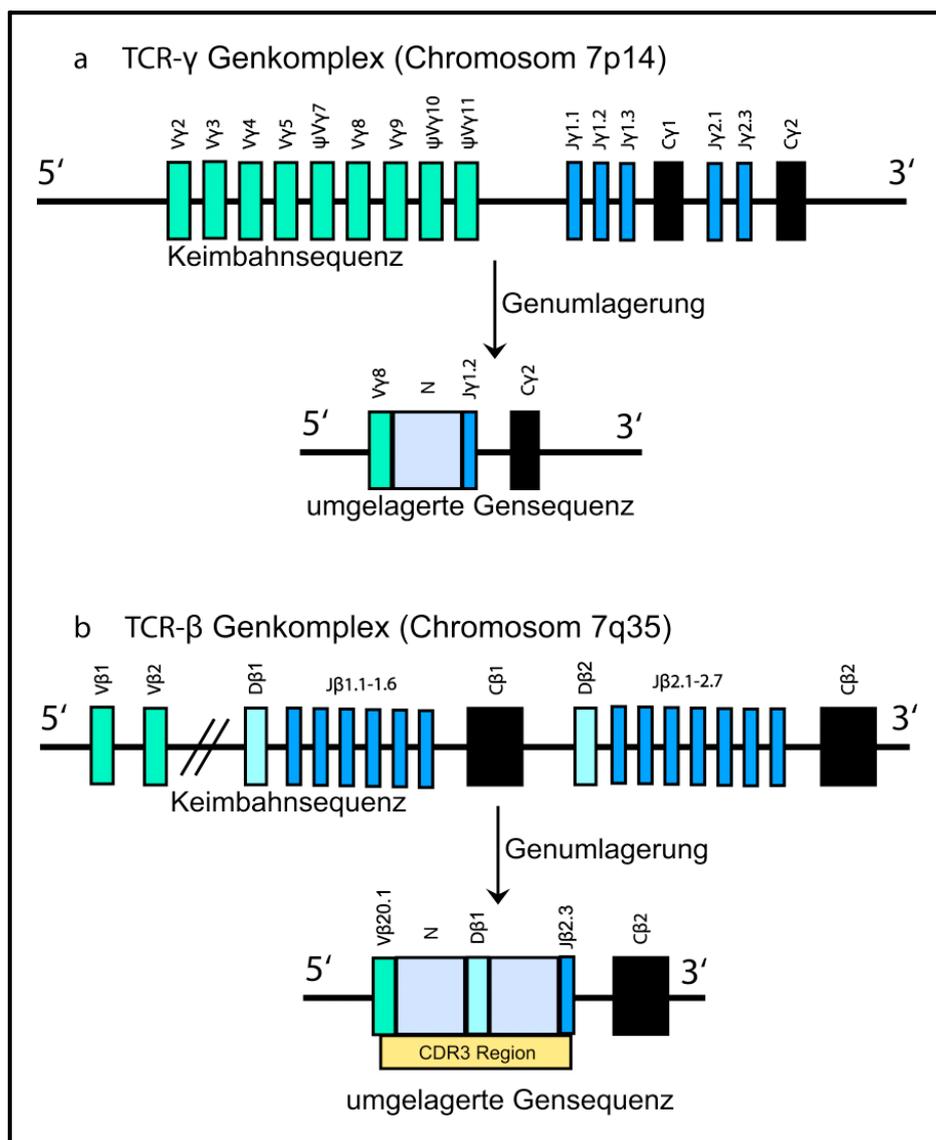
Alle Zellen enthalten in der Keimbahnkonfiguration den genetischen Code für alle vier TCR-Ketten. Während der T-Zell Reifung werden aus den vielen verschiedenen Segmenten durch Genumlagerungen, die nach dem Zufallsprinzip stattfinden, jeweils ein V-, J- und ein C- (bzw. ein weiteres D-Segment in der  $\beta$ - und  $\delta$ -Kette) Gensegment,

unter Bildung eines funktionellen Gens, miteinander kombiniert (Davis und Bjorkman 1988).

Die V-D-J-Genumlagerungen werden durch einen Rekombinase-Enzym-Komplex durchgeführt, in welchem den Rekombinasen RAG1 und RAG2 bei der Erkennung und Abtrennung der DNA Segmente eine Schlüsselfunktion zukommt. Das Genrearrangement beginnt in der Regel mit einer D-J-Umlagerung, gefolgt von der Anlagerung des V- an das D-J-Gensegment im Falle des TCR- $\beta$ - und TCR- $\delta$ -Gens. Für den TCR- $\alpha$  und TCR- $\gamma$  findet die direkte Rekombination eines V- und J-Gensegmentes statt. Die Sequenzen zwischen den umgelagerten Genen werden in Form von sog. TCR excision circles (TREC) eliminiert. Die TCR-Genumlagerungen folgen in der Regel einem hierarchischen Ablauf, bei dem zuerst das TCR- $\delta$ -Gen und dann das TCR- $\gamma$ -Gen umgelagert wird. Daraus entstehen T-Zellen mit einer TCR- $\gamma$ - $\delta$ -Konfiguration, oder es folgt eine weitere TCR- $\beta$ -Genumlagerung mit TCR- $\delta$ -Deletion und anschließender TCR- $\alpha$ -Umlagerungen, woraus die TCR- $\alpha$ / $\beta$ -Konfiguration resultiert. Die Genumlagerungen erfolgen bereits in einem sehr frühen Differenzierungsstadium im Thymus (Takagaki et al. 1989).

Der rekombinierte TCR erhält somit durch die „rekombinatorische Diversität“ der verschiedenen V-, D- und J-Gensegmente eine hohe Variabilität bezüglich seiner Nukleotidsequenz. Diese Variabilität wird zusätzlich durch die zufällige Deletion oder Insertion von Basen in den V-J-, V-D- oder D-J-Verbindungszone (N-Region) unterstützt, was auch als „junktionale Diversität“ bezeichnet wird (Abb. 3).

Die vielen verschiedenen Kombinationen der V-, D- und J-Gensegmente repräsentieren das sog. kombinatorische „T-Zell-Repertoire“. Rechnerisch ergeben sich durch die Kombination der verschiedenen Gensegmente für den  $\alpha$ / $\beta$  TCR über  $3 \times 10^6$  bzw. für den  $\gamma$ / $\delta$  TCR über  $5 \times 10^3$  Kombinationsmöglichkeiten. Aufgrund der junktionalen Diversität ist die Variabilität jedoch weitaus größer und liegt geschätzt bei über  $10^{12}$  verschiedenen Genkonfigurationen (Takagaki et al. 1989, van Dongen et al. 2003).



**Abb. 3: Schematische Darstellung des TCR- $\gamma$ - und TCR- $\beta$ -Genkomplexes auf Keimbahnebene und nach Rekombination.**

a. Dargestellt sind die 14 verschiedenen V $\gamma$ -, fünf J $\gamma$ - und zwei C $\gamma$ -Segmente. Durch die Genumlagerung wird jeweils ein V-, J- und C-Gensegment willkürlich rekombiniert. Des Weiteren ist die Insertion einer N-Region (weiß) abgebildet. b. Dargestellt sind zwei der 24 verschiedenen V $\beta$ -, zwei D $\beta$ - und 13 J $\beta$ -Segmente. Durch die Genumlagerung wird ein V-, D-, J- und C-Gensegment miteinander rekombiniert. Zusätzlich ist die Insertion von zwei N-Region (N) dargestellt (weiß). In gelb ist die Sequenz der hypervariablen Complementary Determining Region 3 (CDR3) hervorgehoben, die maßgeblich für die Antigenerkennung verantwortlich ist.

Zusammenfassend trägt jeder T-Lymphozyt ein einmaliges DNA-Muster für den TCR. Die große Hypervariabilität der Genkonfiguration (V-N-D-N-J) stellt somit einen molekularbiologischen „Fingerabdruck“ für jede einzelne T-Zelle dar. Entsprechend der Annahme, dass sich Neoplasien aus der Duplikation einer einzigen entarteten Zelle entwickeln, findet man bei T-Zell-Lymphomen unter den T-Lymphozyten identische (monoklonale) Genumlagerungen. Im Gegensatz dazu finden sich bei reaktiven Prozessen T-Zellen mit den unterschiedlichsten Genrearrangements (polyklonal). Durch

diese Erkenntnis eignet sich die Analyse der hypervariablen Region der T-Zell-Rezeptoren als T-Zell-Tumormarker.

Für eine lange Zeit war die Southern Blot Analyse der Goldstandard der Klonalitätsuntersuchungen. Trotz der hohen Zuverlässigkeit dieser Methode wurde das Verfahren aufgrund der geringeren Sensitivität (5-10 %), des hohen Zeitaufwandes (ca. 5 Tage) und der Erfordernis großer Mengen hochwertiger DNA (10-15 µg) in den vergangenen Jahren durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR) abgelöst.

### **3.7.3 Klonalitätsanalyse mittels PCR**

Die Nachteile, die mit dem Southernblotting verbunden sind, führten schließlich zur Entwicklung weiterer diagnostischer Hilfsmittel. Einen Durchbruch für die Genforschung stellt das Verfahren der PCR dar, welches 1984 von Kary Mullis entwickelt wurde. Ihr Prinzip besteht in der Amplifizierung einer spezifischen Sequenz des DNA-Doppelstranges (Mullis und Faloona 1987).

In den vergangenen Jahren entwickelten die vielen unterschiedlichen Institute ihre eigenen „in-house“ Primersysteme, sodass die Vergleichbarkeit der Forschungsergebnisse verschiedener Institute bisher nur eingeschränkt möglich war. Um dem entgegenzuwirken, entwickelte die Biomed-2 Concerted Action 2003 erstmals standardisierte Primer mit hoher Sensitivität für klonal rearrangierte Ig- und TCR-Gene sowie Chromosomenaberrationen (van Dongen et al. 2003). Diese Primer wurden daher auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Besonders die TCR- $\gamma$ -Gene werden aufgrund der limitierten Anzahl der V- und J-Segmente bevorzugt für die auf PCR basierenden Klonalitätsanalysen verwendet.

Die Methode der PCR hat dabei den Vorteil, unabhängig von arbeits- und kostenintensiven Hybridisierungsschritten zu sein. Da die Amplifikation bereits geringer Mengen DNA gelingt, kann diese Methode der Klonalitätsanalyse auch gut an Formalin-fixierten Paraffinblöcken angewandt werden. Ein weiterer Vorteil ist in der relativ hohen Sensitivität von 1-5 % zu sehen.

Zum Klonalitätsnachweis ist die Auftrennung der amplifizierten PCR-Produkte nötig. Sie kann sowohl durch Elektrophorese im Agarosegel als auch mit hochauflösenden elektrophoretischen Verfahren wie der Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese

(TGGE) oder der *Fluorescence Fragment Analysis* (FFA, auch Genescan genannt) erfolgen.

Die Elektrophorese trennt die Amplifikate nach Ladung, Größe und Stabilität auf. Da monoklonale Produkte alle die identische V-N-D-N-J-Sequenzgröße und -Ladung besitzen, wandern sie gleich schnell und gleich weit im Gel und bilden sich demzufolge als schmale Bande ab. Hingegen bestehen polyklonale Produkte aus unterschiedlichsten Fragmentlängen mit ungleichen Ladungen, was dazu führt, dass sie verwaschen als „Schmier“ zur Darstellung kommen. FFA ermöglicht weiterhin eine genaue Bestimmung der PCR-Produktlängen (bis auf ein Basenpaar Genauigkeit) und erlaubt somit einen sofortigen Vergleich klonaler Genumlagerungen unterschiedlicher Proben (Simon et al. 1998, Dippel et al. 1999, Assaf et al. 2000).

#### **3.7.4 CDR3-Spectratyping und TcLandscape Analyse**

T-Zellen haben eine zentrale Bedeutung für die adaptive Immunantwort. Um jedoch einen effizienten Schutz gegenüber den unzähligen pathologischen Fremdproteinen zu gewährleisten, braucht es mindestens genauso viele unterschiedliche T-Zellen. Die Spezifität der Fremderkennung wird dabei, wie bereits in Punkt 2.7.2 beschrieben, durch die Vielfalt der TCR sichergestellt.

Im Gegensatz zur Genescan Methode ermöglicht das CDR3-Spectratyping die Darstellung des gesamten T-Zell-Repertoires. Dabei bezeichnet man die dreidimensionale Abbildung des TCR-Repertoires anhand der CDR3-Längenverteilung aller 24 verschiedenen V $\beta$  Gene (Abb. 3) als TcLandscape Graph.

Die CDR3-Regionen beinhalten den höchsten Polymorphismus des TCR- $\beta$ -Gensegmentes und repräsentieren somit die T-Zell Vielfalt. Das CDR3-Spectratyping ist als Instrument zu verstehen, das die Komplexität und Vielfalt aller T-Zellen eines Patienten darstellt. Die Erfassung der CDR3-Längenverteilungen ermöglicht daher eine detailliertere Vorstellung über Repertoireabweichungen, T-Zell Aktivierungen sowie über klonale T-Zell Expansionen.

### **3.8 Fragestellung und Ziele der Arbeit**

Die Lymphomatoide Papulose und das kutane anaplastische großzellige Lymphom gehören zu dem Spektrum der primär kutanen CD30<sup>+</sup> lymphoproliferativen Erkrankungen. Als besonderes charakteristisches Merkmal zeigt die LyP das Phänomen der spontanen klinischen Remission einzelner Hautläsionen auf. Auch beim cALCL können in ca. 20 % der Fälle spontane klinische Remissionen beobachtet werden.

In vielen vorangegangenen Studien konnten bereits anhand der TCR-Genumlagerungen klonale T-Zellpopulationen in der läsionalen Haut identifiziert werden. Dabei zeigten sich auch in anatomisch und zeitlich unterschiedlich entnommenen Hautbiopsien die identischen TCR-Genumlagerungen. Sogar nach einer mehrere Jahre andauernden Phase der klinischen Remission konnte wieder der identische T-Zell-Klon in neu auftretenden Hautveränderungen der LyP detektiert werden. Daraus ist zu folgern, dass die malignen klonalen T-Zellen in einem bestimmten Reservoir persistieren.

Bisher ist es immer noch ungeklärt, in welchen Kompartimenten die klonale T-Zellpopulation, besonders während der Phase der klinischen Remission, persistiert. In einigen Arbeiten konnte bereits bei anderen primär kutanen T-Zell-Lymphomen, wie z. B. der Mykosis fungoides, der identische T-Zell-Klon im peripheren Blut nachgewiesen werden (Muche et al. 1997, Dereure et al. 2003).

Zu untersuchen, ob dies jedoch auch für die Gruppe der CD30<sup>+</sup> Lymphoproliferationen zutrifft, und somit die Frage zu beantworten, ob das periphere Blut das Reservoir der klonalen T-Zellen ist, ist Ziel der vorliegenden Arbeit.

Um zu klären, ob der krankheitsverursachende T-Zell-Klon im peripheren Blut persistiert, wurden 43 Haut- und 83 korrespondierende Blutproben von insgesamt 31 klinisch und histologisch gut charakterisierten Patienten auf ihre TCR-Genumlagerungen analysiert und über einen Zeitraum von bis zu mehr als drei Jahren verglichen. Von den 31 Patienten hatten 29 Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme mindestens eine Hautveränderung und zwei Patienten befanden sich in der Phase der klinischen Remission. Des Weiteren wurden bei einem Großteil der Patienten zusätzliche Blutproben während der klinischen Follow-up Zeit analysiert. Aufgrund der charakteristischen spontanen Abheilungen einhergehend mit dem

Auftreten neuer Hautveränderungen wurde bei der vorliegenden Arbeit ein besonderes Augenmerk auf die Entität der LyP gelegt.

## 4. Material und Methodik

### 4.1 Bezugsquellen für verwendete Geräte und Chemikalien

#### 4.1.1 Geräte

Tischzentrifuge, Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, groß, Megafuge 1,0	Heraeus, Berlin
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Agarosegelkammer	Micro Bio Tec Brand, Gießen
UV-Lampe und Fotodokumentation	Cybertech, Berlin
Thermoblock	Stuart Scientific, Großbritannien
ABI Prism 310 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Weiterstadt
Gene Ray UV Photometer	Biometra, Göttingen

#### 4.1.2 Chemikalien

##### Standardchemikalien:

PBS	1.7mM NaCl; 0,064mM KCl; 0,375 % Tris-Base; 0,002 % Phenolrot; pH 7,4
TBE	89mM Tris-Base; 89mM Borsäure; 2mM EDTA; pH 8,0
Agarose	UltraPure, Life Technologies, Paisley, Scotland
Ethidiumbromid	UltraPure, Life Technologies, Paisley, Scotland
Extraktionspuffer	50mM KCl; 10mM Tris/HCl; 0,45 % nonidet-P40; 0,45 % Tween20; pH 8,3
Ladepuffer	0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylenyanol; 15 % Ficoll
Proteinase K	Qiagen, Hilden, Deutschland

##### Reagenzien:

AmpliTaqGold, 10x PCR-Puffer, MgCl <sub>2</sub>	Applied Biosystems, Roche, Branchburg, NJ, USA
Biomed 2 $\gamma$ -Primer	Biotez, Berlin Buch, Deutschland
dTNP	Amersham, Biosciences, Piscataway, NJ, USA
100bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Performance optimized Polymer 6	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Tamra Size Standard	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Qiagen Midi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

## **4.2 Patienten und Proben**

Die Studie umfasst die Analyse der genomischen DNA von insgesamt 126 Proben von 31 Patienten mit bekannten klinischen Verläufen von CD30<sup>+</sup> Lymphoproliferationen. 21 Patienten waren an Lymphomatoider Papulose erkrankt, sieben Patienten an cALCL und drei Patienten an der primär nodalen Form des ALCL (sALCL) mit sekundärer Hautbeteiligung.

Die Hautläsionen der Patienten mit LyP wurden, basierend auf der aktuellen EORTC-WHO-Klassifikation, in die drei histologischen Subtypen unterteilt: Typ A, gekennzeichnet durch ein stark entzündliches, mischzelliges Infiltrat mit <50 % CD30<sup>+</sup> großer atypischer Lymphozyten; Typ B, charakterisiert durch ein monomorphes Infiltrat aus kleinen bis mittelgroßen CD30<sup>-</sup> Lymphozyten mit cerebriformen Kernen und Typ C, gekennzeichnet durch Cluster von großen CD30<sup>+</sup> T-Zellen in >50 % des Infiltrates. Von den 21 Patienten mit LyP zeigten 18 Patienten den histologischen Subtyp A, ein Patient den Subtyp B und zwei Patienten den Subtyp C. Im klinischen Verlauf entwickelten drei der Patienten mit LyP (Patient 6, 8 und 20) ein assoziiertes Lymphom in Form der MF.

Insgesamt wurden von den 31 Patienten 43 Haut- und 83 Blutproben molekulargenetisch analysiert. Eine genaue Auflistung der Anzahl der analysierten Proben der 31 Patienten ist aus Tabelle 3 ersichtlich. Alle Proben entstammten der Dermatologischen Klinik der Charité – Universitätsmedizin Berlin Campus Mitte. Die Diagnosen wurden durch die gemeinsame Evaluation der Klinik, Histologie und Molekulargenetik in der Lymphomsprechstunde der oben genannten Einrichtung gestellt und basieren auf den aktuellen WHO-EORTC-Kriterien (Willemze et al. 2005). Für jeden Patienten wurde ferner ein dermatologischer körperlicher Status erhoben sowie der Krankheitsverlauf protokolliert. Tabelle 4 fasst den detaillierten klinischen Verlauf der einzelnen Patienten zusammen.

### **4.2.1 Patientenkollektiv, Klinik, Histologie und Immunhistologie**

Alle Hautbiopsien wurden basierend auf Hematoxylin-Eosin (H.E.) sowie durch immunhistologische Färbungen (CD4, 1F6; Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK; CD3, polyklonal CD3, CD8 (C8-144), CD45RO (OPD4), CD30 (Ber-H2), ALK (DAKO, Glostrup, Denmark)) diagnostiziert. Um Antigenepitope zu demaskieren, wurden alle

Präparate durch Hochdruckerhitzung in einem Wasserbad mit 10 mM Zitratpuffer (pH 10) vorbehandelt.

**Tabelle 3: Anzahl der untersuchten Blut- und Hautproben der 31 Patienten mit CLPD**

Patient	Entität	Anzahl untersuchter Hautproben	Anzahl untersuchter Blutproben
1	LyP, Typ A	1	5
2	LyP, Typ A	1	5
3	LyP, Typ A	1	3
4	LyP, Typ A	1	3
5	LyP, Typ A	1	1
6	LyP, Typ A	1	5
7	LyP, Typ A	1	2
8	LyP, Typ A	3	3
9	LyP, Typ A	3	3
10	LyP, Typ A	1	4
11	LyP, Typ A	1	1
12	LyP, Typ A	1	1
13	LyP, Typ A	1	4
14	LyP, Typ A	1	1
15	LyP, Typ A	2	2
16	LyP, Typ A	1	2
17	LyP, Typ A	1	1
18	LyP, Typ A	1	2
19	LyP, Typ B	2	3
20	LyP, Typ C	1	1
21	LyP, Typ C	1	1
22	cALCL	1	3
23	cALCL	3	5
24	cALCL	1	6
25	cALCL	1	1
26	cALCL	2	5
27	cALCL	2	4
28	cALCL	2	3
29	sALCL	1	1
30	sALCL	2	1
31	sALCL	1	1

Tabelle 4: Klinischer Verlauf der 31 Patienten mit CD30<sup>+</sup> Lymphoproliferationen

Pat.	Diagn.	Gesch.	Alter bei Diagnose	Ausmaß der Hautläsion	Behandlung	Verlauf	Follow up/ Monaten	Aktueller Status
1	LyP, Typ A	m	60	multifokal	Exzision, lokale Steroide, MTX	SD	32	ImE
2	LyP, Typ A	m	13	multifokal	PUVA, lokale Steroide	SD	26	ImE
3	LyP, Typ A	w	33	lokalisiert	Exzision, lokale Steroide	SD	24	ImE
4	LyP, Typ A	m	52	multifokal	Exzision, MTX	CR	168	ImE
5	LyP, Typ A	w	31	multifokal	PUVA, MTX	SD	73	ImE
6	LyP, Typ A	m	40	multifokal	PUVA, systemische Retinoide, MTX	CR	96	IoE
7	LyP, Typ A	w	38	lokalisiert	PUVA, Exzision	SD	13	ImE
8	LyP, Typ A	m	56	lokalisiert	Exzision	SD	55	ImE
9	LyP, Typ A	m	64	multifokal	MTX, PUVA, lokale Steroide	SD	36	ImE
10	LyP, Typ A	w	54	solitär	Exzision, MTX	CR	120	IoE
11	LyP, Typ A	m	81	multifokal	Exzision, Radiatio, Chlorambucil, Flucytoarabin	PD	27	saE
12	LyP, Typ A	m	26	multifokal	Beobachtung	SD	12	ImE
13	LyP, Typ A	m	26	lokalisiert	PUVA	CR	33	IoE
14	LyP, Typ A	w	24	multifokal	MTX	CR	13	IoE
15	LyP, Typ A	w	17	multifokal	lokale Steroide	CR	39	IoE
16	LyP, Typ A	w	58	multifokal	MTX	SD	32	ImE
17	LyP, Typ A	w	49	multifokal	PUVA, MTX, INF- $\alpha$	SD	15	ImE
18	LyP, Typ A	m	32	multifokal	MTX	CR	55	IoE
19	LyP, Typ B	m	73	lokalisiert	Exzision, PUVA, MTX	SD	33	ImE
20	LyP, Typ C	m	52	lokalisiert	PUVA, Exzision, MTX	SD	31	ImE
21	LyP, Typ C	m	17	lokalisiert	Exzision, PUVA, MTX	CR	8	IoE
22	cALCL	m	32	solitär	PUVA, Radiatio, Exzision, MTX	CR	17	IoE
23	cALCL	m	61	solitär	Exzision, Radiatio, INF- $\alpha$ , MTX, CHOP	PD	44	ImE
24	cALCL	w	51	solitär	Exzision, MTX	CR	45	IoE
25	cALCL	m	16	multifokal	Exzision, MTX	SD	48	ImE
26	cALCL	m	36	lokalisiert	Exzision, Radiatio, Vakzinierung, MTX, INF- $\alpha$	PD	22	saE
27	cALCL	m	75	solitär	Exzision, Radiatio	SD	30	ImE
28	cALCL	m	24	solitär	Exzision, Radiatio	CR	27	IoE
29	sALCL	m	37	lokalisiert	CHOP, Alemtuzumab	PD	27	ImE
30	sALCL	m	52	lokalisiert	CHOP, Radiatio, MTX, Doxorubicin, Vepesid	PD	42	ImE
31	sALCL	m	18	lokalisiert	KMT	CR	66	IoE

CHOP: Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Oncovin (Vincristin), Prednisolon, CR: Komplette Remission, Diagn.: Diagnose; INF- $\alpha$ : Interferon-alpha; Gesch.: Geschlecht, KMT: Knochenmarkstransplantation, ImE: lebt mit Erkrankung; m: männlich; MTX: Methotrexat, PD: fortschreitende Erkrankung, PUVA: Psoralen und UVA-Phototherapie, saE: starb an Erkrankung; SD: Erkrankung stabil; w: weiblich.

### **4.3 Kontrollproben**

Als Positivkontrollen wurden zuvor analysierte Blutproben mit bekannten polyklonalen TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen aus der Routinediagnostik der dermatologischen Klinik Charité – Universitätsmedizin Berlin verwendet. Des Weiteren dienten als Positivkontrollen zwei klonale T-Zelllinien; SeAx (abstammend von einem Patienten mit Sézary Syndrom) und MyLa (abstammend von einem Patienten mit MF) (Kaltoft et al. 1987). Als Negativkontrollprobe für die PCR wurde Wasser verwendet.

### **4.4 Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut (Ficollgradient)**

Die Isolierung der „mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut“ (PBMC) erfolgte aus mit Citrat versetzten 20 ml Vollblutröhrchen. Zunächst wurde das Vollblut im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt. Das Blut/PBS-Gemisch wurde anschließend auf zwei sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen, die je mit 3 ml Ficoll-Hypaque-Lösung befüllt waren, überführt. Hierbei wurde die Ficoll-Hypaque-Lösung vorsichtig mit dem Blut überschichtet, so dass sich zwei Phasen ausbildeten. Anschließend erfolgte die Trennung durch Zentrifugation für 20 min mit 2400 U/min bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Die in der Grenzschicht (Interphasering) der zwei Phasen angesammelten PBMC bzw. Lymphozyten (70-100 % Anreicherung) wurden abpipettiert (ca. 1 ml) und zweimal mit PBS gewaschen. Hierzu wurden sie in PBS aufgenommen und 10 min bei 1300 U/min (Raumtemperatur) zentrifugiert. In der Regel wurde der Überstand verworfen und das Zellpallett direkt der weiteren Nukleinsäureextraktion zugeführt. Ansonsten wurden sie bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren.

### **4.5 DNA-Extraktion aus PBMC**

Die DNA-Extraktion wurde mit Hilfe eines Proteinase-K-Aufschlusses durchgeführt. Die gewonnenen PBMC Zellen wurden hierzu erneut in 1 ml PBS resuspendiert, in ein Eppendorfröhrchen überführt und mit 13.200 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und die Zellen in 200  $\mu$ l Extraktionspuffer aufgenommen und 20  $\mu$ l Proteinase K hinzugefügt. Anschließend wurde die Zellsuspension im Thermoblock bei 55 °C über Nacht (mindestens 4 Stunden) inkubiert. Um die Proteinase thermisch zu inaktivieren, wurde der Thermoblock für 20 Minuten auf

95 °C erhitzt. Abschließend wurde erneut für 10 min bei 13.200 U/min zentrifugiert. Die in dem Überstand enthaltene DNA wurde in ein Eppendorfröhrchen überführt und zur weiteren Analyse verwendet.

#### **4.6 DNA-Extraktion aus Paraffinblöcken**

Zunächst wurden mit einem Mikrotom aus dem Paraffinblock zehn Schnitte mit einer Schichtdicke von je 10 µm angefertigt und in ein Eppendorfröhrchen überführt. In einem PCR freien Nachbarlabor wurden die Schnitte entparaffinisiert, gewaschen, getrocknet und der weiteren Nucleinsäureextraktion zugeführt. Die folgenden Arbeitsschritte wurden dabei durchlaufen:

1. Um die Paraffinschnitte zu entwachsen, wurden die Proben mit Roticlear gewaschen. Hierzu wurden den Paraffinschnitten 1 ml Roticlear zugegeben, gut gevortext, und für 5 min bei 13.200 U/min zentrifugiert.
2. Der Überstand vorsichtig abgekippt/ abpipettiert.
3. Wiederholung von Schritt 1.
4. Weitere Entparaffinisierung und Waschung mit 96 % Ethanol. Hierzu wurde 1ml Ethanol in das Eppendorfröhrchen gegeben, gut gevortext und 5 min bei 13.200 U/min zentrifugiert.
5. Wiederholung von Schritt 4.
6. Um sämtlichen Alkohol aus der Probe zu entfernen und somit einer Einschränkung der PCR entgegenzuwirken, wurden die Proben für mindestens eine Stunde in einem Exsikkator vollständig getrocknet.
7. Das getrocknete Gewebe wurde anschließend in 200 µl Extraktionspuffer aufgenommen und mit 20 µl Proteinase K versetzt.
8. Die weitere DNA-Extraktion erfolgte wie in 3.4.2 beschrieben.

#### **4.7 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch in einer 1 cm dicken Quarzküvette. Entsprechend dem Lambert-Beer-Gesetz wurde die Extinktion gemessen und die DNA-Konzentration berechnet. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm. Alle Proben wurden dreimal gemessen, um einen repräsentativen Mittelwert

zu bilden. Bei zu hoher DNA-Konzentration wurde zuerst eine Verdünnungslösung hergestellt, die nach der photometrischen Messung auf die Ausgangskonzentration zurückgerechnet wurde.

*Lambert-Beer-Gesetz:*  $E = \epsilon * c * d$ .

Die Absorption monochromatischer Energie (Licht einer bestimmten Wellenlänge) ist direkt proportional zur molekularen Konzentration der zu untersuchenden Probe.  $\epsilon$  bezeichnet dabei den Absorptionskoeffizienten,  $d$  die Küvettschichtdicke und  $c$  eine Konstante.

## **4.8 TCR- $\gamma$ -PCR**

### **4.8.1 Primerauswahl**

Bei der PCR wurde das Biomed-2 Primerset und Protokoll für den TCR- $\gamma$  verwendet (van Dongen et al. 2003). Für das Design der richtigen Primer bedarf es der Balance zwischen einer begrenzten Anzahl an Primern und der maximalen Homologie mit allen relevanten  $\gamma$ -Gensegmenten des TCR. Diese möglichst optimale Primerherstellung wurde 2003 von der Biomed-2 Concertet Action verwirklicht und für diese Arbeit verwendet. Es wurden Primer entworfen, die alle bekannten und relevanten V $\gamma$ - und J $\gamma$ -Gensegmente berücksichtigen. Beim Design wurden folgende Punkte berücksichtigt:

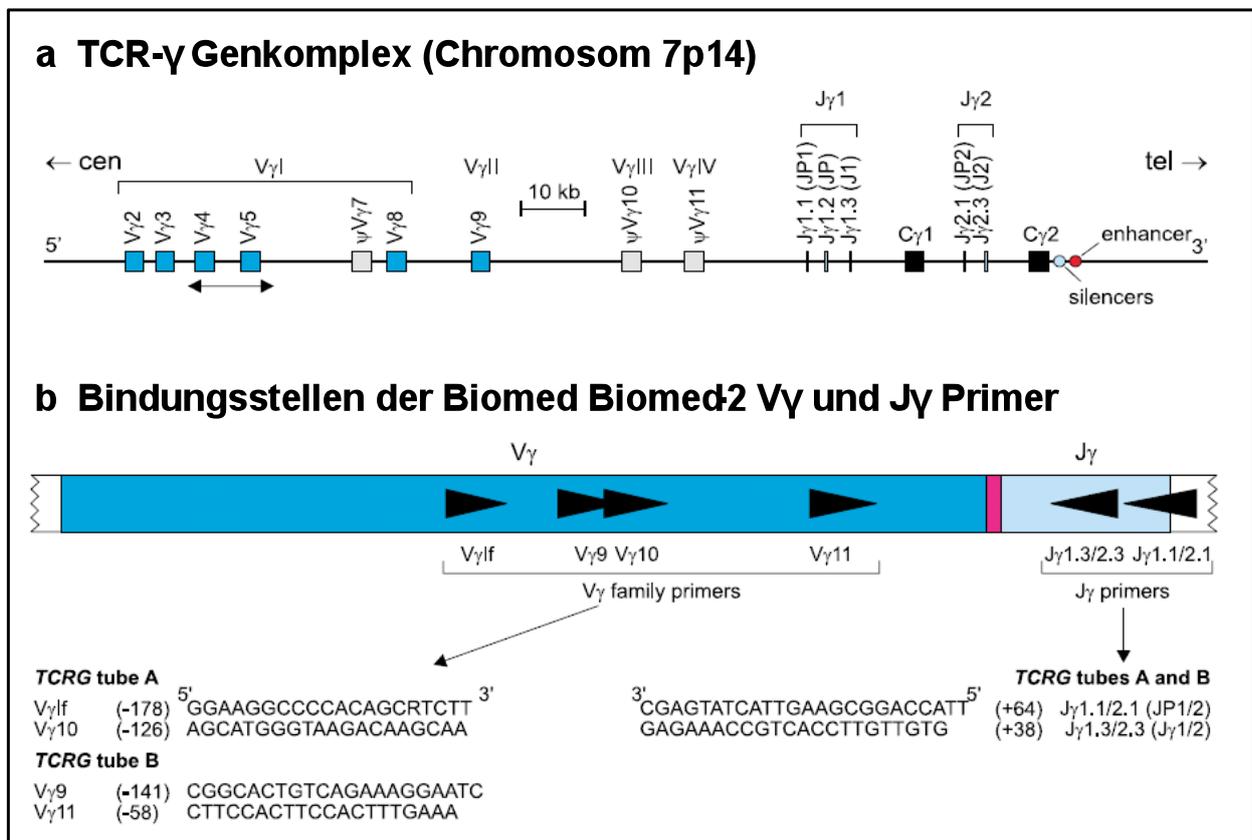
1. Die Position der Primer wurde so gewählt, dass die Größe der PCR-Produkte möglichst unter 300 Basenpaaren (bp) (bevorzugt bei 100-300 bp) liegt. Dies ist insbesondere für in Paraffin eingebettetes Material von Bedeutung.
2. Ein minimaler Abstand von  $> 10$ -15 bp zur junktionalen Region wurde berücksichtigt, um falsch negative Ergebnisse durch eine Bindungsstörung des 3' Endes der Primer zu vermeiden.
3. Die Primer sollten möglichst nicht zu lang sein, d.h.  $< 25$  Nukleotiden.

Die Primer wurden mit Hilfe der OLIGO 6.2 Software entwickelt. Der TCR- $\gamma$ -Genlocus auf Chromosom 7p14 umfasst insgesamt 14 V $\gamma$ -Segmente, von denen nur neun (V $\gamma$ 2, V $\gamma$ 3, V $\gamma$ 4, V $\gamma$ 5, V $\gamma$ 7, V $\gamma$ 8, V $\gamma$ 9, V $\gamma$ 10 und V $\gamma$ 11) und fünf J $\gamma$ -Segmente an der

Genumlagerung beteiligt sind. Aus diesen Gensegmenten wurden vier familienspezifische V $\gamma$ -Primer und zwei J $\gamma$ -Primer entwickelt, die die Detektion nahezu aller klonalen TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen ermöglichen. Die Sequenzen der sechs verwendeten Primer sind in Tabelle 5 dargestellt. Zur bestmöglichen Klonalitätsdetektion werden diese Primer auf zwei Multiplex Tubes (A und B) aufgeteilt (Abb. 4).

**Tube A: V $\gamma$ lf + V $\gamma$ 10 + J $\gamma$  1.1/1.2 + J $\gamma$ 1.3/2.3**

**Tube B: V $\gamma$ 9 + V $\gamma$ 11 + J $\gamma$  1.1/1.2 + J $\gamma$ 1.3/2.3**



**Abb. 4: Schematische Darstellung des TCR- $\gamma$ -Genkomplexes (a) und der daraus entwickelten Primer mit ihren Sequenzen und der Verteilung auf die zwei Tubes A und B (b).**  
Bild aus van Dongen et al. 2003.

#### 4.8.2 PCR-Protokoll

Die Reaktionsbedingungen wurden für ein Endvolumen von 50  $\mu$ l entwickelt. Pro PCR-Ansatz wurden 45  $\mu$ l Mastermix aus folgenden Reagenzien hergestellt (siehe Tabelle 5 für Mastermix A und Tabelle 6 für Mastermix B). Diesem Mix wurden dann jeweils 5  $\mu$ l DNA hinzugegeben. Um Gemischrückstände im Deckel zu vermeiden, wurden die Eppendorfröhrchen kurz mit der Tischzentrifuge an zentrifugiert und anschließend in den

Thermocycler gestellt. Wie in der Arbeit von van Dongen et al. empfohlen, wurden die PCR-Reaktionen in folgenden Zyklen durchlaufen:

1. Voraktivierung: 7 min bei 95 °C
2. Denaturierung: 1 min bei 95 °C
3. Primeranlagerung: 1 min bei 60 °C
4. Verlängerung: 1 min bei 72 °C
5. Abschlussverlängerung: 20 min bei 72 °C

Die Zyklen 1-5 wurden insgesamt 35 Mal durchlaufen. Anschließend wurde das PCR-Amplifikat auf 15 °C abgekühlt.

**Tabelle 5: Biomed-2 TCR- $\gamma$ -PCR Protokoll für Tube A**

Im Stamm		Im Ansatz	Menge pro PCR-Ansatz in $\mu$ l
Aqua bidest			35,8
10 x Puffer			5,0
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM	3,0
dNTP's	10 mM	0,20 mM	1,0
AmpliTaq Gold	5 U/l	2,00 U	0,4
Vg9	50 $\mu$ M	0,20 $\mu$ M	0,2
Vg11	50 $\mu$ M	0,20 $\mu$ M	0,2
J $\gamma$ 1.1/2.1 (J/P 1/2)	50 $\mu$ M	0,20 $\mu$ M	0,2
J $\gamma$ 1.3/2.3 (J $\gamma$ 1/2)	50 $\mu$ M	0,20 $\mu$ M	0,2

**Tabelle 6: Biomed-2 TCR- $\gamma$ -PCR Protokoll für Tube B**

Im Stamm		Im Ansatz	Menge pro PCR-Ansatz in $\mu$ l
Aqua bidest			35,8
10 x Puffer			5,0
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM	3,0
dNTP's	10 mM	0,20 mM	1,0
AmpliTaq Gold	5 U/l	2,00 U	0,4
Vglf	50 $\mu$ M	0,20 $\mu$ M	0,2
Vg10	50 $\mu$ M	0,20 $\mu$ M	0,2
J $\gamma$ 1.1/2.1 (J/P 1/2)	50 $\mu$ M	0,20 $\mu$ M	0,2
J $\gamma$ 1.3/2.3 (J $\gamma$ 1/2)	50 $\mu$ M	0,20 $\mu$ M	0,2

### 4.8.3 Mögliche Amplifikatgrößen

Die unter Verwendung der oben aufgeführten Primer entstehenden möglichen Amplifikatgrößen liegen für den Tube A im Bereich von 145 - 175 Nukleotiden und für den Tube B im Bereich von 80 - 220 Nukleotiden. Die genaue Aufführung der unterschiedlichen Primerkombinationen ist in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7: Mögliche Fragmentlängen der TCR- $\gamma$ -PCR Amplifikate**

TCR- $\gamma$ Tube	TCR- $\gamma$ -Genumlagerung	Größe der PCR-Produkte in bp
Tube A	V $\gamma$ 10 – J $\gamma$ 1.3/2.3	145 – 175
	V $\gamma$ 10 – J $\gamma$ 1.1/2.1	175 – 195
	V $\gamma$ 1f – J $\gamma$ 1.3/2.3	195 – 230
	V $\gamma$ 1f – J $\gamma$ 1.1/2.1	230 – 255
Tube B	V $\gamma$ 11 – J $\gamma$ 1.3/2.3	80 – 110
	V $\gamma$ 11 – J $\gamma$ 1.1/2.1	110 – 140
	V $\gamma$ 9 – J $\gamma$ 1.3/2.3	160 – 195
	V $\gamma$ 9 – J $\gamma$ 1.1/2.1	195 – 220

bp: Basenpaare

### 4.9 Agarosegelelektrophorese und Fotodokumentation

Um die PCR-Amplifikate darzustellen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde ein 2 %iges Agarosegel hergestellt und mit 0,01 % Ethidiumbromid versetzt. Es wurden jeweils 8  $\mu$ l des PCR-Amplifikates mit 2  $\mu$ l Ladepuffer gemischt und auf dem Gel aufgetragen. Um die Größe der Amplifikate abschätzen zu können, wurden auf jeder Elektrophoreseplatte 2  $\mu$ l eines Längenstandarts (100 bp Ladder, In Vitrogen) mit aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in 1x TBE Puffer bei ca. 70 V.

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurden die DNA-Fragmente durch die Fluoreszenz des Ethidiumbromids, das mit den Nucleinsäuren interagiert, mit einer UV-Kamera (230nm) detektiert und fotodokumentiert (Cybertech, Berlin). Die verifizierten Amplifikate wurden anschließend mit der Genescan Methode auf ihre exakte Nukleotidlänge analysiert.

#### **4.10 Fragmentlängenanalyse der PCR-Produkte (Genescan)**

Zur weiteren Analyse der PCR-Produkte wurden die Amplifikate bereits während der PCR mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte wurden durch den Einbau eines 5' markierten Oligonukleotidprimers mit dem Farbstoff FAM (6-Carboxyfluorescein) bereits während der Reamplifikation der PCR generiert. Für die Fragmentlängenanalyse durch die Genescan Methode werden die doppelsträngigen PCR-Produkte zunächst in ihre Einzelstränge denaturiert. Dafür werden die PCR-Produkte wie folgt vorbereitet:

1. 12,5 µl Formamid mit 0,5 µl Genescan Tamra Size Standard mischen
2. 1 µl PCR-Amplifikat hinzufügen
3. Kurz an zentrifugieren
4. Denaturierung im Thermoblock für 5 min bei 95 °C
5. Auf 4 °C abkühlen

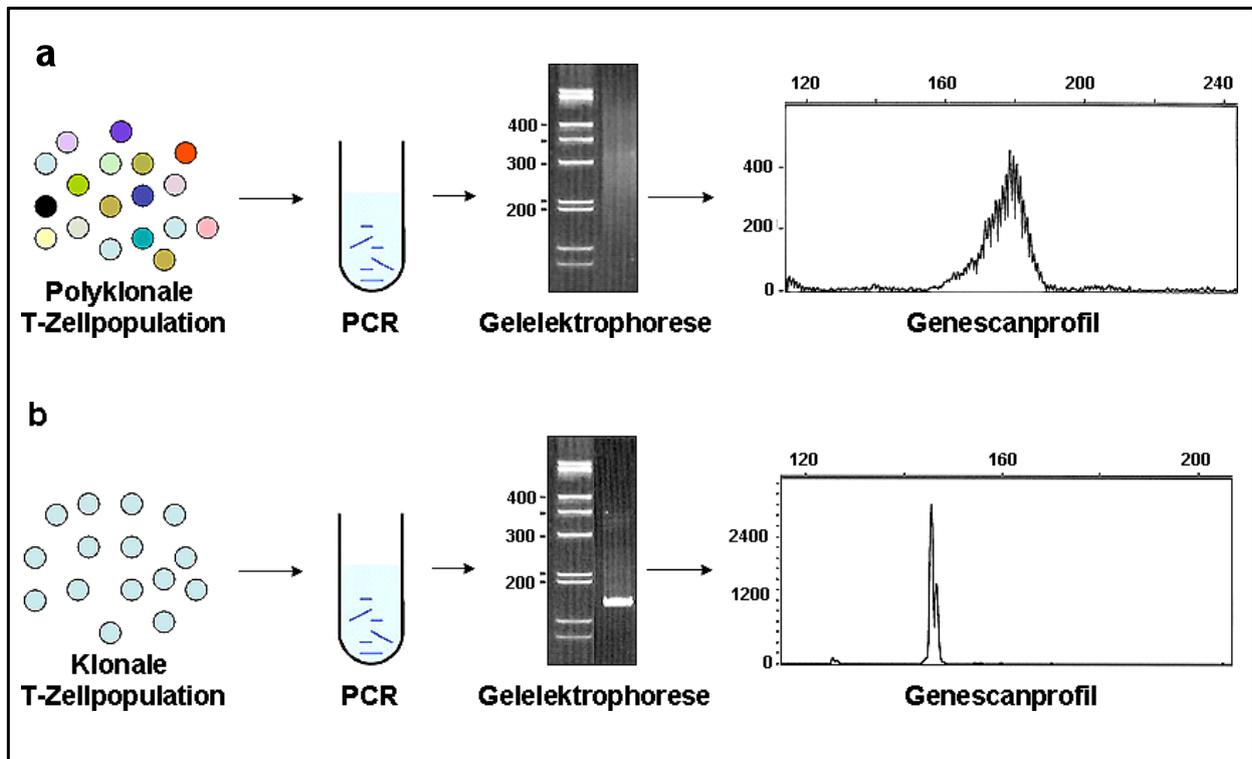
Die Fragmentlängenbestimmung erfolgte schließlich durch die kapillarelektrophoretische Auftrennung der fluoreszenzmarkierten Amplifikate durch den Sequenzer ABI Prism 310 der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland.

Die fluoreszenzmarkierten Einzelstrangprodukte wurden dabei in einem hochauflösenden Polymer (POP 6) innerhalb der Kapillare elektrophoretisch aufgetrennt und via automatischem Laserscan auf die Nukleotidgröße analysiert. Zum Abgleich der Amplifikatgrößen wurde ein interner Längenstandard (Tamra) mit aufgetragen, der sich farblich von den PCR-Produkten unterscheidet. Die Fragmentlängen des Standards produzieren somit eine Eichkurve, mit der die zu analysierenden PCR-Fragmentlängen verglichen werden. Weiterhin wird die Fluoreszenzstärke der einzelnen PCR-Amplifikate detektiert. Je mehr Amplifikate einer bestimmten Fragmentlänge entstehen, desto höher ist dabei die Fluoreszenzintensität dieser Fragmentlänge.

Die Analyse dieser Daten erfolgte durch das Datenverarbeitungsprogramm „Genescan 672“. Es erstellt einen Graphen, indem die Fluoreszenzstärken (Y-Achse) gegen die

einzelnen Fragmentlängen (X-Achse) aufgetragen werden, und gewährleistet eine Genauigkeit der Fragmentlängenbestimmung von bis zu einem Basenpaar.

Abbildung 5 fasst den Analyseprozess von der DNA der T-Zellpopulation bis zur Erstellung der Genescan Elektropherogramme zusammen.



**Abb. 5: Schematische Darstellung der Genescan Analyse anhand einer polyklonalen (a) und klonalen (b) T-Zellpopulation.**

Nach DNA-Extraktion der T-Zellen erfolgt die Biomed-2 TCR- $\gamma$ -PCR. Die verschiedenen Amplifikatgrößen werden durch die Gelelektrophorese verifiziert und anschließend im Genescan kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Die Amplifikate polyklonaler T-Zellpopulationen sind unterschiedlichster Größe und stellen sich daher in der Elektrophorese als „Schmier“ dar sowie im Genescan Elektropherogramm als annähernde Normalverteilungskurve (a). Die Amplifikate einer klonalen T-Zellpopulation haben eine identische Länge und werde daher in der Elektrophorese als Bande und im Genescan Profil als dominanter Peak abgebildet (b). Nach dem Biomed-2 Protokoll werden die Primer auf zwei unterschiedliche Tubes A und B aufgeteilt (nicht dargestellt).

#### **4.11 Etablierung einer Verdünnungsreihe zur Sensitivitätsbestimmung**

Zur Sensitivitätsbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe mit der klonalen T-Zelllinie MyLa angesetzt. Hierzu wurde die DNA der klonalen MyLa Zellen zu 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2 % und 1 % mit der polyklonalen DNA aus einem Blutpool bestehend aus PBMC von zehn gesunden Probanden verdünnt. Die Proben wurden anschließend mit dem Genescan ausgewertet. Die niedrigste Verdünnung, bei der gerade noch der

klonale Peak der MyLa Zellreihe hinter dem polyklonalen Background des Blutpools zu erkennen war, determinierte somit die Sensitivitätsgrenze der Methode.

Die Gesamtmenge an DNA pro PCR-Ansatz beträgt für die bestmögliche Amplifizierung 250 ng. Da insgesamt 5 µl DNA pro Ansatz für die PCR eingesetzt werden, wurden die DNA-Konzentrationen der MyLa- und Blutpoolextrakte zunächst auf 50 ng/µl verdünnt.

Die MyLa Zellen wurden in einer Zellkulturflasche mit Nährlösung in unserer dermatologischen Klinik gezüchtet. Als Indikator wurde der Nährlösung Phenolrot zugesetzt. Um genug DNA für die Verdünnungsreihe zur Verfügung zu haben, sollte eine Zielmenge von mindestens 25 µg DNA aus den MyLa Zellen isoliert werden. Da pro Zelle ca. 5 pg DNA gewonnen werden kann, wurde eine Mindestzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen benötigt. Hierzu wurde zunächst die Zellzahl von  $1,4 \times 10^5$  /ml in der Neubauer-Zählkammer bestimmt, was für die Gesamtmenge von 45 ml eine Gesamtzellzahl von  $6,3 \times 10^6$  Zellen ergibt. Um die DNA aus den Zellen zu extrahieren, wurde das Spinprotokoll des Qiagen Midi Kits verwendet (Hilden, Deutschland). Die DNA-Konzentration wurde photometrisch dreimal gemessen und der Mittelwert von 0.177 µg/µl gebildet. Um die gewünschte Endkonzentration von 50 ng/µl zu erhalten, wurde die DNA mit dem Verdünnungsfaktor 3,52 verdünnt.

Die Gewinnung der DNA aus den Citrat-Blutproben der zehn Patienten erfolgte ebenfalls mit dem Spinprotokoll des Qiagen Midi Kits (Hilden, Deutschland). Die DNA-Konzentration wurde anschließend dreimal bestimmt, und der Mittelwert von 0,170 gebildet. Die Probe wurde mit dem Verdünnungsfaktor 3,40 verdünnt, um die gewünschte Endkonzentration von 50 ng/µl zu erhalten.

Anschließend wurde die DNA aus den MyLa Zellen im Verhältnis von 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2 % und 1 % mit der DNA aus dem Blutpool gemischt.

#### **4.12 CDR3-Spectratyping und TcLandscape Analyse**

Die Analyse der CDR3-Längenverteilungen der 24 verschiedenen Vβ-Familiengene (CDR3-Spectratyping) erlaubt die Exploration der Vielfältigkeit des gesamten TCR-Repertoires. In Kombination mit quantitativen Ergebnissen der einzelnen CDR3-Längenverteilungen können dreidimensionale Graphen errechnet werden. Diese werden als TcLandscape Graphen bezeichnet und ermöglichen einen Überblick über das gesamte TCR-Repertoire. Das CDR3-Spectratyping ermöglicht somit die Erfassung

der Komplexität und Vielfalt der T-Zellen eines Patienten und ihre Visualisierung auf einem einzigen Graphen durch die TcLandscape Analyse. Das CDR3-Spectratyping bzw. die TcLandscape Analyse kann daher dazu verwendet werden, klonale T-Zell Expansionen während der Immunantwort zu erfassen und gestattet eine detaillierte Vorstellung über T-Zell-Repertoireabweichungen.

#### **4.12.1 Material für die TCR-Repertoire Analyse**

Bei dem Immunoscopeverfahren werden die CDR3-Regionen aller 24 verschiedenen TCR- $\beta$ -Familien analysiert. Im Gegensatz zur Genescan Methode beruht dieses Verfahren auf der Analyse von mRNA. Um die mRNA mit Trizol extrahieren zu können, müssen die PBMC in einem dafür geeigneten Gefrierschutzmittel (z. B. DMSO) aufgenommen und aufbewahrt werden. Eine weitere Voraussetzung ist die Mindestmenge von  $3 \times 10^7$  PBMC/ Patient für tiefgefrorene Proben in DMSO. Insgesamt waren von elf der 31 untersuchten Patienten geeignete Proben (PBMC in DMSO) verfügbar (Patienten 1, 2, 5, 8, 12, 14, 15, 19, 22, 23, 24). Alle Proben entstammen der Dermatologischen Klinik der Charité – Universitätsmedizin Berlin Campus Mitte. Da unser Institut nicht über das Immunoscope/TcLandscape Verfahren verfügt, wurde TcLand (Nantes, France) mit der Analyse beauftragt und ihnen die PBMC in DMSO übersandt.

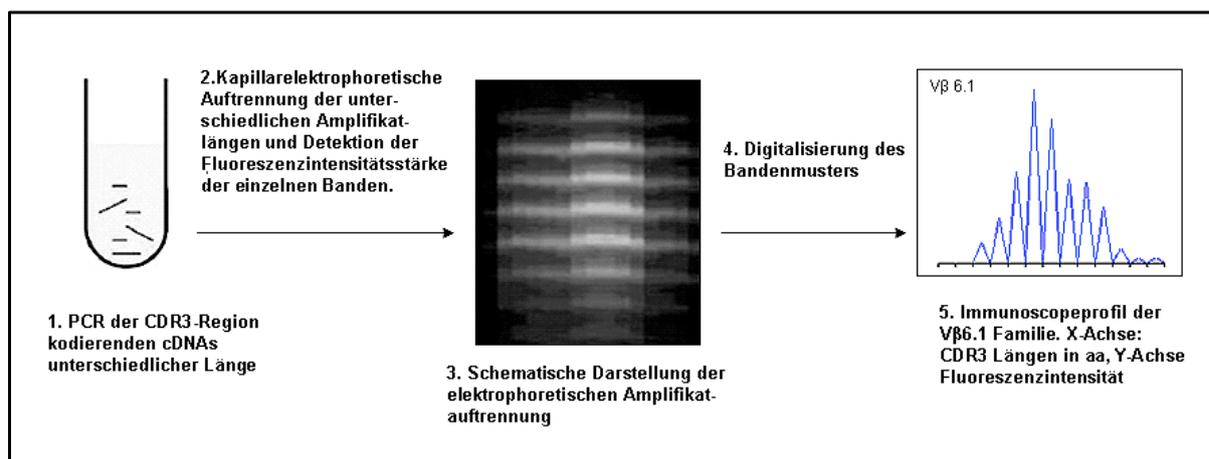
#### **4.12.2 Durchführung der TCR-Repertoire Analyse (Immunoscopeverfahren)**

Die Analyse der CDR3-Längenverteilung ist ein molekularbiologisches Verfahren, das auf der Analyse der Transkripte (mRNA) der V-N-D-N-J-C-Genumlagerungen der 24 verschiedenen V $\beta$ -Familien beruht.

In einem ersten Schritt erfolgt die Umschreibung der CDR3 kodierenden mRNA in cDNA. Anschließend findet durch die PCR die Amplifizierung der unterschiedlich langen CDR3 kodierenden cDNA-Fragmente statt. Es werden insgesamt 26 Einzelreaktionen zur Detektion der Genumlagerungen verschiedener V $\beta$ -Familien sowie V $\beta$ -Subfamilien durchgeführt, indem jeweils ein C $\beta$ -Primer mit einem der 26 verfügbaren V $\beta$ -Primer kombiniert wird. Es existieren mehr (26) V $\beta$ -Primer als die 24 V $\beta$ -Familien, da manche

V $\beta$ -Familien in Subfamilien unterteilt werden und andere V $\beta$ -Familien nicht berücksichtigt werden (Arden et al. 1995).

In Analogie zum Genescan Verfahren werden die PCR-Produkte durch einen fluoreszierenden C $\beta$ -Primer amplifiziert und anschließend durch eine Kapillarelektrophorese ihrer Länge nach aufgetrennt. Es entsteht ein Bandenmuster unterschiedlicher Fluoreszenzintensität. Jede Bande repräsentiert eine bestimmte V-N-D-N-J-C-Genumlagerung durch eine bestimmte Fragmentlänge. Die Fluoreszenzintensität gibt Auskunft über die Anzahl der Amplifikatkopien der einzelnen Fragmentlängen. Durch geeignete Signalprozessierungsprogramme kann das Gelbild digitalisiert werden. Die Signale der Kapillarelektrophorese werden dann grafisch dargestellt, indem die Fluoreszenzstärke gegen die PCR-Fragmentlänge aufgetragen wird. Jedes Profil besteht aus sieben bis elf Peaks, die für die sieben bis elf möglichen unterschiedlichen CDR3-Längen stehen. Bei der TCR- $\beta$ -Analyse der CDR3-Regionen haben die Peaks in der Regel Abstände von drei Basenpaaren/ Nukleotiden. Diese Abstände entsprechen einem Kodon/ Triplet und können als Hinweis gedeutet werden, dass sich die meisten TCR- $\beta$ -Genumlagerungen aus einem offenen Leseraster „in-frame“ zusammensetzen und damit funktional sind. Aufgrund dieser Konstellation werden die CDR3-Längen in Aminosäuren (aa) angegeben. Eine schematische Darstellung des Immunoscopeverfahrens zeigt Abbildung 6.



**Abb. 6: Schematische Darstellung des Immunoscopeverfahrens und der Signalprozessierung.**

Die Immunoscopeanalyse der 26 C-V-Primerpaare wurde stets dreimal durchgeführt, um eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit zu erhalten. Im Falle von drei unterschiedlichen Immunoscope-Profilen wird das Profil mit der geringsten „percentage

of perturbation“ (siehe unten) zur weiteren Berechnung verwendet, um falsch positiven Ergebnissen entgegenzuwirken.

Wenn alle möglichen (sieben bis elf) unterschiedlichen CDR3-Längen in einer V $\beta$ -Familie repräsentiert sind, und der Graph einer Gauß'schen Glockenkurve ähnelt, spricht man von einem polyklonalen Profil, so wie es bei gesunden Probanden beobachtet wird. Wird im Gegensatz dazu nur eine bestimmte CDR3-Länge repräsentiert, handelt es sich um die Dominanz einer bestimmten T-Zellpopulation mit seiner spezifischen C-V-Genumlagerung und der korrespondierenden CDR3-Größe.

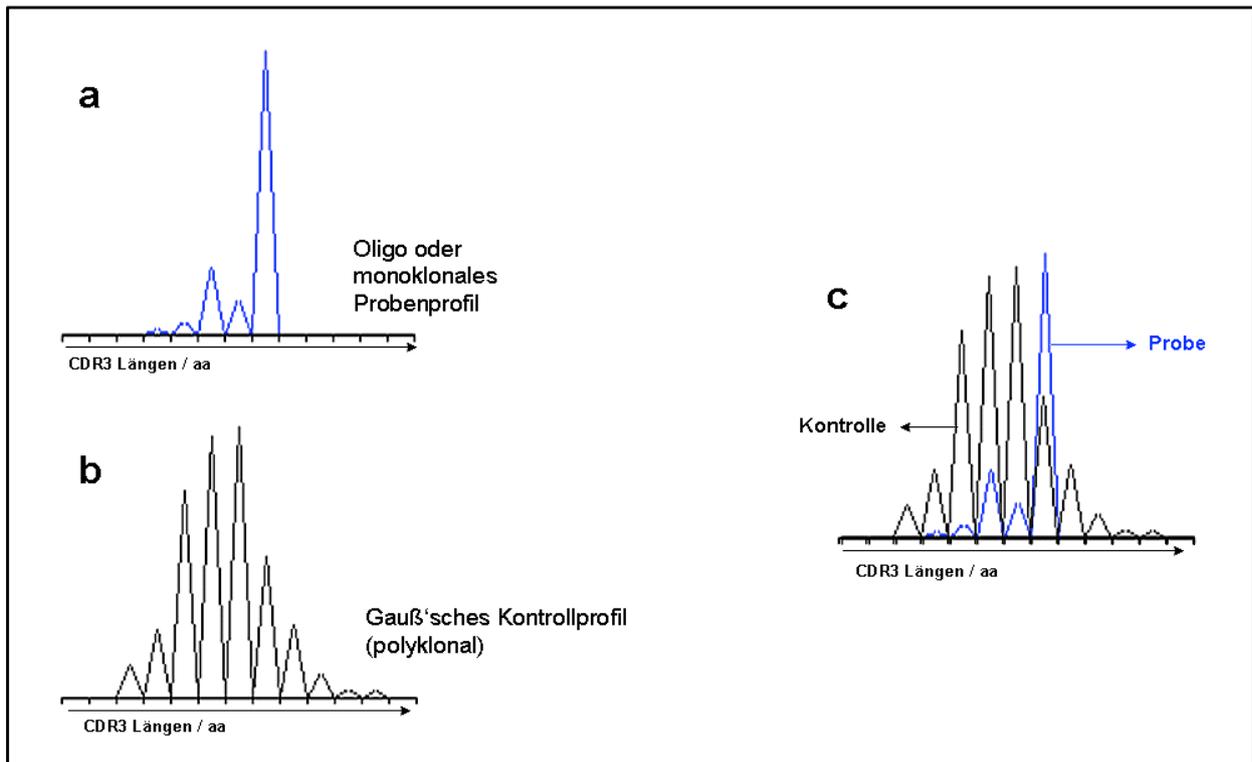
#### 4.12.3 3D-Darstellung der TCR-Repertoire Analyse (TcLandscape)

Für die TcLandscape Analyse werden zwei Arten von Daten gesammelt und fusioniert. Es handelt sich dabei um sog. qualitative und quantitative Daten.

**Qualitative Daten:** Die qualitativen Daten setzen sich aus den einzelnen Immunoscope Profilen der 26 V $\beta$ -Familien zusammen. Aus der Analyse der 26 einzelnen Profile wird der „Grad des Störeinflusses“ oder der sog. „perturbation score“ oder die „percentage of perturbation“ berechnet. Der „Grad des Störeinflusses“ gibt an, wie stark ein Profil von einer Gauß'schen Normalverteilungskurve abweicht.

Um die „percentage of perturbation“ zu ermitteln, wird jedes Immunoscope Profil mit einem normalverteilten Kontrollprofil verglichen. Um die beiden Profile miteinander vergleichen zu können, wird die Differenz zwischen der Fläche unter dem Graphen des Kontrollprofils und der Fläche unter dem Graphen des Probenprofils kalkuliert.

Auf diese Weise erhält man schließlich die prozentuale Abweichung für jedes Probenprofil verglichen mit dem Profil einer Gauß'schen Normalverteilung (Miqueu et al. 2006). Je höher die „percentage of perturbation“ desto mehr weicht der Graph von der Normalverteilungskurve ab und umgekehrt. Für die Darstellung im TcLandscape Histogramm werden diese Daten durch eine Farbskala verschlüsselt. Je höher ein Peak des Immunoscopeprofiles im Vergleich zur normalverteilten Kontrollprobe ist, desto dunkelroter der Farbton. Je mehr ein Peak des Immunoscopeprofiles unter der normalverteilten Kontrollprobe liegt, desto dunkelblauer wird der Farbton kodiert (Abb. 7).

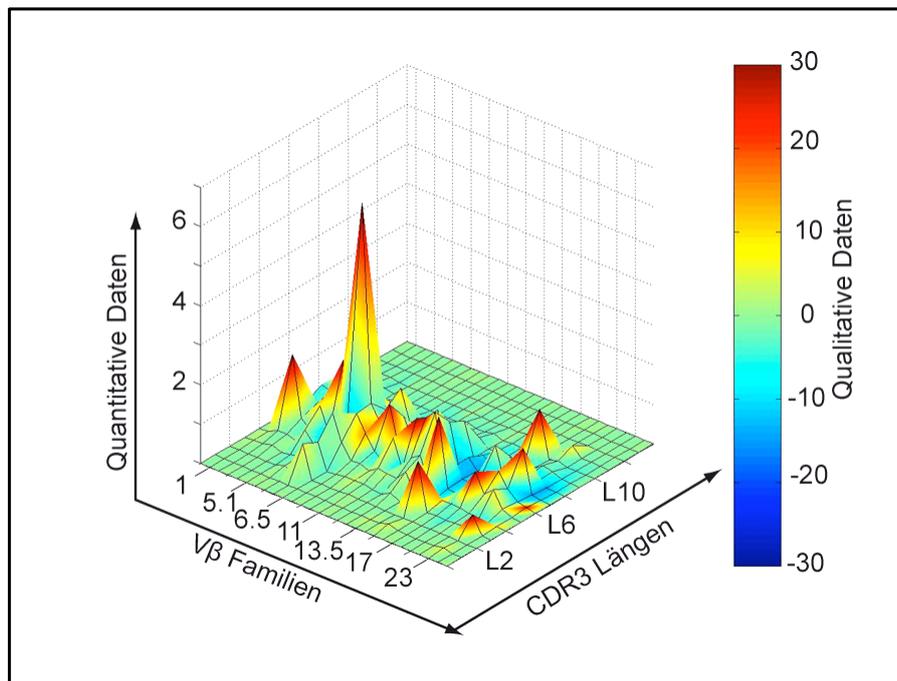


**Abb. 7: Schematische Darstellung der Bestimmung der „percentage of perturbation“.**  
 a: Klonales Profil einer Probe. b: polyklonales Kontrollprofil mit einer Gauß'schen Normalverteilung.  
 c: Vergleich des Probenprofils mit dem Kontrollprofil. Aus der Abweichung der Fläche unter den Kurven berechnet sich die „percentage of perturbation“.

**Quantitative Daten:** Die quantitativen Daten bestehen aus der Menge der PCR-Amplifikate für jede der 26 verschiedenen TCR V $\beta$ -Ketten-Familien. Sie werden in cDNA-Kopien oder dem quantitativen Ratio V $\beta$ /HPRT angegeben, wobei HPRT als interne Kontrolle das „Houskeeping Gen“ Xanthin Phosphoribosyltransferase bezeichnet. Diese quantitativen Daten werden im TcLandscape Histogramm durch die Höhe der einzelnen Peaks dargestellt.

Obwohl die Immunoscopemethode die qualitative Analyse des TCR ermöglicht, gewährt sie immer noch keine präzise Aussage über das gesamte TCR-Repertoire in Bezug auf die einzelnen V $\beta$ -Genumlagerungen. Daher wurde ein neues Verfahren entwickelt, das eine quantitative Dimension zu den qualitativen Daten hinzufügt. Dieses Verfahren bezeichnet man als *TcLandscape*. Hierbei wird das gesamte TCR-Repertoire bzw. TCR-Immunsystem eines Individuums auf einem dreidimensionalen Graphen visualisiert. Die X-Achse zeigt dabei die 26 verschiedenen V $\beta$ -Familien bzw. -Subfamilien, die Y-Achse beinhaltet die quantitativen Daten und die Z-Achse die möglichen CDR3-Längen in Aminosäuren. Weiter existiert eine Farbkodierung, die für

jede V $\beta$ -Familie die „percentage of perturbation“ visualisiert und dadurch angibt, inwiefern jede V $\beta$ -Familie von einer Normalverteilung abweicht (Abb. 8).



**Abb. 8: Beispiel eines TcLandscape Histogramms.**

Dreidimensionale Darstellung der CDR3-Längen (Z-Achse) der unterschiedlichen V $\beta$ -Familien (X-Achse) in Bezug auf ihre Quantität in V $\beta$ /HPRT Ratio (Y-Achse). Die Farbkodierung beinhaltet die qualitativen Daten und beschreibt, wie stark die CDR3-Längen jeder V $\beta$ -Familie von einer Gauß'schen Normalverteilungskurve abweichen.

Die TcLandscape Analyse erlaubt damit auf RNA-Ebene den dreidimensionalen Überblick über das gesamte TCR-Repertoire mit seinen spezifischen V $\beta$ -Genumlagerungen und ermöglicht es auf der quantitativen Ebene (Y-Achse), die Wichtigkeit einer selektierten V $\beta$ -Familie (und damit einer selektierten T-Zellpopulation) während der Immunantwort zu verstehen. Anhand der Abb. 8 kann man beispielhaft erkennen, dass viele V $\beta$ -Familien stark von einer Gauß'schen Normalverteilung abweichen (rote Peaks), jedoch auf der quantitativen Ebene (Y-Achse) nur schwach repräsentiert sind und daher bei der Immunantwort zum Zeitpunkt der Analyse eher von untergeordneter Bedeutung waren. Im Gegensatz dazu existieren andere T-Zellpopulationen (hoher roter Peak), die während der Immunantwort klonal selektiert wurden (roter Peak) und in großer Anzahl unter den T-Zellen vertreten sind (Höhe des Peaks).

## 5. Ergebnisse

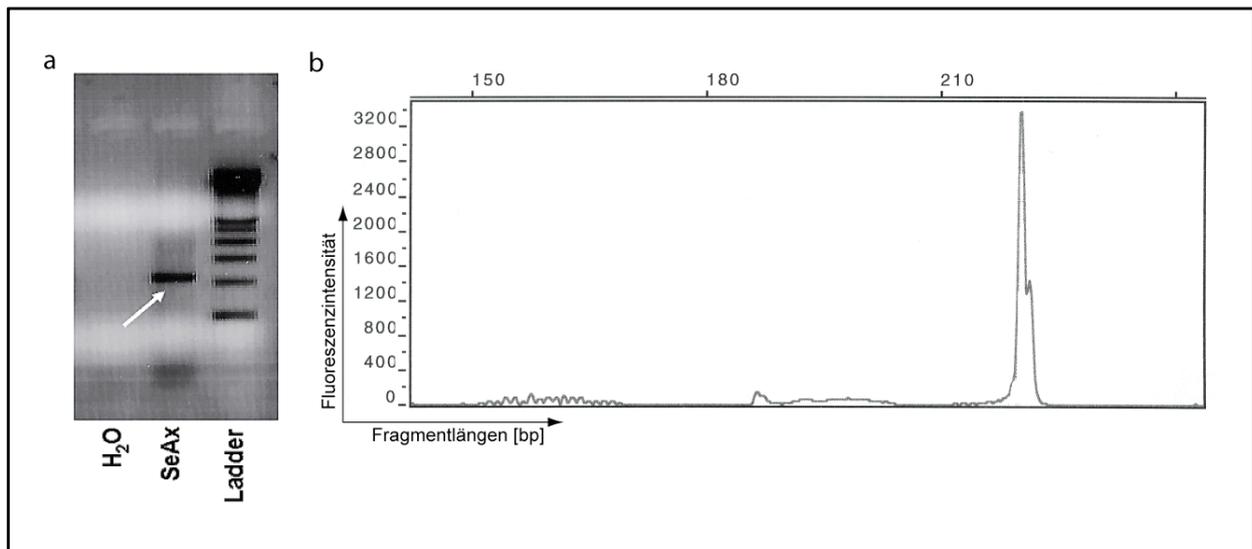
Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu zeigen, ob bei Patienten mit kutanen CD30<sup>+</sup> lymphoproliferativen Erkrankungen das periphere Blut das Reservoir des malignen T-Zell-Klons darstellt. Aufgrund des charakteristischen Merkmals der spontanen klinischen Abheilung einzelner Hautveränderungen wurde ein besonderes Augenmerk auf die Entität der Lymphomatoiden Papulose gelegt. In vorangegangenen Studien konnte anhand der TCR-Genumlagerungen klonale T-Zellpopulationen in den Hautläsionen bereits identifiziert werden. Auch in anatomisch und zeitlich unterschiedlich entnommenen Hautproben zeigten sich identische TCR-Genumlagerungen und auch nach einer mehrere Jahre andauernden Phase der klinischen Remission konnte in neu aufgetretenen Hautveränderungen der ursprünglich nachgewiesene T-Zell-Klon erneut detektiert werden. Daraus ist zu folgern, dass die klonale T-Zellpopulation im Körper persistiert. In welchem Kompartiment die Zellen verbleiben, ist jedoch bisher noch ungeklärt.

Der Klonalitätsnachweis erfolgte dabei mittels TCR- $\gamma$ -PCR und Genscan Analyse. Zur PCR-Analyse des TCR- $\gamma$ -Gensegments wurde das Biomed-2 Primerset und Protokoll ausgewählt, weil es eine besonders hohe und genau Erkennungsrate der TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen verspricht (van Dongen et al. 2003). Es handelt es sich bei diesem Primerset erstmals um ein standardisiertes Verfahren zur Erkennung der Genumlagerungen und ermöglicht daher zum ersten Mal eine Vergleichbarkeit der Klonalitätsdiagnostik unterschiedlicher Institute. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Spezifität und Sensitivität der beiden familienspezifischen TCR- $\gamma$ -PCR Tubes A und B sowie der Genescan Analyse bestimmt.

### 5.1 *Bestimmung der Spezifität der Biomed-2 TCR- $\gamma$ -PCR*

Um die Spezifität der Biomed-2 TCR- $\gamma$ -PCR zu überprüfen, wurden die klonalen T-Zelllinien SeAx und MyLa analysiert. Zunächst wurden die PCR-Amplifikate durch die Gelelektrophorese auf einem 2 % Agarosegel verifiziert. Hierbei zeichneten sich die T-Zelllinien durch eine solitäre, scharf begrenzte Bande ab (siehe Pfeil Abb. 9a). Diese scharf begrenzte Bande entsteht dadurch, dass alle T-Zellen der T-Zelllinie die identische TCR-Genumlagerung besitzen und somit alle PCR-Amplifikate identisch sind. Die Amplifikate verfügen somit über dieselben elektrophoretischen Eigenschaften

(Fragmentgröße und Ladung) und wandern daher in einem bestimmten Zeitintervall identisch weit im Gel, was schließlich als singuläre Bande in Erscheinung tritt. Mit der Genescan Analyse zeichnet sich die monoklonale T-Zellpopulation als solitärer Peak ohne signifikanten Hintergrund ab (Abb. 9b). In ähnlicher Weise kommen auch T-Zell-Lymphome oder T-Zell-Leukämien mit einem hohen Tumorzellgehalt zur Darstellung, wie z. B. das Sézary Syndrom.



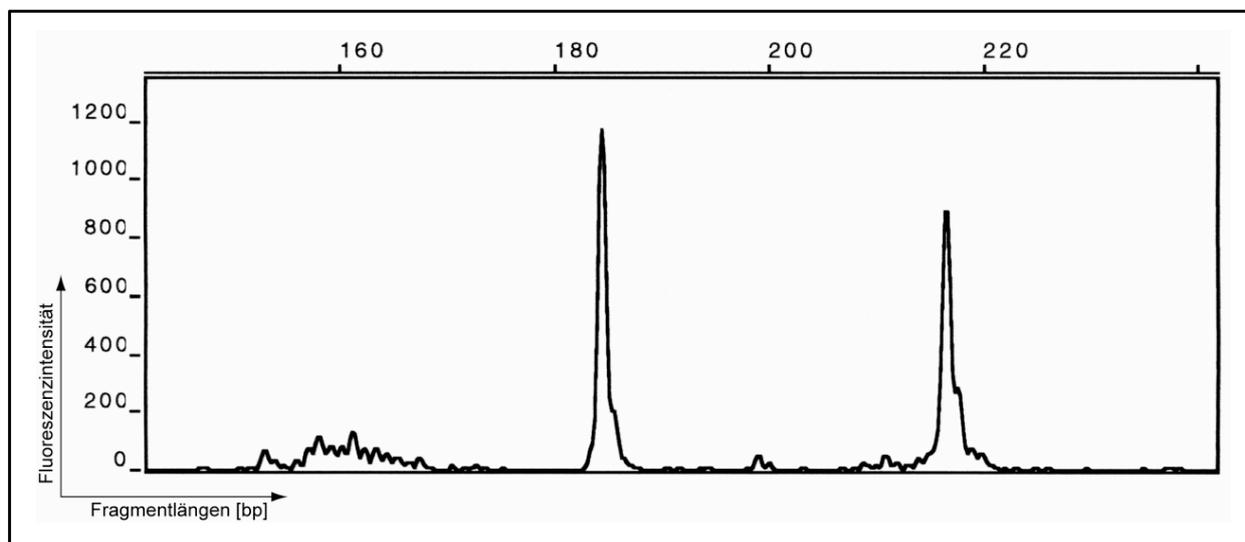
**Abb. 9: Gelelektrophorese (a) und Genescan Profil (b) der klonalen T-Zelllinie SeAx.**

**a:** Solitäre, scharf begrenzte Bande in der Gelelektrophorese als Beispiel einer monoklonalen T-Zellpopulation (Pfeil). Links: fehlende Amplifizierung eines PCR-Produktes als Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O. Rechts: Größenstandard (DNA-Ladder) zur Abschätzung der Amplifikatgrößen. **b:** Solitärer Peak im Genescan Profil ohne signifikanten Hintergrund als Beispiel einer monoklonalen T-Zellpopulation mit einer Fragmentlänge von 219 bp. Die graphische Darstellung entsteht aus der Funktion der PCR-Fragmentlänge in bp (X-Achse) und der Fluoreszenzintensität der einzelnen Fragmentgrößen als quantitatives Maß der PCR-Amplifikate (Y-Achse).

Auch das Auftreten von zwei dominanten Peaks entspricht einer klonalen T-Zellproliferation. Es handelt sich hierbei um Genumlagerungen der beiden Allele eines Gens. In einem solchen Fall spricht man von einer „klonalen biallelischen Genumlagerung“ (Abb. 10) (Simon et al. 1998, Lukowsky 2003).

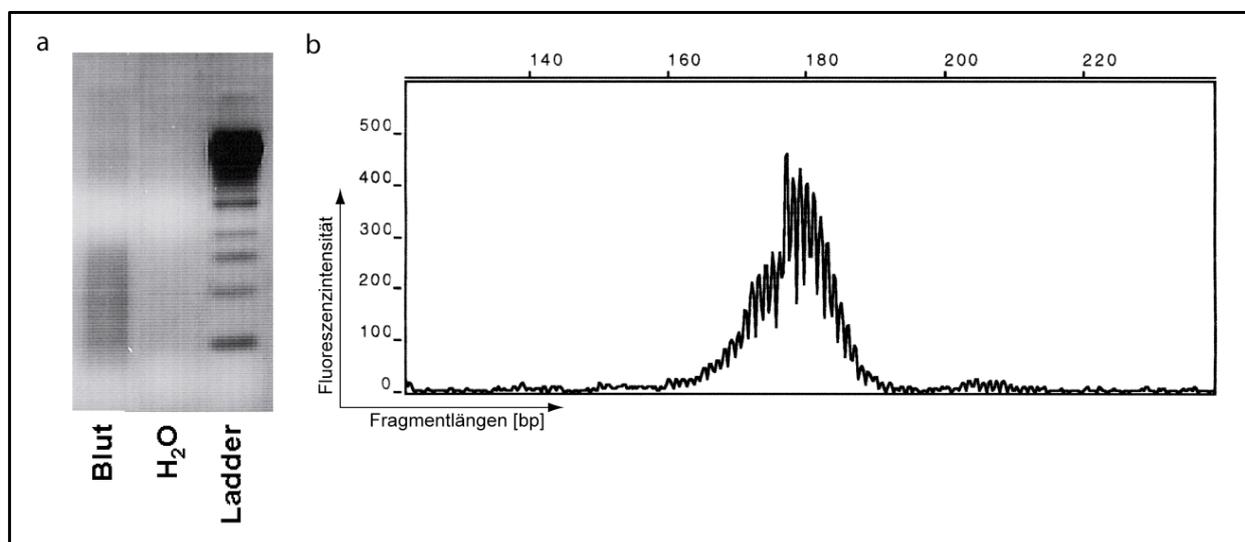
Die Analyse des Blutes gesunder Probanden unter 30 Jahren ergab in der Regel einen streifenförmigen Bandenschmier in der Gelelektrophorese, was auf die Amplifizierung vieler unterschiedlicher PCR-Fragmentlängen verweist, die wiederum alle unterschiedlich weit im Agarosegel wandern (Abb. 11a). Ein solches Muster bezeichnet man als „polyklonal“.

In der Genescan Methode zeichnen sich die unterschiedlichen PCR-Fragmentlängen der polyklonalen T-Lymphozyten durch multiple Peaks ab, die in der Regel dem Verteilungsmuster einer Gauß'schen Normalverteilungskurve stark ähneln (Abb. 11b).



**Abb. 10: Genescan Analyse einer Hautläsion eines kutanen T-Zell Lymphoms.**

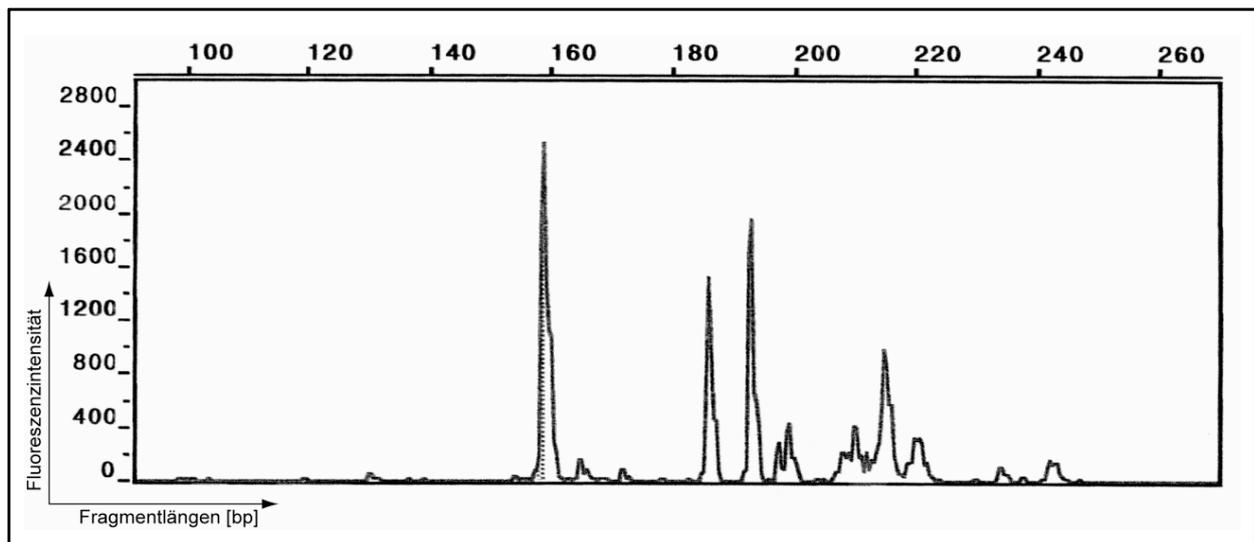
Dargestellt sind zwei dominante Peaks mit Fragmentlängen von 183 bp und 217 bp entsprechend einer klonalen biallelischen Genumlagerung. X-Achse: PCR-Fragmentlängen/ bp. Y-Achse: Fluoreszenzintensität.



**Abb. 11: Gelelektrophorese (a) und Genscanprofil (b) aus PBMC eines gesunden Probanden.**

a: Breiter Schmier als Beispiel einer polyklonalen T-Zellpopulation (links). Mitte: fehlende Amplifizierung eines PCR-Produktes als Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O. Rechts: Größenstandard (Ladder) zur Abschätzung der Amplifikatgrößen. b: Genescan Profil einer polyklonalen T-Zellpopulation. Das Genescan Profil ähnelt dem Bild einer „Gauß'schen Verteilungskurve“ mit einer Fragmentlängenverteilung zwischen ca. 163 bp und 190 bp. X-Achse: PCR-Fragmentlängen/ bp. Y-Achse: Fluoreszenzintensität.

Des Weiteren zeigten sich bei der Analyse des Blutes von vier Patienten Genescan Bilder mit mehreren (drei bis fünf) dominanten Peaks. Die Bedeutung eines solchen „oligoklonalen Bildes“ im Zusammenhang mit kutanen Lymphomen ist bisher noch nicht eindeutig geklärt (Abb. 12). Um falsch positiven Ergebnissen entgegenzuwirken, wurden oligoklonale Profile in der vorliegenden Arbeit als „nicht klonal“ gewertet. In Abhängigkeit von der Dominanz der T-Zell-Klone waren die oligoklonalen T-Zellpopulationen in der Gelelektrophorese meist durch Schmiere gekennzeichnet.

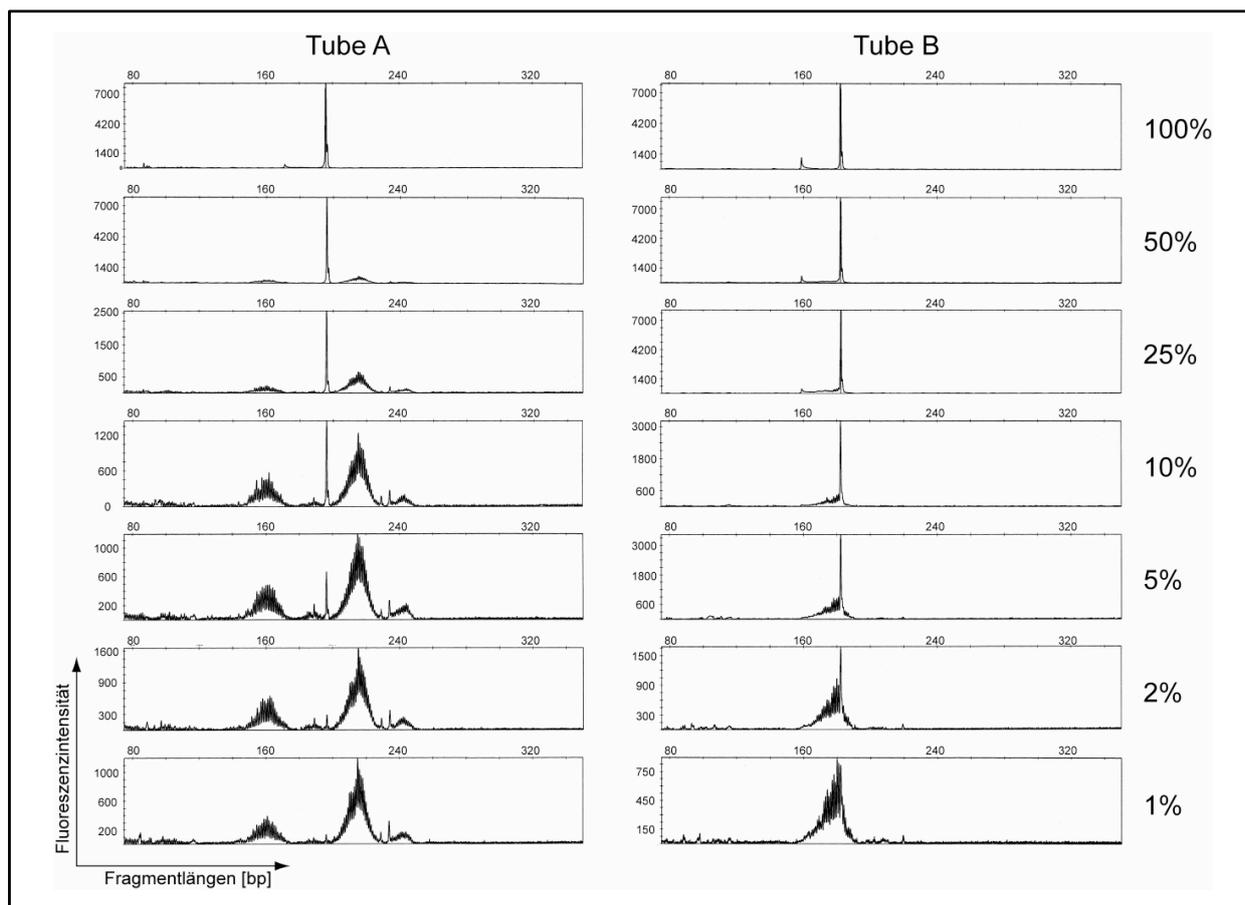


**Abb. 12: Oligoklonale TCR- $\gamma$  T-Zellpopulation im peripheren Blut von Patient 11 mit LyP.**

Zu erkennen sind vier dominante Peaks mit Fragmentlängen von 159, 185, 192 und 216 bp. X-Achse: PCR-Fragmentlängen/ bp. Y-Achse: Fluoreszenzintensität.

## 5.2 Bestimmung der Sensitivität

Die Bestimmung der Sensitivität der beiden familien-spezifischen TCR- $\gamma$ -PCR Tubes A und B sowie der Genescan Analyse erfolgte durch die Etablierung einer Verdünnungsreihe. Hierzu wurde die DNA der klonalen T-Zelllinie MyLa in absteigender Konzentration mit polyklonaler DNA aus einem Blutpool, bestehend aus zehn gesunden Probanden, verdünnt. In den PCR-Produktgemischen konnte der dominante klonale Peak bis zu einer Verdünnung von 2-5 % klonal umgelagerter T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 13). In einem Zellinfiltrat oder Zellgemisch müssen daher mindestens 2-5 % klonale Zellen vorhanden sein, um sie als solche detektieren zu können.



**Abb. 13: Verdünnungsreihe der klonalen T-Zelllinie MyLa in gepoolten PBMC von zehn gesunden Probanden (Genescan).**

Die Verdünnungsschritte erfolgten mit 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2 % und 1 % klonaler DNA. Die MyLa Zelllinie zeigt das PCR-Produkt von 196 bp in Tube A (linke Bildhälfte) und von 182 bp in Tube B (rechte Bildhälfte). X-Achse: Fragmentlänge in bp. Y-Achse: Fluoreszenzintensität.

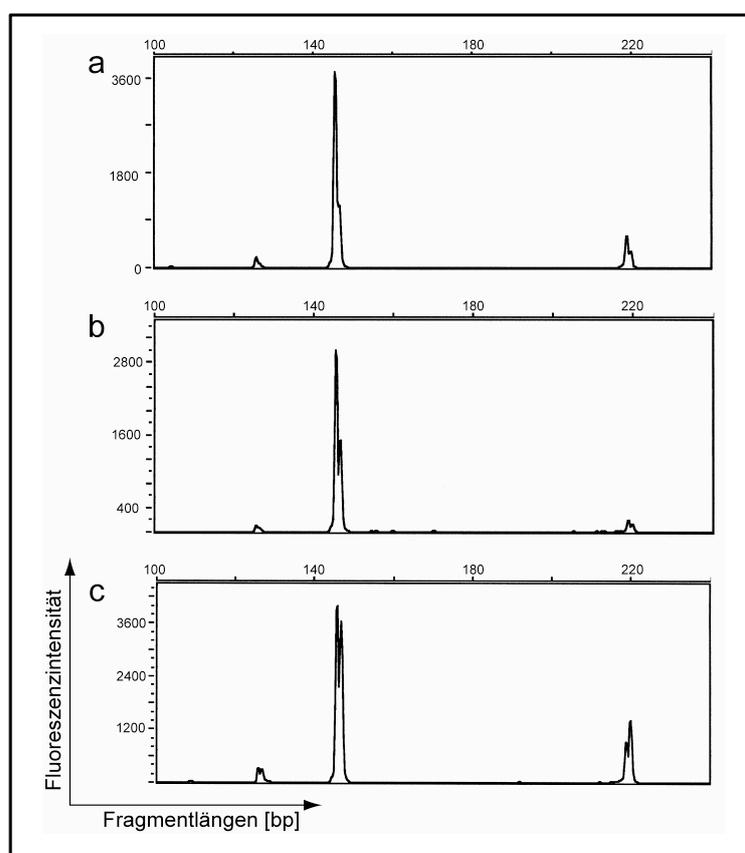
### 5.3 Klonalität in läSIONALER Haut von Patienten mit CLPD

Um das Auftreten einer klonalen T-Zellpopulation in den Hautläsionen von Patienten mit CLPD zu bestimmen, wurden die TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen an läSIONALen T-Lymphozyten von insgesamt 31 Patienten analysiert (Tabelle 3). Hierzu wurden insgesamt 43 in Paraffin eingebettete Hautbiopsien von Patienten mit LyP, cALCL und sALCL untersucht. Bei insgesamt 36 der 43 (84 %) analysierten Hautproben zeigte sich in der Genescananalyse ein dominanter Peak entsprechend einer klonalen T-Zellpopulation.

Bei den Patienten mit LyP (Pat. 1-21) konnte bezogen auf die absolute Patientenzahl bei 17 der 21 Patienten (81 %) eine klonale T-Zellpopulation nachgewiesen werden. Insgesamt wurden von den 21 Patienten 27 Hautveränderungen analysiert. In Bezug

auf die absolute Probenzahl zeigte sich in 21 der 27 Proben (78 %) eine klonale T-Zellproliferation.

Von vier der 21 Patienten mit LyP (Pat. 8, 9, 15 und 19) waren multiple (2-3) Hautproben verfügbar und bei drei dieser Patienten konnte die identische TCR- $\gamma$ -Genumlagerung – und somit der identische T-Zell-Klon – in unterschiedlichen Hautproben detektiert werden. Weiter konnte anhand dieser Patienten der identische Klon über einen Zeitraum von bis zu über drei Jahren nachgewiesen werden, was die Persistenz der klonalen T-Zellpopulation in den Hautveränderungen der LyP hervorhebt (Abb. 14).



**Abb. 14: Genescan Analyse dreier unterschiedlicher Hautläsionen (a, b und c) von Pat. 9 mit Lyp.** Die Probeentnahmen erfolgten im Januar 1999 (a), Juni 1999 (b) und Mai 2002 (c) und zeigten den identischen T-Zell-Klon in den drei Proben mit einer Fragmentlänge von 145 bp. X-Achse: Fragmentlänge in bp. Y-Achse: Fluoreszenzintensität.

Bei 6 von 7 Patienten (86 %) (Pat. 22-28) mit cALCL konnte ein dominanter T-Zell-Klon detektiert werden, bei einem Patienten (Pat. 22) zeigte sich ein polyklonales Verteilungsmuster der hautständigen T-Lymphozyten. Insgesamt wurden von den sieben Patienten zwölf Hautproben analysiert, und von diesen zeigten 92 % (elf von zwölf) klonale TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen. Von vier Patienten mit cALCL wurden

mehrere (zwei bis drei) Hautproben analysiert und bei allen vier Patienten konnte der identische T-Zell-Klon in den unterschiedlichen Proben nachgewiesen werden.

Bei den drei Patienten (Pat. 29-31) mit sekundären kutanen Manifestationen eines primär systemischen ALCL (sALCL) wurden insgesamt vier Proben untersucht. Die Genescan Analyse erbrachte in allen vier Proben (100 %) ein eindeutiges klonales TCR- $\gamma$ -Rearrangement. Von Pat. 30 waren zwei Hautbiopsien verfügbar. Beide zeigten den identischen Klon mit einer Fragmentlänge von 173 bp in Tube B. Der zeitliche Abstand der Probenentnahme lag bei ca. 3,5 Monaten.

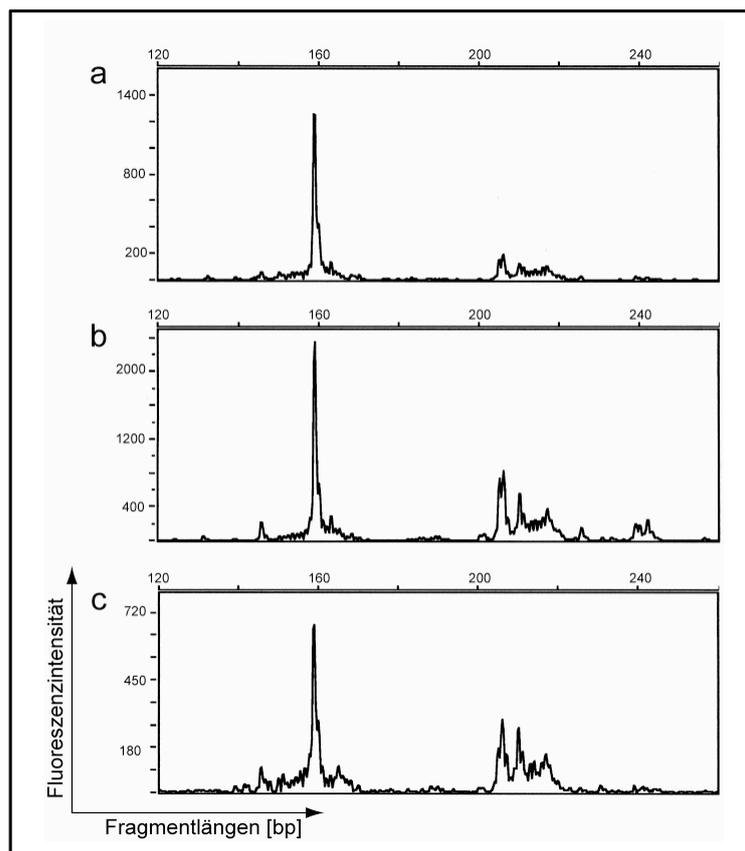
#### **5.4 Klonalität in PBMC bei Patienten mit CLPD**

Das charakteristische klinische Merkmal der LyP sowie auch gelegentlich des cALCL ist die spontane Regression der Hauttumoren. Die Spontanheilung der Hautlymphome ist jedoch oft mit dem Wiederauftreten neuer Hautveränderungen vergesellschaftet. Dieses kennzeichnende klinische Phänomen hat die Frage nach der Persistenz der klonalen T-Zellpopulation aufgeworfen. Eine mögliche Erklärung hierfür kann in der Persistenz der klonalen T-Zellen im peripheren Blut gesehen werden, von wo aus sich die malignen Lymphozyten immer wieder neu in der Haut manifestieren.

Um nach Klonalität im peripheren Blut zu suchen, haben wir genomische DNA von insgesamt 83 Blutproben auf ihre TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen untersucht (Tabelle 3).

Von den 31 Patienten hatten 29 zum Zeitpunkt der Blutentnahme mindestens eine Hautveränderung. Die übrigen zwei Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahmen in einem Stadium der klinischen Remission. Bei einem Großteil wurden zusätzliche Blutproben während der klinischen Follow-up Zeit analysiert.

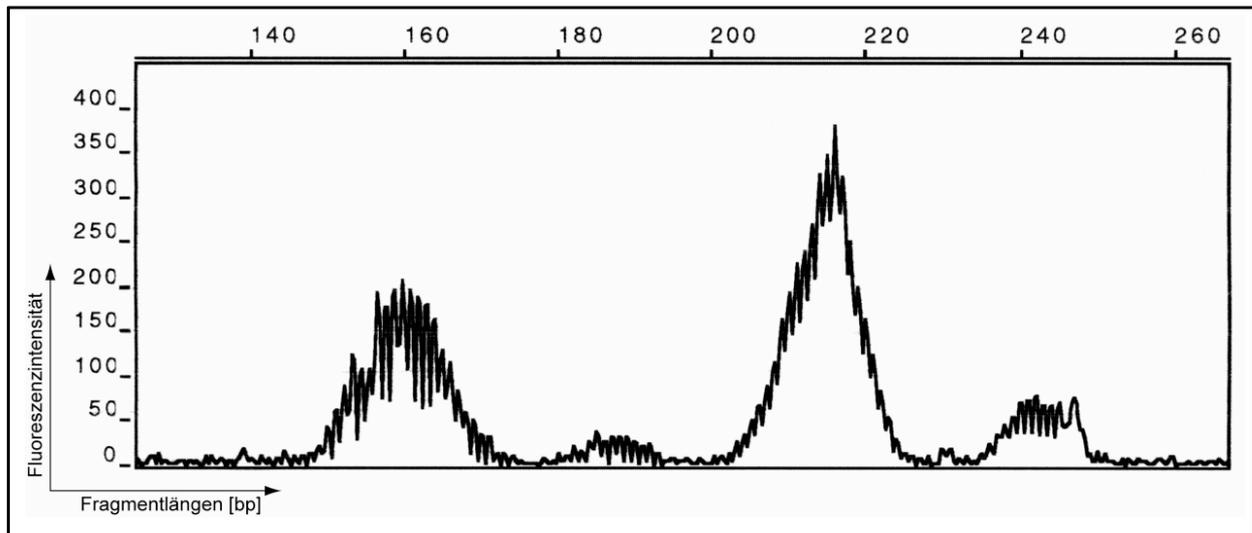
Bei den Patienten mit LyP wurden klonale PCR-Produkte bei acht der 21 (35 %) Patienten im peripheren Blut detektiert. In Bezug auf die absolute Probenzahl zeigten insgesamt 19 der 53 (36 %) analysierten Blutproben eine klonale TCR- $\gamma$ -Genumlagerung. Bei den anderen 13 Patienten konnte eine polyklonale Verteilung der analysierten PBMC aufgezeigt werden. Multiple (zwei bis fünf) Blutproben waren von insgesamt 14 Patienten mit LyP verfügbar und sechs von diesen Patienten zeigten einen identischen Klon in zwei bis vier separaten Proben. Die klonalen T-Zellpopulationen ließen sich über einen Zeitraum von 15 Monaten bis zu über drei Jahren nachweisen (Abb. 15).



**Abb. 15: Genescan Analyse (Tube A) dreier unterschiedlicher Blutproben (a, b und c) von Pat. 9 mit Lyp.**

Die Probeentnahmen erfolgten im Juni 1999 (a), März 2000 (b) und März 2003 (c) und zeigten den identischen T-Zell-Klon in den drei Proben mit einer Fragmentlänge von 159 bp. X-Achse: Fragmentlänge in bp. Y-Achse: Fluoreszenzintensität.

Die Patienten 1-4, 10, 15 und 18 mit LyP, von denen ebenfalls multiple Blutproben analysiert wurden, zeigten hingegen polyklonale Verteilungsmuster der TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen (Abb. 16). Von fünf Patienten wurden Blutentnahmen zu beiden Zeitpunkten – dem der aktiven und dem der inaktiven Phase der Erkrankung – durchgeführt. Trotz einer kompletten klinischen Remission konnte bei drei der fünf (60 %) Patienten die Persistenz des T-Zell-Klons nachgewiesen werden.



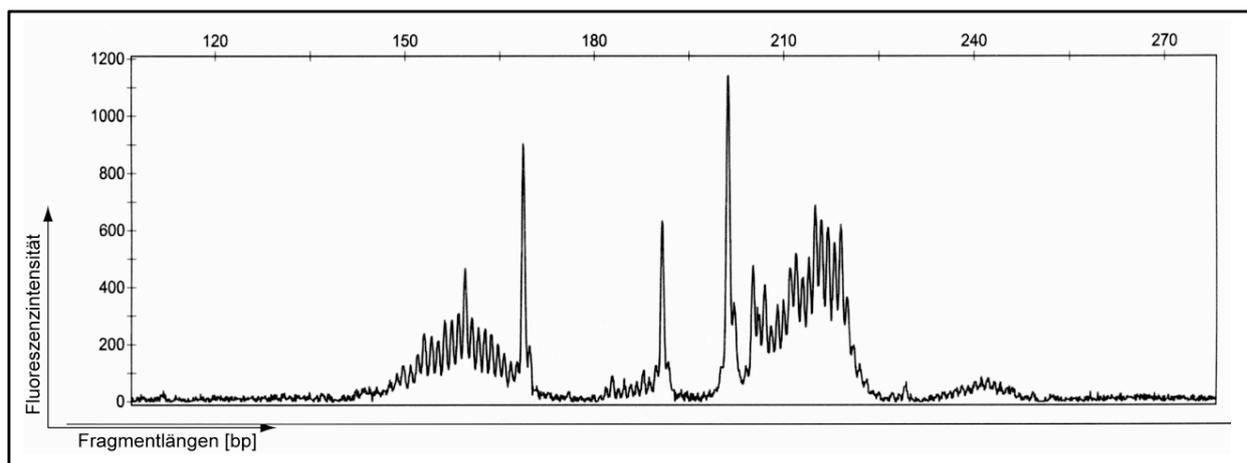
**Abb. 16: Genescan Analyse (Tube A) des peripheren Blutes von Pat. 3 mit LyP.**

Polyklonales Gauß'sches Verteilungsmuster der TCR- $\gamma$ -Genumlagerung. X-Achse: Fragmentlänge in bp. Y-Achse: Fluoreszenzintensität.

Von fünf Patienten wurden Blutentnahmen zu beiden Zeitpunkten – dem der aktiven und dem der inaktiven Phase der Erkrankung – durchgeführt. Trotz einer kompletten klinischen Remission konnte bei drei der fünf (60 %) Patienten die Persistenz des T-Zell-Klons nachgewiesen werden.

Im Hinblick auf die Entität des cALCL konnte im peripheren Blut bei sechs von sieben (86 %) Patienten ein klonales TCR- $\gamma$ -Generearrangement detektiert werden. In Bezug auf die absolute Probenzahl zeigten 16 der insgesamt 27 (59 %) Blutproben einen dominanten T-Zell-Klon. Die Untersuchung mehrerer (drei bis sechs) Proben war bei sechs von sieben Patienten mit cALCL möglich, und vier dieser sechs Patienten demonstrierten identische TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen in unterschiedlichen Blutproben. Auch hier konnte die Persistenz des Klons über ein Intervall von 14 Monaten bis hin zu über 3 Jahren nachgewiesen werden.

Bei den drei Patienten mit der systemischen Form des ALCL (sALCL) war von jedem Patienten jeweils eine Blutprobe verfügbar. In keinem Fall konnte eine klonale T-Zellpopulation detektiert werden, jedoch zeigten sich bei zwei Patienten (Pat. 29 und 30) oligoklonale Verteilungsmuster der TCR- $\gamma$ -Genumlagerung, wie exemplarisch für Pat. 29 dargestellt (Abb. 17).

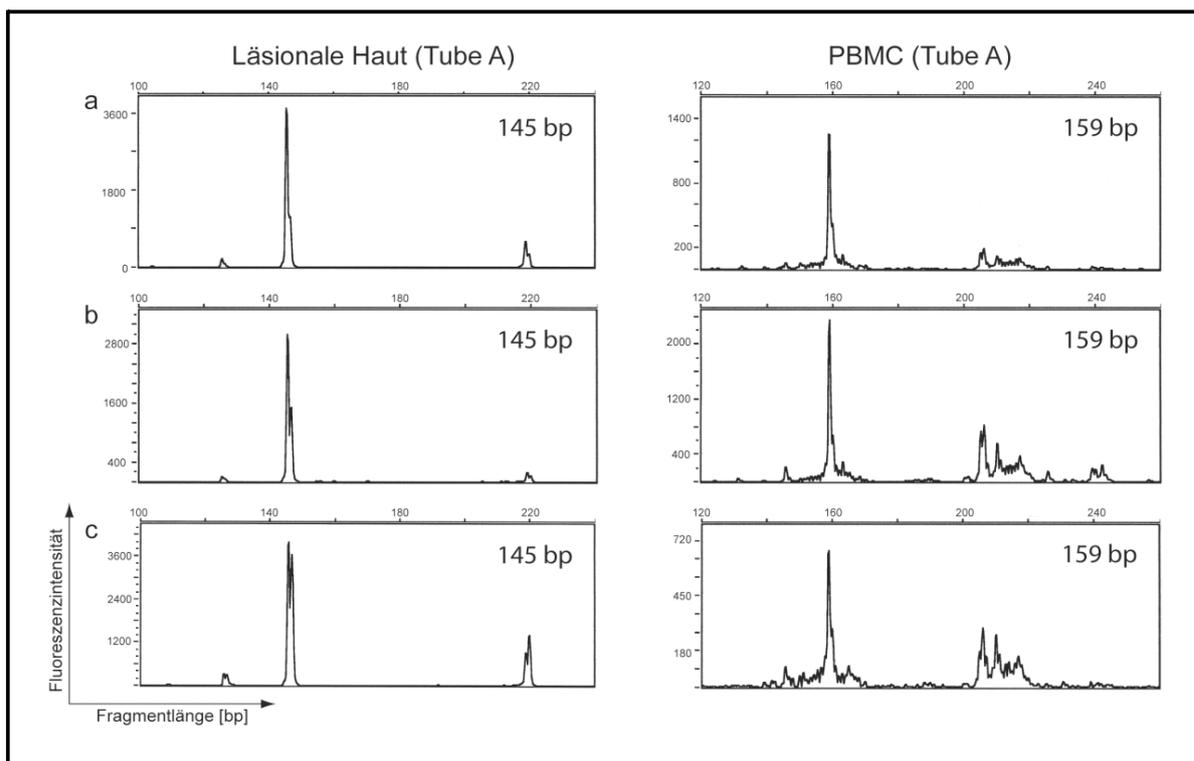


**Abb. 17: Genescan Analyse (Tube A) des peripheren Blutes von Pat. 29 mit sALCL.**

Oligoklonales Verteilungsmuster der TCR- $\gamma$ -Genumlagerung mit Peaks bei 169, 192 und 199 bp vor einem polyklonalen Hintergrund. X-Achse: Fragmentlänge in bp. Y-Achse: Fluoreszenzintensität.

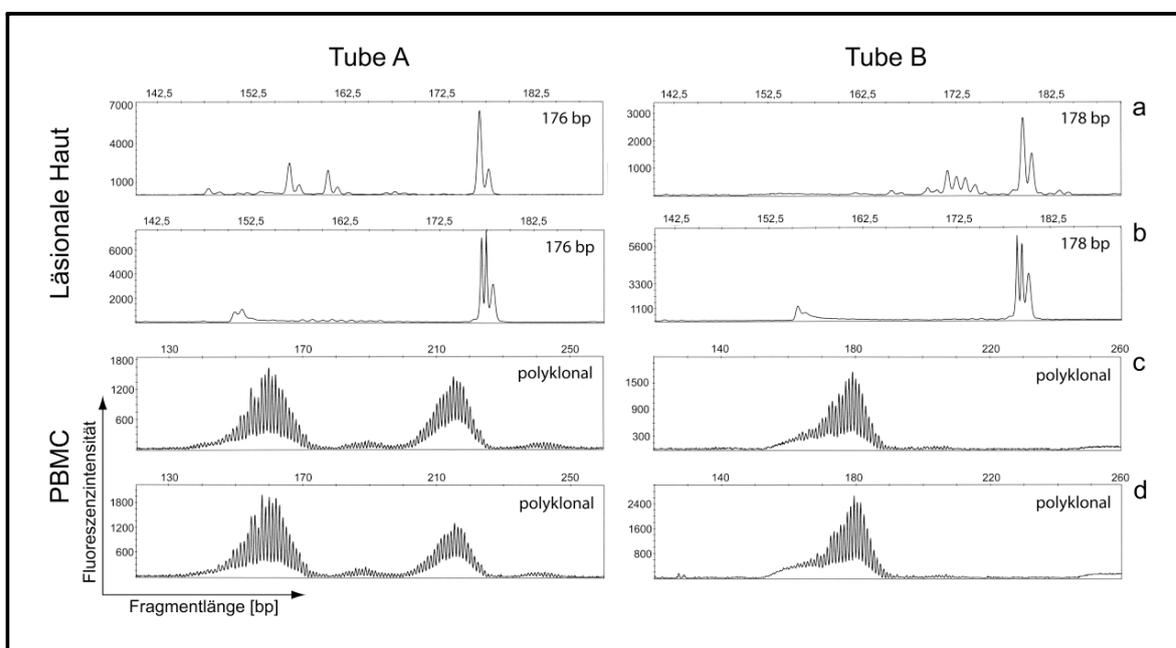
### **5.5 Vergleich der klonalen PBMC- und Hautproben von Patienten mit CLPD**

Der Vergleich der klonalen T-Zellproliferation aus der läsionalen Haut und den korrespondierenden PBMC zeigte anhand der Genescan Daten bei allen 31 Patienten mit CLPD eine unterschiedliche TCR- $\gamma$ -Genumlagerung. Bei keinem Patienten gelang der Nachweis eines identischen T-Zell-Klons in der Haut und im peripheren Blut. Dabei konnten die unterschiedlichen klonalen T-Zellpopulationen in beiden Kompartimenten zum Teil über mehrere Jahre bei den einzelnen Patienten nachverfolgt werden (Abb. 18). 15 von 31 (48 %) Patienten zeigten Klonalität nur in der vom Lymphom befallenen „läsionalen“ Haut und drei von 31 (10 %) Patienten nur im Blutkompartiment (Abb. 19).



**Abb. 18: Vergleich der klonalen T-Zellpopulationen aus läSIONALER Haut und dem peripheren Blut von Pat. 9 mit LyP (Tube A).**

**Links:** Hautproben. Die Entnahmen erfolgten 01.1999 (a), 06.1999 (b) und 03.2002 (c) und zeigten einen Klon mit der identischen Fragmentgröße von 145 bp. **Rechts:** Klonalität von drei unterschiedlichen Blutproben mit einer Fragmentlänge von 159 bp. Die Blutentnahmen erfolgten 06.1999 (a), 03.2000 (b) und 03.2003 (c). X-Achse: Fragmentlänge in bp. Y-Achse: Fluoreszenzintensität.



**Abb. 19: Klonalitätsvergleich aus der läSIONALEN Haut und dem peripheren Blut von Pat. 15 mit LyP (Tube A).**

Identischer Klon in zwei separaten HautläSIONEN mit 176 bp in Tube A und 178 bp in Tube B (a+b). Polyklonales Verteilungsprofil in zwei separaten Blutproben (c+d). X-Achse: Fragmentlänge in bp. Y-Achse: Fluoreszenzintensität.

## 5.6 Zusammenfassende Ergebnisse und Darstellung der Klonalitätsanalyse aus der läsionalen Haut und dem peripheren Blut bei Patienten mit CLPD.

Insgesamt konnten bei 26 von 31 (84 %) Patienten mit CLPD klonale T-Zellen in den Hautbiopsien nachgewiesen werden (17/21 (81 %) LyP, 6/7 (86 %) cALCL, 3/3 (100 %) sALCL). Des Weiteren gelang bei 14 der 31 (45 %) Patienten der Klonalitätsnachweis im peripheren Blut (8/21 (38 %) LyP, 6/7 (86 %) cALCL, 0/3 (0 %) sALCL) (

Tabelle 8). Jedoch konnte in keinem Fall der identische T-Zell-Klon im Haut- und im peripheren Blutkompartiment nachgewiesen werden. Eine ausführliche Auflistung der detektierten PCR-Fragmentlängen des peripheren Blutes sowie läsionaler Haut in Bezug auf jeden Patienten ist in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 8: Vergleich der Proben mit Klonalität in der Haut und im peripheren Blut in Bezug auf die Entitäten LyP, cALCL und sALCL**

Entität	TCR- $\gamma$ -Klonalität		Ident. Klon Blut/Haut
	Haut	Blut	
LyP	21/27 (78 %)	19/53 (36 %)	0
cALCL	11/12 (92 %)	16/27 (59 %)	0
sALCL	4/4 (100 %)	0/3 (0 %)	0
Total	36/43 (84 %)	35/83 (42 %)	0

Tabelle 9: Patienten- und Probenübersicht

Pat.	Entität	Anz. der Proben mit Klonalität in Haut	Ges. Anzahl untersuchter Hautproben	PCR-Fragmentgröße in bp (Haut)	Anz. der Proben mit Klonalität in PBMC	Ges. Anzahl untersuchter Blutproben	PCR-Fragmentgröße in bp (Blut)
1	LyP, Typ A	0	1	/	0 (5 oligo)	5	/
2	LyP, Typ A	1	1	216, 252 (A)	0	5	/
3	LyP, Typ A	1	1	114(B)	0	3	/
4	LyP, Typ A	0	1	/	0	3	/
5	LyP, Typ A	1	1	103(B)	0	1	/
6	LyP, Typ A	0	1	/	2	5	155 (A)
7	LyP, Typ A	0	1	/	1	2	107(B)
8	LyP, Typ A	2	3	184,216(A)	3	3	186(B)
9	LyP, Typ A	3	3	145(A)	3	3	159(A) 112(B)
10	LyP, Typ A	1	1	160,209(A)	0	4	/
11	LyP, Typ A	1	1	241(A) 178(B)	0 (1 oligo)	1	/
12	LyP, Typ A	1	1	218(A) 184(B)	0	1	/
13	LyP, Typ A	1	1	177(B)	4	4	174(A)
14	LyP, Typ A	1	1	182(B)	0	1	/
15	LyP, Typ A	2	2	176(A) 178(B)	0	2	/
16	LyP, Typ A	1	1	202,237(A)	2	2	208(B)
17	LyP, Typ A	1	1	215,229(A)	1	1	150(A)
18	LyP, Typ A	1	1	216,156(A)	0	2	/
19	LyP, Typ B	1	2	215(A) 161(B)	3	3	244(A)
20	LyP, Typ C	1	1	216,219(A)	0	1	/
21	LyP, Typ C	1	1	236(A)	0	1	/
22	cALCL	0	1	/	2	3	142 (B)
23	cALCL	3	3	157(A)	2	5	152(A)
24	cALCL	1	1	162,212(A)	6	6	210,247(A)
25	cALCL	1	1	215(A) 180(B)	0	1	/
26	cALCL	2	2	155(A) 194(B)	1	5	218(A) 110,117(B)
27	cALCL	2	2	215(A) *	4	4	243(A) 157(B) in 3/4
28	cALCL	2	2	151(A)	1	3	159(B)
29	sALCL	1	1	159(A)	0 (1 oligo)	1	/
30	sALCL	2	2	173(B)	0 (1 oligo)	1	/
31	sALCL	1	1	241(A)	0	1	/

(A): Genumlagerung in Tube A, (B): Genumlagerung in Tube B, oligo: oligoklonale Genumlagerung, \*: identischer Klon in Tube A (215 bp); unterschiedliche Klone in Tube B (einer mit 100 bp und der andere mit 161 bp).

### 5.7 Altersverteilung der Patienten mit bzw. ohne klonale T-Zellpopulationen im peripheren Blut

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine physiologische und altersabhängige Expansion klonaler T-Zellproliferationen im peripheren Blut existiert. Es wurde dargelegt, dass bei gesunden Individuen, gehäuft ab dem 65. Lebensjahr, nicht-maligne dominante T-Zellproliferationen im peripheren Blut in Erscheinung treten können (Muche et al. 2003, Schwab et al. 1997, Posnett et al. 1994, Vallejo 2007).

Basierend auf diesen Daten wurde das durchschnittliche Alter des Patientenkollektivs mit klonalen und polyklonalen TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen im peripheren Blut analysiert. Das Alter der Patienten wurde dabei auf das Datum der Blutentnahme zurückgerechnet.

In Bezug auf Patienten, die an LyP erkrankt waren und eine polyklonale TCR- $\gamma$ -Verteilung aufwiesen, zeigte sich ein durchschnittliches Alter von 38 Jahren (Altersbereich: 13-88 Jahre, n=13). Im Gegensatz dazu lag bei den Patienten mit LyP und einer klonalen TCR- $\gamma$ -Genumlagerung ein Durchschnittsalter von 52 Jahren (Altersbereich: 30-70 Jahre, n=8) vor.

Bei den sechs Patienten mit cALCL, bei denen eine klonale T-Zellproliferation im peripheren Blut detektiert wurde, konnte ein durchschnittliches Alter von 50 Jahren (Altersbereich: 23-77 Jahre, n=6) berechnet werden. Ein Patient mit cALCL, der ein polyklonales Verteilungsmuster bei der Genescan Analyse des peripheren Blutes zeigte, war 14 Jahre alt.

Die Daten zeigen, dass bei den Patienten mit CLPD klonale T-Zellpopulationen viel früher im peripheren Blut in Erscheinung treten, als dies bei gesunden, älteren Probanden aus physiologischer Sicht zu erwarten wäre. Eine Zusammenfassung der Altersverteilung im Hinblick auf ein klonales bzw. polyklonales Verteilungsmuster der TCR- $\gamma$ -Genumlagerung im peripheren Blut zeigt Tabelle 10.

**Tabelle 10: Altersverteilung der Patienten mit CLPD in Bezug auf die Klonalitätsdetektion in PBMC.**

Entität	klonal	polyklonal
LyP	Ø52J (range: 30-70 J, n=8)	Ø38 J (range 13-88 J, n=13)
cALCL	Ø50J (range: 23-77 J, n=6)	14 J (n=1)

## **5.8 TCR-Repertoireveränderungen der peripheren Blutlymphozyten bei Patienten mit CLPD**

Mit der Genescan Analyse konnte in dieser Arbeit bei 42 % der insgesamt 83 untersuchten peripheren Blutproben Klonalität aufgezeigt werden. Anhand des Vergleiches der Blutproben mit der Klonalität der korrespondierenden Hautproben eines jeden Patienten konnte weiterhin belegt werden, dass es sich bei den klonalen T-Zellproliferationen des peripheren Blutes nicht um die malignen T-Lymphozyten der

Hauttumoren handelt. Aufgrund der hohen Detektionsrate einer solchen unspezifischen klonalen T-Zellpopulation wurde zur weiteren Charakterisierung der peripheren Blut T-Lymphozyten bei elf Patienten eine CDR3-Größen Analyse veranlasst. Das sog. CDR3-Spectratyping findet im Gegensatz zur Genescan Methode auf mRNA-Ebene statt, sodass die PBMC nur in dafür geeignetem Nährmedium eingefroren und versendet werden konnten. Insgesamt war geeignetes Material (PBMC in DMSO) von elf Patienten (1, 2, 5, 8, 12, 14, 15, 19, 22, 23, 24) im dermatologischen Institut verfügbar. Da in der Charité – Universitätsmedizin Berlin dieses Verfahren nicht angewandt wird, wurde TcLand (Nantes, France) mit der Analyse beauftragt.

Das CDR3-Spectratyping ermöglicht es, Veränderungen der TCR-Repertoire Vielfalt aufzuzeigen, indem das Verhältnis des T-Zell-Klons zu den übrigen T-Lymphozyten analysiert wird. Durch das TcLandscape Verfahren werden die CDR3-Regionen aller 24 verschiedenen V $\beta$ -Familien auf einem Graphen dreidimensional visualisiert, sodass ein Überblick über das gesamte TCR-Repertoire entsteht.

Hierfür wurden zunächst 26 verschiedene TCR-V $\beta$ -Kettengene im Hinblick auf ihre quantitativen und qualitativen Daten analysiert. In einem zweiten Schritt wurden die qualitativen und quantitativen Daten schließlich fusioniert, was in den TcLandscape Histogrammen zum Ausdruck kommt.

### **5.8.1 Ergebnisse der CDR3-Spectratyping Analyse**

Insgesamt wurden PBMC von elf Patienten (1, 2, 5, 8, 12, 14, 15, 19, 22, 23, 24) zur CDR3-Spectratypinganalyse versandt. Die Analyse der Probe von Patient 19 konnte aufgrund einer zu niedrigen Menge intakter RNA (unter  $3 \times 10^7$  PBMC) nicht durchgeführt werden.

### **5.8.2 Quantitative Daten**

Die quantitativen Daten repräsentieren die mengenmäßige Bemessung der PCR-Amplifikate für jede der 26 TCR-V $\beta$ Kettengene und werden in cDNA Kopien oder den sog. quantitativen Ratio-V $\beta$ /HPRT bemessen. Sie stellen später die Höhe der Peaks im TcLandscape Histogramm dar.

Insgesamt konnten in den PBMC von sieben der zehn Patienten (1, 2, 5, 8, 14, 15, 24) akkumulierte V $\beta$ -Amplifikate gefunden werden (V $\beta$ 2 in Probe 8 und in einem etwas

geringeren Ausmaß bei den Patienten 5, 14 und 24; V $\beta$ 5.1 bei den Patienten 14, 15 und 24; V $\beta$ 6.4 bei Patient 1; V $\beta$ 6.5 bei Patient 5; V $\beta$ 13.1 bei den Patienten 2, 5, 14, 15 und V $\beta$ 17 bei Patient 24). Im Vergleich dazu waren anderen V $\beta$ -Familien (V $\beta$ 13.5, V $\beta$ 15, V $\beta$ 23 und V $\beta$ 24) in den meisten Proben nur sehr schwach repräsentiert (

Tabelle 11 und Tabelle 12).

**Tabelle 11: Anzahl der V $\beta$ -familienspezifischen Amplifikate in cDNA Kopien.**

V $\beta$ Familie	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 5	Pat. 8	Pat. 12	Pat. 14	Pat. 15	Pat. 22	Pat. 23	Pat. 24
V $\beta$ 1	4082	29492	24396	762	7646	16451	18897	8903	4521	7372
V $\beta$ 2	27618	49875	73426	61181	26242	53216	62081	16692	8105	20476
V $\beta$ 3	20626	33145	46705	757	13052	10464	22514	14321	5966	16212
V $\beta$ 4	19175	30145	48088	2432	20476	31957	31494	9657	5546	16815
V $\beta$ 5.1	21866	46028	51352	1897	18623	58561	58989	10696	14638	28644
V $\beta$ 5.2	21083	17187	35137	2432	14853	31038	31265	9243	5879	9799
V $\beta$ 6.1	23181	16094	46705	5752	19035	32427	26052	17696	9943	13025
V $\beta$ 6.4	70280	23351	35395	3116	16094	32904	27020	11012	9448	13509
V $\beta$ 6.5	32665	17956	58561	5879	24218	35654	32427	20930	11505	16571
V $\beta$ 7	15405	11846	45032	1013	14113	27618	32665	11674	6279	6143
V $\beta$ 8	19599	17696	47047	2635	18088	36710	27820	7590	8047	15861
V $\beta$ 9	5506	9517	13808	698	5007	13909	9176	2855	1640	5966
V $\beta$ 11	26823	33632	51352	1438	17696	17567	28436	15746	9176	18760
V $\beta$ 12.1	14426	11589	18220	1164	7005	13025	11093	3580	3328	5669
V $\beta$ 12.2	19743	12558	17313	2876	8225	12286	11589	4689	5879	6853
V $\beta$ 13.1	36979	55644	83732	14321	41558	68258	76154	22679	19457	22514
V $\beta$ 13.5	746	2834	2294	173	428	4723	7318	337	729	612
V $\beta$ 14	21550	19175	21237	1106	12197	17696	18760	11174	6656	6560
V $\beta$ 15	12376	2897	4023	122	921	1172	2635	1122	729	2753
V $\beta$ 16	3554	6188	8074	1513	4082	8165	6560	4142	2056	3256
V $\beta$ 17	26052	20626	34628	3426	14745	24754	29492	9311	26823	33878
V $\beta$ 18	9379	6417	11174	1480	3936	7372	8285	2344	1968	5966
V $\beta$ 21	15861	12286	14962	1676	10696	14321	12108	5347	7318	6560
V $\beta$ 22	17696	11093	18220	1427	8346	19175	29065	5506	4052	11589
V $\beta$ 23	6417	5156	7372	246	4265	5044	7108	2467	1396	2041
V $\beta$ 24	1243	3907	6656	392	2713	3936	4456	928	503	1448

Vβ Familie	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 5	Pat. 8	Pat. 12	Pat. 14	Pat. 15	Pat. 22	Pat. 23	Pat. 24
HPRT	7626	9448	9587	1968	10541	7758	6853	4456	5044	4294

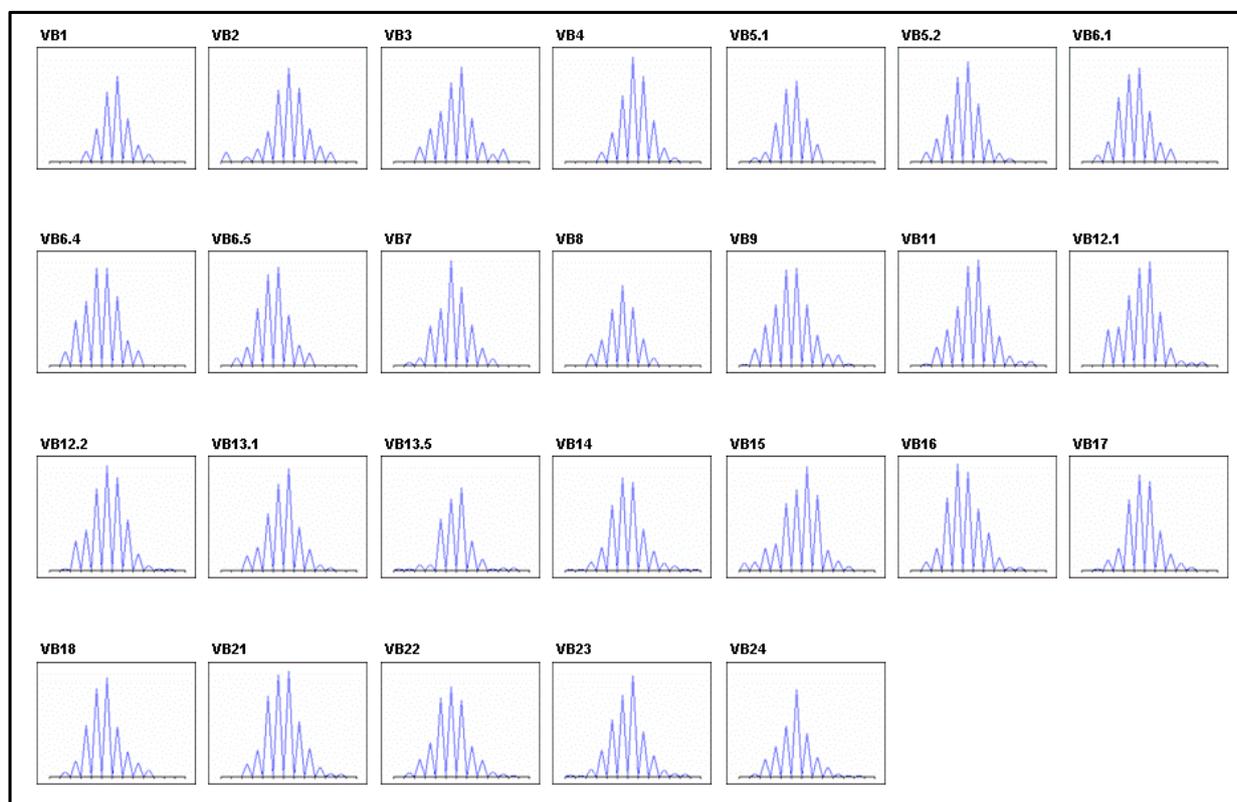
Tabelle 12: Vβ-familien-spezifische quantitative Ratios in Vβ / HPRT.

Vβ Familie	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 5	Pat. 8	Pat. 12	Pat. 14	Pat. 15	Pat. 22	Pat. 23	Pat. 24
Vβ 1	0,55	3,12	2,55	0,39	0,73	2,12	2,76	1,55	0,90	1,72
Vβ 2	3,27	5,28	7,66	31,09	2,49	6,87	9,06	3,75	1,61	4,44
Vβ 3	2,78	3,51	4,67	0,38	1,24	1,35	3,29	3,21	1,18	3,77
Vβ 4	2,58	3,19	5,02	1,24	1,94	4,12	4,60	2,17	1,10	3,91
Vβ 5.1	2,95	4,87	5,36	0,96	1,77	7,55	8,61	2,40	2,90	6,67
Vβ 5.2	2,64	1,82	3,67	1,24	1,41	4,00	4,56	2,07	1,17	2,28
Vβ 6.1	3,12	1,70	4,87	2,92	1,91	4,18	3,80	3,97	1,97	3,03
Vβ 6.4	9,46	2,47	3,69	1,58	1,53	4,24	3,94	2,47	1,87	3,14
Vβ 6.5	4,40	1,90	6,11	2,99	2,30	4,60	4,73	4,70	2,26	3,66
Vβ 7	2,07	1,25	4,70	0,25	1,34	3,56	4,77	2,62	1,25	1,43
Vβ 8	2,64	1,87	4,91	1,34	1,72	4,73	4,06	1,70	1,60	3,69
Vβ 9	0,74	1,01	1,44	0,36	0,48	1,79	1,34	0,64	0,33	1,39
Vβ 11	3,61	3,56	5,36	0,73	1,68	2,26	4,16	3,53	1,82	4,37
Vβ 12.1	1,94	1,23	1,90	0,59	0,67	1,68	1,62	0,80	0,66	1,32
Vβ 12.2	2,66	1,33	1,81	1,46	0,78	1,58	1,69	1,05	1,17	1,60
Vβ 13.1	4,98	5,89	8,73	7,28	3,94	8,80	11,11	5,09	3,86	5,24
Vβ 13.5	0,10	0,30	0,24	0,09	0,04	0,61	1,07	0,06	0,15	0,14
Vβ 14	2,90	2,03	2,22	0,56	1,16	2,26	2,74	2,51	1,32	1,53
Vβ 15	1,67	0,31	0,42	0,06	0,09	0,15	0,38	0,25	0,15	0,64
Vβ 16	0,48	0,66	0,84	0,77	0,39	1,05	0,69	0,93	0,41	0,76
Vβ 17	3,51	2,18	3,61	1,74	1,40	3,19	4,30	2,09	5,32	7,89
Vβ 18	1,26	0,68	1,17	0,75	0,37	0,95	1,21	0,53	0,39	1,39
Vβ 21	2,14	1,30	1,56	0,85	1,02	1,85	1,77	1,20	1,45	1,53
Vβ 22	2,38	1,17	1,90	0,73	0,79	2,47	4,24	1,24	0,80	2,70
Vβ 23	0,86	0,55	0,77	0,13	0,41	0,65	1,04	0,55	0,26	0,48
Vβ 24	0,17	0,41	0,69	0,20	0,26	0,51	0,65	0,21	0,10	0,34
HPRT	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

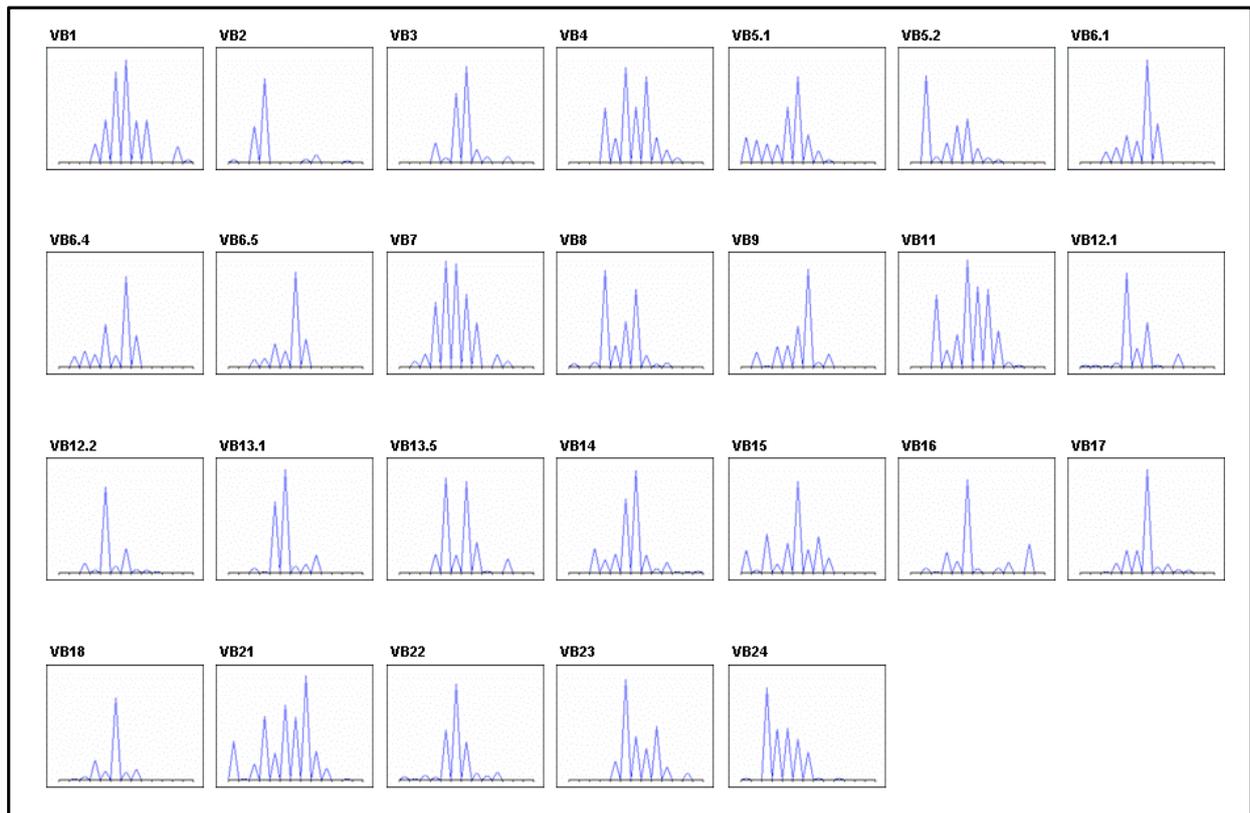
### 5.8.3 Qualitative Daten

Die qualitativen Daten werden aus den einzelnen Immunoscope-Profilen der 26 analysierten V $\beta$ -Familiengene eines jeden Patienten erstellt. Aus diesen Profilen wird schließlich der „*perturbation score*“ bzw. die „*percentage of perturbation*“ errechnet. Hierzu wurde jedes Immunoscope-Profil mit einem normalverteilten Kontrollprofil verglichen und die Differenz zwischen der Fläche unter dem Graphen des Kontrollprofils und der Fläche unter dem Graphen des Probenprofils verglichen und die prozentuale Abweichung kalkuliert (siehe 4.8.4).

Bei der Analyse unserer Patienten konnte eine veränderte CDR3-Längenverteilung für die meisten V $\beta$ -Familien von Patient 1 und 8 beobachtet werden. Weniger stark ausgeprägt war die Verschiebung der CDR3-Längenverteilung bei den Patienten 22 und 23. Die übrigen Patienten zeigten in den meisten V $\beta$ -Familien eine nahezu Gauß'sche Normalverteilung der CDR3-Längen. Aufgrund der Datenmenge sind in Abb. 20 und Abbildung 21 repräsentative Beispiele von Patient 5 mit nahezu normalverteilten CDR3-Längen sowie von Patient 8 mit einem stark veränderten TCR-Repertoire dargestellt.



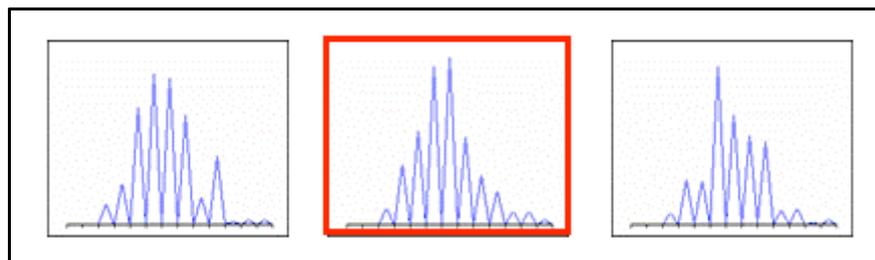
**Abb. 20: CDR3-Spectratyping Profile der 26 verschiedenen V $\beta$ -Gensegmente von Pat. 5 mit LyP.** Dargestellt ist eine nahezu Gauß'sche Verteilung der CDR3-Längen der 26 analysierten V $\beta$ -Gensegmente.



**Abb. 21: CDR3-Spectratyping Profile der 26 verschiedenen V $\beta$ -Gensegmente von Pat. 8 mit LyP.** Stark verändertes TCR-Repertoire. Zu erkennen sind starke Abweichungen der CDR3-Längenverteilungen der meisten V $\beta$ -Familien.

### 5.8.3.1 Grad der Reproduzierbarkeit

Die Immunoscope-Analyse der 26 verschiedenen V $\beta$ -Familien bzw. -Subfamilien wurde bei jedem Patienten dreimal durchgeführt, um reproduzierbare Daten zu erhalten und falsch positiven bzw. negativen Ergebnissen entgegenzuwirken. Es zeigte sich, dass alle Profile, bei denen mehr als 5000 Kopien cDNA vorhanden waren (mit Ausnahme der V $\beta$ 2-Familie bei Pat. 23), nahezu identische Reproduzierbarkeit aufzeigten. Für insgesamt sieben V $\beta$ -Familien ergab die Analyse der dreifachen Ausführung leicht unterschiedliche CDR3-Längenverteilungen (V $\beta$ 16 bei Pat.1, V $\beta$ 13.5 und V $\beta$ 23 bei Pat. 24, V $\beta$ 15 bei Pat. 14, V $\beta$ 15 bei Pat.12, V $\beta$ 2 und V $\beta$ 15 bei Pat. 23) (Tabelle 13). In diesen Fällen wurde das Profil mit der geringsten „percentage of perturbation“ (siehe unten) verwendet (Abb. 22).



**Abb. 22: Grad der Reproduzierbarkeit des Vβ23-Segments bei Patient 24 mit cALCL.**

Dargestellt sind die drei Immunoscope-Profile der Vβ23-Familie, bei denen sich geringe Unterschiede in der CDR3-Längenverteilung zeigten. Roter Rahmen: Profil mit der geringsten „percentage of perturbation“.

#### 5.8.4 Anteil des Störeinflusses „percentage of perturbation“

Um den Grad des Störeinflusses, die „percentage of perturbation“, zu ermitteln, wurde jedes Immunoscope-Profil mit einem normal verteilten Kontrollprofil verglichen. Hierzu wurde die Differenz zwischen der Fläche unter dem Graphen des Kontrollprofils und der Fläche unter dem Graphen des Probenprofils verglichen und die prozentuale Abweichung kalkuliert.

Für die Darstellung im TcLandscape Histogramm wurden diese Daten in Form einer Farbskala verschlüsselt. Liegt dabei die Fläche des Probenprofils über der des Kontrollprofils, wird dies durch einen roten Farbton codiert. Liegt die Fläche des Probenprofils unter der des Kontrollprofils, wird dies durch einen blauen Farbton visualisiert. Die Berechnung der Flächen bzw. Proportionsunterschiede von jeder CDR3-Längenklasse ermöglicht es schließlich, klonale T-Zellpopulationen zu identifizieren (Miqueu et al. 2007). Tabelle 13 fasst die Ergebnisse aller 26 analysierten Vβ-Ketten Gene zusammen.

**Tabelle 13: Percentage of perturbation aller Vβ-Familien.**

Vβ-Familie	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 5	Pat. 8	Pat. 12	Pat. 14	Pat. 15	Pat. 22	Pat. 23	Pat. 24
Vβ 1	16,33	24,09	11,99	15,75	14,30	18,22	14,27	25,99	33,54	33,80
Vβ 2	40,01	31,62	8,82	84,83	7,99	14,55	12,91	15,53	13,43	8,47
Vβ 3	14,28	12,23	10,54	35,27	8,54	31,66	12,79	9,83	26,81	9,54
Vβ 4	22,25	13,02	11,76	28,25	14,72	17,23	14,77	16,24	18,97	11,37
Vβ 5.1	14,43	18,45	11,10	23,87	11,05	12,60	10,64	11,91	24,71	14,86
Vβ 5.2	44,20	10,64	10,65	38,09	12,83	16,09	12,76	12,02	23,50	7,58
Vβ 6.1	14,80	15,00	14,17	37,48	13,52	21,89	15,57	26,40	21,29	8,90

Vβ-Familie	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 5	Pat. 8	Pat. 12	Pat. 14	Pat. 15	Pat. 22	Pat. 23	Pat. 24
Vβ 6.4	46,14	14,09	8,23	33,49	9,74	15,19	12,21	13,11	27,05	9,17
Vβ 6.5	18,08	15,47	14,97	39,67	15,64	22,46	15,55	28,95	22,09	9,50
Vβ 7	25,78	8,91	12,01	20,91	18,26	18,52	14,99	11,99	20,39	13,20
Vβ 8	27,28	16,12	16,90	35,53	14,56	18,93	17,36	13,64	20,74	18,41
Vβ 9	18,96	20,46	17,45	31,69	16,58	20,81	20,78	17,16	14,45	17,01
Vβ 11	16,54	9,79	8,71	19,64	9,90	16,67	13,67	9,63	19,78	7,45
Vβ 12.1	40,07	7,38	8,93	43,40	7,55	15,85	8,66	11,01	13,77	6,84
Vβ 12.2	26,98	8,50	9,00	50,24	8,69	16,71	9,08	16,56	16,10	6,87
Vβ 13.1	13,77	20,04	10,94	46,20	14,71	16,04	15,83	8,56	18,00	11,66
Vβ 13.5	28,31	19,14	13,60	29,71	26,98	17,53	23,78	29,08	20,82	14,92
Vβ 14	74,03	6,74	8,83	25,94	13,94	13,98	11,05	19,11	19,04	10,89
Vβ 15	73,44	11,14	10,43	32,81	10,81	16,40	11,17	26,20	13,24	39,02
Vβ 16	25,84	15,91	14,37	48,67	12,37	22,73	20,01	44,27	22,28	9,85
Vβ 17	34,50	13,67	10,28	34,27	11,41	13,86	7,57	11,90	55,18	41,32
Vβ 18	41,98	15,26	11,50	42,00	8,53	17,69	15,19	14,78	10,86	32,00
Vβ 21	25,98	13,53	14,50	26,37	10,74	22,40	15,32	16,95	23,54	8,57
Vβ 22	34,49	17,23	13,00	32,18	12,49	19,13	10,30	14,94	19,84	13,30
Vβ 23	56,99	11,41	10,43	28,83	10,46	13,39	14,27	10,77	24,89	6,05
Vβ 24	32,44	22,99	18,27	43,09	12,86	25,71	15,22	16,21	23,40	12,31

## 5.9 Ergebnisse der TCR-Repertoire Analyse

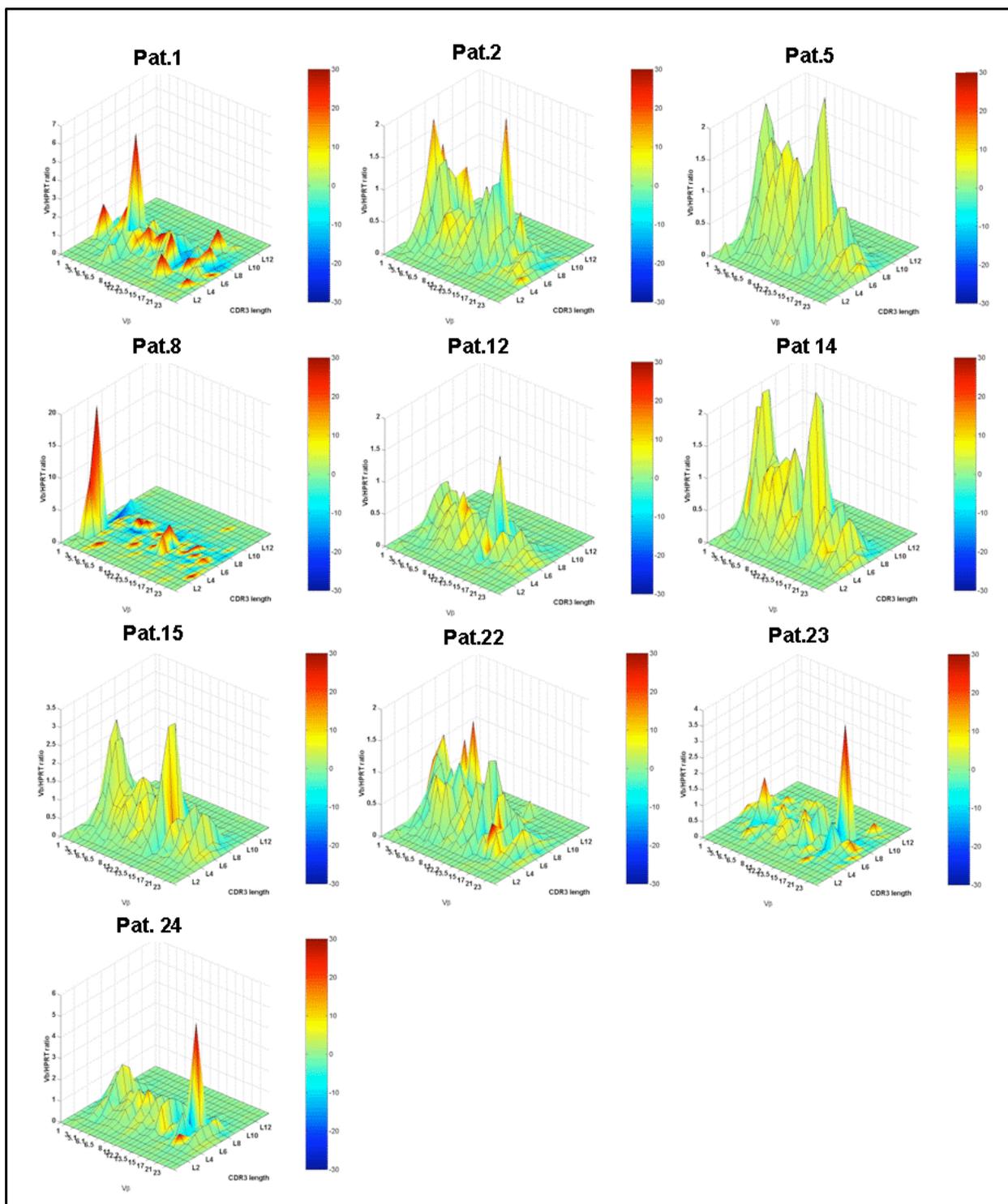
Um einen präzisen Überblick über das gesamte TCR-Repertoire zu bekommen, wurde ein neues Verfahren entwickelt, das den qualitativen Daten des CDR3-Spectratypings eine weitere quantitative Dimension hinzufügt.

Dieser neue Ansatz, bestehend aus der Kombination der qualitativen und quantitativen Daten, wird als TcLandscape Analyse bezeichnet. Die TcLandscape Methode erstellt dabei einen dreidimensionalen Graphen, der einen Überblick über das gesamte TCR-Repertoire bzw. damit über das T-Zell-Immunsystem eines Individuums ermöglicht (Pannetier et al. 1995, Miquieu et al. 2007). Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der PBMC der zehn analysierten Patienten.

Bei Patient 1 zeigte sich in der TcLandscape Analyse eine von der Gauß'schen Normalverteilung stark abweichende CDR3-Längenverteilung der meisten V $\beta$ -Familien, was durch die qualitativen Daten in Form der Farben dargestellt ist. Weiterhin zeigten sich T-Zellpopulationen, die in relativ größerer Anzahl im peripheren Blut vertreten sind (Höhe der Peaks). Anhand des Graphen sowie der quantitativen Daten ist zu erkennen, dass die Genumlagerung in der V $\beta$ 6.4-Subfamilie besonders stark vertreten ist und die T-Zellpopulation mit diesem Rearrangement möglicherweise während der Immunantwort besonders stark selektiert worden ist.

Bei den Patienten 8, 23 und 24 ist jeweils nur eine Genumlagerung besonders stark repräsentiert (bei Pat. 8 in der V $\beta$ 2-Familie und bei Pat. 23 und 24 in der V $\beta$ 17-Familie). Die T-Zellpopulationen mit dieser Genumlagerung sind unter den gesamten T-Zellen in großer Anzahl vertreten. Bei Patient 8 und 23 ist zu erkennen, dass einige V $\beta$ -Familien stark von einer normalen CDR3-Längenverteilung abweichen (rote Peaks), jedoch auf dem quantitativen Level (Y-Achse) nur schwach vertreten sind und ihnen daher möglicherweise bei der Immunantwort eher eine untergeordnete Bedeutung zukommt. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Patient 24 eine nahezu normale CDR3-Längenverteilung der übrigen T-Zellpopulationen.

Die Patienten 2, 5, 12, 14, 15 und 22 offenbarten hingegen keine starken Abweichungen von der Gauß'schen Normalverteilung, und es zeigten sich keine dominierenden T-Zellproliferationen. Zusammenfassend demonstrierten Pat. 1, 8, 23 und 24 eindeutige Veränderungen des TCR-Repertoires, die Analyse der PBMC der übrigen Patienten zeigte eine nahezu Gauß'sche Normalverteilung und damit ein ausbalanciertes TCR-Immunrepertoire.



**Abb. 23: TcLandscape Analyse aus PBMC.**

Tc Landscape Analyse von Patienten 1, 2, 5, 8, 12, 14, 15, 22, 23 und 24. X-Achse: analysierte Vβ-Familien. Y-Achse: quantitative Daten in Vβ/ HPRT. Z-Achse: CDR3-Längen in Aminosäuren. Farbcodierung: Darstellung der „percentage of perturbation“ bzw. der qualitativen Daten.

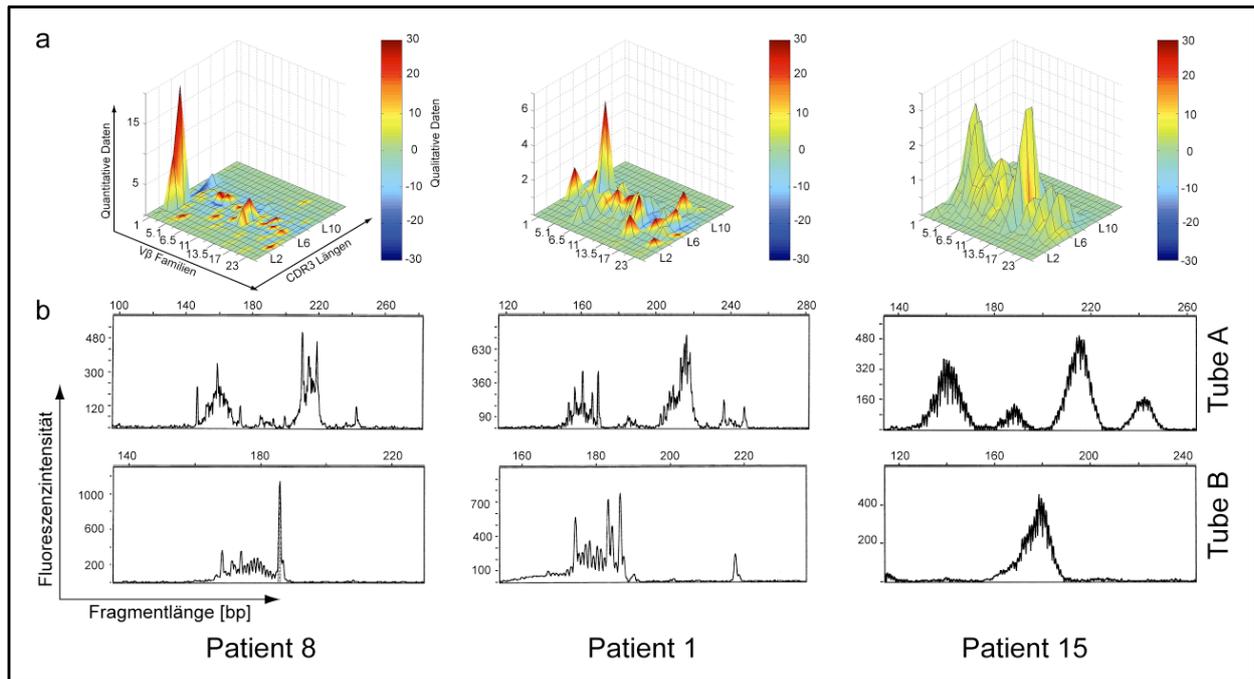
### **5.10 Vergleich der TCR- $\gamma$ -Genumlagerung mit der CDR3-Analyse der V $\beta$ -Kettentranskripte**

Bei dem Vergleich der TCR- $\gamma$ -Klonalitätsanalyse und der Immunoscopeanalyse der PBMC von Patient 8 mit LyP zeigte sich eine eindeutige monoklonale TCR- $\gamma$ -Genumlagerung mit der Genescan Methode sowie eine sehr starke Verschiebung der CDR3-Längenverteilung.

Patient 1, der ebenfalls an LyP erkrankt war, demonstrierte mehrere Peaks bei der Genescan Analyse des peripheren Blutes im Sinne einer oligoklonalen TCR-Genumlagerung, und hier zeigte sich bei der TcLandscape Analyse eine weniger stark ausgeprägte Abweichung der CDR3-Längenverteilung als bei Patient 8. Bei Patient 15 mit LyP dagegen war ein polyklonales Profil der TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen im peripheren Blut zu erkennen (Genescan). Im Gegensatz zu den Patienten 1 und 8 zeigte sich hier eine nahezu Gauß'sche CDR3-Längenverteilung in der Immunoscope/TcLandscape Analyse der PBMC (Abb. 24).

Insgesamt zeigten drei der vier untersuchten Patienten mit einer klonalen TCR- $\gamma$ -Genumlagerung eine eindeutige und ausgeprägte Abweichung der CDR3-Längenverteilungen (Pat. 8, 23 und 24). Obwohl die Analyse des PBMC von Patient 22 mit cALCL bei der Genescan Analyse Klonalität demonstrierte, zeigte sich bei der Immunoscopeanalyse eine ausgeglichene und normale CDR3-Längenverteilung. Bei allen fünf Patienten (2, 5, 12, 14, 15) mit polyklonalen TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen zeigte die Immunoscopeanalyse ein balanciertes Immunrepertoire mit nahezu normalverteilten CDR3-Längen. Wie bereits oben beschrieben, zeigte sich bei Patient 1 mit einem oligoklonalen Genescan Profil eine Verschiebung des TCR-Repertoires.

Zusammenfassend zeigte der Vergleich der beiden Methoden eine auffällige Assoziation zwischen der Stärke der Klonalität und dem Ausmaß der CDR3-Längenverschiebungen im peripheren Blut. Patienten mit einer polyklonalen TCR- $\gamma$ -Genumlagerung zeigten in der Regel eine gaußartige Verteilung des TCR-Repertoires, Patienten mit oligoklonalen TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen ein abweichendes und Patienten mit einem dominanten T-Zell-Klon ein stark verändertes TCR-Repertoire.



**Abb. 24: Korrelation der Immunoscope Analyse mit der TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen.**

Immunoscope Analyse (a) und korrespondierende Genescan Profile, Tube A und Tube B (b). Patient 8 (links) mit LyP entwickelte im klinischen Verlauf ein assoziiertes Lymphom (MF) und zeigte eine eindeutige Einschränkung des TCR-Repertoires sowie eine monoklonale TCR- $\gamma$ -Genumlagerung im peripheren Blut. Bei Patient 1 (Mitte) mit LyP zeigte sich ein oligoklonales TCR- $\gamma$ -Generearrangement und eine Verschiebung der CDR3-Längenverteilung. Patient 15 (rechts) mit LyP demonstrierte ein polyklonales Genescan Profile und eine annähernd Gauß'sche CDR3-Längenverteilung im peripheren Blut.

## 6. Diskussion

Die Lymphomatoide Papulose und das kutane anaplastische großzellige Lymphom gehören zu der Gruppe der CD30<sup>+</sup> lymphoproliferativen Erkrankungen der Haut. Diese Gruppe bildet nach der MF mit ca. 20 % die zweithäufigste Gruppe der primär kutanen Lymphome (Willemze et al. 2005). Gerade die LyP nimmt eine Sonderstellung unter den kutanen Lymphomen ein, da die einzelnen Hautläsionen typischerweise spontane Remissionen aufzeigen. Diese selbstheilende Rückbildung geht jedoch meist mit dem Auftreten neuer Hautveränderungen einher. Bereits 1968 bezeichnete Macaulay, der Erstbeschreiber dieser Entität, die LyP als eine „rhythmic paradoxical eruption“ und beschrieb sie als eine selbstheilende und gewöhnlich wieder auftretende papulöse Hauterkrankung (Macaulay 1968). Im Gegensatz zu dem klinisch gutartigen Erscheinungsbild zeigten sich mikroskopisch große atypische Zellen mit einer anaplastischen Morphologie, wie sie ursprünglich nur in hochgradig bösartigen Lymphomen beobachtet wurden. Um die Diskrepanz zwischen dem klinisch benignen und dem histologisch eher malignen Phänotyp hervorzuheben, erhielt diese neue Entität den Namen „Lymphomatoide Papulose“. Der Terminus „lymphomatoid“ charakterisierte die morphologische Ähnlichkeit der Zellen zu Lymphozyten, da eine immunhistochemische Phänotypisierung 1968 noch nicht existierte.

Trotz des eher malignen histologischen Bildes hat die LyP einen benignen klinischen Verlauf mit einer Fünfjahres-Überlebensrate von >95 %. Diese widersprüchlichen Merkmale warfen lange Zeit die Frage auf, ob es sich bei der LyP um einen reaktiv-entzündlichen Prozess oder ein niedrigmalignes Lymphom handelt. Studien der vergangenen Jahre haben jedoch inzwischen bewiesen, dass der LyP eine klonale T-Zellpopulation zugrunde liegt (Weiss et al. 1986, Davis et al. 1992, Steinhoff et al. 2002). Des Weiteren konnte der identische T-Zell-Klon in unterschiedlichen Hautläsionen detektiert werden sowie in Hautbiopsien, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen wurden (Chott et al. 1996). Sogar nach einer mehrere Jahre andauernden Phase der klinischen Remission konnte die identische klonale T-Zellpopulation wiederholt in neu auftretenden Hautveränderungen nachgewiesen werden (Chott et al. 1996).

Bei ca. 10-20 % der Patienten mit LyP wird das Auftreten von weiteren malignen kutanen Lymphomen beobachtet, wobei in einem Großteil ein gemeinsamer klonaler

Ursprung von LyP und assoziierten Lymphomen (Mf, ALCL, HD) gezeigt wurde (Davis et al. 1992, McCarty et al. 1994, Wood et al. 1995, Chott et al. 1996).

Im Gegensatz zur LyP treten die Hautläsionen des cALCL in der Regel solitär auf oder sind auf eine Körperregion beschränkt. Jedoch können auch bei dieser Entität in ca. 20 % der Fälle spontane Remissionen beobachtet werden (Beljaards et al, 1993, Willemze et al. 1997, Willemze und Meijer 2003). Im Gegensatz zu der systemischen Variante (sALCL) hat das cALCL eine ähnlich gute Prognose wie die LyP mit einer 5-JÜR von > 90 % (Bekkenk et al. 2000, Paulli et al. 1995, Gascoyne et al. 1999, Liu et al. 2003, Assaf et al. 2006).

Das Wiederauftreten des identischen T-Zell-Klons nach einer Phase der klinischen Remission zeigt, dass die klonalen T-Zellen persistieren müssen. Bisher ist es jedoch immer noch ungeklärt, in welchen Kompartimenten die klonale T-Zellpopulation persistiert. Eine mögliche Hypothese ist, dass die neoplastischen T-Zellen im peripheren Blut disseminieren und sich von dort immer wieder neu in der Haut manifestieren und dadurch neue Hautläsionen hervorrufen.

Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob der krankheitsverursachende T-Zell-Klon im peripheren Blut persistiert. Um dieser Frage nachzugehen, wurden 43 Haut- und 83 korrespondierende Blutproben von insgesamt 31 histologisch und klinisch sicher diagnostizierten Patienten auf ihre TCR-Genumlagerungen analysiert und verglichen. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Entität der LyP gelegt.

## **6.1 Methodik**

Bei Patienten mit suspekten kutanen Lymphoproliferationen kann in vielen Fällen durch die gemeinsame Evaluation des klinischen und histopathologischen Bildes eine sichere Diagnose bezüglich der Dignität und Entität der Hauterscheinung gestellt werden. Das große und zum Teil überlappende klinische und histologische Spektrum der kutanen lymphoproliferativen Erkrankungen erschwert jedoch die Diagnose, so dass in 5-10 % der Fälle nicht immer sicher zwischen malignen CTCL und benignen lymphoproliferativ-inflammatorischen Hauterkrankungen unterschieden werden kann (Van Dongen et al. 2003). Schwierigkeiten bereitet die Diagnosestellung insbesondere bei frühen Stadien und bei seltenen Entitäten der CTCL. Die Diagnose einer bösartigen Hautveränderung wird dabei durch die Klonalitätsanalyse unterstützt, die darauf basiert, dass die

malignen T-Zellen einen gemeinsamen klonalen Ursprung haben. In diesen Fällen ist der Nachweis klonaler T-Zellproliferationen durch die identisch umgelagerten TCR-Gene eine wertvolle Hilfe.

In der Vergangenheit wurden einige Methoden entwickelt, um Klonalität unter den T-Zellen zu detektieren. Die Southern-Blot-Analyse galt dabei viele Jahre lang als Goldstandard (Weiss et al 1986). Trotz der hohen Zuverlässigkeit dieser Methode wurde sie in den letzten Jahren immer mehr von der PCR-Methode abgelöst (Bourguin et al, 1990, Weiss und Spagnolo 1993). Im Gegensatz zur Southern-Blot-Analyse überzeugte die PCR-Methode durch ihren geringeren Zeit- (Tage) und Kostenaufwand. Des Weiteren ermöglicht sie die Verwendung geringerer Mengen an DNA, auch niedriger Qualität, und hat eine höhere Sensitivität von 1-5 %. Durch diese Gegebenheiten konnte die PCR-Methode auch in der Routine üblichen Formalin-fixierten und Paraffin-eingebettetem Material angewandt werden. Ferner ist auch das Arbeiten mit radioaktivem Material nicht mehr notwendig (Wan et al. 1990, Trainor et al. 1991, Slack et al. 1993, Hodges et al. 2003, Lukowsky 2003).

### **6.1.1 Auswahl des Primersystems**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Klonalitätsanalyse des TCR- $\gamma$ -Genlokus durchgeführt. Der TCR- $\gamma$  ist eine bevorzugte Zielstruktur der Klonalitätsanalysen, da die Gene bereits sehr früh während der T-Zellreifung umgelagert werden. Ferner ist die TCR- $\gamma$ -Genumlagerung im Genom der meisten reifen T-Zellen verankert, unabhängig davon, ob diese an ihrer Zelloberfläche das  $\alpha/\beta$  oder  $\gamma/\delta$  Herterodimer exprimieren (Bachelez 1999).

Im Gegensatz zu den anderen TCR-Genloci ist die Genomstruktur des TCR- $\gamma$  einfacher strukturiert. Die limitierte Anzahl von nur vier  $V\gamma$ -Genfamilien mit ihren 14 Gensegmenten und den fünf  $J\gamma$ -Gensegmenten ermöglicht die Amplifizierung fast aller möglichen  $V\gamma$ - $J\gamma$ -Kombinationen mit nur wenigen Primern. Die diagnostische Sensitivität hängt dabei von dem Bruchstück der V- und J-Gensegmente ab, die von den Primern erkannt werden. Für eine optimale TCR- $\gamma$ -PCR sollten möglichst alle vier  $\gamma$ -Gensegmente in Kombination mit den J1- und J2-Segmenten analysiert werden.

In Bezug auf die CTCL konnten klonale TCR-Genumlagerungen in 50-90 % nachgewiesen werden (Wood et al. 1994, Algara et al 1994, Theodorou et al. 1995,

Bakels et al 1997, Muche et al. 1997, Delfau-Larue 1998, Dippel et al. 1999, Lukowsky et al. 2002, Humme et al. 2009). Diese große Bandbreite resultiert sowohl aus der Untersuchung unterschiedlicher Entitäten und variierender Stadien, als auch aus der Verwendung von unterschiedlichen Primersystemen mit verschiedenen Sensitivitätsgraden sowie der angewandten Techniken zur weiteren Auftrennung der PCR-Amplifikate.

Bis zur Entwicklung der Biomed-2 Primer im Jahre 2003 (van Dongen et al. 2003) wurden viele verschiedene Primersets mit unterschiedlichster Sensitivität und Eignung verwendet, was die Vergleichbarkeit der Klonalitätsergebnisse einzelner Studien stark erschwerte. Erst die Biomed-2 Concerted Action entwickelte erstmalig standardisierte und hoch sensitive Primer im Hinblick auf eine zuverlässige Klonalitätsdetektion in suspekten Lymphoproliferationen. Die Verwendung dieser Primer ermöglicht daher erstmalig den hochsensitiven Vergleich bezüglich der Klonalitätsdiagnostik zwischen unterschiedlichen Insituten bzw. Studien (van Dongen et al. 2003, van Krieken et al. 2007, Brüggemann et al. 2007). Basierend auf diesen Grundlagen wurden die Biomed-2 Primer für den TCR- $\gamma$ -Genkomplex in dieser Arbeit verwendet. Es handelt sich dabei um vier V $\gamma$ - und zwei J $\gamma$ -Primer, die auf zwei Multiplextubes verteilt sind und alle relevanten Gensegmente des TCR- $\gamma$ -Genkomplexes hochspezifisch erfassen. Da die Genumlagerungen des V $\gamma$ 12-Segments extrem ungewöhnlich sind und ferner die Analyse des J $\gamma$ 1.2-Gensegments zu falsch positiven Ergebnissen führen kann, wurden diese Gensegmente bewusst von der Primersynthese ausgeschlossen. Somit entstand eine minimale Anzahl an hochspezifischen und informativen Primern, die ferner das Risiko falsch positiver Ergebnisse minimieren (van Dongen et al. 2003).

### **6.1.2 Auftrennung der PCR Amplifikate mittels Genescan**

Die Detektionsstärke klonaler Genumlagerungen basiert jedoch nicht nur auf der PCR- bzw. Primersensitivität, sondern auch auf dem anschließenden Verfahren der Amplifikatauftrennung. Die geringe Größenauftrennung der PCR-Amplifikate durch eine herkömmliche Agarosegel- oder Polyacrylamidgelelektrophorese kann in vielen Fällen nicht eindeutig zwischen einer monoklonalen und polyklonalen TCR-Genkonfiguration unterscheiden (Kneba et al. 1994, Witzens et al. 1997, Scheller et al. 1998, Lukowsky et al. 2002). Daher wurde die Agarosegelelektrophorese in dieser Studie lediglich zur

Verifikation der PCR-Amplifikate verwendet, um so bei fehlenden PCR-Produkten die folgenden kostspieligen Analyseverfahren zu vermeiden.

Um mit großer Zuverlässigkeit klonale TCR-Genumlagerungen zu identifizieren, wird daher eine hochentwickelte und technisch anspruchsvolle „high resolution“ Elektrophorese wie die Genescan Methode erforderlich (Simon et al. 1998). Die hohe Sensitivität und Überlegenheit dieser Methode konnte bereits in mehreren Studien an kutanen Lymphomen belegt werden (Kneba et al. 1995, Simon et al. 1998, Dippel et al. 1999, Assaf et al. 2000, Assaf et al. 2005). Im Vergleich zu anderen hochauflösenden Elektrophoresen hat die Fluoreszent-Fragment-Analyse (FFA, Genescan) mehrere Vorteile. Die genaue Bemessung der einzelnen PCR-Produktlängen ermöglicht den Klonalitätsvergleich unterschiedlicher Proben eines Patienten, ohne dass eine Sequenzierung erforderlich wird. Dies ist z. B. bei der Tumorausbreitungsdiagnostik (Monitoring) von praktischer Relevanz (Assaf 2004, Assaf et al. 2005). Die exakte Analyse der Amplifikatgrößen mit bis zu einem Basenpaar Längenunterschied ermöglicht es weiterhin im Vergleich mehrerer Proben eines Patienten denkbare Kreuzkontaminationen zu erkennen. Die FFA funktioniert weiterhin automatisch und schnell, benötigt jedoch relativ teures Equipment (van Dongen et al. 2003, Lukowsky et al. 2002, Dippel et al. 1999). Im Hinblick auf die Sensitivität ermöglicht dieses Verfahren ein Detektionslimit von ca. 0,5 % bis 1 % klonaler TCR-Genumlagerungen (Meyer et al. 1997, Dippel et al. 1999, Lukowsky et al. 2002, Lukowsy et al. 2010).

## **6.2 *Detektionsrate klonaler T-Zellpopulationen in der Haut von Patienten mit LyP***

Weiss et al. waren die Ersten, die zeigten, dass der LyP eine klonale T-Zellpopulation zugrunde liegt. Sie analysierten 1986 die DNA der Hautläsionen von sechs Patienten auf ihre  $\beta$ - und  $\gamma$ -TCR-Genumlagerungen mit der Southern-Blot-Technik und fanden in fünf der sechs Patienten (83 %) klonale Genumlagerungen (Weiss et al. 1986).

In darauffolgenden Studien konnten mittels Southern-Blot-Analyse klonale Genumlagerungen in der Haut von Patienten mit LyP in 45 – 83% gezeigt werden (Weiss et al. 1986, Kadin et al. 1987, Whittaker et al. 1991, El-Azhary et al. 1994).

1996 analysierten Chott et al. multiple Proben von elf Patienten mittels PCR und detektierten bei neun der elf Patienten (82 %) Klonalität in den Hautläsionen (Chott et al. 1996).

Die in dieser Arbeit vorgelegte Detektionsrate eines dominanten T-Zell-Klons in der Haut bei 81 % der analysierten Patienten mit LyP stimmt mit denen aus vorausgegangenen Publikationen (45-83 %) überein (Humme et al. 2009). Des Weiteren unterstreicht die vergleichbar hohe Detektionsrate die Sensitivität der analytischen Methode.

Trotz der Tatsache, dass es sich bei der LyP um ein kutanes T-Zell-Lymphom mit klonalen T-Zellpopulationen handelt, kann nicht in allen Fällen eine klonale TCR-Genumlagerung nachgewiesen werden (Weiss et al. 1986, Kadin et al. 1987, Whittaker et al. 1991, El-Azhary et al. 1994, Greisser et al. 2006, Kadin et al. 2006, Humme et al. 2009). Dies schließt jedoch nicht zwangsläufig die Abwesenheit eines solchen Klons aus. Der fehlende Nachweis einer klonalen T-Zellopopulation sowie die Schwankung der unterschiedlichen Detektionsraten von 45-83 % Klonalität in den Hautproben können sowohl a) auf methodischen als auch b) auf biologischen Gegebenheiten basieren, das im Folgenden diskutiert wird (van Dongen und Wolvers-Tettero 1991).

Zu a) Die o. g. Ergebnisse basieren auf zwei unterschiedlichen analytischen Verfahren, der Southern-Blot-Analyse und der PCR-Technik. Wie oben beschrieben werden zur Klonalitätsdetektion mit der Southern-Blot-Methode größere Mengen hochwertiger DNA benötigt als bei der PCR-Analyse. Eine geringe Menge an klonaler DNA bzw. DNA niedriger Qualität durch z. B. bereits eingetretene DNA-Fragmentation kann somit zu einem falsch negativen Klonalitätsnachweis führen.

Des Weiteren wurden in der Vergangenheit viele unterschiedliche Primersysteme und Auftrennungsverfahren unterschiedlichster Sensitivität angewandt. Dabei waren viele Primersysteme nicht befähigt, alle möglichen Genumlagerungen zu erkennen. Klone mit seltenen Rearrangements wurden somit nicht amplifiziert und detektiert. Erst durch die Biomed-2 Arbeit konnte nun erstmalig ein standardisiertes Primersystem entwickelt werden, für das gezeigt wurde, dass es so gut wie alle möglichen Genumlagerungen mit großer Zuverlässigkeit erkennt (van Dongen et al. 2003, van Krieken et al. 2007).

Zu b) Die fehlende Detektion einer klonalen T-Zellopopulation kann auch durch eine niedrige Zahl klonaler Zellen in einem starken entzündlichen Infiltrat erklärt werden, so

wie es besonders für den histologischen Typ A der LyP charakteristisch ist. Der klonale Peak, der aus den wenigen klonalen T-Zellen hervorgeht, wird dabei durch das starke polyklonale Profil der dominierenden inflammatorischen Zellen überlagert.

Diese analytischen und biologischen Herausforderungen könnten auch erklären, warum Greisser et. al 2006 in nur vier von 18 Patienten mit LyP der Nachweis eines T-Zell-Klons mittels der Kombination aus PCR und Genescan Technik gelang. In Hinblick auf die histologischen Subtypen wurde Klonalität ausschließlich in vier von acht Proben mit dem histologischen Subtyp C nachgewiesen, wohingegen keine der zehn Proben mit dem histologischen Subtyp A und B Klonalität aufzeigte (Greisser et al. 2006). Die Diskrepanz zwischen dieser Studie und den hier präsentierten Daten kann dabei auf den unterschiedlichen PCR-Protokollen, die zur Analyse der TCR-Genumlagerungen verwendet wurden, beruhen. Im Gegensatz zur Studie von Greisser et al. kann die hohe Sensitivität der Biomed-2 Primer in dieser Arbeit zum Nachweis klonaler T-Zellpopulationen auch in den für LyP Typ A charakteristischen Hautveränderungen mit niedriger Anzahl an Tumorzellen geführt haben.

### **6.3 *Detektionsrate klonaler T-Zellpopulationen in der Haut von Patienten mit cALCL und sALCL***

Im Hinblick auf die Entität des cALCL gelang uns der Nachweis einer klonalen T-Zellpopulation in elf von zwölf Hautproben (92 %) bzw. in sechs von sieben Patienten (86 %). Diese Ergebnisse stimmen mit den meisten Studien überein, die den Nachweis einer klonalen T-Zellpopulation in den Hautläsionen der meisten cALCL erbrachten (Willemze und Meijer, 2003, Willemze et al. 2005, Greisser et al. 2006, Kadin 2006). Das histologische Bild des cALCL ist dem Bild der LyP Typ C sehr ähnlich. Der hohe Anteil rasenartig angeordneter CD30<sup>+</sup> Tumorzellen erklärt somit die hohe Detektionsrate klonaler T-Zellpopulationen. Der fehlende Nachweis einer klonalen T-Zellpopulation kann auch hier durch seltene Genumlagerungen, die nicht von den Primern erkannt werden, oder durch Maskierung der Tumorzellen durch ein stark ausgeprägtes inflammatorisches Umgebungsinfiltrat erklärt werden. Bei den sekundären Hautmanifestationen der systemischen Form des ALCL konnte bei allen vier Proben der drei Patienten Klonalität aufgezeigt werden, was für einen hohen Anteil an Tumorzellen in den Hautveränderungen spricht.

#### **6.4 Klonale T-Zellpopulationen in PBMC von Patienten mit LyP**

Bisher gab es nur wenige initiale Berichte über die Detektion klonaler T-Zellpopulationen im peripheren Blut von Patienten mit LyP (Whittaker et al. 1991, Schultz et al. 2005). Um diese Lücke zu schließen, wurden systematisch 52 Blutproben von 21 Patienten mit LyP auf Ihre TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen analysiert.

Unsere Daten zeigen eine klonale T-Zellpopulation in 19 der 53 (36 %) Blutproben bzw. bei acht der 21 (38 %) Patienten mit LyP. Jedoch zeigte der intra-individuelle Vergleich der klonalen T-Zellpopulationen im peripheren Blut und den Hautläsionen eines jeden Patienten unterschiedliche TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen. Dies bedeutet unter Berücksichtigung der PCR/Genescan Sensitivität von 2-5 %, die anhand der Verdünnungsreihe bestimmt wurden, dass die klonalen Tumorzellen der Haut nicht im peripheren Blut nachweisbar sind.

Whittaker et al. führten bereits 1991 die Analyse der  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -TCR-Gene der PBMC von acht Patienten mit LyP durch. Um Klonalität zu detektieren, wurden alle Proben mit der Southern-Blot-Analyse untersucht. Hochsensitive Verfahren wie die PCR/Genescan Methode waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht etabliert. Die Ergebnisse zeigten keine klonalen Genumlagerungen der PBMC bei sieben der acht Patienten. In Übereinstimmung mit unseren Daten zeigte nur ein Patient eine diskrete Genumlagerung der  $\gamma$ - und  $\delta$ -Gene im peripheren Blut, wohingegen die korrespondierende Hautprobe unterschiedliche Umlagerungen der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Gene sowie eine Keimbahnkonfiguration des  $\delta$ -TCR-Gens aufzeigte (Whittaker, 1991). Whittaker und Mitarbeiter konnten also ebenfalls keinen identischen Klon in der Haut und dem peripheren Blut nachweisen.

2005 publizierten Schultz et al. ihre Arbeit, in der sie Blut und korrespondierende Hautproben von sechs Patienten mit LyP untersuchten (Schultz et al. 2005). Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit beschrieben die Autoren identische Genumlagerungen in der Haut und den PBMC von zwei der sechs (33 %) Patienten. Als analytische Methode wurde auch hier die PCR-Methode zum Nachweis der TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen angewandt. Der Klonalitätsnachweis erfolgte dabei jedoch nicht durch eine „high resolution eletrophoresis“, sondern durch eine herkömmliche Polyacrylamidgelelektrophorese zur Detektion klonaler Banden. Eine weitere Auftrennung bzw. Sequenzierung zum Beweis der Identität eines identischen T-Zell-

Klons erfolgte jedoch nicht. Aufgrund der hier angewandten Methodik gibt es jedoch zwei Gründe, die vermuten lassen, dass die Autoren die Detektionsrate eines identischen T-Zell-Klons überschätzt haben könnten. Zum einen fand die Anwendung eines Primersystems statt, das nur ca. 75 % der möglichen TCR- $\gamma$ -Rearrangements abdeckt (McCarthy et al. 1992), und zum anderen erlaubt die Aufteilung der PCR-Amplifikate auf dem Polyacrylamidgel nur die Unterscheidung von PCR-Produkten mit einem Größenunterschied von mehr als zehn Basenpaaren (Scheller et al. 1998). Dies könnte fälschlicherweise den Eindruck einer identischen T-Zellpopulation mit zwei ähnlich großen, jedoch unterschiedlichen PCR-Produkten vermittelt haben.

Die vorliegende Arbeit ist daher die erste, bei der gestützt auf dem hochsensitiven Biomed-2 Primerset in Kombination mit der PCR/Genescan Methode vergleichende Klonalitätsanalysen der Haut und Blutproben systematisch an einem größeren Patientenkollektiv mit LyP durchgeführt wurde.

### **6.5 Klonale T-Zellpopulationen in PBMC von Patienten mit cALCL und sALCL**

Bei den Patienten mit cALCL konnte in 16 von 27 Proben (59 %) bzw. bei sechs der sieben Patienten (86 %) ein dominanter T-Zell-Klon detektiert werden. Auch bei dieser Entität konnte durch den Vergleich von Haut- und korrespondierenden Blutproben kein identischer Klon in der Haut und im peripheren Blut nachgewiesen werden. Bisher gibt es nur eine größere Studie, die über Klonalität im peripheren Blut bei Patienten mit cALCL berichtet. Gegensätzlich zu dieser Arbeit beschrieben Dereure et al. 2003 den Nachweis von Klonalität in PBMC bei drei von neun Patienten mit cALCL, wobei zwei der Patienten identische TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen in den beiden Kompartimenten Blut und Haut zeigten. In Übereinstimmung mit unserer Arbeit wurde auch hier die PCR-Analyse mit der Genescan Methode zum Klonalitätsnachweis kombiniert. Jedoch geht aus ihrer Arbeit nicht hervor, ob es sich bei den zwei o.g. Hautbiopsien um primäre oder sekundäre Hautläsionen des ALCL handelt, welche beide von den Autoren untersucht wurden (Dereure et al. 2003).

Interessanterweise gelang uns bei der systemischen Form des ALCL (sALCL) bei keinem der drei Patienten der Nachweis einer klonalen T-Zellpopulation im peripheren Blut. Aufgrund der niedrigen Fallzahl lässt sich jedoch eine klonale T-Zellpopulation im peripheren Blut bei dieser Entität nicht ausschließen. Ferner besteht auch hier die

Möglichkeit, dass die übrigen polyklonalen T-Lymphozyten des peripheren Blutes den klonalen Peak der transformierten T-Zellen überdecken. Hingegen finden beim sALCL im fortgeschrittenen Stadium mit Knochenmarkbeteiligung, auch im peripheren Blut Tumorzellen (Damm-Welk et al. 2007). Dieses aggressive Verhalten des sALCL findet sich in der Regel nicht bei der kutanen Variante.

## **6.6 Pseudoklonalität**

Mit zunehmender Sensitivität der Klonalitätsdiagnostik konnte in vergangenen Studien bei einigen T- und B-Zell-Entitäten Klonalität detektiert werden, die sich bei wiederholter Probenanalyse nicht verifizieren ließ (Dippel et al. 1999, Klemke et al. 2002, Hummel und Stein 2003, Hummel et al. 2006). Diese Fälle, die nicht die identische TCR-Genumlagerung in der wiederholten PCR-Analyse derselben Probe zeigen, werden per Definition als „pseudoklonal“ bezeichnet. Die genaue Ursache dieses Phänomens ist noch nicht geklärt. Sie scheint jedoch auf einem PCR-Artefakt, basierend auf eingeschränkter DNA-Qualität weniger reaktiver T-Zellen im Paraffinmaterial, zu beruhen. Im Gegensatz zu den pseudoklonalen Fällen lassen sich die PCR-Produkte der malignen Lymphoproliferationen exakt reproduzieren. Um falsch positiven Ergebnissen durch Pseudoklonalität entgegenzuwirken, wurde in den letzten Jahren immer mehr auf die Relevanz der mindestens doppelten Probenanalyse hingewiesen (Assaf et al. 2000, Klemke et al. 2002, Hummel und Stein 2003, van Krieken et al. 2007).

Bei der Analyse der Proben dieser Studie konnten die klonalen T-Zellpopulationen meist durch identische TCR-Genumlagerungen in multiplen Haut- oder Blutproben eines Patienten verifiziert werden. Von den Patienten, von denen nur singuläre Haut- oder Blutproben verfügbar waren oder sich nur in einer Haut- bzw. Blutprobe ein dominanter T-Zell-Klon zeigte, wurden erneute PCR/Genescan Analysen durchgeführt. Durch die wiederholte Detektion des identischen T-Zell-Klons können somit falsch positive Ergebnisse durch Pseudoklonalität in dieser Studie mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden.

## **6.7 Persistenz der klonalen T-Zellpopulation im peripheren Blut**

Unsere Daten zeigen, dass sich die klonale Tumorzellpopulation der Hautläsionen bei Patienten mit primär kutanen CD30<sup>+</sup> Lymphoproliferationen nicht im peripheren Blut nachweisen lassen. Es gibt zwei Möglichkeiten, die diese Ergebnisse erklären können.

1) Die malignen klonalen T-Zellen zirkulieren in so geringer Anzahl im peripheren Blut, dass sie durch die angewandte Methode nicht detektiert werden können. Die Verdünnungsreihe zeigt, dass erst eine Gesamtanzahl von 2-5 % klonaler T-Zellen unter allen T-Lymphozyten zum Nachweis eines klonalen Peaks über dem polyklonalen Hintergrund führt.

2) Die malignen Zellen persistieren nicht im peripheren Blut, sondern in einem anderen Kompartiment. Gniadecki et al. veröffentlichten hierzu 2003 zwei Fallbeispiele. Sie beschrieben zwei Patienten, die drei bzw. vier Jahre vor dem Auftreten der LyP wegen eines Burkitt Lymphoms bzw. eines kleinzelligen B-Zell-Lymphoms behandelt wurden. Die Autoren analysierten die TCR-Genumlagerungen der Hautläsionen, der PBMC sowie des Knochenmarks mittels der PCR/Genescan Methode. Des Weiteren fand auch die Untersuchung von archiviertem Knochenmark, das Jahre vor dem Auftreten der initialen LyP-Hautläsionen entnommen wurde, statt. In beiden Fällen konnte in den Proben eine identische monoklonale TCR-Genumlagerung detektiert werden. Gniadecki und Kollegen stellten die These auf, dass die initiale maligne Transformation der LyP im Knochenmark und nicht in der Haut auftritt und somit das Knochenmark das Kompartiment darstellt, von dem die klonalen Zellen der LyP ausgehen und persistieren. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit gelang es ihnen jedoch bei einem Patienten, den T-Zell-Klon auch im peripheren Blut aufzuzeigen, und das sogar mit einer zehnfach höheren Häufigkeit als im Knochenmark. Aufgrund dieser Beobachtung hielten die Autoren eine Rezirkulation der malignen Zellen zwischen der Haut- und dem Blutkompartiment für sehr wahrscheinlich (Gniadecki et al. 2003). Diese Hypothese kann jedoch durch die Daten dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

## **6.8 T-Zell-Klonalität im peripheren Blut bei MF, Autoimmunerkrankungen und anderen Malignomen**

Obwohl bei keinem der 31 Patienten der identische T-Zell-Klon in der Haut und im peripheren Blut nachgewiesen werden konnte, zeigten sich bei 14 der 31 Patienten (45 %) klonale T-Zellpopulationen im peripheren Blut und ließen sich zum Teil über mehrere Jahre nachweisen.

In der Vergangenheit wurden Klonalitätsanalysen bereits für andere Entitäten der primär kutanen lymphoproliferativen Erkrankungen durchgeführt. Muche et al. detektierten identische TCR-Genumlagerungen in der läsionalen Haut und dem peripheren Blut von 23 von 64 (36 %) Patienten mit Mycosis fungoides und zeigten somit die hämatogene Ausbreitung der malignen T-Zellen (Muche et al. 1997). Signifikante Unterschiede in Bezug auf die Tumorstadien wurden dabei nicht beobachtet.

In Analogie zu unseren Ergebnissen konnten in darauffolgenden Studien mit großen Patientenzahlen ebenfalls unterschiedliche klonale T-Zellproliferationen in den beiden Kompartimenten Blut und Haut aufgezeigt werden. Insgesamt konnten ungleiche klonale T-Zellproliferationen im peripheren Blut in 48-73 % der Patienten detektiert werden (Delfau-Larue et al. 1998, Muche et al. 2003).

Des Weiteren konnten klonale T-Zellpopulationen im peripheren Blut von gesunden Probanden (5 von 38), bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen (3 von 8), mit MF (8 von 64) und bei anderen Hautkrebsarten (keine Lymphome (neun von 39) (Muche et al. 2003) sowie bei Patienten mit Kollagenosen (50 von 97) nachgewiesen werden (Dereure et al. 2006).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich die Hypothese ableiten, dass sowohl Autoimmun- als auch maligne Erkrankungen in direktem Zusammenhang mit der Entstehung von reaktiven nicht malignen T-Zellpopulationen stehen.

## **6.9 TCR-Repertoire Analyse**

Wie aus den oben genannten Studien hervorgeht, ist der alleinige Nachweis eines dominanten T-Zell-Klons im peripheren Blut nicht unbedingt mit einer T-Zell abhängigen Erkrankung assoziiert. Um einen detaillierteren Einblick bezüglich der Konstitution des gesamten T-Zell-Rezeptor-Repertoires zu erhalten, wurde aus den PBMC von zehn Patienten die CDR3-Spectratyping Analyse durchgeführt. Die Darstellung der CDR3-

Längenverteilungen aller 24 verschiedenen V $\beta$ -Familiengene ermöglicht dadurch eine klarere Vorstellung über Repertoireabweichungen sowie über klonale T-Zell Expansionen bei einzelnen Patienten.

Im Gegensatz zur Genescan Methode, die auf der DNA-Analyse beruht, basiert das Immunoscope/TcLandscape Verfahren auf mRNA Ebene. Dies hat zur Folge, dass auch quantitative Aspekte wie z. B. T-Zell Aktivierung durch höhere Transkriptionsraten der TCR-kodierenden Gene in die Ergebnisse mit einfließen.

Die Daten unserer Immunoscopeanalyse zeigen, dass die Erfassung einer klonalen TCR-Genumlagerung im peripheren Blut in fast allen Fällen mit einer deutlichen Veränderung der CDR3-Längenverteilung und folglich auch des TCR-Repertoires assoziiert ist. Im Gegensatz dazu demonstrierten die Patienten, bei denen kein T-Zell-Klon im Blut detektierbar war, ein nahezu normales und balanciertes TCR-Repertoire.

Eine deutlich hervortretende Repräsentation einer bestimmten V $\beta$ -Familie auf dem quantitativen Level weist somit auf die starke Proliferation einer T-Zellsubpopulation hin, die möglicherweise als Antwort auf tumorassoziierte Antigene hervorgerufen wird. Albers et al. führten TCR-Repertoire Analysen anhand von tumorinfiltrierenden Lymphozyten und peripheren Blut T-Zellen bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses durch. Ihre Ergebnisse zeigten identische TCR-V $\beta$ -Repertoireveränderungen bei den tumorinfiltrierenden T-Zellen und den zirkulierenden Blut Lymphozyten. Da bestimmte TCR-Repertoireveränderungen öfters bei Patienten mit der gleichen Tumorart auftreten wurde angenommen, dass sie Expansionen tumorassoziierter T-Zellen darstellen (Albers et al. 2006).

Dies bedeutet, dass eine T-Zellpopulation ein bestimmtes Protein, das von den Tumorzellen exprimiert wird oder auch sezerniert wird, als Antigen erkennt und daraufhin diese T-Zellpopulation proliferiert (Kumamaru et al. 2004). Aufgrund der sehr hohen Sensitivität der Immunoscope/TcLandscape Analyse bzw. auch durch die hochsensitive PCR/Genescan Methode können diese reaktiven, nicht malignen T-Zellpopulationen detektiert werden.

Auch andere Arbeiten unterstützen diese Hypothese. Bei Patienten mit Sézary Syndrom konnten neben identischen T-Zell-Klonen der Haut und des peripheren Blutes noch weitere transitorische Peaks im peripheren Blut mit der Immunoscopemethode detektiert werden. Auch diese zusätzlichen T-Zell-Klone wurden als nichtmaligne

reaktive Lymphoproliferationen auf ein unbekanntes Tumorantigen gedeutet (Ingen-Housz-Oro et al. 2002). Ortonne et al. charakterisierten diese klonalen unspezifischen T-Zellpopulationen des peripheren Blutes anhand ihrer TCR-V $\beta$ -, CD158k- und Vimentinexpression an der Zelloberfläche. Dabei wird CD158k von den malignen Sézary Zellen exprimiert und Vimentin sowohl an der Zelloberfläche von Sézary Zellen als auch von nichtmalignen reaktiven Lymphozyten exprimiert. Ihre Ergebnisse zeigten klonale T-Zellpopulationen mit einem großen Anteil an Vimentin und dem Fehlen des CD158k Oberflächenmarkers als weiteres Indiz für die Gegenwart von nichtmalignen reaktiven klonalen T-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit Sézary Syndrom (Ortonne et al. 2006).

Auch für andere Tumorentitäten wie das maligne Melanom oder das Plattenepithelkarzinom konnten reaktive T-Zellpopulationen im peripheren Blut identifiziert werden. Hier gelang bereits die Isolierung von tumorassoziierten Antigenen (MART-1, SART-1) (Terheyden et al. 2003, Kumamaru et al. 2004).

### **6.10 Altersverteilung bei Patienten mit nicht tumorassoziierten klonalen T-Zellproliferationen im peripheren Blut**

In bisherigen Studien wurde das Auftreten von unspezifischen klonalen T-Zellpopulationen im peripheren Blut, genauso wie Abweichungen des TCR-Repertoires, besonders bei älteren Patienten beobachtet (Muche et al. 2003, Schwab et al. 1997, Posnett et al. 1994, Naylor et al. 2005, Vallejo 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass die TCR-Vielfalt für gewöhnlich bis zum 65. Lebensjahr beibehalten wird und anschließend rapide abschwächt und verloren geht (Naylor et al. 2005). Vallejo lieferte 2007 ein detailliertes Konzept, das die Veränderungen des TCR-Repertoires während des physiologischen Alterungsprozesses aufzeigte. Dabei kommt es mit dem Einsetzen der Pubertät zur Thymusinvolution, was die Produktion von neuen naiven T-Zellen stark abschwächt. Dadurch haben ältere Menschen stark eingeschränkte Möglichkeiten, ihren Pool nativer T-Zellen aufzufüllen. Antigenkontakte während der Lebenszeit vermindern weiter die Reserve an nativen T-Zellen, indem die nativen T-Zellen auf Antigenkontakte proliferieren und klonal expandieren. Die meisten dieser T-Zellpopulationen gehen nach dem Antigenkontakt in die Apoptose über. Ein kleiner Anteil überlebt jedoch in Form von langlebigen Memoryzellen. Diese zum Teil klonalen Memory-T-Zellpopulationen resultieren im Zusammenhang mit der

eingeschränkten Vielfalt nativer T-Zellen in den detektierbaren TCR-Repertoireveränderungen (Vallejo 2007).

Um auszuschließen, dass die Detektion der nicht tumorspezifischen klonalen T-Zellpopulationen im peripheren Blut bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv lediglich die physiologischen Alterserscheinungen des Immunsystems widerspiegelt, wurde eine Altersanalyse der Patienten durchgeführt. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Daten war die Patientengruppe dieser Studie, die einen nicht tumorspezifischen dominanten T-Zell-Klon im peripheren Blut demonstrierte, deutlich jünger als 65 Jahre (Durchschnittsalter 52 Jahre, 30-70 Jahre, n=8). Des Weiteren waren auch alle Patienten mit TCR-Repertoireveränderungen jünger als 65 Jahre (51, 59, 60 und 61 Jahre). Die Daten zeigen also, dass die nicht tumorspezifischen klonalen T-Zellpopulationen bei Patienten mit CD30<sup>+</sup> kutanen Lymphoproliferationen bereits früher als physiologisch erwartet auftreten.

### **6.11 Bedeutung der nicht tumoridentischen klonalen T-Zellpopulationen im peripheren Blut**

Interessanterweise wurden Abweichungen des TCR-Immunrepertoires im peripheren Blut auch bei jüngeren Patienten, die an chronischen Erkrankungen wie z. B. CMV-Infektionen leiden, beschrieben (Koch et al. 2006, Looney et al. 1999). Ferner wurde darüber berichtet, dass Patienten, die seropositiv für eine CMV-Infektion sind, ähnliche T-Zell-Repertoireveränderungen aufzeigten, wie sie auch bei der Immunseneszenz zu verzeichnen sind. Dies deutet darauf hin, dass Antigenstimulationen durch persistierende oder periodische virale Infektionen vergleichbare Effekte auf das TCR-Repertoire haben könnten.

Eingeschränkte CDR3-Längenverteilungen wurden, wie bereits oben erwähnt, auch für andere Tumorentitäten beschrieben (Albers et al. 2006). Aber auch für den Formenkreis der kutanen T-Zell-Lymphome existieren solche Daten. Yawalker et al. untersuchten periphere Blut T-Zellen von Patienten mit CTCL mittels der CDR3-Spectratyping Analyse und fanden tiefgreifende Abweichungen der TCR-Repertoire Komplexität in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium (Yawalker et al. 2003). Auch hier wurden abermals nicht tumoridentische klonale T-Zellpopulationen detektiert. Yawalker und Kollegen interpretierten das Auftreten klonaler T-Zell Expansionen als gleichzeitige

Minderung und Kontraktion des übrigen TCR-Repertoires mit erheblichem Verlust der TCR-Vielfalt sowie Verlust der Immunkompetenz.

Betrachtet man jedoch die Klonalitätsprofile der TcLandscape Analyse und die Immunoscope Daten im Kontext des auf der PCR-Methode beruhenden Experiments zur Sensitivitätsbestimmung, gibt es noch eine alternative Interpretation. Bereits 10 % klonaler T-Zellen vermischt mit einer polyklonalen T-Zellpopulation generieren ein Genescan Profil, das eine eindeutige Dominanz der klonalen T-Zellpopulation über den übrigen T-Zellen suggeriert. Die anderen T-Zellpopulationen scheinen deutlich reduziert vorhanden zu sein, obwohl immer noch die Mehrzahl (90 %) aller T-Zellen polyklonal sind. Da bei der Immunoscopeanalyse die 24 verschiedenen V $\beta$ -Familien einzeln auf diese Weise analysiert werden, wird die Sensitivität der Detektion einer klonalen T-Zellpopulation hier noch beträchtlich erhöht. Dies hat zur Folge, dass die Darstellung eines einzelstehenden hohen Peaks in der TcLandscape Abbildung meist nur niedrige oder gelegentlich auch keine Peaks der übrigen V $\beta$ -Familien anzeigt. Dies bedeutet aber nicht, dass die T-Zellpopulationen der anderen V $\beta$ -Familien mit ihren unterschiedlichen CDR3-Genumlagerungen nicht existieren, sondern resultiert aufgrund der Darstellung der relativen Häufigkeiten der einzelnen T-Zellpopulationen im Vergleich zueinander. Eine starke Abweichung der CDR3-Längenverteilung auf der quantitativen Ebene muss daher nicht zwangsläufig mit einer reduzierten Immunkompetenz assoziiert sein.

Vielmehr lassen die vorausgegangenen Studien sowie auch die hier präsentierten Daten vermuten, dass die Veränderungen im TCR-Repertoire mit dem Hervortreten einzelner nichtmaligner T-Zellproliferationen möglicherweise in Relation mit einer persistierenden Stimulation der peripheren Blut T-Zellen durch unbekannte Antigene stehen. Durch die Altersanalyse der Patienten konnte weiter gezeigt werden, dass die klonalen T-Zellpopulationen bei Patienten mit kutanen lymphoproliferativen Erkrankungen früher als physiologisch erwartet auftreten. Diese Beobachtung spricht für einen möglichen Zusammenhang der reaktiven klonalen T-Zellproliferationen mit den CD30<sup>+</sup> Lymphoproliferationen.

Aufgrund dieser Daten resultiert die Hypothese, dass die unspezifischen klonalen T-Zellpopulationen des peripheren Blutes den Ausdruck einer tumorantigenspezifischen reaktiven T-Zellproliferation darstellen. Der genaue Pathomechanismus, mögliche

Antigenstrukturen sowie die prognostische Bedeutung der reaktiven T-Zellen bleiben jedoch zunächst noch ungeklärt.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Albers AE, Visus C, Tsukishiro T et al. (2006) Alterations in the T-cell receptor variable beta gene-restricted profile of CD8+ T lymphocytes in the peripheral circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 12:2394-2403
2. Algara P, Soria C, Martinez P et al. (1994) Value of PCR detection of TCR gamma gene rearrangement in the diagnosis of cutaneous lymphocytic infiltrates. *Diagn Mol Pathol* 3:275-82
3. Arden B, Clark SP, Kabelitz D et al. (1995) Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 42:455-500
4. Assaf C (2004) Diagnostischer Stellenwert und klinische Bedeutung der Analyse von T-Zellrezeptor-Genumlagerungen beim kutanen T-Zell-Lymphom. *Akt Dermatol* 30:566-572
5. Assaf C, Gellrich S, Steinhoff M et al. (2007) Cutaneous lymphomas in Germany: an analysis of the Central Cutaneous Lymphoma Registry of the German Society of Dermatology (DDG). *J Dtsch Dermatol Ges* 5:662-668
6. Assaf C, Hirsch B, Wagner F et al. (2007) Differential expression of TRAF1 aids in the distinction of cutaneous CD30-positive lymphoproliferations. *J Invest Dermatol* 127:1898-904
7. Assaf C, Hummel M, Dippel E et al. (2000) High detection rate of T-cell receptor beta chain rearrangements in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction in combination with the GeneScan technique and DNA sequencing. *Blood* 96:640-646
8. Assaf C, Hummel M, Steinhoff M et al. (2005) Early TCR-beta and TCR-gamma PCR detection of T-cell clonality indicates minimal tumor disease in lymph nodes of cutaneous T-cell lymphoma: diagnostic and prognostic implications. *Blood* 105:503-10
9. Assaf C, Steinhoff M, Gellrich S et al. (2006) Klassifikation of Primary Cutaneous Lymphomas. *Front Radiat Therm Oncol* 39:25-37
10. Bachelez H (1999) The clinical use of molecular analysis of clonality in cutaneous lymphocytic infiltrates. *Arch Dermatol* 135:200-202
11. Bakels V, van Oostveen JW, van der Putte SC et al. (1997) Immunophenotyping and gene rearrangement analysis provide additional criteria to differentiate between cutaneous T-cell lymphomas and pseudo-T-cell lymphomas. *Am J Pathol* 150:1941-9
12. Bekkenk MW, Geelen FAMJ, van Voorst Vader PC et al. (2000) Primary and secondary cutaneous CD30+ lymphoproliferative disorders: a report from the Dutch Cutaneous Lymphoma Group on the long-term follow-up data of 219 patients and guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 95:3653-3661
13. Beljaards RC, Kaudewitz P, Berti E et al. (1993) Primary cutaneous CD 30+ large cell lymphoma. Definition of a new type of cutaneous lymphoma with a favourable prognosis. A European multicenter study of 47 patients. *Cancer* 71:2097-104
14. Beljaards RC, Willemze R (1992) The prognosis of patients with lymphomatoid papulosis associated with malignant lymphomas. *Br J Dermatol* 126:596-602
15. Beylot-Barry M, Groppi A, Vergier B et al. (1998) Characterization of t(2;5) reciprocal transcripts and genomic breakpoints in CD30+ cutaneous lymphoproliferations. *Blood* 91:4668-76
16. Brüggemann M, White H, Gaulard P et al. (2007) Powerful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98-3936. *Leukemia* 21:215-21

17. Burgdorf W, Kempf W (2006) Warren L. Macaulay (1915-2006). *J Am Acad Dermatol* 55:730-732
18. Burg G, Kempf W, Cozzio A et al. (2005) WHO/EORTC classification of cutaneous lymphomas 2005: histological and molecular aspects. *J Cutan Pathol* 32:647-674
19. Bourguin A, Tung R, Galili N et al. (1990) Rapid, nonradioactive detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in lymphoid neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8536-40
20. Chott A, Vonderheit EC, Olbricht S et al. (1996) The dominant T cell clone is present in multiple regressing skin lesions and associated T cell lymphomas of patients with lymphomatoid papulosis. *J Invest Dermatol* 106:696-700
21. Criscione VD, Weinstock MA (2007) Incidence of cutaneous T-cell lymphoma in the United States, 1973-2002. *Arch Dermatol* 143:854-9
22. Damm-Welk C, Busch K, Burkhardt B et al. (2007) Prognostic significance of circulating tumor cells in bone marrow or peripheral blood as detected by qualitative and quantitative PCR in pediatric NPM-ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* 110:670-7
23. Davis MM, Bjorkman PJ (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334:395-402
24. Davis TH, Morton CC, Miller-Cassman R et al. (1992) Hodgkin's disease, lymphomatoid papulosis, and cutaneous T-cell lymphoma derived from a common T-cell clone. *N Engl J Med* 326:1115-22
25. De Bruin PC, Beljaards RC, van Heerde P et al. (1992) Differences in clinical behaviour and immunophenotype between primary cutaneous and primary nodal anaplastic large cell lymphoma of T-cell or null cell phenotype. *Histopathology* 23:127-135
26. Delfau-Larue MH, Dalac S, Lepage E et al. (1998) Prognostic significance of a polymerase chain reaction-detectable dominant T-lymphocyte clone in cutaneous lesions of patients with mycosis fungoides. *Blood* 92:3376-80
27. Dereure O, Portales P, Balavoine M et al. (2003) Rare occurrence of CD30+ circulating cells in patients with cutaneous CD30+ anaplastic large cell lymphoma: a study of nine patients. *Br J Dermatol* 148:246-251
28. Dippel E, Assaf C, Hummel M et al. (1999) Clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan analysis in advanced cutaneous T-cell lymphoma: a critical evaluation. *J Pathol* 188:146-54
29. Droc C, Cualing HD, Kadin ME (2007) Need for an improved molecular/genetic classification for CD30+ lymphomas involving the skin. *Cancer Control* 14:124-32
30. El Azhary RA, Gibson LE, Kurtin PJ et al. (1994) Pymphomatoid papulosis: a clinical and histopathologic review of 53 cases with leukocyte immunophenotyping, DNA flow cytometry, and T-cell receptor gene rearrangement studies. *J Am Acad Dermatol* 30:210-218
31. El Shabrawi-Caelen L, Kerl H, Cerroni L (2004) Lymphomatoid Papulosis. Reappraisal of clinicopathologic presentation and classification into subtypes A, B, and C. *Arch Dermatol* 140:441-447
32. Falini B, Pileri S, Zinzani PL et al. (1999) ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood* 93:2697-706
33. Gascoyne RD, Aoun P, Wu D et al. (1999) Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) Protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 93:3913-3921

34. Gellrich S, Wernicke M, Wilks A et al. (2004) The cell infiltrate in lymphomatoid papulosis comprises a mixture of polyclonal large atypical cells (CD30-positive) and smaller monoclonal T cells (CD30-negative). *J Invest dermatol* 122:859-861
35. Gniadecki R, Lukowsky A, Rossen K et al. (2003) Bone marrow precursor of extranodal T-cell lymphoma. *Blood* 102:3797-3799
36. Greisser J, Palmedo G, Sander C et al. (2006) Detection of clonal rearrangement of T-cell receptor genes in the diagnosis of primary cutaneous CD30 lymphoproliferative disorders. *J Cutan Pathol* 33:711-5
37. Groves FD, Linet MS, Travis LB et al. (2000) Cancer surveillance series: non Hodgkin's lymphoma incidence by histologic subtype in the United States from 1978 through 1995. *J Natl Cancer Inst* 92:1240-1251
38. Gruber R, Sepp NT, Fritsch PO et al. (2006). Prognosis of lymphomatoid papulosis. *Oncologist* 11:955-957
39. Gruss HJ, DaSilva N, Hu ZB et al. (1994) Expression and regulation of CD30 ligand and CD30 in human leukaemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* 12:2083-2094
40. Hirsch B, Hummel M, Bentink S et al. (2008) CD30-Induced Signaling Is Absent in Hodgkin's Cells but Present in Anaplastic Large Cell Lymphoma Cells. *Am J Pathol* 172:510-20
41. Hodges E, Krishna MT, Pickard C et al. (2003) Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes. *J Clin Pathol* 56:1-11
42. Humme D, Lukowsky A, Steinhoff M et al. (2009) Dominance of nonmalignant T-cell clones and distortion of the TCR repertoire in the peripheral blood of patients with cutaneous CD30+ lymphoproliferative disorders. *J Invest Dermatol* 129:89-98
43. Hummel M, Oeschger S, Barth TF et al. (2006) Wotherspoon criteria combined with B cell clonality analysis by advanced polymerase chain reaction technology discriminates covert gastric marginal zone lymphoma from chronic gastritis. *Gut* 55:782-787
44. Hummel M, Stein H (2003) Clonality and malignancy. PCR assays for the diagnosis of clonal B- and T-cell proliferations: potentials and pitfalls. *Verh Dtsch Ges Pathol* 87:102-108
45. Ingen-Housz-Oro S, Bussel A, Flageul B et al. (2002) A prospective study on the evolution of the T-cell repertoire in patients with Sézary syndrome treated by extracorporeal photopheresis. *Blood* 100:2168-74
46. Jaffe ES, Harris NL, Stein H et al. (2001) World Health Organisation Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press
47. Kadin ME, Cavaille-Coll MW, Gertz R et al. (1994) Loss of receptors for transforming growth factor beta in human T-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6002-6
48. Kadin ME, Nasu K, Sako D et al. (1985) Lymphomatoid papulosis. A cutaneous proliferation of activated helper T cells expressing Hodgkin's disease-associated antigens *Am J Pathol* 119:315-25
49. Kadin ME (2006) Pathobiology of CD30+ cutaneous T-cell lymphomas. *J Cutan Pathol* 33:10-17
50. Kadin ME, Vonderheid EC, Sako D et al. (1987) Clonal composition of T cells in lymphomatoid papulosis *Am J Pathol* 126:13-7
51. Kaltoft K, Bisballe S, Rasmussen HF, Thestrup-Pedersen K, Thomsen K, Sterry W. (1987) A continuous T-cell line from a patient with Sézary syndrome. *Arch Dermatol Res* 279:293-8

52. Kaudewitz P, Herbst H, Anagnostopoulos I et al. (1991) Lymphomatoid papulosis followed by large-cell lymphoma: immunophenotypical and genotypical analysis. *Br J Dermatol* 124:465-469
53. Kaudewitz P, Stein H, Plewig G et al. (1990) Hodgkin's disease followed by lymphomatoid papulosis. Immunophenotypic evidence for a close relationship between lymphomatoid papulosis and Hodgkin's disease. *J Am Acad Dermatol* 22:999-1006
54. Kempf W, Kadin ME, Kutzner H et al. (2001) Lymphomatoid papulosis and human herpesviruses--A PCR-based evaluation for the presence of human herpesvirus 6, 7 and 8 related herpesviruses. *J Cutan Pathol* 28:29-33
55. Klemke CD, Dippel E, Dembinski A et al. (2002) Clonal T cell receptor gamma-chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan analysis in the skin and blood of patients with parapsoriasis and early-stage mycosis fungoides. *J Pathol* 197:348-54
56. Kneba M, Bolz I, Linke B et al. (1994) Characterization of clone-specific rearrangement T-cell receptor gamma-chain genes in lymphomas and leukemias by the polymerase chain reaction and DNA sequencing. *Blood* 84:574-81
57. Kneba M, Bolz I, Linke B et al. (1995) Analysis of rearranged T-cell receptor beta-chain genes by polymerase chain reaction (PCR) DNA sequencing and automated high resolution PCR fragment analysis. *Blood* 86:3930-7
58. Koch S, Solana R, Dela Rosa O et al. (2006) Human cytomegalovirus infection and T cell immunosenescence: a mini review. *Mech Ageing Dev* 127:538-43
59. Krishnan J, Tomaszewski MM, Kao GF (1993) Primary cutaneous CD30-positive anaplastic large cell lymphoma. Report of 27 cases. *J Cutan Pathol* 20:193-202
60. Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y et al. (2003) To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 22:8961-82
61. Kumamaru W, Nakamura S, Kadena T et al. (2004) T-cell receptor Vbeta gene usage by T cells reactive with the tumor-rejection antigen SART-1 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 108:686-95
62. Levi E, Pfeifer WM, Kadin ME (2001) CD30-activation-mediated growth inhibition of anaplastic large-cell lymphoma cell lines: apoptosis or cell-cycle arrest? *Blood* 98:1630-1632
63. Levi E, Wang Z, Petrogiannis-Haliotis T et al. (2000) Distinct Effects of CD30 and Fas Signaling in Cutaneous Anaplastic Lymphomas: A Possible Mechanism for Disease Progression. *J Invest Dermatol* 115:1034-1040
64. Liu HL, Hoppe RT, Kohler S et al. (2003) CD30+ cutaneous lymphoproliferative disorders: the Stanford experience in lymphomatoid papulosis and primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* 49:1049-58
65. Looney RJ, Falsey A, Campbell D et al. (1999) Role of cytomegalovirus in the T cell changes seen in elderly individuals. *Clin Immunol* 90:213-219
66. Lukowsky A (2003) Clonality analysis by T-cell receptor gamma PCR and high-resolution electrophoresis in the diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Methods Mol Biol* 218:303-20
67. Lukowsky A, Mucbe JM, Möbs M, Assaf C, Humme D, Hummel M et al. (2010) Evaluation of T-cell clonality in archival skin biopsy samples of cutaneous T-cell lymphomas using the biomed-2 protocol. *Diagn Mol Pathol* 19:70-7

68. Lukowsky A, Richter S, Dijkstal K et al. (2002) A T-cell receptor gamma polymerase chain reaction assay using capillary electrophoresis for the diagnosis of cutaneous T-cell lymphomas. *Diagn Mol Pathol* 11:59-66
69. Macaulay WL (1968) Lymphomatoid Papulosis. A continuing self healing eruption, clinically benign – histologically malignant. *Arch Dermatol* 97:23-30
70. McCarthy KP, Sloane JP, Kabarowski JH et al. (1992) A simplified method of detection of clonal rearrangements of the T-cell receptor-gamma chain gene. *Diagn Mol Pathol* 1:173-9
71. McCarty MJ, Vukelja SJ, Sausville EA et al. (1994) Lymphomatoid papulosis associated with Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma. A report of two cases and a review of the literature. *Cancer* 74:3051-3058
72. Medeiros LJ, Elenitoba-Johnson KS (2007) Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Am J Clin Pathol* 127:707-22
73. Meyer JC, Hassam S, Dummer R et al. (1997) A realistic approach to the sensitivity of PCR-DGGE and its application as a sensitive tool for the detection of clonality in cutaneous T-cell proliferations. *Exp Dermatol* 6:122-7
74. Miqueu P, Guillet M, Degauque N et al. (2007) Statistical analysis of CDR3 length distributions for the assessment of T and B cell repertoire biases. *Mol Immunol* 44:1057-64
75. Mori M, Manuelli C, Pimpinelli N et al. (1999) CD30-CD30 Ligand Interaction in Primary Cutaneous CD30+ T-Cell Lymphomas: A Clue to the Pathophysiology of Clinical Regression. *Blood* 94:3077-3083
76. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. (1994) Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 263:1281-4
77. Muche JM, Sterry W, Gellrich S et al. (2003) Peripheral blood T-cell clonality in mycosis fungoides and nonlymphoma controls. *Diagn Mol Pathol* 12:142-50
78. Muche M, Lukowsky A, Asadullah K et al (1997) Demonstration of frequent occurrence of clonal T cells in the peripheral blood of patients with primary cutaneous T cell lymphoma. *Blood* 90:1636-1642
79. Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350
80. Naylor K, Li G, Vallejo AN et al. (2005) The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol* 174:7446-52
81. Nijsten T, Curiel-Lewandrowski C, Kadin ME (2004) Lymphomatoid papulosis in children: a retrospective cohort study of 35 cases. *Arch Dermatol* 140:306-12
82. Ortonne N, Huet D, Gaudez C et al. (2006) Significance of circulating T-cell clones in Sezary syndrome. *Blood* 107:4030-8
83. Pannetier C, Even J, Kourilsky P (1995) T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today* 16:176-81
84. Paulli M, Berti E, Rosso R et al. (1995) CD30/Ki-1-positive lymphoproliferative disorders of the skin--clinicopathologic correlation and statistical analysis of 86 cases: a multicentric study from the European Organization for Research and Treatment of Cancer Cutaneous Lymphoma Project Group. *J Clin Oncol* 13:1343-54

85. Piris M, Brown DC, Gatter KC et al. (1990) CD 30 expression in non-Hodgkin's Lymphoma. *Histopathology* 17:211-8
86. Posnett DN, Sinha R, Kabak S et al. (1994) Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy". *J Exp Med* 179:609-18
87. Rosen ST, Querfeld C (2006) Primary cutaneous T-cell lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 323-330
88. Sangüeza OP, Galloway J, Eagan PA et al. (1996) Absence of Epstein-Barr virus in lymphomatoid papulosis. An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Arch Dermatol* 132:279-82
89. Scheller U, Muche JM, Sterry W et al. (1998) Detection of clonal T cells in cutaneous T cell lymphoma by polymerase chain reaction: comparison of mutation detection enhancement-polyacrylamide gel electrophoresis, temperature gradient gel electrophoresis and fragment analysis of sequencing gels. *Electrophoresis* 19:653-658
90. Schiemann WP, Pfeifer WM, Levi E et al. (1999) A deletion in the gene for transforming growth factor beta type I receptor abolishes growth regulation by transforming growth factor beta in a cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 94:2854-61
91. Schultz JC, Granados S, Vonderheid EC et al. (2005) T-cell clonality of peripheral blood lymphocytes in patients with lymphomatoid papulosis. *J Am Acad Dermatol* 53:152-5
92. Schwab R, Szabo P, Manavalan JS et al. (1997) Expanded CD4+ and CD8+ T cell clones in elderly humans. *J Immunol* 158:4493-9
93. Shiota M, Nakamura S, Ichinohasama R et al. (1995) Anaplastic large cell lymphomas expressing the novel chimeric protein p80NPM/ALK: a distinct clinicopathologic entity. *Blood* 86:1954-60
94. Simon M, Kind P, Kaudewitz P et al. (1998) Automated high-resolution polymerase chain reaction fragment analysis: a method for detecting T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in lymphoproliferative diseases. *Am J Pathol* 152:29-33
95. Slack DN, McCarthy, Wiedemann LM et al. (1993) Evaluation of sensitivity, specificity, and reproducibility of an optimized method for detecting clonal rearrangements of immunoglobulin and T-cell receptor genes in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Diagn Mol Pathol* 2:223-32
96. Slater DN (2005) The new World Health Organisation- European Organisation for Research and Treatment of Cancer classification for cutaneous lymphomas: a practical marriage of two giants. *Br J Dermatol* 153:874-880
97. Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-17
98. Stadler R, Assaf C, Klemke CD et al. (2008) Short German guidelines: cutaneous lymphomas. *J Dtsch Dermatol Ges* 1:25-31
99. Stein H, Foss HD, Dürkop H et al. (2000) CD 30+ anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood* 96:3681-95
100. Stein H, Gerdes J, Schwab U et al. (1982) Identification of Hodgkin and Sternberg-reed cells as a unique cell type derived from a newly-detected small-cell population. *Int J Cancer* 30:445-59
101. Stein H, Mason DY, Gerdes J et al. (1985) The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 66:848-58
102. Steinhoff M, Hummel M, Anagnostopoulos I et al. (2002) Single-cell analysis of CD30+ cells in lymphomatoid papulosis demonstrates a common clonal T-cell origin. *Blood* 100:578-84

103. Steinhoff M (2004) Lymphomatoide Papulose – ein Schaf im Wolfspelz. *Akt Dermatol* 30:579-84
104. Su LD, Schnitzer B, Ross CW et al. (1997) The t(2;5)-associated p80 NPM/ALK fusion protein in nodal and cutaneous CD30+ lymphoproliferative disorders. *J Cutan Pathol* 24:597-603
105. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. (2008) WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues (ed 4<sup>th</sup>). Lyon, France IARC Press; 2008
106. Takagaki Y, DeCloux A, Bonneville M, Tonegawa S (1989) Diversity of gamma delta T-cell receptors on murine intestinal intra-epithelial lymphocytes. *Nature* 29;339:712-4
107. Terheyden P, Schrama D, Pedersen LØ et al. (2003) Longitudinal analysis of MART-1/HLA-A2-reactive T cells over the course of melanoma progression. *Scand J Immunol* 58:566-71
108. Theodorou I, Delfau-Larue MH, Bigorgne C et al. (1995) Cutaneous T-cell infiltrates: analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangement by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Blood* 86:305-10
109. Tomaszewski MM, Lupton GP, Krishnan J et al. (1995) A comparison of clinical, morphological and immunohistochemical features of lymphomatoid papulosis and primary cutaneous CD30(Ki-1)-positive anaplastic large cell lymphoma. *J Cutan Pathol* 22:310-318
110. Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH et al. (1991) Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood* 78:192-6
111. Vallejo AN (2007) Immune remodeling: lessons from repertoire alterations during chronological aging and in immune-mediated disease. *Trends Mol Med* 13:94-102
112. van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL (1991) Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin Chim Acta* 198:1-91.
113. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M et al. (2003) Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 concerted action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17:2257-2317
114. van Krieken JH, Langerak AW, Macintyre EA et al. (2007) Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 21:201-206
115. Wan JH, Trainor KJ, Brisco MJ et al. (1990) Monoclonality in B cell lymphoma detected in paraffin wax embedded sections using the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 43:888-90
116. Weiss LM, Spagnolo DV (1993) Assessment of clonality in lymphoid proliferations. *Am J Pathol* 142:1679-82
117. Weiss LM, Wood GS, Trela M et al. (1986) Clonal T-cell populations in lymphomatoid papulosis. Evidence of a lymphoproliferative origin for a clinically benign disease. *N Engl J Med* 315:475-479
118. Wendtner CM, Schmitt B, Gruss HJ et al. (1995) CD30 ligand signal transduction involves activation of a tyrosine kinase and of mitogen-activated protein kinase in a Hodgkin's lymphoma cell line. *Cancer Res* 55:4157-61
119. Whittaker S, Smith N, Jones RR et al. (1991) Analysis of  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$  T-cell receptor genes in lymphomatoid papulosis: cellular basis of two distinct histologic subsets. *J Invest Dermatol* 96:786-791
120. Willemze R, Beljaards RC (1993) Spectrum of primary cutaneous CD30 (Ki-1) positive lymphoproliferative disorders: a proposal for classification and guidelines for management and treatment. *J AM Acad Dermatol* 28:973-80

121. Willemze R, Jaffe ES, Burg G et al. (2005) WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 105:3768-85
122. Willemze R, Kerl H, Sterry W et al. (1997) EORTC Classification for Primary Cutaneous Lymphomas: A Proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *Blood* 90:354-371
123. Willemze R, Meijer CJLM (2003) Primary cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorders. *Hematol Oncol Clin N Am* 17:1319-1332
124. Willemze R, Meyer CJ, Van Vloten WA et al. (1982) The clinical and histological spectrum of lymphomatoid papulosis. *Br J Dermatol* 107:131-44
125. Witzens M, Möhler T, Willhauck M et al. (1997) Detection of clonally rearranged T-cell-receptor gamma chain genes from T-cell malignancies and acute inflammatory rheumatic disease using PCR amplification, PAGE, and automated analysis. *Ann Hematol* 74:123-30
126. Wood GS, Crooks CF, Uuer AZ (1995) Lymphomatoid papulosis and associated cutaneous lymphoproliferative disorders exhibit a common clonal origin. *J Invest Dermatol* 105:51-55
127. Wood GS, Schaffer JM, Boni R et al. (1997) No evidence of HTLV-I proviral integration in lymphoproliferative disorders associated with cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Pathol* 150:667-73
128. Wood GS, Tung RM, Haeffner AC et al. (1994) Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements in early mycosis fungoides/Sezary syndrome by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE). *J Invest Dermatol* 103:34-41
129. Yawalkar N, Ferenczi K, Jones DA et al. (2003) Profound loss of T-cell receptor repertoire complexity in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 102:4059-4066

## Erklärung

Ich, Daniel Humme, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Komparative T-Zell-Rezeptor Genumlagerungs- und Expressionsanalysen in Haut- und Blutkompartimenten bei Patienten mit CD30<sup>+</sup> kutanen T-Zell-Lymphomen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

---

Datum

---

Unterschrift

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank geht an PD Dr. Chalid Assaf für die sehr enge, unterstützende und engagierte Betreuung der Arbeit und den damit in Zusammenhang stehenden Projekten.

Ich danke PD Dr. Ansgar Lukowsky für die sehr freundliche und intensive Betreuung bei der Laborarbeit sowie für die vielen wertvollen Ratschläge im Verlauf der theoretischen und praktischen Arbeit.

Den Mitarbeitern Linda El-Ahmad, Sarina Richter, Katharina Dijkstal, Ingeborg Gläser und Dr. Markus Möbs danke ich für die labortechnische Assistenz.

Ferner danke ich meiner Familie für den Rückhalt und die Unterstützung während der Arbeit sowie für die Revision des Manuskripts.

## **Curriculum Vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.