

Aus dem  
Institut für Pathologie des  
Universitätsklinikum Benjamin Franklin  
der Freien Universität Berlin  
Leiter: Prof. Dr. med. H. Stein

**Nachweis monoklonaler Umlagerungen der Beta-Kette des  
T-Zell-Rezeptor-Gens mittels einer neu entwickelten Polymerase-  
Kettenreaktion in Verbindung mit der GENESCAN-Technik**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Chalid Assaf  
aus Darmstadt

2001

Referent : Prof. Dr. med. H. Stein

Coreferent : Prof. Dr. med. T. Blankenstein

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der  
Freien Universität Berlin

Pomoviert am : 14. Dezember 2001

*Meinem Vater, meinen Geschwistern,  
unserer kleinen Tochter Thalia Sinem  
und dem Andenken meiner Mutter gewidmet.*

## Inhalt

<b>1 Abkürzungen</b>	<b>6</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>7</b>
2.1 Allgemeines	7
2.2 Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome	8
2.3 Der T-Zell-Rezeptor: Aufbau und Funktion	10
2.4 Konfiguration der T-Zell-Rezeptor Gene in lymphatischen Zellen	11
2.5 Analyse der T-Zell-Rezeptor Gene mittels Polymerase-Kettenreaktion	15
2.6 Fragestellung und Ziele der Arbeit	17
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>18</b>
3.1 Bezugsquellen für die verwendeten Geräte	18
3.2 Bezugsquellen für die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterial	19
3.3 Kontrollgewebe	19
3.4 Maligne Lymphome der T-Zellreihe	19
3.5 Histologie und Immunhistologie	20
3.6 DNA-Extraktion	21
3.6.1 Automatische DNA-Isolierung aus Patientenmaterial	21
3.6.2 DNA-Extraktion aus Paraffin-eingebettetem Gewebe	22
3.6.3 Isolierung mononukleärer Zellen (Ficoll-Gradient)	22
3.7 Bestimmung der DNA-Konzentration	22
3.8 Entwicklung einer PCR-Methode zum Nachweis von Umlagerungen der TCR- $\beta$ -Kette	23
3.8.1 Kriterien für die Primerauswahl	23
3.8.2 Primersynthese	23
3.8.3 Aufreinigung der Oligonukleotide mittels HPLC	24
3.8.4 Optimierung der PCR-Bedingungen	24
3.8.5 Kontrollexperimente	24
3.9 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	25
3.9.1 Herstellung eines Polyacrylamidgels	26
3.9.2 Photodokumentation	26
3.10 Sequenzanalyse der Amplifikate	26
3.10.1 Sequenzreaktion	27
3.10.2 Auswertung der Sequenzen	29

3.11 Analyse von PCR-Produkten (GENESCAN-Analyse)	29
3.11.1 Vorbereitung der Gelelektrophorese	30
3.11.2 Probenvorbereitung für die Elektrophorese	31
3.11.3 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten	32
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Methodische Entwicklung</b>	<b>33</b>
4.1.1 Etablierung einer TCR- $\beta$ PCR mittels hochdegenerierter J $\beta$ -Konsensusprimer	33
4.1.2 Eigene Entwicklung einer familienspezifischen TCR- $\beta$ PCR	35
4.1.3 Primerselektion für die J $\beta$ -Segmente	35
4.1.4 Primerselektion für die V $\beta$ -Segmente	36
4.1.5 Etablierung der Reaktionsbedingungen	38
4.1.6 Etablierung der GENESCAN-Analyse	40
4.1.7 Spezifität der familienspezifischen TCR- $\beta$ PCR	41
4.1.8 Sensitivität der familienspezifischen TCR- $\beta$ PCR	43
4.1.9 Sequenzanalyse von TCR- $\beta$ PCR-Produkten	44
4.1.10 Optimierung einer TCR- $\gamma$ PCR	46
4.1.11 Spezifität der TCR- $\gamma$ PCR	46
4.1.12 Sensitivität der TCR- $\gamma$ PCR	48
<b>4.2 Untersuchung von Patientenmaterial</b>	<b>49</b>
4.2.1 Molekularbiologische Verlaufsuntersuchung von CTCL-Patienten mittels TCR- $\beta$ PCR im Vergleich zur TCR- $\gamma$ PCR	49
4.2.2 TCR- $\beta$ Analyse transformierter kutaner T-Zell-Lymphome	54
4.2.3 Klonalitätsanalysen von nicht-kutanen T-NHL mittels TCR- $\beta$ PCR im Vergleich zur TCR- $\gamma$ PCR	58
4.2.4 Untersuchung von reaktiven Hautveränderungen mittels TCR- $\beta$ und TCR- $\gamma$ PCR	62
4.2.5 Zusammenfassender Vergleich der familienspezifischen TCR- $\beta$ PCR mit der TCR- $\gamma$ PCR	64
<b>5 Diskussion</b>	<b>65</b>
<b>5.1 Methodische Aspekte</b>	<b>66</b>
5.1.1 Vergleich bisher publizierter TCR- $\beta$ PCRs	66
5.1.2 Vergleich mit der familienspezifischen TCR- $\beta$ PCR	68
5.1.3 Vergleich der familienspezifischen TCR- $\beta$ PCR mit TCR- $\gamma$ PCRs	69
5.1.4 Klonalitätsanalyse mittels GENESCAN-Technik	70

<b>5.2 Klinische Aspekte</b>	<b>71</b>
5.2.1 Untersuchung von normalem und reaktivem Gewebe	71
5.2.2 Maligne T-Zellproliferationen	71
5.2.3 Vorläufer-T-lymphoblastische Lymphome/Leukämien	72
5.2.4 Peripheres T-Zell-Lymphom, unspezifiziert	72
5.2.5 Kutane T-Zell-Lymphome	73
5.2.6 Anaplastisch großzellige Lymphome	76
5.2.7 Angioimmunoblastische T-Zell-Lymphome	77
5.2.8 Enteropathieassoziierte T-Zell-Lymphome	78
5.2.9 Nasale T/NK-Zell-Lymphome	79
5.2.10 Morbus Hodgkin	79
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>81</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>94</b>

## 1. Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
AILD	Angioimmunoblastisches T-Non-Hodgkin-Lymphom
B-ALCL	Diffuses großzelliges B-NHL von der anaplastischen Variante
B-NHL	Non-Hodgkin-Lymphom vom B-Zelltyp
Bp	Basenpaare
C-Segment	<i>Constant</i> -Segment des T-Zellrezeptor- $\beta$ -Kettengens
CD	<i>cluster of differentiation</i>
D-Segment	<i>Diversity</i> -Segment des T-Zellrezeptor- $\beta$ -Kettengens
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Gew. %	Gewichtsprozent
ITCL	Intestinales T-Zell-Lymphom
J-Segment	<i>Joining</i> -Segment des T-Zellrezeptor- $\beta$ -Kettengens
Kb	Kilobasen (1000 Basen)
M	Molarität
Min.	Minute(n)
MF	Mycosis fungoides
MH	Morbus Hodgkin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBL	periphere Blut-Lymphozyten
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde(n)
SS	Sézary-Syndrom
St.	Stunde(n)
T-ALCL	Anaplastisch-großzelliges Lymphom vom T-Zell-Typ
T-NHL	Non-Hodgkin-Lymphom vom T-Zell-Typ
TAE	Tris-Base/Essigsäure/EDTA
TBE	Tris-Base/Borsäure/EDTA
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TCR- $\alpha$	T-Zellrezeptor-Alpha-Kette
TCR- $\beta$	T-Zellrezeptor-Beta-Kette
TCR- $\gamma$	T-Zellrezeptor-Gamma-Kette
TCR- $\delta$	T-Zellrezeptor-Delta-Kette
TE	Tris/ EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris-base	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid
V-Segment	<i>Variability</i> -Segment des T-Zellrezeptor- $\beta$ -Kettengens
V/v	Volumen/Volumen

## 6. Zusammenfassung

T-Zell-Lymphome treten in verschiedenen klinischen und histologischen Erscheinungsformen auf, die ihre Abgrenzung von nicht-malignen T-Zell Lymphoproliferationen häufig schwierig macht. Der Nachweis klonaler T-Zellrezeptor-Umlagerungen bietet für diese Unterscheidung eine wichtige Hilfestellung, da maligne T-NHL sich immer durch eine klonale T-Zellpopulation mit identischen T-Zellrezeptor-Umlagerungen auszeichnen.

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Entwicklung einer neuen Methode zum Nachweis klonaler T-Zellrezeptor-Umlagerungen. Hierfür wurden 13 neue J $\beta$ -Primer generiert, die zusammen mit einem modifizierten V $\beta$ -Primer eingesetzt wurden. Darüber hinaus wurde für die Analyse der entstandenen PCR-Produkte ein neues automatisiertes Trennverfahren (GENESCAN) etabliert und angewendet, das in der Lage ist, PCR-Produkte bis auf ein einziges Basenpaar zu unterscheiden. Schließlich wurde das neu entwickelte TCR- $\beta$  PCR-Verfahren mit einem bestehenden TCR- $\gamma$  Verfahren verglichen.

In einer großen Vergleichsstudie mit 132 Proben von 62 Patienten mit verschiedenen T-Zell-Lymphomen- bzw. Leukämien konnten wir mittels der familienspezifischen TCR- $\beta$  PCR in 61/62 der Fälle (98,4 %) eine monoklonale TCR- $\beta$  Umlagerung nachweisen. Zusätzlich konnte der identische T-Zellklon in 15/18 korrespondierenden regionären Lymphknoten und in 7/11 Blutproben detektiert werden. Im Gegensatz hierzu zeigte die TCR- $\gamma$  PCR eine T-Zell-Klonalität lediglich in 50/62 (80 %) Patienten sowie in 63 % der Lymphknoten und 44 % der Blutproben.

Die Ergebnisse zeigen, daß die neue TCR- $\beta$  PCR in der Lage ist, praktisch alle klonalen T-Zellpopulationen nachzuweisen. Da dieser Nachweis nicht auf qualitativ hochwertige DNA beschränkt ist, sondern auch bei in Paraffin-eingebettetem Gewebematerial gleiche Ergebnisse liefert, ist das hier beschriebene Verfahren allen anderen bisher eingesetzten Methoden überlegen. Damit stellt die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und etablierte TCR- $\beta$  PCR eine echte Alternative zu den bisher verwendeten Nachweismethoden dar.



## 7. Literaturverzeichnis

---

- <sup>1</sup> Lin AY, Tucker MA: Epidemiology of Hodgkin's Disease and Non-Hodgkin's Lymphoma. In: Canellos GP, Lister TA, Sklar J, eds. *The Lymphomas*. Philadelphia:WB Saunders; 1998: 43-61.
- <sup>2</sup> Coiffier B, Brousse N, Peuchmaur M, Berger F, Gisselbrecht C, Bryon PA, Diebold J: Peripheral T-cell lymphomas have a worse prognosis than B-cell lymphomas: A prospective study of 361 immunophenotyped patients treated with the LNH-84 regimen. The GELA (Groupe d'Etude des Lymphomes Aggressives). *Ann Oncol* 1990;1:45-50.
- <sup>3</sup> Ng CS, Chan JK, Lo ST, Poon YF: Immunophenotypic analysis of non-Hodgkin's lymphomas in Chinese. A study of 75 cases in Hong Kong. *Pathology* 1986;18:419-25.
- <sup>4</sup> The non-Hodgkin's lymphoma classification project. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: Summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer* 1982;49:2112-2135.
- <sup>5</sup> Lennert K, Mori N, Stein H, Kaiserling E: The histopathology of malignant lymphoma. *Br J Haematol* 1975;31:193-203.
- <sup>6</sup> Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf Peeters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink HK, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiaer E, Warnke RA: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 1994;84:1361-1392.
- <sup>7</sup> Jaffe ES, Harris NL, Diebold J, Müller-Hermelink HK: World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: A progress report. *Am J Clin Pathol* 1999;111 (Suppl):S8-S12.
- <sup>8</sup> Stein H: Die neue WHO Klassifikation der malignen Lymphome. *Pathologie* 2000;21:101-105.
- <sup>9</sup> Schwartz RH: T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Ann Rev Immunol* 1985;3:237-261.
- <sup>10</sup> Yagüe J, White J, Coleclough C, Kappler J, Palmer E, Marrack P: The T-cell receptor: The  $\alpha$  and  $\beta$  chains define idiotype, and antigen and MHC specificity. *Cell* 1985;42: 81-87.
- <sup>11</sup> Zinkernagl RM, Doherty PC: Restriction of in vitro T-cell mediated cytotoxicity in lymphocytic chorionmeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248:701-702.
- <sup>12</sup> Meuer SC, Schlossmann SF, Reinherz EL: Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4+ and T8+ effector T-cells recognize products of different major histocompatibility complex regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:4395-4399.

- 
- <sup>13</sup> Sims JE, Tunnacliffe A, Smith WJ, Rabbitts TH: Complexity of human T-cell antigen receptor beta-chain constant- and variable-region genes. *Nature* 1984;312:541-545.
- <sup>14</sup> Kimura N, Toyonaga B, Yoshikai Y, Triebel F, Debre P, Minden MD, Mak TW: Sequences and diversity of human T-cell receptor beta chain variable-region genes. *J Exp Med* 1986;164:739-750.
- <sup>15</sup> Rowen L, Koop BF, Hood L: The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T-cell receptor locus. *Science* 1996;272:1755-1762.
- <sup>16</sup> Toyonaga B, Yoshikai Y, Vadasz V, Chin B, Mak TW: Organisation and sequences of the diversity, joining, and constant region genes of the human T-cell receptor beta chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:8624-8628.
- <sup>17</sup> Tunnacliffe A, Rabbitts TH: Sequence of the D beta 2-J beta 2 region of the human T-cell receptor beta-chain locus. *Nucleic Acid Res* 1985;13:6651-6661.
- <sup>18</sup> Chien YH, Iwashima M, Kaplan KB, Elliot JF, Davis MM: A new T-cell receptor gene located within the a locus and expressed early in T-cell differentiation. *Nature* 1987;327:677-682.
- <sup>19</sup> Petrie HT, Livak F, Burtrum D, Mazel S: T-cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue, and T-cell production. *J Exp Med* 1995;128:121-127.
- <sup>20</sup> Janeway CA Jr: Thymic selection: two pathways to life and to death. *Immunity* 1994;1:3-6.
- <sup>21</sup> Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore DG: RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 1990;248:1517-1523.
- <sup>22</sup> Lindsten T, Fowlkes BJ, Samelson LE, Davis MM, Chien YH: Transient rearrangements of the T-cell antigen receptor alpha locus in early thymocytes. *J Exp Med* 1987;166:761-775.
- <sup>23</sup> Southern EM: Detection of specific sequences among fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503-517.
- <sup>24</sup> Weiss LM, Hu E, Wood GS, Moulds C, Cleary ML, Warnke R, Sklar J: Clonal rearrangements of T-cell receptor genes in Mycosis fungoides and dermatopathic lymphadenopathy. *N Engl J Med* 1985;313:539-544.
- <sup>25</sup> Griesser H, Feller A, Lennert K, Minden M, Mak TW: Rearrangement of the beta chain of the T-cell antigen receptor and immunoglobulin genes in lymphoproliferative disorders. *J Clin Invest* 1986;78:1179-1184.
- <sup>26</sup> Weiss LM, Wood GS, Hu E, Abel EA, Hoppe RT, Sklar J: Detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in the peripheral blood of patients with Mycosis fungoides/sézary syndrome. *J Invest Dermatol* 1989;92:601-604.

- 
- <sup>27</sup> Weiss LM, Picker LJ, Grogan TM, Warnke RA, Sklar J: Absence of clonal beta and gamma T-cell receptor gene rearrangements in a subset of peripheral T-cell lymphomas. *Am J Pathol* 1988;130:436-442.
- <sup>28</sup> O'Connor N, Crick JA, Wainscoat JS, Gatter KC, Stein H, Falini B, Mason DY: Evidence for monoclonal T lymphocyte proliferation in angioimmunoblastic lymphadenopathy. *J Clin Pathol* 1986;39:1229-1232.
- <sup>29</sup> O'Connor N, Wainscoat JS, Weatherall DJ, Gatter KC, Feller AC, Isaacson PG, Jones D, Lennert K, Pallesen G, Ramsey A, Stein H, Wright DH, Mason DY: Rearrangement of the T-cell receptor beta-chain gene in the diagnosis of lymphoproliferative disorders. *Lancet* 1985;1:1295-1297.
- <sup>30</sup> Mullis KB, Faloona. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase chain reaction. *Meth.Enzym* 1987;155:335-350.
- <sup>31</sup> Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.
- <sup>32</sup> Dyer MJS: T-cell receptor  $\delta/\alpha$  rearrangements in lymphoid neoplasms. *Blood* 1989;74:1073-1083
- <sup>33</sup> Diss TC, Watts M, Pan LX, Burke M, Linch D, Isaacson PG: The polymerase chain reaction in the demonstration of monoclonality in T-cell lymphomas. *J Clin Pathol* 1995;48:1045-1050.
- <sup>34</sup> Kneba M, Bolz I, Linke B, Hiddemann W: Analysis of rearranged T-cell receptor  $\beta$ -chain genes by polymerase chain reaction (PCR), DNA sequencing and automated high resolution PCR fragment analysis. *Blood* 1995;86:3930-3937.
- <sup>35</sup> Kranz DM, Saito H, Heller M, Takagaki Y, Haas W, Eisen HN, Tonegawa S: Limited diversity of the rearranged T-cell gamma gene. *Nature* 1985;313:752-755.
- <sup>36</sup> Hayday AC, Saito H, Gillies SD, Kranz DM, Tanigawa G, Eisen HN, Tonegawa S: Structure, organization, and somatic rearrangement of T-cell gamma genes. *Cell* 1985;40:259-269.
- <sup>37</sup> Bourguin A, Tung R, Galili N, Sklar J: Rapid, nonradioactive detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in lymphoid neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8536-8540.
- <sup>38</sup> Trainor K, Brisco M, Wan J, Neoh S, Grist S, Morley A: Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by polymerase chain reaction. *Blood* 1991;78:192-196.
- <sup>39</sup> Bottaro M, Berti E, Biondi A, Migone N, Crosti L: Heteroduplex analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 1994;83:3271-3278.

- 
- <sup>40</sup> Wood GS, Tung RM, Haeffner AC, Crooks CF, Liao S, Orozco R, Veelken H, Kadin ME, Koh H, Heald P, Barnhill RL, Sklar J: Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements in early Mycosis fungoides/sézary syndrome by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE). *J Invest Dermatol* 1994;103:34-41.
- <sup>41</sup> Kneba M, Bolz I, Linke B, Bertram J, Rothaupt D, Hiddemann W: Characterization of clone-specific rearrangement T-cell receptor gamma-chain genes in lymphomas and leukemias by the polymerase chain reaction and DNA sequencing. *Blood* 1994;84:574-581.
- <sup>42</sup> Theodorou I, Delfau Larue MH, Bigorgne C, Lahet C, Cochet G, Bagot M, Wechsler J, Farcet JP: Cutaneous T-cell infiltrates: Analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangement by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Blood* 1995;86:305-310.
- <sup>43</sup> Greiner TC, Raffeld M, Lutz C, Dick F, Jaffe ES: Analysis of T-cell receptor-gamma gene rearrangements by denaturing gradient gel electrophoresis of GC-clamped polymerase chain reaction products. Correlation with tumor-specific sequences. *Am J Pathol* 1995;146:46-55.
- <sup>44</sup> Witzens M, Möhler T, Willhauck M, Scheibenbogen C, Lee K-H, Keilholz U: 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* 1997;74:123-130.
- <sup>45</sup> Ashton-Key M, Diss T, Du M, Kirkham N, Wotherspoon A, Isaacson P: The value of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous T-cell infiltrates. *Am J Surg Pathol* 1997, 21:743-747.
- <sup>46</sup> Dippel E, Assaf C, Hummel M, Schrag HJ, Stein H, Goerdts S, Orfanos CE: Clonal T-cell receptor  $\gamma$ -chain gene rearrangement by PCR-based GENESCAN analysis in advanced cutaneous T-cell lymphoma: A critical evaluation. *J Pathol* 1999; 188:146-154.
- <sup>47</sup> Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY: Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984; 32:219-229.
- <sup>48</sup> Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA-Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-5467.
- <sup>49</sup> Ruiz M, Giudicelli V, Ginestoux C, Stoehr P, Robinson J, Bodmer J, Marsh SG, Bontrop R, Lemaître M, Lefranc G, Chaume D, Lefranc MP:IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:219-221.
- <sup>50</sup> Lessin SR, Rook AH, Rovera G: Molecular diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma: Polymerase chain reaction amplification of T-cell antigen receptor beta-chain gene rearrangements. *J Invest Dermatol* 1991;96:299-302.

- 
- <sup>51</sup> Knoth K, Roberds S, Poteet C, Tamkun M: Highly degenerate, inosine-containing primers specifically amplify rare cDNA using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 1988;16:10932.
- <sup>52</sup> Patil RV, Dekker EE: PCR amplification of an *Escherichia coli* gene using mixed primers containing deoxyinosine at ambiguous positions in degenerate amino acid codons. *Nucleic Acids Res* 1990;18:3080.
- <sup>53</sup> Knittel T, Picard D: PCR with degenerate primers containing deoxyinosine fails with Pfu DNA polymerase. *PCR Methods Appl* 1993;2:346-347.
- <sup>54</sup> Foss HD, Anagnostopoulos I, Araujo I, Assaf C, Demel G, Kummer JA, Hummel M, Stein H: Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and Null-cell phenotype express cytotoxic molecules. *Blood* 1996;88:4005-4011.
- <sup>55</sup> Ferradini L, Roman-Roman S, Azocar J, Michalaki H, Triebel F, Hercend T: Studies on the human T cell receptor alpha/beta variable region genes. II. Identification of four additional V beta subfamilies. *Eur J Immunol*. 1991;21:935-942.
- <sup>56</sup> Dippel E; Goerdts S, Assaf C, Stein H, Orfanos CE: Cutaneous T-cell lymphoma severity index and T-cell gene rearrangement. *Lancet* 1997;350:1776-1777.
- <sup>57</sup> Salhany KE, Cousar JB, Greer JP, Casey TT, Fields JP, Collins RD: Transformation of cutaneous T cell lymphoma to large cell lymphoma. A clinicopathologic and immunologic study. *Am J Pathol* 1988;132:265-77.
- <sup>58</sup> Cerroni L, Rieger E, Hodl S, Kerl H: Clinicopathologic and immunologic features associated with transformation of Mycosis fungoides to large-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 1992;16:543-52.
- <sup>59</sup> Diamandidou E, Colome-Grimmer M, Fayad L, Duvic M, Kurzrock R: Transformation of Mycosis fungoides/ Sézary syndrome: clinical characteristics and prognosis. *Blood* 1998;92:1150-1159.
- <sup>60</sup> Klemke CD, Dippel E, Assaf C, Hummel M, Stein H, Goerdts S, Orfanos CE: Follicular Mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 1999;141:137-140.
- <sup>61</sup> Ben-Nun A, Liblau R, Cohen L, Lehmann D, Tournier-Lasserre E, Rosenzweig A, Zhang J, Raus J, Bach M: Restricted T-cell receptor V beta gene usage by myelin basic protein-specific T-cell clones in multiple sclerosis: Predominant genes vary in individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:2466-2470.
- <sup>62</sup> McCarthy KP, Sloane JP, Kabarowski JH, Matutes E, Wiedemann LM: The rapid detection of clonal T-cell proliferations in patients with lymphoid disorders. *Am J Pathol* 1991;138:821-828.

- 
- <sup>63</sup> Slack DN, McCarthy KP, Wiedemann LM, Sloane JP: 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* 1993;2:223-232.
- <sup>64</sup> Diss TC, Watts M, Pan LX, Burke M, Linch D, Isaacson PG: The polymerase chain reaction in the demonstration of monoclonality in T-cell lymphomas. *J Clin Pathol* 1995;48:1045-1050.
- <sup>65</sup> Obata F, Tsunoda M, Ito K, Ito I, Kaneko T, Pawelec G, Kashiwagi N: A single universal primer for the T-cell receptor (TCR) variable genes enables enzymatic amplification and direct sequencing of TCR $\beta$  cDNA of various T-cell clones. *Hum Immunol* 1993;36:163-167.
- <sup>66</sup> Kono DH, Baccala R, Balderas RS, Kovac SJ, Heald PW, Edelson RL, Theofilopoulos AN: Application of a multiprobe RNase protection assay and junctional sequences to define V $\beta$  gene diversity in Sézary syndrome. *Am J Pathol* 1992;140:823-830.
- <sup>67</sup> Zemlin M: Entwicklung einer Methode zur Frühdiagnose von T-Zell-Lymphomen: Nachweis monoklonaler Umlagerungen der Beta-Kette des T-Zell-Rezeptor-Gens mit der Polymerase-kettenreaktion. 1997 Inaugural-Dissertation, Berlin.
- <sup>68</sup> Zemlin M, Hummel M, Anagnostopoulos I, Stein H: Improved polymerase chain reaction detection of clonally rearranged T-cell receptor beta chain genes. *Diagn Mol Pathol* 1998;7:138-145.
- <sup>69</sup> Owen RG, Goulden NJ, Oakhill A, Shiach C, Evans PA, Potter MN, Morgan GJ: Comparison of fluorescent consensus IgH PCR and allele-specific oligonucleotide probing in the detection of minimal residual disease in childhood ALL. *Br J Haematol* 1997;97:457-459.
- <sup>70</sup> Assaf C, Hummel M, Dippel E, Goerdts S, Müller HH, Anagnostopoulos I, Orfanos CE, Stein H: 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* 2000;96:640-646.
- <sup>71</sup> Yoshikai Y, Toyonaga B, Yasuhiro K, Kimura N, Griesser H, Mak TW: Repertoire of the human T- cell gamma genes: High frequency of nonfunctional transcripts in thymus and mature T cells. *Eur J Immunol* 1987;17:119-126.
- <sup>72</sup> Tycko B, Coyle H, Sklar J: Chimeric  $\gamma$ - $\delta$  signal joints: Implications for the mechanism and regulation of T-cell receptor gene rearrangement. *J Immunol* 1991;147:705-713.
- <sup>73</sup> Scheller U, Muche JM, Sterry W, Lukowsky A: 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* 1998;19:653-658.

- 
- <sup>74</sup> Simon M, Kind P, Kaudewitz P, Krokowski M, Graf A, Prinz J, Puchta U, Medeiros LJ, Sander CA: 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* 1998;152:29-33.
- <sup>75</sup> Szepanski, Langerak AW, Wolvers-Tettero ILM, Ossenkoppele GJ, Verhoef G, Stul M, Petersen EJ, De Bruijn MAC, Van't Veer MB, Van Dongen JJM. Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement patterns in acute lymphoblastic leukemia are less mature in adults than in children: implications for selections of PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1998;12:1081-1088.
- <sup>76</sup> Thiel E, Kranz BR, Raghavachar A, Bartram CR, Löffler H, Messerer D, Ganser A, Ludwig WD, Büchner T, Hölzer D. Prethymic phenotype and genotype of pre-T (CD7+/ER-)-cell leukemia and its clinical significance within adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1989;73:1247-1258.
- <sup>77</sup> Chan JK, Sin VC, Wong KF, Ng CS, Tsang WY, Chan CH, Cheung MM, Lau WH: Nonnasal lymphoma expressing the natural killer cell marker CD56: a clinicopathologic study of 49 cases of an uncommon aggressive neoplasm. *Blood* 1997;89:4501-4513.
- <sup>78</sup> Jaffe ES, Krenacs L, Raffeld MC: Classification of T-cell and NK-cell neoplasms based on the REAL-classification. *Ann Oncol* 1997;8:17-24.
- <sup>79</sup> Alibert JL. Tableau du plan fungoide. In: Description des maladies de la peau observees a l'Hopital Saint-Louis, et exposition des meilleures methodes suivies pour leur traitement. Paris: Barrois l'Áine et Fils 1806;157-161.
- <sup>80</sup> Sézary A, Bouvrain Y. Erythrodermie avec presence de cellules montreuses dans derme et sang circulant. *Bull Soc Fr Dermatol Syph* 1938;45:254-260.
- <sup>81</sup> Willemze R, Kerl H, Sterry W, Berti E, Cerroni L, Chimenti S, Diaz-Perez JL, Geerts ML, Goos M, Knobler R, Ralfkiaer E, Santucci M, Smith N, Wechsler J, van Vloten WA, Meijer CJ: 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* 1997;90:354-371.
- <sup>82</sup> Mielke V, Staib G, Boehnke WH, Duller B, Sterry W: Clonal disease in early cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatol Clin* 1994;12: 351-360.
- <sup>83</sup> Sterry W, Staib G: Moderne molekularbiologische Diagnostik kutaner maligner Lymphome. *Hautarzt* 1995; 46:4-9.
- <sup>84</sup> Delfau-Larue MH, Petrella T, Lahet C, Lebozec C, Bagot M, Roudot-Thoraval F, Dalac S, Farcet JP, Wechsler J: Value of clonality of cutaneous T-lymphocytes in the diagnosis and follow-up of patients with Mycosis fungoides. *J Pathol* 1998;184:185-190.

- 
- <sup>85</sup> Schlegelberger B, Himmler A, Götde E, Grote W, Feller AC, Lennert K: Cytogenetic findings in peripheral T-cell lymphomas as a basis for distinguishing low-grade and high-grade lymphomas. *Blood* 1994;83:505-509.
- <sup>86</sup> Dippel E, Assaf C, Hummel M, Stein H, Goerdts S, Orfanos CE: Nachweis klonaler T-Zellrezeptor- $\gamma$ -Umlagerungen bei kutanen T-Zell-Lymphomen mittels der PCR in Kombination mit der GENESCAN-Analyse: Sensitivität und Kriterien der Spezifität. In: Plettenberg A, Meigel WN, Moll I: *Dermatologie an der Schwelle zum neuen Jahrtausend*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2000; 460-462.
- <sup>87</sup> Weiss LM, Hu E, Wood GS, Moulds C, Cleary ML, Warnke R, Sklar J: Clonal rearrangements of T-cell receptor genes in Mycosis fungoides and dermatopathic lymphadenopathy. *N Engl J Med* 1985;313:539-544.
- <sup>88</sup> Lynch JW Jr, Linoilla I, Sausville EA, Steinberg SM, Ghosh BC, Nguyen DT, Schechter GP, Fischmann AB, Ihde DC, Stocker JL, et al: Prognostic implications of evaluation for lymph node involvement by T-cell antigen receptor gene rearrangement in Mycosis fungoides. *Blood* 1992;79:3293-3299.
- <sup>89</sup> Bakels V, van Oostveen JW, Geerts ML, Gordijn RL, Walboomers JM, Scheffer E, Meijer CJ, Willemze R: Diagnostic and prognostic significance of clonal T-cell receptor beta-gene rearrangements in lymph nodes of patients with Mycosis fungoides. *J Pathol.* 1993;170:249-255.
- <sup>90</sup> Kern DE, Kidd PG, Moe R, Hanke D, Olerud JE: Analysis of T-cell receptor gene rearrangement in lymph nodes of patients with Mycosis fungoides. Prognostic implications. *Arch Dermatol* 1998;134:158-164.
- <sup>91</sup> Bakels V, van Oostveen JW, Gordijn RL, Walboomers JM, Meijer CJ, Willemze R: Frequency and prognostic significance of clonal T-cell receptor beta-gene rearrangements in the peripheral blood of patients with Mycosis fungoides. *Arch Dermatol* 1992;128:1602-1607.
- <sup>92</sup> Weiss LM, Wood GS, Hu E, Abel EA, Hoppe RT, Sklar J: Detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in the peripheral blood of patients with Mycosis fungoides/Sézary syndrome. *J Invest Dermatol* 1989;92:601-604.
- <sup>93</sup> Muche JM, Lukowsky A, Asadullah K, Gellrich S, Sterry W: Demonstration of frequent occurrence of clonal T-cells in the peripheral blood of patients with primary cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 1997;90:1636-1642.
- <sup>94</sup> Stein H, Mason DY, Gerdes J, O'Connor N, Wainscoat J, Pallesen G, Gatter K, Falini B, Delsol G, Lemke H, Schwarting R, Lennert K: 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* 1985;66:848-858.



- 
- <sup>95</sup> Falini B, Pileri S, Pizzolo G, Durkop H, Flenghi L, Stirpe F, Martelli MF, Stein H: CD30 (Ki-1) molecule: a new cytokine receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy. *Blood* 1995;85:1-14.
- <sup>96</sup> Rimokh R, Magaud JP, Berger F, Samarut J, Coiffier B, Germain D, Mason DY. A translocation involving a specific breakpoint (q35) on chromosome 5 is characteristic of anaplastic large cell lymphoma ('Ki-1 lymphoma'). *Br J Haematol* 1989;71:31-36.
- <sup>97</sup> Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltmann DL, Look AT: Fusion of kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994; 263:1281-1284.
- <sup>98</sup> Herbst H, Anagnostopoulos I, Heinze B, Dürkop H, Hummel M, Stein H: ALK gene products in anaplastic large cell lymphomas and Hodgkin's disease. *Blood* 1995;86:1694-1700.
- <sup>99</sup> Falini B, Bigerna B, Fizzotti M, Pulford K, Pileri SA, Delsol G, Carbone A, Paulli M, Magrini U, Menestrina F, Giardini R, Pilotti S, Mezzelani A, Ugolini B, Billi M, Pucciarini A, Pacini R, Pelicci PG, Flenghi L: ALK expression defines a distinct group of T/null lymphomas ("ALK lymphomas") with a wide morphological spectrum. *Am J Pathol.* 1998;153:875-886.
- <sup>100</sup> Pulford K, Lamant L, Morris SW, Butler LH, Wood KM, Stroud D, Delsol G, Mason DY. Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood* 1997;89:1394-1404.
- <sup>101</sup> Falini B, Bigerna B, Fizzotti M, Pulford K, Pileri S, Delsol G, Carbone A, Paulli M, Magrini U, Menestrina F, Giardini R, Pilotti S, Mezzelani A, Ugolini B, Billi M, Pucciarini A, Pacini A, Pelicci PG, Flenghi L: ALK expression defines a distinct group of T/Null Lymphomas ("ALK lymphomas") with a wide morphological spectrum. *Blood* 1998;153:875-886.
- <sup>102</sup> Stein H, Foss HD, Durkop H, Marafioti T, Delsol G, Pulford K, Pileri S, Falini B: CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood* 2000;96:3681-3695.
- <sup>103</sup> Bekkenk MW, Geelen FA, van Voorst Vader PC, Heule F, Geerts ML, van Vloten WA, Meijer CJ, Willemze R: 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* 2000;95:3653-3661.
- <sup>104</sup> Coupland SE, Foss HD, Assaf C, Auw-Haedrich C, Anastassiou G, Anagnostopoulos I, Hummel M, Karesh JW, Lee WR, Stein H: T-cell and T/natural killer-cell lymphomas involving ocular and ocular adnexal tissues: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular study of seven cases. *Ophthalmology.* 1999; 106:2109-2120.

- 
- <sup>105</sup> O'Connor NT, Stein H, Gatter KC, Wainscoat JS, Crick J, Al Saati T, Falini B, Delsol G, Mason DY: Genotypic analysis of large cell lymphomas which express the Ki-1 antigen. *Histopathology* 1987;11:733-740.
- <sup>106</sup> Herbst H, Tippelmann G, Anagnostopoulos I, Gerdes J, Schwarting R, Boehm T, Pileri S, Jones DB, Stein H: Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement in Hodgkin's disease and Ki-1 positive anaplastic large cell lymphoma: dissociation between phenotype and genotype. *Leu Res* 1989;13:103-116.
- <sup>107</sup> Anagnostopoulos I, Hummel M, Finn T, Tiemann M, Korbjuhn P, Dimmler C, Gatter K, Dallenbach F, Parwaresch MR, Stein H: Heterogeneous Epstein-Barr virus infection patterns in peripheral T-cell lymphoma of angioimmunoblastic lymphadenopathy type. *Blood* 1992;80:1804-1812.
- <sup>108</sup> Tobinai K, Minato K, Ohtsu T, Mukai K, Kagami Y, Miwa M, Watanabe S, Shimoyama M: Clinicopathologic, immunophenotypic, and immunogenotypic analyses of immunoblastic lymphadenopathy-like T-cell lymphoma. *Blood* 1988;72:1000-1006.
- <sup>109</sup> Frizzera G, Moran EM, Rappaport H: Angio-immunoblastic lymphadenopathy. Diagnosis and clinical course. *Am J Med.* 1975;59:803-818.
- <sup>110</sup> Lipford EH, Smith HR, Pittaluga S, Jaffe ES, Steinberg AD, Cossman J: Clonality of angioimmunoblastic lymphadenopathy and implications for its evolution to malignant lymphoma. *J Clin Invest* 1987;79:637-642.
- <sup>111</sup> Weiss LM, Strickler JG, Dorfman RF, Horning SJ, Warnke RA, Sklar J: Clonal T-cell populations in angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Am J Pathol* 1986;122:392-397.
- <sup>112</sup> Cellier C, Patey N, Mauvieux L, Jabr B, Delabesse E, Cervoni JP, Burtin ML, Guy-Grand D, Bouhnik Y, Modigliani R, Barbier JP, Macintyre E, Brousse N, Cerf-Bensussan N: Abnormal intestinal intraepithelial Lymphocytes in refractory Sprue. *Gastroenterology* 1998;114:471-481.
- <sup>113</sup> O'Farrelly C, Feighery C, O'Brian DS, Stevens F, Connolly CE, McCarthy C, Weir DG: Humoral response to wheat protein in patients with coeliac disease and enteropathy associated T-cell lymphoma. *Br Med J* 1986;293:908-910.
- <sup>114</sup> Mead GM, Whitehouse JM, Thompson J, Sweetenham JW, Williams CJ, Wright DH: Clinical features and management of malignant histiocytosis of the intestine. *Cancer* 1987;60:2791-2796.
- <sup>115</sup> Isaacson PG, O'Connor NTJ, Spencer J, Bevan DH, Connolly CE, Kirkham N, Pollock DJ, Wainscoat JS, Stein H, Mason DY: Malignant histiocytosis of the intestine: a T-cell lymphoma. *Lancet* 1985;2:688-691.

- 
- <sup>116</sup> Spencer J, Cerf-Bensussan N, Jarry A, Brousse N, Guy-Grand D, Krajewski A, Isaacson PG: Enteropathy associated T-cell lymphoma (malignant histiocytosis of the intestine) is recognized by a monoclonal antibody (HML-1) that defines a membrane molecule on human mucosal lymphocytes. *Am J Pathol.* 1988;132:1-5.
- <sup>117</sup> Murray A, Cuevas EC, Jones B, Wright DH: Study of the immunohistochemistry and T cell clonality of enteropathy-associated T cell lymphoma. *Am J Pathol* 1995;146:509-519.
- <sup>118</sup> Foss HD, Schmitt-Gräf A, Daum S, Anagnostopoulos I, Assaf C, Hummel M, Stein H: Origin of primary gastric T-cell lymphomas from intraepithelial T-lymphocytes: Report of two cases. *Histopathology* 1999;34:9-15.
- <sup>119</sup> Daum S, Assaf C, Dederke B, Heise W, Foss HD, Ullrich R, Hummel M, Stein H, Riecken EO und die Studiengruppe Intestinale Non-Hodgkin Lymphome: Nachweis von T-Zellrezeptor- $\gamma$ -Genumlagerungen in Biopsien und Resektaten von Patienten mit Intestinalem T-Zell-Lymphom. Poster. Deutscher Gastroenterologen Kongress, Essen 1997.
- <sup>120</sup> Daum S, Hummel M, Weiss D, Peters M, Wiedenmann B, Schaper F, Stein H, Riecken EO, Foss H: Refractory sprue syndrome with clonal intraepithelial lymphocytes evolving into overt enteropathy-type intestinal T-cell lymphoma. *Digestion.* 2000;62:60-65.
- <sup>121</sup> Jaffe ES, Chan JK, Su IJ, Frizzera G, Mori S, Feller AC, Ho FC: Report of the workshop on nasal and related extranodal angiocentric T/natural killer cell lymphomas. Definitions, differential diagnosis and epidemiology. *Am J Surg Pathol* 1996;20:103-111.
- <sup>122</sup> Hummel M, Ziemann K, Lammert H, Pileri S, Sabattini E, Stein H: Hodgkin's disease with monoclonal and polyclonal populations of Reed-Sternberg cells. *N Engl J Med* 1995;333:901-906.
- <sup>123</sup> Kuppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, Hansmann ML: Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10962-10966.
- <sup>124</sup> Marafioti T, Hummel M, Anagnostopoulos I, Foss HD, Falini B, Delsol G, Isaacson PG, Pileri S, Stein H: Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. *N Engl J Med* 1997;337:453-458.
- <sup>125</sup> Brauninger A, Hansmann ML, Strickler JG, Dummer R, Burg G, Rajewsky K, Kuppers R. Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1999;22;340:1239-1247.
- <sup>126</sup> Marafioti T, Hummel M, Anagnostopoulos I, Foss HD, Huhn D, Stein H: Classical Hodgkin's disease and follicular lymphoma originating from the same germinal center B cell. *J Clin Oncol* 1999;17:3804-3809.

- 
- <sup>127</sup> Marafioti T, Hummel M, Foss HD, Laumen H, Korbjuhn P, Anagnostopoulos I, Lammert H, Demel G, Theil J, Wirth T, Stein H: Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* 2000;95:1443-1450.
- <sup>128</sup> Foss HD, Reusch R, Demel G, Lenz G, Anagnostopoulos I, Hummel M, Stein H: Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin. *Blood* 1999;94:3108-3113.
- <sup>129</sup> Dallenbach FE, Stein H: Expression of T-cell-receptor beta chain in Reed-Sternberg cells. *Lancet* 1989;2:828-830.
- <sup>130</sup> Kadin ME, Muramoto L, Said J: Expression of T-cell antigens on Reed-Sternberg cells in a subset of patients with nodular sclerosing and mixed cellularity Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1988;130:345-353.
- <sup>131</sup> Oudejans JJ, Kummer JA, Jiwa M, van der Valk P, Ossenkuppele GJ, Kluin PM, Kluin-Nelemans JC, Meijer CJ: Granzyme B expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1996;148:233-240.
- <sup>132</sup> Drexler HG: Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. II. Continuous cell lines. *Leuk Lymphoma* 1993;9:1-25.
- <sup>133</sup> Kaudewitz P, Stein H, Plewig G, Schwarting R, Gerdes J, Burg G, Kind P, Eckert F, Braun-Falco O: Hodgkin's disease followed by lymphomatoid papulosis. Immunophenotypic evidence for a close relationship between lymphomatoid papulosis and Hodgkin's disease. *J Am Acad Dermatol* 1990;22:999-1006.
- <sup>134</sup> Seitz V, Hummel M, Marafioti T, Anagnostopoulos I, Assaf C, Stein H: Detection of T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood* 2000; 95:3020-3024.
- <sup>135</sup> Muschen M, Rajewsky K, Brauninger A, Baur AS, Oudejans JJ, Roers A, Hansmann ML, Kuppers R: Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med* 2000;191:387-394.

---

## **8 Anhang**

### **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Harald Stein für die freundliche Überlassung des Rahmenthemas sowie die Förderung und Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Michael Hummel möchte ich ganz besonders sowohl für die Anregungen beim experimentellen Teil, als auch für eine ständig engagierte Unterstützung und Diskussionsbereitschaft danken, die sich nicht nur auf diese Arbeit beschränkte.

Mein Dank gilt außerdem PD Dr. Ioannis Anagnostopoulos für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin danke ich für die ausgesprochen angenehme Zusammenarbeit, dabei gilt mein besonderer Dank Herrn Hans-Henning Müller, Frau Hetty Lammert und Frau Hella Hempel für die hervorragende technische Unterstützung.

Besonders meiner lieben Frau Selma möchte ich für ihre Geduld und Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit danken.

---

Ein Teil in meiner Dissertation vorgelegten Ergebnisse wurde bereits an anderer Stelle publiziert oder vorgetragen:

**Originalarbeiten:**

- 1.) Assaf C, Hummel M, Dippel E, Goerdts S, Müller HH, Anagnostopoulos I, Orfanos CE, Stein H: 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* 2000;96:640-646.
- 2.) Seitz V, Hummel M, Marafioti T, Anagnostopoulos I, Assaf C, Stein H: Detection of T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood* 2000; 95:3020-3024.
- 3.) Coupland SE, Foss HD, Assaf C, Auw-Haedrich C, Anastassiou G, Anagnostopoulos I, Hummel M, Karesh JW, Lee WR, Stein H: T-cell and T/natural killer-cell lymphomas involving ocular and ocular adnexal tissues: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular study of seven cases. *Ophthalmology*. 1999; 106:2109-2120.
- 4.) Klemke CD, Dippel E, Assaf C, Hummel M, Stein H, Goerdts S, Orfanos CE: Follicular Mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 1999;141:137-140.
- 5.) Dippel E, Assaf C, Hummel M, Schrag HJ, Stein H, Goerdts S, Orfanos CE: Clonal T-cell receptor  $\gamma$ -chain gene rearrangement by PCR-based GENESCAN analysis in advanced cutaneous T-cell lymphoma: A critical evaluation. *J Pathol* 1999; 188:146-154.
- 6.) Foss HD, Schmitt-Gräf A, Daum S, Anagnostopoulos I, Assaf C, Hummel M, Stein H: Origin of primary gastric T-cell lymphomas from intraepithelial T-lymphocytes: Report of two cases. *Histopathology* 1999;34:9-15.

---

7.) Dippel E; Goerd S, Assaf C, Stein H, Orfanos CE: Cutaneous T-cell lymphoma severity index and T-cell gene rearrangement. Lancet 1997;350:1776-1177.

8.) Foss HD, Anagnostopoulos I, Araujo I, Assaf C, Demel G, Kummer JA, Hummel M, Stein H: Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and Null-cell phenotype express cytotoxic molecules. Blood 1996;88:4005-4011.

### **Abstracts bzw. Buchbeiträge:**

1.) Assaf C, Hummel M, Dippel E, Goerd S, Müller HH, Anagnostopoulos I, Orfanos CE, Stein H: "Detection of T-cell receptor beta chain rearrangement in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction". Arch Dermatol Res 2000;292:89.

2.) Assaf C, Hummel M, Dippel E, Goerd S, Müller HH, Anagnostopoulos I, Orfanos CE, Stein H: "Detection of T-cell receptor beta chain rearrangement in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction". 1998,

1. Preis der Wissenschaftswoche des Universitätsklinikums Benjamin Franklin.

3.) Dippel E, Assaf C, Hummel M, Stein H, Goerd S, Orfanos CE: Nachweis klonaler T-Zellrezeptor- $\gamma$ -Umlagerungen bei kutanen T-Zell-Lymphomen mittels der PCR in Kombination mit der GENESCAN-Analyse: Sensitivität und Kriterien der Spezifität. In: Plettenberg A, Meigel WN, Moll I: Dermatologie an der Schwelle zum neuen Jahrtausend. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2000; 460-462.

4.) Daum S, Assaf C, Dederke B, Heise W, Foss HD, Ullrich R, Hummel M, Stein H, Riecken EO und die Studiengruppe Intestinale Non-Hodgkin Lymphome: Nachweis von T-Zellrezeptor- $\gamma$ -Genumlagerungen in Biopsien und Resektaten von Patienten mit Intestinalem T-Zell-Lymphom. Deutscher Gastroenterologen Kongress, Essen 1997.

---

5.) Foss HD, Demel G, Anagnostopoulos I, Araujo I, Assaf C, Hummel M, Stein H: Expression zytotoxischer Moleküle in anaplastischen großzelligen Non-Hodgkin-Lymphomen vom T- und Null-Zeltyp. 81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Berlin 1997.



---

**Lebenslauf**
**Chalid Assaf**

 Bosestr. 44  
 12103 Berlin

Geboren am 18.01.1969 in Darmstadt

- |                  |  |
|------------------|--|
| 1976-80          | Gebrüder Grimm Grundschule in Darmstadt  |
| 1980-90          | Justus-Liebig- Gymnasium in Darmstadt  |
| 1990             | Allgemeine Hochschulreife  |
| 1990-97          | Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin  |
| 1992             | Ärztliche Vorprüfung   |
| 1993             | I. Staatsexamen  |
| 1996             | II. Staatsexamen   |
| 1996-97          | Praktisches Jahr im Universitätsklinikum Benjamin Franklin:<br><i>1. Klinik und Poliklinik für Dermatologie (Prof. Dr. CE. Orfanos)</i><br><i>2. Traumatologie und Wiederherstellungschirurgie</i><br><i>(Prof. Dr. R. Rahmanzadeh)/Allgemeine und Thoraxchirurgie</i><br><i>Prof. Dr. HJ. Buhr)</i><br><i>3. Abteilung für Hämatologie/Onkologie und Transfusionsmedizin</i><br><i>(Prof. Dr. E. Thiel)</i> |
| 5/1997           | III. Staatsexamen und Teilapprobation als Arzt   |
| 1.7.97-13.1.1999 | Arzt im Praktikum im Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Benjamin Franklin der FU Berlin (Leiter: Prof. Dr. H.Stein).   |
| seit 14.1.99     | Vollapprobation sowie Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Universitätsklinikum Benjamin Franklin der FU-Berlin (Leiter: Prof. Dr. CE Orfanos).   |