

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Möglichkeiten und Grenzen der klonspezifischen,  
quantitativen Real-Time-PCR bei Patienten  
mit Sézary Syndrom**

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

Vorgelegt der Medizinische Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Kerstin Wehrheim  
aus Bad Homburg v. d. H.

Datum der Promotion: 22.06.2014



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>XII</b>
<b>Abstract (deutsch)</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das Sézary Syndrom ein kutanes T-Zell-Lymphom.....	1
1.1.1 Klinik.....	2
1.1.2 Histologie.....	3
1.1.3 Diagnostik.....	4
1.1.4 Ätiologie und Pathogenese.....	6
1.1.4.1 Genetische Veränderungen.....	6
1.1.4.2 Infektiologische Einflüsse.....	9
1.1.4.3 Immunologische Eigenschaften.....	9
1.1.4.4 Chemokine.....	11
1.1.5 Therapie.....	12
1.1.6 Prognose.....	14
1.2 Molekulare Diagnostik zum qualitativen Klonalitätsnachweis.....	15
1.3 Die Real-Time- PCR zur Quantifizierung monoklonaler Zellen.....	17
1.4 Fragestellung.....	21
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
2.1 Material.....	23
2.1.1 Geräte.....	23
2.1.2 Software.....	23
2.1.3 Chemikalien.....	24
2.1.4 Puffer und Reaktionslösungen.....	24
2.1.4.1 Proteinase-K-Verdau.....	24
2.1.4.2 Phenol-Chloroform-Extraktion.....	24
2.1.4.3 Gelelektrophorese mit Agarosegelen.....	24
2.1.4.4 Gelelektrophorese mit Acrylamidgel.....	24
2.1.4.5 Sequenzierung.....	25
2.1.4.6 Real- Time- PCR.....	25

2.1.4.7	Allgemein .....	25
2.1.5	Kits .....	25
2.1.6	Primer .....	25
2.1.6.1	Primer zur Sequenzierung des pCR4-TOPO3956 .....	25
2.1.6.2	Backward-Q-Primer.....	26
2.1.6.3	Biomed-2-Primer .....	26
2.1.6.4	$\beta$ -Aktin-Primer.....	27
2.1.7	Sonden .....	27
2.1.8	Kulturmedien.....	28
2.1.9	Bakteriengenotyp.....	28
2.1.10	Plasmid .....	28
2.1.11	Enzyme .....	29
2.1.12	DNS-Größenstandards.....	29
2.2	Methoden.....	30
2.2.1	Patientenkollektiv .....	30
2.2.2	Molekularbiologische Standardmethoden .....	31
2.2.2.1	Extraktion genomischer DNS aus PBMC.....	31
2.2.2.2	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion.....	31
2.2.2.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung .....	32
2.2.2.4	Fluorimetrische Konzentrationsbestimmung.....	32
2.2.2.5	Konventionelle PCR .....	33
2.2.2.6	Klonierung .....	33
2.2.2.7	Gelelektrophorese im Agarosegel.....	35
2.2.2.8	Hochauflösende Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	36
2.2.3	Nachweis der klonalen TCR- $\beta$ -Rearrangements .....	38
2.2.3.1	Amplifikation des TCR- $\beta$ -Genlokus .....	38
2.2.3.2	Fluoreszenzfragmentlängenanalyse mittels GeneScan.....	39
2.2.4	Analyse der TCR- $\beta$ -Rearrangements .....	40
2.2.4.1	Sequenzierungs-PCR .....	40
2.2.4.2	Ethanol/EDTA/Natriumacetat-Fällung.....	41
2.2.4.3	Kapillarelektrophorese.....	41
2.2.4.4	Sequenzanalyse.....	42
2.2.5	Primerdesign für die RT-Q-PCR.....	42
2.2.6	Quantifizierung.....	43
2.2.6.1	Quantitative Real-Time-PCR.....	43
2.2.6.2	Optimierung der PCR-Bedingungen.....	45
2.2.6.3	Klonspezifische PCR.....	45
2.2.6.4	$\beta$ - Aktin-PCR.....	46

2.2.7	Statistische Auswertung .....	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
3.1	Charakterisierung des klonalen TCR- $\beta$ -Rearrangement .....	48
3.1.1	Klonalitätsnachweis .....	48
3.1.1.1	Fluoreszenzfragmentlängenanalyse mittels GeneScan .....	48
3.1.1.2	Hochauflösende Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	49
3.1.2	Sequenzierung und Charakterisierung der N-D-N-Regionen.....	49
3.2	Primerdesign.....	53
3.3	Optimierung der PCR-Bedingungen .....	53
3.3.1	Temperatur.....	54
3.3.1.1	Temperaturoptimierung mit der konventionellen PCR.....	54
3.3.1.2	Temperaturoptimierung mit der RT-Q-PCR.....	54
3.3.2	Primerkonzentration .....	56
3.3.3	MgCl <sub>2</sub> Konzentration.....	57
3.3.4	Sondenkonzentration .....	58
3.4	Sensitivität und quantifizierbare Bereiche.....	59
3.4.1	Kriterien der Standardkurve .....	59
3.4.2	Sensitivität und quantifizierbarer Bereich .....	60
3.4.3	Eigenschaften der N-D-N-Regionen und Sensitivität .....	62
3.4.4	Primerbindungsstellen und Sensitivität der PCR.....	64
3.5	Quantifizierungen .....	66
3.5.1	Bestimmung der absoluten Tumorzellzahl .....	67
3.5.2	Quantifizierung der Gesamtzellzahl .....	69
3.5.3	Kalkulation der relativen Tumorzellzahl .....	71
3.6	Quantifizierungsergebnisse und klinische Daten Patient 4 .....	72
3.6.1	Laborparameter.....	73
3.6.2	Hautbefund .....	75
3.7	Darstellung von CGH Analysen des $\beta$ -Aktin-Genlocus.....	76
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>79</b>
4.1	Korrelation der Quantifizierungsergebnisse zu klinischen Daten .....	79
4.2	Diskussion der Methodik.....	82
4.3	Limitationen der Anwendung der RT-Q-PCR beim SéS .....	86
4.4	Fazit .....	90
4.5	Ausblick.....	92
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>102</b>
	<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>103</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACTB	$\beta$ -Aktin-Gen
APC	Antigen-präsentierenden Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	<i>Aqua bidestillata</i> , zweifach destilliertes Wasser
Bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serume albumine</i> , Rinderserumalbumin
c	Zenti ( $10^{-2}$ )
°C	Grad Celsius
CGH	<i>comparative genomic hybridization</i> , vergleichende genomische Hybridisierung
CL	Kutane Lymphome
CLA	<i>cutaneous lymphocyte antigene</i> , Oberflächenmolekül von T- Zellen
CMV	Cytomegalie-Virus
$C_t$	<i>Cycle threshold</i>
CTCL	<i>Cutaneous t cell lymphoma</i> , Kutane T-Zell-Lymphome
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
D- Segment	<i>Diversity</i> -Segment, DNS-Abschnitt des T-Zell-Rezeptor-Gens
dsDNS	Doppelstrang-DNS
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
E. coli	Escherichia coli
ECP	Extrakorporale Photopherese
ED	Erstdiagnose

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
et al.	<i>et alii</i> , und andere
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FAM	5-Carboxy-Fluoreszin
FFA	Fluoreszenzfragmentlängenanalyse
FFA-GS	Fluoreszenzfragmentlängenanalyse mittels GeneScan-Analyse
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FKS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz- Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm oder <i>gravity</i> , Erdbeschleunigung
GC-Anteil	Anteil der Basen Guanin und Cytosin
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
hdPAGE	Hochauflösende Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Heteroduplexbildung
HE	Hämatoxylin
HiDi	<i>Highly deionized formamide</i> , entionisiertes Formamid
Hkt	Hämatokrit
HLA	Humanes-Leukozyten-Antigene
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
HTLV-1	Humanes T-Zell-lymphotropes Virus
INF $\alpha$	Interferon $\alpha$
ISCL	<i>International Society of Cutaneous Lymphoma</i>
J- Segment	<i>Joining</i> -Segment, DNS-Abschnitt des T-Zell-Rezeptor-Gens
kb	Kilobasen, 1000 Basenpaare
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LB-Medium	Medium nach Luria Bertani

m	milli ( $10^{-3}$ ) oder Meter
$\mu$	micro ( $10^{-6}$ )
M	Molar, Mol pro Liter
mA	milli Ampere
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MF	<i>Mycosis fungoides</i>
MFCG	<i>Mycosis fungoides Cooperative Group</i>
MOPS	3- N-Morpholinopropansulfonsäure
n	Nano ( $10^{-9}$ )
NaCl	Natriumchlorid
NHL	Non-Hodgkin- Lymphome
NK	Negativkontrolle
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAGE	Hochauflösende Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> , periphere mononukleäre Zellen
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der Oxonium- ionen einer Lösung
PUVA	Psoralen- UV-A- Behandlung
REAL	<i>Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RSS	<i>Recombination signal sequence</i> , DNS-Abschnitt, welcher Restriktion- enzymen während der Rekombination der T-Zell-Rezeptor-Gene als Erkennungssequenz dient
RT	Raumtemperatur
RT-Q-PCR	<i>Real-time-quantitative-PCR</i> , quantitative Echtzeit Polymerase-Ketten- Reaktion
sec	Sekunden
SéS	Sézary Syndrom
SOB	<i>Super optimal broth</i> , Nährmedium zur Bakterienanzucht



SOC	SOB-Medium mit Zusatz von 20 mM Glucose
STAT	<i>Signal transducer and activators of transcription</i>
TAMRA	<i>5-Carboxytetramethylrhodamine</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCR	T-Zell-Rezeptor
TCR- $\beta$ -R	Rearrangement des Genlocus der $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors
TGGE	Temperaturgradienten-Gelelektrophorese
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TLR	Toll-like-Rezeptoren
T <sub>m</sub>	<i>Melting temperature</i> , Schmelztemperatur
TNMB	<i>Tumor, Node, Metastasis, Blood</i> , Tumormasse, Lymphknotenbeteiligung, Fernmetastasierung, Blutbeteiligung; Kategorien zur Stadieneinteilung von Tumorerkrankungen
Treg	Regulatorische T-Zelle
Tris	Trihydromethylamoniumethan
TSEB	<i>Total skin electron beam</i> , Ganzhaut-schnelle-Elektronen- Behandlung
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
UV	Ultraviolett
V	Volt
V- Segment	<i>Variable- Segment</i> , DNS-Abschnitt des T-Zell-Rezeptor-Gens
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
5-JÜLR	5-Jahres-Überlebensrate

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klinische Manifestation des Sézary Syndroms .....	3
Abbildung 2: Sézaryzelle .....	4
Abbildung 3: Rearrangement der $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors .....	16
Abbildung 4: Fluoreszenz-Fragmentlängen-Analyse GeneScan .....	17
Abbildung 5: Sondenhydrolyse bei Amplifikation des PCR Produktes. ....	18
Abbildung 6: Amplifikationskurve der RT-Q-PCR.....	19
Abbildung 7: Standardkurve der RT-Q-PCR. ....	20
Abbildung 8: pCR4-TOPO3956 .....	29
Abbildung 9: Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Heteroduplexbildung.....	49
Abbildung 10: Graphische Darstellung der Hybridisierungszahlen und erreichte Sensitivität.....	66
Abbildung 11: Quantifizierung Patient 1. ....	68
Abbildung 12: Quantifizierung der Verdünnungsreihe zur Generierung der Standardkurve. ....	70
Abbildung 13: Standardkurve der $\beta$ -Aktin-RT-Q-PCR.....	70
Abbildung 14: Leukozyten-/ Lymphozytenzahlen und rel. Tumorzellzahl unter Alemtuzumab .	74
Abbildung 15: LDH und relative Tumorzellzahl .....	75
Abbildung 16: CGH Analyse des kurzen Arms von Chromosom 7. ....	76
Abbildung 17: CGH-Analyse kurzer Arm Chromosom 7 Patient 1 .....	77
Abbildung 18: CGH Analyse Kurzer Arm Chromosom 7 Patient 3 .....	78

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-EORTC-Klassifikation kutaner Lymphome .....	1
Tabelle 2: Primersequenzen zur Sequenzierung des Plasmids .....	25
Tabelle 3: backward-Q-Primersequenzen. ....	26
Tabelle 4: Biomed-2-Primersequenzen .....	26
Tabelle 5: $\beta$ -Aktin-Primersequenzen.....	27
Tabelle 6: Sondensequenzen der RT-Q-PCR.....	28
Tabelle 7: Patientenkollektiv .....	30
Tabelle 8: Standard-PCR-Programm Thermocycler T3. ....	33
Tabelle 9: Ansatz zur Linearisierung von Plasmid-DNS.....	35
Tabelle 10: Ansatz hdPAGE-Gellösung für MOPS/EDTA-Puffer-System .....	37
Tabelle 11: Färbeprotokoll hdPAGE .....	37
Tabelle 12: Reaktionsansatz biomed-2-PCR.....	39
Tabelle 13: PCR-Protokoll der biomed-2-PCR.....	39
Tabelle 14: PCR-Programm der Sequenzierungs-PCR.....	41
Tabelle 15: Reaktionsansatz RT-Q-PCR .....	43
Tabelle 16: Standardprogramm der RT-Q-PCR .....	44
Tabelle 17: Ansatz zur Quantifizierung von Patientenproben.....	46
Tabelle 18: Größe der amplifizierten Bereiche der klonalen TCR- $\beta$ -R. ....	48
Tabelle 19: N-D-N-Region und Bindungsbereiche der patientenspezifischen Primer.....	50
Tabelle 20: Charakterisierung der N-D-N-Regionen. ....	51
Tabelle 21: N-D-N-Regionen des erweiterten Patientenkollektivs und Patienten mit T-ALL.....	52
Tabelle 22: N-D-N-spezifische Primer.....	53
Tabelle 23: Temperaturoptima.....	55
Tabelle 24: Optimale Primerkonzentrationen .....	57

Tabelle 25: Variation der MgCl <sub>2</sub> -Konzentration. ....	58
Tabelle 26: Variation der Sondenkonzentration .....	59
Tabelle 27: Sensitivität und Quantifizierbare Bereiche .....	61
Tabelle 28: N-D-N-Region und Sensitivität.....	63
Tabelle 29: Gensegmente, GC-Gehalt und Sensitivität .....	63
Tabelle 30: Hybridisierungsbereiche N-D-N-spezifischer Primer und Sensitivität.....	65
Tabelle 31: Absolute Tumorzellzahlen.....	67
Tabelle 32: Doppelbestimmung der absoluten Tumorzellzahl Patient 4 .....	69
Tabelle 33: β-Aktin-spezifische RT-Q-PCR Patient 1 und Patient 4 .....	69
Tabelle 34: Doppelbestimmung β-Aktin-spezifische RT-Q-PCR von Patient 4.....	71
Tabelle 35: Kalkulierte relative Tumorzellzahlen. ....	71
Tabelle 36: Doppelbestimmung der relativen Tumorzellzahl Patient 4 .....	72
Tabelle 37: Laborparameter und relative Tumorzellzahlen von Patient 4 .....	73



## Abstract

### Limitations and Opportunities of Clonspecific Quantitative Real-Time PCR for the Quantification of Tumor Cells in Patients Suffering from Sézary Syndrome

Quantitative real-time PCR (RT-Q-PCR) is a sensitive technique for the detection of minimal residual disease (MRD) in samples from patients with acute lymphoplastic leukemia. The MRD diagnostic is essential for the detection of incomplete remission, may help to identify patients with poor prognosis and provides insight into the effectiveness of different therapeutic options. Cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) represent a heterogenous group of non-Hodgkin lymphomas with clonal T-cell- proliferation in the skin. Sézary syndrome (SéS) is an aggressive subtype of the CTCL characterized by erythroderma, generalized lymphadenopathy and atypical T-cells circulating in the blood. Up to now there has been no specific and sensitive method for MRD detection in patients with SéS. Therefore we developed a highly sensitive RT-Q-PCR which is specific for the rearranged T-cell-receptor- $\beta$ -gene-locus (TCR- $\beta$ -R) of the clonally expanded tumor cell population. We included 30 samples from 14 patients in our study; samples were collected during routine diagnosis. The clonal TCR- $\beta$ -R were amplified by using the biomed-2 multiplex PCR assay and sequenced. We designed 20 primers complementary to the N-D-N junctional region specific for each patient by using Primer3Plus ([www.bioinformatics.nl](http://www.bioinformatics.nl)). For absolute quantification, the PCR- products of the qualitative PCR were cloned and serially diluted to serve as a standard curve in the following clonspecific RT-Q-PCR. To quantify the total cell count contained in the samples and later calculate the relative number of tumor cells, we used the  $\beta$ -actin gene locus and a dilution series of commercially available human genomic DNA. The RT-Q-PCR was accomplished by the LightCycler II instrument and TaqMan probes. To optimize reaction conditions, we varied the annealing temperature and primer concentration for the 20 primers. Moreover, we analyzed the influence of a varied concentration of  $MgCl_2$  and the TaqMan probes. We established the RT-Q-PCR for 14 patients. 13 reactions reached a sensitivity of at least one copy of the tumor cell- specific TCR- $\beta$ -R among 1000 polyclonal cells. For the quantification we used 18 samples from two patients. In conclusion, the RT-Q-PCR is a highly specific and sensitive, though technically challenging and expensive method, for quantifying tumor cells in patients with SéS. Hence the RT-Q-PCR will be more interesting for scientific studies than for routine diagnostic application.

## Abstract (deutsch)

Die quantitative Real-Time-PCR (RT-Q-PCR) ist als sensitive Methode zur Quantifizierung kleinster Mengen residueller Tumorzellen sog. *minimal residual disease* (MRD) für Patienten mit akuter lymphoblastischer T-Zell-Leukämie (T-ALL) etabliert. Dies ist für eine individuelle Therapigestaltung, Evaluation von Therapieoptionen und Identifikation von Risikogruppen mit schlechter Prognose relevant. Bislang existiert keine zuverlässige Methode zur MRD Diagnostik für Patienten mit kutanen T-Zell-Lymphomen (CTCL). Das Sézary Syndrom (SéS) ist eine aggressive Form der CTCL, charakterisiert durch die Trias: atypische Zellen im Blut, Erythrodermie und generalisierte Lymphadenopathie. Wir entwickelten eine hocheinsensitive RT-Q-PCR für Patienten mit SéS zur Anwendung mittels LightCycler Technologie. PCR *target* war die N-D-N-Region des T-Zell-Rezeptor-Rearrangements der  $\beta$ -Kette (TCR- $\beta$ -R) der monoklonalen Tumorzellpopulation. Es wurden 30 Proben von 14 Patienten in die Studie eingeschlossen. Das klonale TCR- $\beta$ -R wurde nach biomed-2-Protokoll amplifiziert (van Dongen et al., 2004) und sequenziert. Für die RT-Q-PCR wurden sequenzspezifische TaqMan Sonden verwendet und 20 N-D-N-spezifische Primer designt (Primer3Plus; [www.bioinformatics.nl](http://www.bioinformatics.nl)). Die Quantifizierung der absoluten Tumorzellzahl erfolgte durch den Vergleich der gemessenen  $C_t$ -Werte zu  $C_t$ -Werten einer Verdünnungsreihe mit bekannter Genkopienzahl. Zur Herstellung der Verdünnungsreihen wurden die Amplifikate der qualitativen PCR kloniert und seriell verdünnt. Die Gesamtzellzahl in den Proben wurde mit Hilfe von Verdünnungsreihen kommerziell erworbener, polyklonaler DNS und  $\beta$ -Aktin-spezifischen Primern bestimmt. Aus beiden Bestimmungen wurde die relative Tumorzellzahl errechnet. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden für alle 20 Primerpaare die Anlagerungstemperatur und die Primerkonzentration variiert. Zusätzlich wurde der Einfluss der Magnesium- und Sondenkonzentration im Reaktionsansatz untersucht. Für alle 14 Patienten konnte eine hochspezifische und sensitive RT-Q-PCR etabliert werden. Für 13 Patienten wurde mindestens eine Nachweisbarkeit von einer Zelle des klonalen TCR- $\beta$ -R unter  $10^3$  Gesamtzellen erreicht. Die Quantifizierung wurde in 18 Proben von zwei Patienten vorgenommen. Die Quantifizierungsergebnisse wurden mit den Hautbefunden unter Berücksichtigung der Therapie mit Alemtuzumab in zwei unterschiedlichen Dosierungen korreliert. Insgesamt erwies sich die Methode als hochspezifisch und sensitiv, doch technisch anspruchsvoll und nicht für alle Patienten gleichwertig anwendbar. So dass die RT-Q-PCR für Studienzwecke interessant ist, auch wenn sie für die Routinediagnostik weniger geeignet scheint.





# 1 Einleitung

## 1.1 Das Sézary Syndrom ein kutanes T-Zell-Lymphom

Kutane Lymphome (CL) sind meist klonale Proliferationen der Lymphozyten der T- oder B-Zell-Reihe, selten auch der natürlichen Killerzellen (NK) oder dendritischen Zellen, mit Manifestation an der Haut. Sie gehören zu den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). Der Begriff umfasst eine heterogene Gruppe bezüglich der klinischen Manifestation, der Histologie und des Immunphänotyps (Kempf et al., 2010). Gemeinsames Kriterium zur Abgrenzung der primär kutanen Lymphome gegenüber sekundär kutanen Lymphomen, welche einer Hautbeteiligung primär nodaler Lymphome oder Leukämien entsprechen, ist das Fehlen einer extrakutanen Manifestation zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (Willemze et al., 2005; Kempf et al. 2010). In Tabelle 1 ist die aktuelle WHO-EORTC-Klassifikation zur Einteilung der kutanen Lymphome dargestellt (Swerdlow et al., 2008).

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

Kutane T-Zell und NK-Zell-Lymphome:	Kutane B-Zell-Lymphome:
Mycosis fungoides (MF)	Primär kutanes Marginalzonen B-Zell-Lymphom
Mycosis fungoides Varianten und Subtypen:	Primär kutanes Keimzentrumslymphom
Follikuläre MF	Primär kutanes diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, Beintyp
Pagetoide Retikulose	Primär kutanes diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, Andere Typen
Granulomatous slack skin/ Elastolytisches Lymphom	Primär kutanes intravaskuläres B-Zell-Lymphom
Sézary Syndrom (SéS)	Vorläufer hämatodermischer Neoplasien: CD4+/ CD56+ hämatodermischer Neoplasien
Adulte T-Zell-Leukämie/ Lymphom	
Primär Kutane CD30+ lymphoproliferative Erkrankungen:	
Primär kutanes anaplastisches großzelliges Lymphom	
Lymphomatoide Papulose	
Subkutanes pannikulitisartiges T-Zell-Lymphom	
Extranodales NK-/ T-Zell-Lymphom, nasaler Typ	
Primär kutanes peripheres T-Zell-Lymphom, nicht spezifiziert:	
Primär kutanes aggressives epidermotropes CD8+ T-Zell-Lymphom	
Kutanes $\gamma/\delta$ -T-Zell-Lymphom	
Primär kutanes CD4+ klein- bis mittelgroßzelliges pleomorphes T-Zell-Lymphom	

73 % der CL gehen von der T-Zell-Reihe aus (kutane T-Zell-Lymphome (CTCL)), 22 % der CL sind B-Zell-Lymphome, der Rest umfasst eine Gruppe seltener Entitäten wie beispielsweise CD4+/ CD56+ hämatodermische Neoplasien. Die Inzidenz der CTCL wird mit einer Neuerkrankung pro Jahr und 100.000 Einwohnern angegeben (Willemze et al., 2005). Nach Aussagen von

9 Krebsregistern der USA aus den Jahren 1973 bis 1984 ist die Inzidenz für die CTCL insgesamt, so wie der Mycosis fungoides (MF) und des Sézary Syndroms (SéS), zunehmend (Cricione et al., 2007).

Die MF ist mit einem Anteil von 40-50 % die häufigste Form der CTCL (Willemze et al., 2005; Kempf et al., 2010). Es handelt sich um eine Neoplasie der T-Lymphozyten mit CD4+-T-Helfer-Zell-Phänotyp, welche durch ein Th2-Profil gekennzeichnet ist (Willemze et al., 2005). Die Erkrankung verläuft typischerweise langsam progredient in Stadien, unter Ausbildung ekzematöser Effloreszenzen, Plaques und Tumoren an vornehmlich nicht-sonnenexponierten Körperpartien. Im Verlauf können die Manifestationsformen parallel bestehen und Lymphknoten, sowie viszerale Organe involvieren (Willemze et al., 2005).

Das SéS, benannt nach dem Erstbeschreiber Albert Sézary (Sézary et al., 1938), ist mit einem prozentualen Anteil von 3 % eine seltene Entität der CTCL (Kempf et al., 2010). Die Inzidenz wird mit 0,3 Fällen pro 1 Mio. Personen bzw. 0,36-0,90 Fälle pro 100.000 Personenjahre angegeben (Weinstock et al. 1999). Das SéS ist durch eine Erythrodermie (>80 % der Körperoberfläche), eine leukämische Aussaat atypischer Leukozyten sog. Sézaryzellen in das periphere Blut (>5 % Sézaryzellen an der Gesamtlymphozytenzahl) und eine generalisierte Lymphadenopathie charakterisiert (Russel-Jones et al., 2000).

### **1.1.1 Klinik**

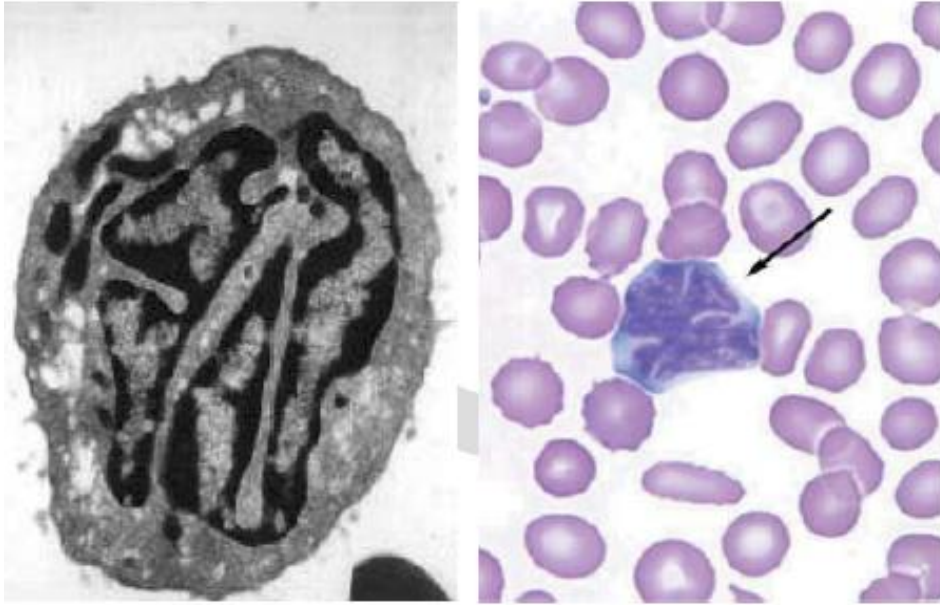
72,6 % der Patienten zeigen hyperkeratotische Veränderungen von Palmae und Plantae (Bernengo et al., 1998; siehe Abbildung 1). Begleitend zu den genannten Hautveränderungen tritt oftmals ein generalisierter Pruritus variabler Intensität auf. Dieser wird von 22,5 % der Patienten als mild, von 56,5 % als moderat und von 21 % als schwer eingestuft (Bernengo et al., 1998). Onychodystrophien (66 % der Patienten), eine Alopezie (64,5 %) und ophthalmologische Komplikationen, wie ein Ektropium oder eine seborrhoische Blepharokonjunktivitis, gehören ebenfalls zu dem Symptomspektrum (Leib et al., 1991). 12,9 % der Patienten leiden an tumorösen Veränderungen des Gesichts, was als *Facies leonina* bezeichnet wird. Darüber hinaus ist bei 32,3 % der Patienten eine Hepatosplenomegalie auffällig (Bernengo et al., 1998). Es besteht eine Prädisposition für opportunistische Infektionen, so wie eine gestörte Regulation der Körpertemperatur (Wieselthier et al., 1990; Hwang et al., 2008).



**Abbildung 1: Klinische Manifestation des Sézary Syndroms** Plantare Hyperkeratosen und Erythrodermie

### 1.1.2 Histologie

Im Blutausstrich und der Elektronenmikroskopie zeigen sich die Sézaryzellen vergrößert, imponieren mit einem verschlungenen, cerebriformen, hyperchromatischen Nucleus und weisen einen schmalen Zytoplasmasaum auf (Lutzner et al., 1975) (Abbildung 2). Biopsien mit Hämatoxylin-(HE-) oder *GIEMSA*-Färbung zeigen eine bandförmige Infiltration der Dermis mit atypischen Lymphozyten und eine Infiltration der Epidermis (Epidermotropismus). In der Epidermis formieren sich die infiltrierenden Tumorzellen, umgeben von Langerhans-Zellen, zu sog. Pautrier'schen Mikroabszessen. Dieses Merkmal ist charakteristisch für die MF und kann beim SéS komplett fehlen (Vonderheid, 2006). Bei einigen Patienten zeigt sich die Epidermis akanthotisch und parakeratotisch verdickt (Hwang et al., 2008). Die histologischen Befunde sind oftmals unspezifisch (Trotter et al., 1997), so dass die Unterscheidung zwischen CTCL und gutartigen Läsionen mitunter schwierig ist.



**Abbildung 2: Sézaryzelle** mit cerebriformem, hyperchromatischem Nucleus in elektronenmikroskopischer Darstellung (links); umgeben von Erythrocyten im Blutausstrich (rechts)

### 1.1.3 Diagnostik

Charakteristikum des SéS ist die leukämische Aussaat monoklonal proliferierter Zellen in das Blutkompartiment. Bislang ist kein phänotypischer Marker vorhanden, welcher die Gesamtheit der Tumorzellen zuverlässig und spezifisch repräsentiert. Aktuell besteht Konsens bezüglich der von der *International Society of Cutaneous Lymphoma* (ISCL) definierten Kriterien zur Diagnostikstellung des SéS und zur Abgrenzung gegenüber entzündlichen Hauterkrankungen (Vonderheid et al. 2003):

- Absolute Zahl atypischer Zellen oder Sézaryzellen  $>1000/\mu\text{l}$ .
- Erhöhte Leukozytenzahl mit einer CD4/ CD8-Ratio  $>10$  oder einem Anteil CD4+/ CD7-Zellen  $>40\%$ .
- Nachweis eines T-Zell-Klons im Blut mittels multiplex-PCR oder Southern Blot.
- Nachweis chromosomaler Aberrationen des T-Zell-Klons.

Diese Kriterien umfassen neben einer klinischen, histologischen und immunphänotypischen Untersuchung, molekularbiologische Methoden zum Nachweis der Tumorzellen im Blut, welche an späterer Stelle näher erläutert werden (siehe 1.2.).

Etablierte Marker zur Immunphänotypisierung der Sézaryzellen mittels Durchflusszytometrie oder *fluorescence activating cell sorting* (FACS) sind Antikörper gegen CD7, CD26 und CD4.

Das Oberflächenmolekül CD7 ist physiologischerweise auf 90 % der CD4+ Lymphozyten exprimiert, hingegen bei Patienten mit SéS in 60 % der Fälle defizitär (Vonderheid et al., 2003). Die Bedeutung von CD26 ist vielfach diskutiert. In einer Studie von Kelemen et al. konnte lediglich bei 59 % der Patientenproben eine CD26-Negativität festgestellt werden (Kelemen et al., 2008). Physiologischerweise wird CD26 auf über 85 % der CD4+ Lymphozyten exprimiert. Die Expression von CD26 wird u. A. durch Zytokine, die von Th1-Zellen sezerniert werden, reguliert. Die starke Reduktion der Th1 Zellen im Rahmen eines SéS könnte die Expression von CD26 auf der Oberfläche von reaktiven Lymphozyten mindern (Steinhoff et al., 2009) und eine Quantifizierung der Tumorzellen mit Hilfe des CD26 Oberflächenproteins als Marker beeinflussen. Steinhoff et al. analysierten die Verteilung der Tumorzellen auf CD7+/- und CD26+/- Subpopulationen, indem sie eine qualitative und eine quantitative klonspezifische PCR zur Amplifikation des TCR- $\beta$ - und TCR- $\gamma$ -Rearrangements nach Vorsortierung in diese Subpopulationen durchführten. Hierbei waren Tumorzellen in allen Subpopulationen nachweisbar. Es zeigte sich eine Dominanz innerhalb der CD26-Subpopulation. Die CD7-Negativität manifestierte sich intra- und interindividuell unterschiedlich (Steinhoff et al., 2009), so dass weder die CD26- noch die CD7-Negativität die Tumorzellpopulation zuverlässig repräsentiert.

Neben den in der Routinediagnostik etablierten Antikörpern wurde eine Vielzahl von Antikörpern zur Immunphänotypisierung der Tumorzellen untersucht:

Die Expression von CD158k/KIR3-DL2 als Marker für die Tumorzellen wird kontrovers diskutiert (Poszepczynska-Guigné et al., 2004; Klemke et al. 2008; Bahler et al. 2008). Es handelt sich um einen Killerzell-Immunglobulin-Rezeptor, welcher auf zytotoxischen CD8+ Zellen und NK-Zellen exprimiert wird (Moretta et al., 1997). Auf CD4+ Zellen wird dieses Oberflächenmolekül physiologischerweise nicht exprimiert. Klemke et al. konnten lediglich 65 % der SéS Fälle mit Hilfe des Antikörpers anti-AZ158 identifizieren (Klemke et al., 2008). Poszepczynska-Guigné et al. konnten eine gesteigerte Expression von CD158k/ KIR3-DL2 bei Patienten mit SéS und eine positive Korrelation der Werte mit denen der zirkulierenden atypischen Zellen zeigen.

T-Plastin, ist eine der drei Isoformen des Plastin-Proteins, welches an der Regulation der Zytoskelettsstruktur beteiligt ist. Die drei Isoformen sind spezifisch auf verschiedene Zellsubtypen

verteilt, wobei T-Plastin unter physiologischen Bedingungen nicht in hämatologischen Zellen exprimiert ist. Im Rahmen eines SéS ist T-Plastin jedoch in den atypischen Zellen nachweisbar. So ist anzunehmen, dass eine Differenzierung zwischen neoplastischen Zellen und T-Lymphozyten mit Hilfe dieses Proteins möglich ist. Su und Kollegen konnten zeigen, dass detektierte Mengen an mRNA für T-Plastin in atypischen Zellen statistisch signifikant höher waren, als in Nicht-Sézaryzellen (Su et al., 2003). Ebenso zeigte sich eine Korrelation der mRNA-Menge mit den zirkulierenden Tumorzellen (Capriotti et al., 2008). Prinzipiell ist die Bestimmung der Tumorzellzahl über Detektion der Expressionslevel von Markergenen problematisch, da bislang unklar ist, ob sich diese in verschiedenen Patienten gleich verhalten, bzw. die Expressionslevel gleichermaßen die Tumorzellzahl repräsentieren. Zudem bleibt unklar, ob sich die Expressionslevel im Verlauf der Erkrankung konstant verhalten und ob alle Zellen der Tumorzellpopulation verwendete Makergene exprimieren.

In einer Studie von Feng und Mitarbeitern erwies sich die V $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors als sensitiver und spezifischer Marker für die FACS-Analyse im Rahmen der Diagnostik des SéS und der MF (Feng et al., 2010). Limitierend für die Anwendung ist, dass nur acht spezifische Antikörper für die 23 Familien der V $\beta$ - Ketten kommerziell erhältlich sind und dass der Anteil an gesunden T-Zellen mit einer spezifischen V $\beta$ - Kette stark variiert.

#### **1.1.4 Ätiologie und Pathogenese**

Die Ätiologie des SéS ist bislang ungeklärt. Durch Betrachtung der folgend dargestellten, pathologischen Eigenschaften auf genetischer, immunologischer und infektiologischer Ebene ergeben sich Hinweise auf die Ätiologie und Pathogenese.

##### **1.1.4.1 Genetische Veränderungen**

Im Rahmen der MF wurde eine Assoziation zu bestimmten Histokompatibilitätsfaktoren bzw. den Humanen-Leukozyten-Antigenen (HLA)-Klassen nachgewiesen und mit einem familiär gehäuftem Auftreten der Erkrankung korreliert (Hodak et al., 2005). Bei Patienten mit SéS sind die HLA -DR5, HLA-DBQ1 03 und HLA-DBQ1 0502 vermehrt nachweisbar (Jackow et al., 1996). Dies lässt eine genetische Disposition vermuten. Eine positive Korrelation der HLA-Klassen zur Manifestation des SéS ist, aufgrund der niedrigen Inzidenz jedoch kaum zu beweisen.

Das Genom der Sézaryzellen weist eine Vielzahl chromosomaler Aberrationen auf. Diese betreffen Deletionen in den Bereichen 1p, 9p, 10q, 13q, 17p, 19p und Amplifikationen verschiedener

Genloci der Chromosomen 4, 17q, 18 (Scarlsbrick et al., 2001<sub>A</sub>, Mao et al., 2003, Whittacker et al., 2007, Vermeer et al., 2008). Einige Gene, welche möglicherweise eine pathogenetische Relevanz besitzen, wurden identifiziert:

- Aberrationen des p 53 Genlokus (*TP 53*) auf Chromosom 17 (17p13) (Marks et al., 1996; Vermeer et al., 2008; Steininger et al., 2011): Sowohl ein Verlust von *TP- 53* (Vermeer et al. 2008), als auch ein durch Mutation nichtfunktionelles p 53 (Protein) (Lamprecht et al., 2012, Manfé et al., 2012). Das p 53 Gen ist ein sog. Tumorsuppressorgen, welches über vielfältige Mechanismen unreguliertes Zellwachstum verhindert. Bei DNS Schädigung kommt es zu einer Stabilisierung des p 53 Proteins und einer intrazellulären Akkumulation, was zu einem Zellzyklusarrest und über die Aktivierung von Genen der Bcl2-Familie, insbesondere BAX, zu einer caspasenvermittelten Apoptoseinduktion der Zelle führt (Manfé et al., 2012).
- Amplifikation und Überexpression des *MYC* Onkogens, so wie die Herabregulation *MYC*-regulierender Gene, wie *MXII* auf Chromosom 10, *MNT* auf Chromosom 17 und auch *TCF-3* (oder *E2A*) auf Chromosom 19p13.3 (Vermeer et al., 2008; Steininger et al., 2011). Durch den Verlust bzw. die Inaktivierung verschiedener Regulatoren der *MYC* induzierten Apoptose, zu denen neben *TWIST* und *BIM* auch p 53 zählt, ist das durch *MYC* induzierte Apoptoseprogramm (Eischen et al., 1999) vermindert (Vermeer et al., 2008; Steininger et al., 2011, Lamprecht et al., 2012).
- Inaktivierung der Tumorsuppressorgene p15 und p16 (Chromosom 9p21) durch Methylierung von Promotorsequenzen auf epigenetischer Ebene und den Verlust oder Mutation der codierenden Genloci (Scarlsbrick et al., 2002).
- Deletion des *FAS*-Tumorsuppressorgens (50 % der Fälle). Das *FAS*-Gen spielt eine Schlüsselrolle in der Apoptoseinduktion reifer T-Zellen (Vermeer et al., 2008; Ni et al., 2005).
- Vielfache Dysregulationen der *signal transducer and activators of transcription* (*STAT*-) Proteine. *STAT*-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, welche für Interleukin-2-(*IL-2*) Signaltransduktionswege und die Aktivierung von T-Zellen zur Proliferation entscheidend sind (Sommer et al. 2004). In 75 % der Patientenproben wurde eine Amplifikation des *STAT 3* nachgewiesen (Vermeer et al., 2008), ebenso die Expression einer abnormen

Isoform des Transkriptionsfaktors STAT 5 (Mitchell et al., 2003). In 55 % der Proben lag ein genomischer Verlust von *DUSB 5*, ein Inhibitor des IL-2-Transduktionsweges, vor (Vermeer et al., 2008).

- Mao et al. zeigten eine Überexpression von JUN-B in neoplastischen Zellen bei Patienten mit SéS (Mao et al., 2003). JUN-B ist Teil des AP1-Transkriptionsfaktorkomplexes und führt über die Hochregulation von IL-4 zu einer gesteigerten Th2-Differenzierung (Li et al., 1999, Mao et al., 2003).
- Überexpression weiterer Th2-spezifischer Transkriptionsfaktoren: GATA3, Integrin-β1, Proteoglykan 2 und RhoB (Kari et al., 2003).
- Deletionen bzw. Translokationen der codierenden Sequenz des Transkriptionsfaktors *NAV-3* werden kontrovers diskutiert. Karenko et al. gaben die Häufigkeit einer Deletion des *NAV-3*-Genlokus nach Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) in frühen Stadien der MF mit 50 %, in späteren Stadien der MF oder des SéS bis zu 85 % an (Karenko et al., 2005). Jedoch zeigten sich diese Ergebnisse bei einer Kontrolle mittels FISH und *comparative genomic hybridization* (CGH)-Analysen als nicht reproduzierbar (Marty et al., 2008, Vermeer et al., 2008).
- Eine stadienabhängige Hochregulation der Expression von NOTCH- 1. Dieses Molekül ist Teil des Rezeptorkomplexes, welcher über verschiedene Signaltransduktionswege (TNF- $\alpha$ -*converting enzyme*,  $\gamma$ -Sekretase- Signalwege) an den Apoptosemechanismen der Zelle beteiligt ist. Eine Blockierung der Signaltransduktion führt zu einer Minderung der Tumorzellzahl und besitzt gegebenenfalls therapeutisches Potential (Kamstrup et al., 2010).

Die dargestellten genetischen Veränderungen wirken sich kumulativ positiv auf die Proliferation und negativ auf die Apoptose von T-Zellen aus, was in der Genese des SéS eine maßgebliche Rolle spielen könnte.



#### **1.1.4.2 Infektiologische Einflüsse**

Eine T-Zell-Expansion aufgrund einer chronischen Antigenstimulation und der Übergang physiologischer Lymphozyten in eine monoklonale Tumorzellpopulation durch die Ansammlung chromosomaler Aberrationen ist denkbar (Kim et al., 2005). Diesbezüglich wurde ein Zusammenhang von Infektionen mit den Erregern *Chlamydia pneumoniae* (Abrams et al., 2001) und *Staphylococcus aureus* (Jackow et al., 1997) beschrieben. Die Übertragung viraler Onkogene in die Zielzellen ist als Mechanismus maligner Zelltransformationen durch virale Infektionen möglich. Für das SéS wurde zunächst ein Zusammenhang mit einer Infektion des humanen T-Zell-lymphotrophen Virus (HTLV-1), das an der Genese der akuten T-Zell Leukämie beteiligt ist, angenommen (Pancake et al., 1995). Die These ließ sich in späteren Analysen nicht bestätigen (Wood et al., 1997). Dem Epstein-Barr-Virus (EBV), ein ubiquitär vorkommender Erreger, welcher an der Entstehung anderer lymphoproliferativer Erkrankungen wie dem Burkitt-Lymphom beteiligt ist, konnte keine ätiologische Relevanz nachgewiesen werden. Jedoch hat die Koinfektion eine negative prognostische Bedeutung (Novelli et al., 2009). Häufig tritt eine Reaktivierung einer Cytomegalie-Virus-Infektion (CMV-Reaktivierung) im Rahmen eines CTCL auf, was den Krankheitsverlauf negativ beeinflusst (Ballanger et al., 2009).

Zusätzlich wurden Besonderheiten, welche die Reaktion auf eine Infektion beeinflussen nachgewiesen. So waren im Vergleich zu inflammatorisch affizierten Läsionen bei MF und SéS eine gesteigerte Expression bestimmter Toll-like-Rezeptoren (TLR), TLR-2, -4 und -9, auffällig (Jarrouse et al., 2006). TLR sind über nachgeschaltete Signaltransduktionswege an der Hochregulation von NF- $\kappa$ -B beteiligt, was sich proinflammatorisch auswirkt, die Rekrutierung von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) induziert und die Reifung naiver T-Zellen zu CD4+-T-Effektor-Zellen bewirkt.

#### **1.1.4.3 Immunologische Eigenschaften**

Im Verlauf des SéS und der MF kommt es zu einer Expansion monoklonaler, neoplastischer T-Zellen, sowie zu einer Reduktion der Diversität des T-Zell-Rezeptor-Repertoires insgesamt (Yawalkar et al., 2003). Eine geminderte Komplexität des T-Zell-Rezeptor-Repertoires tritt bereits bei 50 % der Patienten im Stadium I bzw. II und bei allen Patienten in den Stadien III und IV auf. Insgesamt ist eine geminderte Zahl polyklonaler T-Zellen bei Patienten in späteren Stadien bzw. mit ausgeprägter Blutbeteiligung nachweisbar. Hier kommt es bei deutlich erhöhten T-Zellzahlen insgesamt, aufgrund der Expansion monoklonaler T-Zell-Populationen, zu einer Verdrängung funktioneller Lymphozyten, insbesondere CD8+-zytotoxischer T-Zellen, dendriti-

scher Zellen und CD56+-natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Kim et al., 2005; Yawalkar et al., 2003). Jedoch war auch bei Patienten in früheren Krankheitsstadien ohne Blutbeteiligung, eine reduzierte Diversität des T-Zell-Rezeptor-Repertoires nachweisbar (Yawalkar et al., 2003). Dieser Zusammenhang trägt zur Erklärung der fortschreitenden Immunsuppression bei.

Bei MF und SéS wird der Th2-Phänotyp im Verlauf der Erkrankung dominant. Dies korreliert mit einem Ungleichgewicht der sezernierten Zytokine zu Gunsten der Th2-assoziierten Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 (Vowels et al., 1992; Vowels et al., 1994; Asadullah et al., 1996). Das veränderte Zytokinmuster könnte das Symptom der Eosinophilie (IL-5), eine Reduktion der Th1-Antwort (IL-4 und IL-10) und eine erhöhte Synthese von IgE (IL-4) erklären. Mit Progress der Erkrankung werden die Th1-assoziierten Zytokine, IL-12, Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ), gemindert (French et al., 2005). Dieses Zytokinprofil geht mit einer Reduktion der Zellen des mononukleären Systems, insbesondere auch der dendritischen Zellen, einher (Wysocka et al., 2002). Diese Vorgänge sind als weiterer Teilaspekt zur Erklärung der sich während des SéS entwickelten Immunsuppression wichtig und führen gegebenenfalls zu einer Umgehung der körpereigenen Antitumorantwort.

Für Tumorzellen des SéS konnte ein für regulatorische T-Zellen ( $T_{\text{regs}}$ ) spezifischer Phänotyp und weitere Charakteristika der  $T_{\text{regs}}$ , wie die Expression von CD25, CTLA-4, FOXP3, die Sekretion von IL-10 und TGF- $\beta$  nachgewiesen werden (Berger et al., 2005). Studien identifizierten CD25 defizitäre Zellen innerhalb der monoklonalen Tumorzellpopulation im Blut von Patienten mit SéS, welche ansonsten den Phänotyp der  $T_{\text{regs}}$  aufwiesen und auch funktional waren (Heid et al., 2009).  $T_{\text{regs}}$  bilden eine Untergruppe der T-Zellen, welche eine Unterdrückung der körpereigenen Immunantwort bewirken, was u. A. Wichtigkeit zur Verhinderung von Autoimmunerkrankungen besitzt, bei Patienten mit SéS jedoch in einer Immunsuppression und Modifikation der Antitumorantwort resultieren könnte.

Eine immunologische Besonderheit neoplastischer T-Zellen im Rahmen eines CTCL ist das Vorliegen eines dysfunktionellen FAS-Rezeptor (CD95) aufgrund einer alternativen Splice-Variante (van Doorn et al., 2002). Zur körpereigenen Immunantwort gegen maligne Erkrankungen zählt die Rekrutierung zytotoxischer CD8+-Lymphozyten. Diese tragen auf der Zelloberfläche FAS-Rezeptor zur Autoregulation und FAS-Ligand zur sog. Antitumorantwort. Bei Bindung des Liganden an den FAS-Rezeptor wird über Caspase-8 Apoptose induziert. Es ist eine negative Korrelation zwischen der Anzahl neoplastischer T-Zellen und zytotoxischen CD8+-Lymphozyten

zu beobachten (Ni et al., 2001). Veränderungen des FAS/ FAS-Ligand-Signalweges auf genetischer, epigenetischer und Protein-Ebene führen zu einer zusätzlichen Apoptose-Resistenz der Tumorzellen (Wu et al., 2009; Jones et al., 2010; Braun et al., 2007). Diese Mechanismen führen zu einer Umgehung der körpereigenen Immunantwort zur Tumorabwehr (*Immunoescape*) und zu einer Akkumulation neoplastischer Zellen aufgrund einer beeinträchtigten Apoptoseinduktion (Ni et al., 2005).

Es wird vermutet, dass die gesteigerte Expression des Oberflächenantigens CD25, die Funktion der regulatorischen T-Zellen und damit die körpereigene Immunantwort des Organismus auf die Tumorgenese negativ beeinflusst. Außerdem bewirkt die Bindung eine Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren STAT 3 und JAK, was einerseits den Mechanismus unterhält und zusätzlich zur Präsentation eines charakteristischen Th2-Zytokinsekretionsmusters führt, d.h. die Sekretion von IL-4, IL-5, IL-10 steigert (Kim et al., 2005).

Weitere Besonderheit im Zytokinmuster sind eine Erhöhung der IL-7-, IL-18- und IL-22-Spiegel, was die Proliferation und das Überleben von T-Zellen fördert (Yamanaka et al., 2006; Miyagaki et al., 2011).

#### **1.1.4.4 Chemokine**

Die Migration neoplastischer Lymphozyten in die Epidermis im Rahmen des SéS (Epidermotropismus) lässt sich teilweise durch Dysregulationen verschiedener Chemokine (chemotaktische Cytokine) erklären. Im Rahmen des SéS auftretenden Veränderungen sind vielfältig und betreffen neben, im Folgenden näher erläuterten Mechanismen, eine Überexpression von CXCL-13 (Pichio et al., 2008), so wie CCR-7, CXCR-7, CCR-10 und CD62L (Capriotti et al., 2007).

Die neoplastischen Lymphozyten des SéS besitzen in der Regel einen CD4<sup>+</sup>-Th2-Helfer-Phänotyp und exprimieren zusätzlich CD45RO und CD25 in späteren Stadien der Erkrankung. Außerdem tragen die neoplastischen Lymphozyten *cutaneous lymphocyte antigene* (CLA) auf der Zelloberfläche, welches zur Interaktion mit E-Selektin auf Zellen postkapillärer Venolen befähigt und Chemokin-C-C-Rezeptor-4 (CCR-4) (Ferenczi et al., 2002; Capriotti et al., 2007; Campbell et al., 2010). Bei CCR-4 handelt es sich um einen Chemokinrezeptor, welcher mit Chemokin-C-C-Ligand 17 (CCL-17)/ *thymus and activation regulated chemokin* (TARC), sowie dem Liganden CCL-22 in Bindung gehen kann. Diese Molekülbindungen fördern die Migration der Lymphozyten in die Dermis bzw. Epidermis (Capriotti et al., 2007). CCR-4, CCL-17 und

CCL-22 werden bei MF und SéS überexprimiert (Ferenczi et al., 2002). Darüber hinaus konnten Kakinuma und Kollegen zeigen, dass die Expression von CCL-17/ TARC mit dem Stadium der MF (Ekzem, Plaque oder Tumorstadium), sowie mit der LDH und dem löslichen IL-2-Rezeptor korreliert und möglicherweise zur Evaluation der Krankheitsaktivität eingesetzt werden kann (Kakinuma et al., 2003). Ein weiterer Mechanismus zur Migration neoplastischer Zellen in Dermis und Epidermis, funktioniert vermutlich über die Vermittlung des Oberflächenmoleküls CXCR-4, welches von Narducci und Mitarbeitern auf der Oberfläche von SéS Zellen nachgewiesen werden konnte (Narducci et al., 2006). Eine Interaktion des Moleküls CXCR-4 mit dem Rezeptor CXCL-12/ SDF-1 ermöglicht die Einwanderung in die Haut. Dipeptidylpeptidase IV (CD26), welches SDF-1 inaktiviert, ist dabei bei SéS Zellen oftmals nicht vorhanden.

### 1.1.5 Therapie

Eine kurative Therapie des SéS steht bislang nicht zur Verfügung. Prinzipiell wird durch eine stadiengerechte Behandlung versucht, eine Remission zu erreichen, die Remissionsdauer zu verlängern und die Lebensqualität zu steigern.

Therapien der ersten Wahl (*first-line recommendations*) sind: die extrakorporale Photopherese (ECP), die Psoralen plus Ultraviolett A Phototherapie (PUVA), so wie eine Kombination beider Verfahren mit INF- $\alpha$  (Trautinger et al., 2006).

Die PUVA, so wie die ECP gehören zu den lokalen Phototherapieverfahren. Bei der ECP werden mononukleäre Zellen mittels Leukapherese isoliert, mit dem Photosensibilisator 8-Methoxy-Psoralen (8-MOP) behandelt und extrakorporal UV-A-Licht exponiert. In einer Studie von Evans et al., zeigte sich eine Ansprechrate von 57 %, eine Reduktion der Sézaryzellen und der CD4+ Zellen, so wie eine Besserung des Hautbefundes (Evans et al., 2001). Durch die Kombination mit INF- $\alpha$  lässt sich die Effizienz der PUVA und der ECP steigern. Nebenwirkungen von INF- $\alpha$  sind ein Anstieg der Leberenzyme, eine Leukopenie und Thrombozytopenie, so wie eine dosisabhängige grippeähnliche Symptomatik. In Studien konnte ein positiver Effekt durch die Kombination mit Bexaroten gezeigt werden (Mc Ginnis et al., 2003).

Empfehlungen der zweiten Wahl (*second line recommendations*) umfassen: Ganzhaut-schnelle-Elektronen-Therapie (*total skin electron beam*, TSEB), Chlorambucil/ Prednisolon (KNOSPE-Schema), CHOP-Polychemotherapie, low-dose Methotrexat, Bexaroten, Denileukin-Difitox (Ontak) und Vorinostat (Histondeacetylase-Inhibitor).

Bei der TSEB handelt es sich um eine Ganzkörperbestrahlung mit Elektronen geringer Eindringtiefe. Die Remissionsrate für Patienten mit MF im erythrodermischen Stadium und SéS liegt bei 75 %, eine subjektive Besserung, insbesondere des Pruritus, ist in vielen Fällen beschrieben. Akute Nebenwirkungen umfassen vor allem lokale Hautreaktionen, wie Erythem- und Ödembildung, so wie eine temporäre Epilation.

Bexaroten ist ein synthetisches Vitamin-A-Derivat, welches selektiv an den Retinoid-X-Rezeptor bindet. Durch die Bexaroten-Rezeptorbindung kommt es zur Apoptoseeinleitung und Hemmung der Zellproliferation. Die Ansprechrate bei SéS Patienten wird mit 24 % angegeben (Duvic et al., 2001). Nebenwirkungen im Sinne einer zentralen Hypothyreose, entstehen durch morphologische Verwandtschaft des Retinoid-X-Rezeptors mit Rezeptoren der Thyroidea (Shermann, 2003; Hwang et al., 2008). Weitere Nebenwirkungen sind Trockenheit der Schleimhäute und ein Anstieg der Blutfette (Assaf et al., 2006).

Denileukin-Difitox (Ontak) ist ein rekombinantes Fusionsprotein aus dem zytotoxischen Anteil des Diphtherietoxins und der rezeptorbindenden Domäne von IL-2. Über die Rezeptorbindung an den IL-2-Rezeptor wird Denileukin-Difitox durch Endozytose internalisiert. Der hochaffine IL-2-Rezeptor (CD25) befindet sich vornehmlich auf neoplastischen Zellen im Rahmen der CTCL und aktivierten Leukozyten. Intrazellulär wird das Toxin freigesetzt. Es inhibiert die Proteinsynthese und induziert den Zelltod. Die Gesamtansprechrate liegt bei 44 %, eine komplette Remission kann bei 10 % der Patienten erreicht werden. Leichte Nebenwirkungen treten in 97 % der Fälle auf, insbesondere Übelkeit (10 %), Fatigue (12 %), Fieber (11 %) und Krämpfe (12 %). In seltenen Fällen kommt es zu schwerwiegenden Nebenwirkungen wie Dehydratation (2 %) und einem *capillary-leak*-Syndrom (2 %) mit den Symptomen Hypotension, Ödembildung und Hypalbuminämie (Prince et al., 2010; Assaf 2008).

Histondeacetylase-Inhibitoren (u. A. Vorinostat, Romidepsin, Panobinostat) greifen in die Regulationsmechanismen der Zelldifferenzierung ein und induzieren Apoptose. Für Patienten mit SéS liegt die Ansprechrate bei 30%. Häufige Nebenwirkungen umfassen Thrombozytopenie, Diarrhoe und Nausea. Einzelfälle von schwerwiegenden kardiologischen Komplikationen wurden berichtet (Fantin et al., 2008; Duvic et al., 2007; Dummer et al. 2012).

Bei Krankheitsprogress werden Chemotherapeutika eingesetzt: Chlorambucil und Prednison (KNOSPE-Schema) oder Methotrexat. Bei Nichtansprechen kann als Ultima Ratio eine Poly-

chemotherapie nach dem CHOP-Schema (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison) versucht werden.

Alemtuzumab (MabCampath, ein CD52-Antikörper) gehörte ebenfalls zu den Empfehlungen der zweiten Wahl. Im August 2012 wurde das Medikament jedoch durch den Hersteller vom Markt genommen, um weitere Zulassungsverfahren (zur Behandlung der Multiplen Sklerose) einzuleiten und ist seitdem nur noch im Rahmen von Studien einsetzbar. Alemtuzumab ist ein rekombinanter, humanisierter anti-CD52-IgG-Antikörper. Das CD-52 Antigen wird von den meisten malignen und benignen Lymphozyten, jedoch nicht von den hämatopoetischen Stammzellen exprimiert, so dass polyklonale Lymphozyten nachgebildet werden können. Nebeneffekte sind generalisierte Infektionen durch Herpes simplex und atypische Pneumonien, hervorgerufen durch *Mycobacterium pneumoniae*, so wie eine CMV-Reaktivierung. Diskutiert wird eine Kardiotoxizität und das gesteigerte Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen (Lenihan et al., 2004). Zum Erreichen einer Reduktion des Nebenwirkungsprofils bei möglichst gleichbleibender Wirksamkeit, wurden verschiedene Strategieansätze analysiert. Diese umfassen eine Dosisreduktion in der systemischen Anwendung (Zizani et al., 2005) und eine Modifikation des Applikationsweges (intravenös versus subkutan). Bei intravenöser Applikation höherer Dosierungen (3 x 30mg/Woche) wird eine Ansprechrates von 55 % mit einer kompletten Remission von 32 % bei Patienten mit MF oder SéS angegeben. Nebenwirkungen im Sinne einer CMV-Reaktivierung traten bei 18 % der Patienten auf (Lundin et al. 2003). Eine Studie von Clark und Mitarbeitern zeigt bei subkutaner Applikation von Alemtuzumab in niedriger Dosierung (3 x 10mg/ Woche) bei 50 % der Patienten mit SéS eine komplette Remission, bezogen auf die Hautmanifestationen und das Auftreten von Tumorzellen im Blut, und bei 89 % der Patienten eine inkomplette Remission. Eine CMV Reaktivierung trat bei keinem der Patienten auf. Lediglich ein Patient erlitt unter der Therapie mit Alemtuzumab eine Pneumonie (Clark et al., 2012).

### **1.1.6 Prognose**

Das SéS gehört zu den CL mit mäßiger Prognose. Das mittlere krankheitsspezifische Überleben wird mit 65,5 +/-10 Monate angegeben (Foulc et al., 2003; Booken et al., 2013). Häufigste Todesursache ist ein septisches Geschehen, was durch die Beeinträchtigung der Hautbarriere und die fortschreitende Immunsuppression begünstigt wird (Vidulich et al., 2008).

Negative Prädiktoren bezüglich des Krankheitsverlaufs sind: eine hohe Tumorlast im peripheren Blut (Vonderheid et al., 2006) und in der Haut (Booken et al. 2013), erhöhte Serumlevel der Lak-

tatdehydrogenase (LDH), ein hohes Lebensalter zum Zeitpunkt der Erkrankung, ein langes Intervall vom Auftreten der Symptome bis zur Erstdiagnose, eine Infektion mit dem Epstein Barr Virus (Foulc et al., 2003), eine nachweisbare Expression von FOXP3 (Capriotti et al., 2008), eine hohe CD4/ CD8-Ratio, CD7-Negativität (Bernengo et al., 1998), so wie eine messbare Erhöhung des löslichen IL-2-Rezeptors im Blut (Wasik et al., 1996). Die histologische Beteiligung der Lymphknoten als prognostischer Faktor wird kontrovers diskutiert (Scarlsbrick et al., 2001<sub>B</sub>, Vidulich et al., 2008, Assaf et al., 2005). Eine Eosinophilie zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, als Hinweis auf ein kürzeres Überleben (Tancrede-Bohin et al., 2004), konnte nicht bestätigt werden (Vidulich et al., 2008).

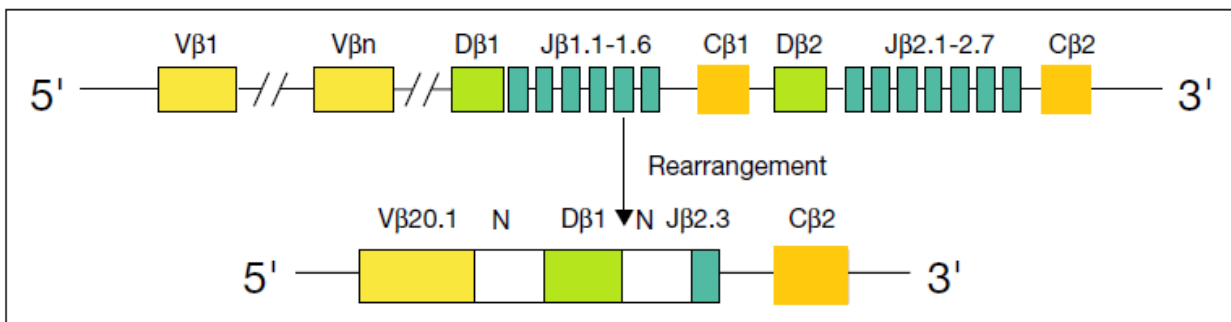
## 1.2 Molekulare Diagnostik zum qualitativen Klonalitätsnachweis

Der Nachweis einer klonalen T-Zell-Proliferation erfolgt im Rahmen der Routinediagnostik durch Amplifikation der umgelagerten T-Zell-Rezeptor-Gene (TCR- $\beta$ - oder TCR- $\gamma$ ) mittels multiplex-PCR und kapillarelektrophoretischer Auftrennung der PCR Produkte.

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) ist ein antigenspezifisches Glykoprotein, das auf der Oberfläche reifer T-Zellen exprimiert wird. Er ist Teil der adaptiven Immunantwort. Der Rezeptor setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen: In 85 % der Fälle aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, seltener (15 %) aus einer  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette. Der Rezeptorkomplex ist transmembranär gelegen, beide Ketten sind extrazellulär über Disulfidbrücken verbunden. Die Untereinheiten weisen eine konstante (C) und eine variable (V) Region auf. Die genetische Information ist auf Segmenten codiert, welche sich während der Zellreifung zu einem funktionellen Gen umlagern (Abbildung 3). Die Sequenzen der  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Kette umfassen ein *Variety*-(V-) Segment und ein *Joining*- (J-) Segment, die der  $\beta$ - bzw.  $\delta$ -Kette zusätzlich ein *Diversity*- (D-) Segment. Die Gene der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten umfassen eine wesentlich größere Zahl an V-( $\alpha$ : 57;  $\beta$ : 65) und J-Segmenten ( $\alpha$ : 55;  $\beta$ :13), verglichen mit denen der  $\delta$ - und  $\gamma$ -Ketten (V  $\gamma$ : 8;  $\delta$ : 6; J  $\gamma$ : 5 und  $\delta$ : 3).

Die Rezeptorvariabilität ist Voraussetzung für die adaptive Immunantwort gegenüber einem weiten Spektrum von Antigenen. Sie ergibt sich aus der Rekombination (*Rearrangement*) der V-, D- und J-Segmente zu einem funktionellen Gen während der T-Zelldifferenzierung (kombinatorische Diversität). Insgesamt gibt es  $>10^{12}$  mögliche Kombinationen der  $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors. Die Gesamtheit wird als rekombinatorisches Repertoire bezeichnet (van Dongen et al., 2003). Durch Deletionen, Insertionen und Translokationen an den Verbindungsstellen der

Segmente entstehen zusätzlich spezifische junktionale Regionen (N-Regionen) (junktionale Diversität) (van Dongen et al., 1990; Alt et al., 1992; Rowen et al., 1996; Lukowsky et al., 1998).

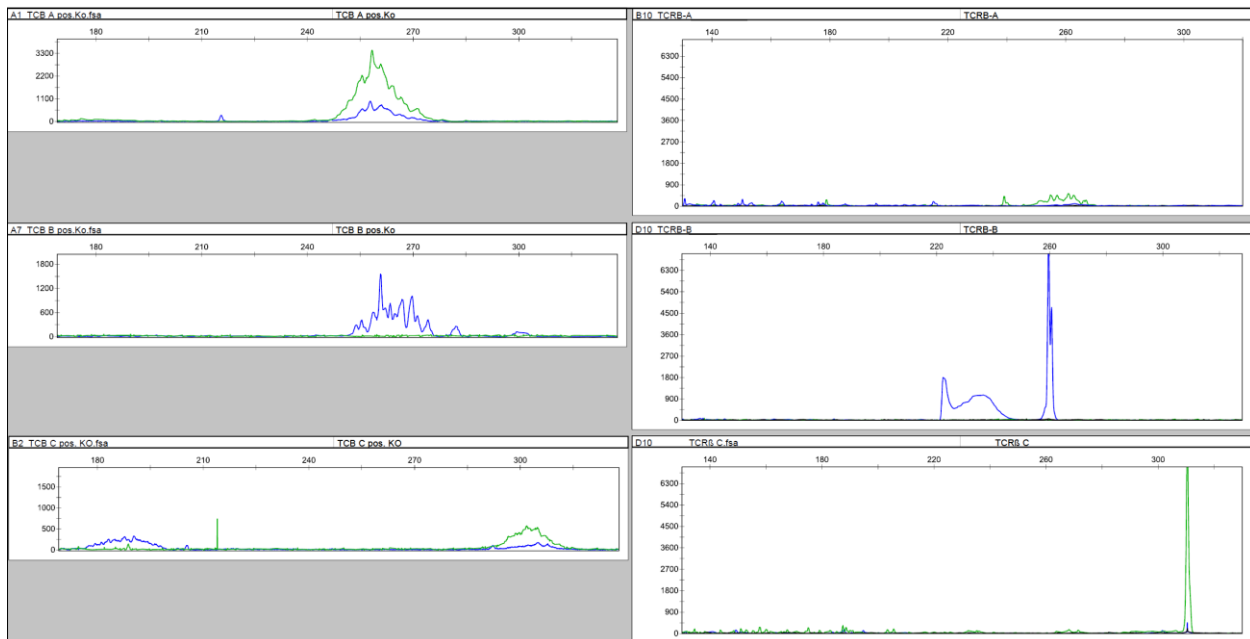


**Abbildung 3: Rearrangement der β-Kette des T-Zell-Rezeptors** während der T-Zell-Reifung (nach Assaf, 2006).

Im Vergleich des TCR-β- und des TCR-γ- bzw. δ-Genlocus, zeichnet sich der TCR-β- Genlocus durch ein größeres rekombinatorisches Repertoire und eine größere hypervariable Region aus.

Zur Amplifikation des T-Zellrezeptor-Rearrangements hat sich die PCR nach dem von van Dongen et al. entwickelten biomed-2 BMH4-CT98-3936-Concerted Action Protokoll etabliert (van Dongen et al., 2003). Das Protokoll umfasst zwei Ansätze zur Amplifikation des TCR-γ-Genlocus und drei Ansätze zum Nachweis kompletter und inkompletter T-Zell-Rezeptor-β-Rearrangements (TCR-β-R). Aufgrund der geringeren Diversität der TCR-γ-codierenden Segmente ist die Zahl der Primer limitiert und die PCR technisch weniger aufwendig, als die PCR zur Amplifikation der TCR-β-R. Die relativ simple Konfiguration des Gens führt andererseits zu einer vergleichbar hohen Zahl falsch-positiver Ergebnisse (Lukowsky et al., 2010). Bei Vorliegen einer klonalen Lymphozytenpopulation mit identischem Rearrangement des TCR-β bzw. TCR-γ ergeben sich dominante PCR Produkte. Im Rahmen einer reaktiven polyklonalen Lymphozytenvermehrung entstehen Amplifikate unterschiedlicher Sequenzen und Segmentlängen. Qualitative Methoden zur Klonalitätsanalyse umfassen verschiedene elektrophoretische Auftrennungsmethoden: die Fluoreszenz-Fragmentlängen-Analyse mit Hilfe des Gene Scan (FFA-GS) (Abbildung 4), die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), die hochauflösende Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Heteroduplexbildung (hdPAGE), die Denaturierende-Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) und die Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese (TGGE). Methoden zum quantitativen Nachweis klonaler Proliferationen, wie die quantitative- Real-Time-PCR (RT-Q-PCR), werden bislang in der Routinediagnostik der CTCL nicht eingesetzt.



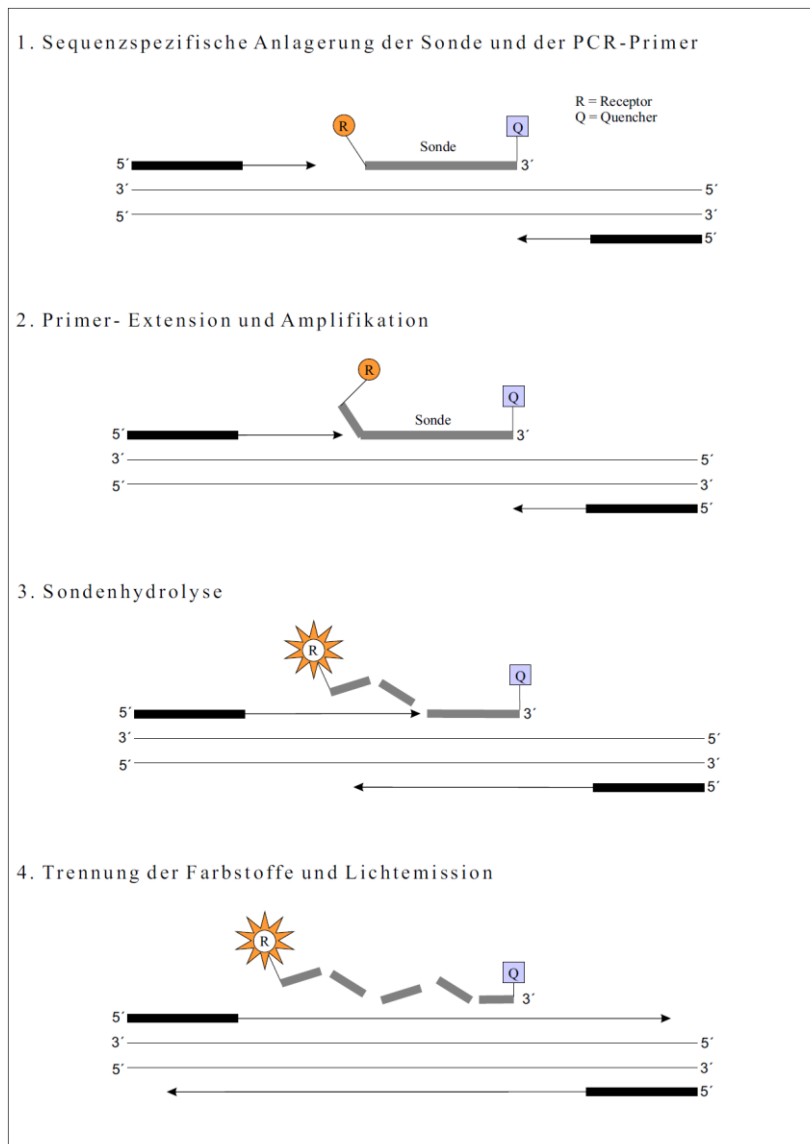


**Abbildung 4: Fluoreszenz-Fragmentlängen-Analyse GeneScan (FFA-GS)** PCR-Produkte nach Amplifikation des T-Zell-Rezeptor-Rearrangements der  $\beta$ -Kette mit nahezu normalverteilten Fragmentlängen bei einer polyklonalen Lymphozytenpopulation (linke Seite), Nachweis eines dominanten PCR Produkts bei Vorliegen einer monoklonalen T-Zell-Population bei Patient mit SéS (rechte Seite). Die y-Achse gibt die Intensität des Fluoreszenzsignals, die x-Achse die Länge der Basenpaare der DNS-Segmente an.

### 1.3 Die Real-Time- PCR zur Quantifizierung monoklonaler Zellen

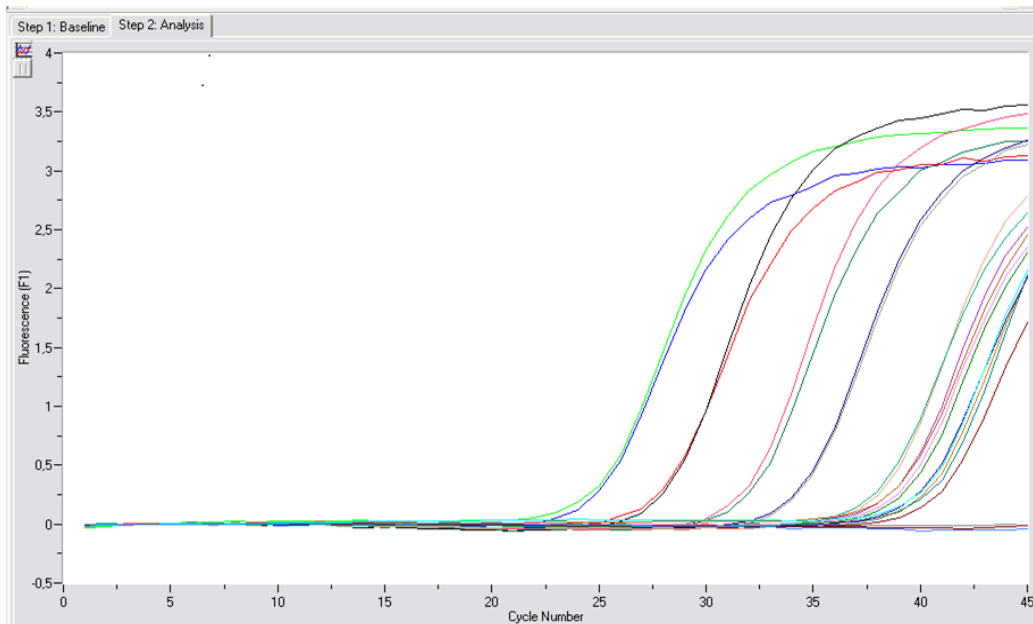
Die quantitative Echtzeit- oder *Real-Time*-PCR (RT-Q-PCR) ist eine Weiterentwicklung der rein qualitativen PCR Methoden, sie ermöglicht eine Quantifizierung von Genkopien bekannter Sequenzen. Das Prinzip basiert auf Fluoreszenzmessungen. Nach jedem Reaktionszyklus wird ein optisches Signal fluorimetrisch detektiert. Dieses wird durch Farbstoffe, welche unspezifisch an doppelsträngige DNS binden (SYBRGreen) oder durch sequenzspezifische Sonden generiert (TaqMan-Sonden).

TaqMan-Sonden sind mit zwei Farbstoffen versehen. Befinden sie sich in räumlicher Nähe zueinander, findet ein gegenseitiger Energieaustausch statt (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) (Cardullo et al., 1988), der die Emission eines Fluoreszenzsignals verhindert. Durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase bei Amplifikation der Matrizen-DNS werden die Farbstoffe der Sonde getrennt und die Energie wird in Form eines Lichtsignals spezifischer Wellenlänge emittiert (Livak et al., 1995) (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Sondenhydrolyse bei Amplifikation des PCR Produktes.**

Die Intensität des Fluoreszenzsignals korreliert mit der Menge an PCR Produkt. Zu Beginn der Reaktion ist wenig Matrizen- oder *template*- DNS im Ansatz vorhanden (Hintergrundphase). In einer späteren Phase der Reaktion akkumulieren Nebenprodukte der PCR und Reaktionskomponenten werden verbraucht, die Amplifikationsrate nimmt ab (Plateauphase). Ein exponentieller Anstieg der Menge an PCR Produkt passiert in der Phase dazwischen (exponentielle Phase). In der graphischen Darstellung zeigt sich ein charakteristischer Kurvenverlauf:



**Abbildung 6: Amplifikationskurve der RT-Q-PCR** Charakteristische Kurvenverläufe der RT-Q-PCR, welche sich in Hintergrundphase, exponentielle und Plateauphase gliedern. Doppelbestimmungen von PCR mit unterschiedlicher Menge an Matrizen- oder template- DNS. Die y-Achse gibt die Intensität des Fluoreszenzsignals an, die x-Achse die Zyklenzahl.

Während der exponentiellen Phase ist die Effizienz der Reaktion konstant und die Berechnung der ursprünglichen Menge an *template*- DNS mit Hilfe der folgenden mathematischen Gleichung möglich:

$$N_n = N_0 \cdot (E_{\text{const}})^n$$

$N_n$ : Anzahl der Moleküle zu  $n$  Zyklen;  $N_0$ : Initiale Anzahl der Moleküle;  $E_{\text{const}}$ : konstante Effizienz der Amplifikation;  $n$ : Zyklenzahl.

Der Übergang von Hintergrundphase zu exponentieller Phase wird durch den Schwellenwertzyklus oder *Cycle threshold* ( $C_t$ ) angegeben. Der  $C_t$ -Wert definiert den Reaktionszyklus ( $n$ ), bei welchem das Fluoreszenzsignal der spezifischen Amplifikation das Hintergrundsignal, d. h. das Fluoreszenzsignal unspezifischer Amplifikation, erstmalig signifikant überschreitet sog. *fit point method*. Der Grenzwert wird vom Untersucher oder dem Gerät automatisch eingestellt. Bei der alternativen Methode, der sog. *second derivative maximum method* erfasst das Gerät den  $C_t$ -Wert durch eine maximale Änderung der Steigung der Amplifikationskurve. Der  $C_t$ -Wert ist von der

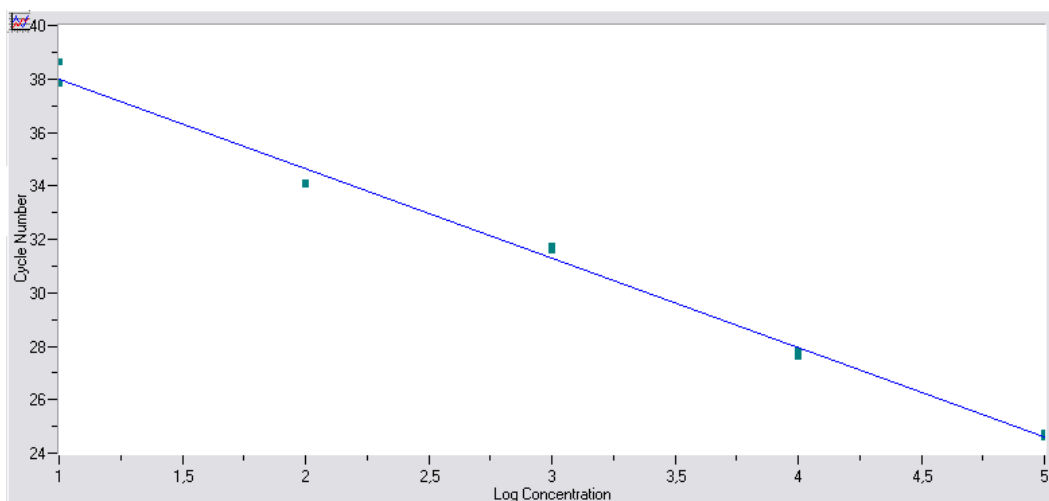
initial vorhandenen Menge an DNS Molekülen abhängig. Je höher die ursprüngliche Konzentration der Matrizen oder *template* DNS in der Probe ist, desto früher wird der  $C_t$ -Wert erreicht.

Zur Quantifizierung von DNS gibt es zwei Strategien: die absolute und die relative Quantifizierung. Bei der absoluten Quantifizierung wird die DNS Menge durch den Vergleich der gemessenen  $C_t$ -Werte mit  $C_t$ -Werten einer Verdünnungsreihe bekannter DNS Mengen (der gleichen Sequenz) bestimmt. Die  $C_t$ -Werte der Verdünnungsreihe bilden ein „Raster“, in welchem die Werte unbekannter DNS Mengen eingeordnet werden können. Voraussetzung ist, dass die PCR aller Verdünnungsstufen mit gleicher Effizienz ablaufen. Die Effizienz der PCR kann aus der Steigung (*Slope*) der Standardkurve berechnet werden:

$$E = 10^{(-1/S)} - 1$$

E= Effizienz der PCR; S= *Slope*, Steigung der Standardkurve

Die Standardkurve wird durch logarithmisches Auftragen der  $C_t$ -Werte gegen die Zyklenzahl generiert. Bei gleicher Effizienz der Reaktion aller Verdünnungsstufen, verläuft die Standardkurve linear (Abbildung 7). Weitere Kriterien der Standardkurve zur Quantifizierung sind später erläutert (siehe 3.4.1).



**Abbildung 7: Standardkurve der RT-Q-PCR** generiert durch logarithmisches Auftragen der  $C_t$ -Werte einer Verdünnungsreihe mit bekannter DNS-Menge (*Log concentration*) auf der x-Achse gegen die Zahl der Reaktionszyklen (*Cycle number*) auf der y-Achse.

Bei der relativen Quantifizierung werden die gemessenen  $C_t$ -Werte mit denen einer Referenzsequenz korreliert. Hierzu dienen oftmals sog. *house-keeping* Gene, welche in allen Zellen und konstant exprimiert werden. Die Bestimmung ist semiquantitativ. Es lassen sich Aussagen über Konzentrationsunterschiede oder ein verändertes Expressionsmuster treffen.

Brüggemann et al. nutzen die RT-Q-PCR zur Quantifizierung monoklonaler Zellen bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (T-ALL). Als PCR *target* wurde die klonspezifische, junctionale N-D-N-Region des TCR- $\beta$ -R gewählt. Der Nachweis einer monoklonalen Proliferation erfolgte mit Primersequenzen des biomed-2-Protokolls (van Dongen et al., 2003). Die PCR-Produkte wurden sequenziert und die N-D-N-Regionen der monoklonalen Rearrangements im Vergleich zu öffentlichen Gendatenbanken identifiziert. Ausgehend von diesen Sequenzen wurden klonspezifische Primer, J $\beta$ -spezifische TaqMan-Sonden und J $\beta$ -spezifische *reverse* Primer designt. Die Methode erwies sich als hochsensitiv und spezifisch zum Nachweis kleinster Mengen von Tumorzellen bzw. der frühzeitigen Erkennung sog. minimaler Resterkrankung oder *minimal residual disease* nach inkompletter Remission (Brüggemann et al., 2004). Bei 93 % der Fälle war mindestens eine Tumorzelle unter  $10^4$  Gesamtzellen nachweisbar.

#### **1.4 Fragestellung**

Das SéS ist eine seltene Entität der CTCL. Charakteristikum ist die leukämische Aussaat monoklonal proliferierter Lymphozyten sog. Sézaryzellen in das Blut.

Die Tumorzellzahl im Blut ist ein prädiktiver Marker für den Krankheitsverlauf (Kim et al., 2003; Vonderheid et al., 2006). In einer Veröffentlichung von Scarisbrick und Kollegen zeigte sich ein Anstieg der krankheitsspezifischen Todesfälle bei steigender Tumorzellzahl im Blut. Vonderheid et al. unterstützt die Annahme, dass die absolute Zahl der Sézaryzellen von prognostischer Bedeutung ist und ordnet die Patienten, basierend auf der Tumorzellzahl, in Kategorien bezüglich des Gesamtüberlebens und des krankheitsspezifischen Überlebens ein. Ebenfalls ist eine genaue Quantifizierung der Tumorzellen relevant, um Therapieschemata anhand eines objektiven Parameters für jeden Patienten zu individualisieren und bietet die Möglichkeit unterschiedliche Therapieoptionen bezüglich des Tumoransprechens zu evaluieren. Eine hochsensitive Methode zum Nachweis kleinster Tumorzellmengen im Blut kann darüber hinaus ein Rezidiv oder eine inkomplette Remission sog. minimale Resterkrankung oder *minimal residual disease* (MRD) frühzeitig anzeigen. Im Rahmen der T-ALL erwies sich die quantitative Echtzeit- oder *Real-Time*-PCR (RT-Q-PCR) als hochsensitiv für den spezifischen Nachweis von Tumorzellen

(Brüggemann et al., 2004). Bei Patienten mit SéS ist die Methode bislang nur einmal beschrieben (Steinhoff et al., 2009).

Zudem sind die Diagnosestellung eines SéS und die Unterscheidung zu benignen Läsionen mittels mikroskopischer Untersuchungsmethoden, aufgrund histologisch unspezifischer Befunde, mitunter erschwert (Trotter et al., 1997). Phänotypische Marker, welche die Gesamtheit der Tumorzellpopulation zuverlässig und komplett repräsentieren fehlen bislang. Die RT-Q-PCR umgeht einige Begrenzungen phänotypischer Untersuchungsmethoden und ist möglicherweise eine neue, vielversprechende Nachweismethode für Tumorzellen im Blut bei Patienten mit SéS.

Ziel vorgelegter Arbeit ist die Etablierung einer klonspezifischen RT-Q-PCR für Patienten mit SéS und die Evaluation der Methode bezüglich Sensitivität, Spezifität und Anwendbarkeit.

Weiteres Ziel ist die Quantifizierung der absoluten Tumorzellzahl, so wie der Gesamtzellzahl und Kalkulation der relativen Tumorzellzahl für Proben von drei Patienten mit SéS.

Die Quantifizierungsergebnisse sollen dann mit dem Krankheitsverlauf eines Patienten verglichen werden. Diesbezüglich werden Dokumentationen der Hautmanifestationen und ausgesuchte Laborparameter (Laktatdehydrogenase, Gesamtleukozyten, Lymphozyten), welche u. A. in der Literatur als prognostische Marker beschrieben sind (Foulc et al., 2003), ausgewertet.

Die durchgeführte Therapie mit Alemtuzumab soll anhand der Quantifizierungsergebnisse, so wie des klinischen Verlaufs, bezüglich des Tumoransprechens (Reduktion der Tumorzellen im Blut, klinische Besserung) kritisch beurteilt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
GeneRay UV-Photometer	Biometra, Göttingen, Serial No. 3549
Küvette	Hellma Analytics, Mühlheim, Schichtdicke 10 mm, Typ: 105.202.008-QS
Lightcycler 2.0	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lightcycler Capillaries	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Volumen: 20 µl, Cat.No. 11 909 339 001
Lightcycler Centrifuge Adapters	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Cat.No. 11 909 312 001
Qubit Fluorometer	Invitrogen, Karlsruhe
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
TGGE Maxi-System	Biometra, Göttingen
UV-Gerät, BDA Digital	Whatman Biometra, Göttingen
UV-Lampe, Fotodokumentation	Cybertech, Berlin
Zentrifuge	Megafuge 1.0 Heraeus, Berlin

#### 2.1.2 Software

Genmapper, Data Collection	Applied Biosystems Weiterstadt
Vector NTI Advance 11	Invitrogen, Karlsruhe
Lightcycler Software Version 3.5.	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

### 2.1.3 Chemikalien

Standardchemikalien wurden, wenn nicht im Speziellen aufgeführt, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) bzw. Sigma-Aldrich (St. Louise, USA/ München) in höchstmöglicher Reinheit bezogen.

Agarose	SERVA, Heidelberg
GelRed	Biotium, Hayard, U.S.A.
HiDi Formamide	Applied Biosystems Weiterstadt
Dimethylsulfoxid/ DMSO	AppliChem, Darmstadt, Lot.No. 9L004198
Foetal Bovine Serume Gold/ FKS	PAA cell culture company, Lot.No. A111-151

### 2.1.4 Puffer und Reaktionslösungen

#### 2.1.4.1 Proteinase-K-Verdau

Lysepuffer	150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,5% SDS, 10 mM Tris, pH 7,4
------------	---

#### 2.1.4.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Hochsalzpuffer	650 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7,4
----------------	---

#### 2.1.4.3 Gelelektrophorese mit Agarosegelen

5x TBE- Puffer	89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA; pH 8.0
Laufpuffer Agarosegele	100 ml 5x TBE-Puffer, 400 ml Aqua dest.
Ladepuffer Agarosegel	100 µl Bromphenolblau + 350 µl 1x TBE- Puffer
Agarose	Ultra Pure, Life Technologies, Paisly Scotland

#### 2.1.4.4 Gelelektrophorese mit Acrylamidgel

MOPS- Laufpuffer	1 M MOPS, 50 mM EDTA, pH 8.0
Ladepuffer	5 x MOPS, 0,125% Bromphenolblau, 0,125% Xylolcyanol, 20% Glycerin, pH 8.0
Fixier- /Stopplösung	50 ml 100%-Ethanol, 2,5 ml Essigsäure + Aqua bidest.
Imprägnierlösung	75 ml Silbernitrat, 750 µl Formaldehyd (37%-HCOH) + Aqua bidest.
Entwicklerlösung	7,5 g Natriumhydroxid 1 ml Formaldehyd (37%-HCOH) + Aqua bidest.



### 2.1.4.5 Sequenzierung

Big Dye Terminator v 1.1. Cycle Sequencing Kit

Applied Biosystems, Foster City U.S.A.

### 2.1.4.6 Real- Time- PCR

Master Mix

Lightcycler TaqMan Master, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Cat. No. 047355536001

### 2.1.4.7 Allgemein

PBS

1,7 mM NaCl, 0,064 mM KCl, 0,375% Tris-Base; pH : 7,4

TE-Puffer

10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0

10x PCR Puffer

100 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 42 °C), 500 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Gelatine, Applied Biosystems, Foster City U.S.A.

### 2.1.5 Kits

QIAmp DNA Mini Kit

Qiagen, Cat. No 51304

Qiaquick Gel Extraction Kit

Qiagen, Cat. No 28 704

QiaexII Polyacrylamid Gel Extraction Kit

Qiagen, Cat. No 20021

plasmidna-OLS

Omni life Science, Art.No. 2700916

Quant-iT dsDNA HS Assay Kits

Invitrogen, Cat.No. 32851

Quant-iT dsDNA BR Assay Kits

Invitrogen, Cat. No. Q10210

Topo-TA-Cloning

Invitrogen, Cat. No. K4500-01

dNTP Mix

12,5 mM dATP, 12,5 mM dCTP, 12,5 mM dGTP, 12,5 mM dTTP, in Wasser neutralisiert pH 8.0

### 2.1.6 Primer

Die Primer zur Sequenzierung des Plasmids (pCR4-TOPO3956) wurden von der Firma Invitrogen, Foster City U.S.A., bezogen. Sonst verwendete und folgend tabellarisch aufgeführte Primer von der Firma BioTeZ, Berlin Buch.

#### 2.1.6.1 Primer zur Sequenzierung des pCR4-TOPO3956

**Tabelle 2: Primersequenzen zur Sequenzierung des Plasmids (pCR4-TOPO3956)**  
Konzentration des jeweiligen Primers im Reaktionsansatz der Sequenzierungs-PCR gemäß den Herstellerangaben.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Konzentration
M13-Forward Primer	GTA AAA CGA CGG CCA G	0,1 µg/µl in TE Puffer
M13-Reverse Primer	CAG GAA ACA GCT ATG AC	0,1 µg/µl in TE Puffer

### 2.1.6.2 Backward-Q-Primer

Folgend sind die Sequenzen der *backward*-Q-Primer zur Quantifizierung des klonalen TCR- $\beta$ -Rearrangements (TCR- $\beta$ -R) aufgeführt (Brüggemann et al., 2004).

**Tabelle 3: backward-Q-Primersequenzen** in 5'→3'-Richtung (Brüggemann et al., 2004), J- $\beta$ -Segmente (J $\beta$ ) entsprechend der Nomenklatur nach Arden et al. (Arden et al., 1995).

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
J $\beta$ -2-7-BW	GGC TGG AAG GTG GGG AGA
J $\beta$ -1-6-BW	AGC CCC CAT ACC TGT CAC AGT
J $\beta$ -1-2-BW	GAC CCC CAG CCT TAC CTA CAA
J $\beta$ -1-3-BW	GCT GTC CAG CCT TGA CTT ACT CA
J $\beta$ -1-1-BW	TGT GAC GGA TCT GCA AAA GAA C
J $\beta$ -1-4-BW	ACC TTA TGA TAC ACT ATC CCG AAA GAA
J $\beta$ -2-1-BW	CCC TTC TTA CCT AGC ACG GTG A
J $\beta$ -2-2-BW	CAA CCG CCT CCT TAC CCA
J $\beta$ -2-4-BW	GGC GGC CCC AGC TTA C

### 2.1.6.3 Biomed-2-Primer

**Tabelle 4: Biomed-2-Primersequenzen zum Klonalitätsnachweis** mit Hilfe der PCR nach biomed-2-Protokoll der Concerted Action BMH4-CT98-3936 (van Dongen et al., 2003). V $\beta$ -, D $\beta$ - und J $\beta$ -Segmente entsprechend der Nomenklatur nach Arden et al. (Arden et al., 1995). Jeweilige Reaktionsansätze (*tube*).

Primer	<i>tube</i>	Sequenz
		<b>3'→5'</b>
J $\beta$ 1.1	A und C	GTG GTC TAA GTG TCA ACA TCC ATT C
J $\beta$ 1.2	A und C	CTG GTC CAA TTG GCA ACA TCC ATT C
J $\beta$ 1.3	A und C	TTC AAC CGA GTG ACA ACA TCC ATT C
J $\beta$ 1.4	A und C	CTT GGG TCG AGA GAC AGA ACC CAT AC
J $\beta$ 1.5	A und C	CTG AGC TGA GAG GTA GGA TCC ATT C
J $\beta$ 1.6	A und C	GTC CGA GTG ACA CTG TCC ATA C
J $\beta$ 2.2	A und C	TCC GAC TGG CAT GAC CCA TTC
J $\beta$ 2.6	A und C	TCC GAC TGG CAC GAC CCG CTC
J $\beta$ 2.7	A und C	GTC CGA GTG CCA ATG TCC ATT C
J $\beta$ 2.1	B und C	AGT GGC ACG ATC CAT TCT TCC
J $\beta$ 2.3	B und C	ACT GTC ACG AGC CAT TCG CCC
J $\beta$ 2.4	B und C	AGA GTC ACG ACC CAT TCG ACC
J $\beta$ 2.5	B und C	CAC GAG CCA CAC GCG C
		<b>5'→3'</b>
D $\beta$ 1	C	GCC AAA CAG CCT TAC AAA GAC
D $\beta$ 2	C	TTT CCA AGC CCC ACA CAG TC

		5'→3'
Vβ2	A und B	AAC TAT GTT TTGGTA TCG TCA
Vβ4	A und B	CAC GAT GTT CTG GTA CCG TCA GCA
Vβ 5/1	A und B	CAG TGT GTC CTG GTA CCA ACA G
Vβ6a/11	A und B	AAC CCT TTA TTG GTA CCG ACA
Vβ6b/25	A und B	ATC CCT TTT TTG GTA CCA ACA G
Vβ6c	A und B	AAC CCT TTA TTG GTA TCA ACA G
Vβ7	A und B	CGC TAT GTA TTG GTA CAA GCA
Vβ8a	A und B	CTC CCG TTT TCT GGT ACA GAC AGA C
Vβ9	A und B	CGC TAT GTA TTG GTA TAA ACA G
Vβ10	A und B	TTA TGT TTA CTG GTA TCG TAA GAA GC
Vβ11	A und B	CAA AAT GTA CTG GTA TCA ACA A
Vβ12a/3/13a/15	A und B	ATA CAT GTA CTG GTA TCG ACA AGA C
Vβ13b	A und B	GGC CAT GTA CTG GTA TAG ACA AG
Vβ13c/12b/14	A und B	GTA TAT GTC CTG GTA TCG ACA AGA
Vβ16	A und B	TAA CCT TTA TTG GTA TCG ACG TGT
Vβ17	A und B	GGC CAT GTA CTG GTA CCG ACA
Vβ18	A und B	TCA TGT TTA CTG GTA TCG GCA G
Vβ19	A und B	TTA TGT TTA TTG GTA TCA ACA GAA TCA
Vβ20	A und B	CAA CCT ATA CTG GTA CCG ACA
Vβ21	A und B	TAC CCT TTA CTG GTA CCG GCA G
Vβ22	A und B	ATA CTT CTA TTG GTA CAG ACA AAT CT
Vβ23/8b	A und B	CAC GGT CTA CTG GTA CCA GCA
Vβ24	A und B	CGT CAT GTA CTG GTA CCA GCA

#### 2.1.6.4 β-Aktin-Primer

**Tabelle 5: β-Aktin-Primersequenzen** zur Amplifikation des β-Aktin-Genlokus.

Primer	Sequenzen 5→3'
forward	5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCC ATC TAC GA-3'
backward	5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3'

#### 2.1.7 Sonden

Alle Sonden, wurden von der Firma BioTeZ Berlin Buch bezogen. Die Sequenzen wurden dem Protokoll von Brüggemann et al. (Brüggemann et al., 2004) entnommen (Tabelle 6). Die Sonden sind am 5'-Ende mit dem Farbstoff Carboxy-Fluoreszin (6-FAM) und am 3'-Ende mit 5-Carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) markiert. Die Sonden wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie oder *high performance liquid chromatography* (HPLC) aufgereinigt.

**Tabelle 6: Sondensequenzen** der RT-Q-PCR komplementär zu den jeweiligen J $\beta$ -Segmenten (Brüggemann et al., 2004). Farbstoffe: Carboxy-Fluoreszin (6-FAM) und 5-Carboxytetramethylrhodamine (TAMRA). J- $\beta$ -Segmente (J $\beta$ ) entsprechend der Nomenklatur nach Arden et al. (Arden et al., 1995).

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
J $\beta$ -1-3	6FAM-TTG GAG AGG GAA GTT GGC TCA CTG TTG TAG-TAMRA
J $\beta$ -1-2	6FAM-CCT TCG TCG GTT CGG GGA CCA GGT TAA-TAMRA
J $\beta$ -1-6	6FAM-CCA CTT TGG GAA CGG GAC CAG GCT-TAMRA
J $\beta$ -1-1	6FAM-TTG GAC AAG GCA CCA GAC TCA CAG TTG-TAMRA
J $\beta$ -1-4	6FAM-TGG CAG TGG AAC CCA GCT CTC TGT C-TAMRA
J $\beta$ -2-7	6FAM-CGG GCA CCA GGC TCA CGG TC-TAMRA
J $\beta$ -2-4	6FAM-CGG GAC CCG GCT CTC AGT GCT -TAMRA
J $\beta$ -2-2	6FAM-TTG GAG AAG GCT CTA GGC TGA CCG TA-TAMRA
J $\beta$ -2-1	6FAM-CGG GCA CCA GGC TCA CGG TC-TAMRA

### 2.1.8 Kulturmedien

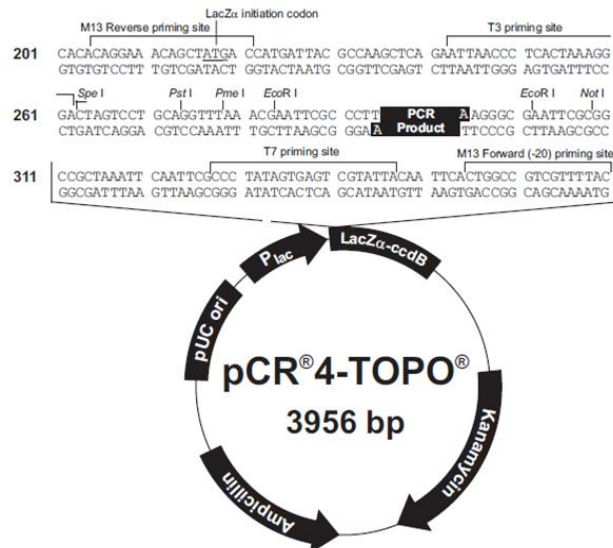
SOC-Medium	2% Trypton, 0,5% Hefe Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose
Agar	Agar-Agar Kobe I pulver, Roth, Karlsruhe Art.No. 5210.1
LB-Medium	Trypton 10 g/l, Hefeextrakt 5 g/l, NaCl 10 g/l; pH 7; LB Broth Luria/ Miller, Roth, Karlsruhe, Art.No. X968.1,
Agar-Platten	7,5 g Agar, 12,5 g LB-Medium, Aqua bidest. Ad 500 ml, Ampicillin 100 mg/100 ml, 40 $\mu$ l X-Gal
BSA	Bovine Serume Albumine Acetylated, Promega Madron WI U.S.A., 608-274-4330 R 3960 19768146

### 2.1.9 Bakteriengenotyp

Top 10: F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*araleu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*

### 2.1.10 Plasmid

Das Plasmid pCR4-TOPO3956 diente als Vektor zur Klonierung und Vervielfältigung der amplifizierten TCR- $\beta$ -R Fragmente und ist Bestandteil des TOPO-A-Cloning Kit von Invitrogen (Abbildung 8).



**Abbildung 8: pCR4-TOPO3956** Schematische Darstellung des Plasmid pCR4-TOPO3956 (Gesamtgröße 3956 Bp). Basensequenz der multiple cloning site (obere Bildhälfte). Bindungsstellen der Sequenzier-Primer (*M13 Reverse priming site* bzw. *M13 Forward priming site*), Schnittstellen der Restriktionsenzyme (u.A. *EcoRI* und *NotI*) und Ligationsstelle. Ampicillin- und Kanamycinresistenz,  $\beta$ -Galaktosidase-Genlocus (*LacZ $\alpha$ -ccdB*) (untere Bildhälfte).

### 2.1.11 Enzyme

Proteinase K	Qiagen Protease, Qiagen, Hilden, Konz.: 7,5 U/10 ml Aqua dest., Cat.No. 19157, Lot.No. 11553738, Mat.No. 1019138
Taq-Gold Polymerase	Ampli Taq Gold 250 U, Applied Biosystems, Foster City U.S.A., Konz.: 5 U/ $\mu$ l, Lot.No. KP2861

Restriktionsendonukleasen, Promega Madiron WI U.S.A. 608-274-4336:

Not I	10 U/ $\mu$ l, Cat.No. 22066702
EcoR I	12 U/ $\mu$ l, Cat.No. 18606640

### 2.1.12 DNS-Größenstandards

100 Bp-DNA-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Cat.No. 15628-019, Konzentration: 1 $\mu$ g/ $\mu$ l, gelöst in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA; Fragmente zwischen 100 Bp -1500 Bp + 2072 Bp
1 kB-DNA-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Cat.No. 15615-016, Konzentration: 1 $\mu$ g/ $\mu$ l, gelöst in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 mM EDTA, Fragmente zwischen 500 Bp- 12 kB
GeneScan -500 TAMRA Size Standard	Applied Biosystems, Warrington W A1 4SR, UK, Part.No. 401733, Cat.No. 0811249, Fragmente zwischen 35 Bp und 500 Bp
Böhringer Standard V	Mannheim

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben von 14 Patienten verwendet (Tabelle 7). Bei allen Patienten wurde ein Sézary Syndrom (SézS) gemäß den WHO-EORTC Kriterien (Willemze et al., 2005) diagnostiziert. Ein Ethikvotum für die Verwendung humanen Materials, so wie eine Einwilligungserklärung der Patienten liegt vor. Alle Patienten befanden sich in Behandlung der dermatologischen Klinik der Charité Berlin. Im Rahmen der Routinediagnostik wird der körperliche Status protokolliert, regelmäßig Blutbildkontrollen und FACS-Analysen durchgeführt. Blutentnahmen werden vor, während und nach Therapiebeginn vorgenommen.

Verwendet werden *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) aus Vollblut bzw. Leukapheresen und PBMC, welche bereits isoliert kryokonserviert vorlagen. Zur Kryokonservierung werden die Zellen in 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) auf fetalem Kälberserum (FKS) bei - 80 °C gelagert.

**Tabelle 7: Patientenkollektiv** Kennzeichnung der Patientenproben durch Nummern und Geschlecht m (männlich) bzw. w (weiblich); Alter, Krankheitsstadium (Stadium), CD4/ CD8-Ratio, Sézaryzellen jeweils bei Erst-diagnose; (Patienten 3, 9, 13 keine Angaben zu CD4/ CD8-Ratio und Sézaryzellen, da die ED extern gestellt wurde).

Patient	m/w	Alter	Stadium	CD4/CD8-Ratio	Sézaryzellen
1	m	57	IVa	8	2172/ $\mu$ l
2	w	77	IVa	33,65	2192/ $\mu$ l
3	w	67	IVa	-	-
4	w	61	IVa	8,5	9060/ $\mu$ l
5	m	64	IVa	10	1683/ $\mu$ l
6	w	61	IVa	-	1453,5/ $\mu$ l
7	w	76	IVa	4,59	908/ $\mu$ l
8	w	63	IVa	7	2058/ $\mu$ l
9	w	79	IVa	-	-
10	m	67	IVa	9,6	1000/ $\mu$ l
11	w	71	IVa	70,16	4834,5/ $\mu$ l
12	m	49	IVa	99	852/ $\mu$ l
13	m	72	IVa	585,94 (1Jahr nach ED)	-
14	m	29	IVa	12,1	1560/ $\mu$ l

## **2.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden**

### **2.2.2.1 Extraktion genomischer DNS aus PBMC**

Die DNS-Isolierung erfolgt aus Citratblut. Das Citratblut wird in einem Verhältnis von 1: 1 mit PBS-Puffer gemischt und auf 3 ml Ficoll, ein synthetisches Saccharosepolymer mit einer spezifischen Dichte von 1.077 g/ml, aufgeschichtet. Nach Zentrifugation bei 2.400 rpm für 20 min formiert sich ein typisches Verteilungsmuster: Im Überstand befindet sich das Blutplasma. Getrennt durch einen in der Mitte gelegenen Interphasering, zeigen sich, als unteres rotes Sediment erkennbar, die Erythrozyten. Der Interphasering wird aus dem sogenannten *buffy coat*, bestehend aus den zu isolierenden Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, gebildet. Der *buffy coat* wird in sterile Gefäße überführt. Anschließend werden die Zellen zweimalig mit PBS-Puffer gewaschen, hierbei wird die Probe für jeweils 10 min bei 1.200 rpm bzw. 300 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

Zu einem Volumen mit jeweils  $10^7$  Zellen werden 1 ml Lysepuffer und 100 µl Proteinkinase K zugegeben. Der Ansatz wird für 20 min bei 65 °C und für etwa 12 h bei 37 °C inkubiert. Eine anschließende Temperaturerhöhung auf 95 °C führt zur Inaktivierung der Proteinkinase K. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 13.200 rpm für 10 min, hierbei setzen sich unlösliche Zellbestandteile als Sediment ab, die DNS verbleibt im Überstand. Dieser wird in ein steriles Gefäß überführt. Die Proben werden bei + 4 °C gelagert.

In einigen Fällen erfolgt die DNS-Isolierung aus PBMC mit Hilfe des QIAmp Blood Midi Kit von Qiagen. Hier wird nach Angaben des Herstellers verfahren. Gelagert werden die Proben bei + 4 °C.

### **2.2.2.2 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion**

Alle Proben werden mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol- Extraktion aufgereinigt, um diese vor der Quantifizierung möglichst vollständig von Verunreinigungen zu befreien und gleichwertig aufzuarbeiten.

Zunächst werden ein Volumen Hochsalzpuffer und zwei Volumina Roti-Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (redestilliertes, in TE-Puffer äquibriertes Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol im Verhältnis 25 : 24 : 1, pH 7,5-8) hinzugegeben und die Proben vorsichtig geschüttelt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm und Raumtemperatur (RT) wird der wässrige Überstand in sterile Gefäße überführt. Dem Überstand werden zwei Volumina des Ausgangsvolumens Chlo-

roform-Isoamylalkohol (24: 1) zugegeben. Nach vorsichtigem Schütteln wird eine nochmalige Zentrifugation (10 min, 5000 rpm, RT) durchgeführt. Der wässrige Überstand wird in sterile Reaktionsgefäße überführt. 0,25 Volumina 10 M Ammoniumacetat und 0,7 Volumina Isopropanol werden zugegeben. Die DNS wird bei - 20 °C für mindestens zwei Stunden gefällt. Anschließend wird die DNS durch Zentrifugation pelletiert und nach einmaligem Waschen mit 70 % Ethanol (EtOH) bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Das Pellet wird dann in TE-Puffer resuspendiert. So können die Proben bei + 4 °C gelagert werden.

### **2.2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung**

Die photometrische Konzentrationsbestimmung beruht auf der molekülspezifischen Eigenschaft eines Stoffes Licht zu absorbieren. Durch die Bestimmung des Abfalls der Lichtintensität lässt sich die Konzentration der gelösten Teilchen in der Probe mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes berechnen. Zur Messung werden 70 µl der Probe bzw. eine Verdünnung in eine Quarzglasküvette (Hellma Analytics, Mühlheim; Schichtdicke 10 mm) gegeben, diese wird von monochromatischem Licht durchleuchtet. Das Absorptionsmaximum für DNS liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Parallel wird eine Messung der Proben mit Licht der Wellenlänge 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) durchgeführt. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm zur Extinktion bei 280 nm spiegelt den Reinheitsgrad der DNS Präparation wider. Es liegt für reine DNS bei 1,6 bis 1,8.

Die photometrischen Konzentrationsmessungen werden mit dem GeneRay UV-Photometer (von Biometra, Göttingen, Serial No. 3549) durchgeführt, die Konzentrationen werden hierbei von dem Gerät automatisch berechnet.

### **2.2.2.4 Fluorimetrische Konzentrationsbestimmung**

Alternativ werden Konzentrationsmessungen mit dem Qubit Fluorometer (Invitrogen, Hilden, Cat.No. Q32857) durchgeführt. Hierbei werden Farbstoffe eingesetzt, welche bei Bindung an DNS fluoreszieren. Durch die Fluoreszenzmessung wird die Konzentration der gelösten Moleküle berechnet. Der messbare Bereich liegt zwischen 0,2 ng/ 200 µl und 1000 ng/ 200 µl.



### 2.2.2.5 Konventionelle PCR

Zur Kontrolle der Spezifität, Optimierung der Anlagerungstemperaturen (*Annealingtemperatur*) der patientenspezifischen Primer, so wie zur selektiven Vervielfältigung genetischen Materials vorbereitend auf das Klonieren werden Standard-PCR mit dem T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Es werden 100 ng genomische DNS und die *forward* (5'→3') (FW)- bzw. *backward* (3'→5') (BW)-Primer zur Amplifikation der V $\beta$ - und J $\beta$ -Regionen in einer Konzentration von 0,5  $\mu$ M eingesetzt. Die Amplifikation wird von einer TaqPolymerase katalysiert. Für die konventionellen PCR wird ein Standardprogramm festgelegt (Tabelle 8). Die Anlagerungstemperatur zur Kontrolle der Primerspezifität beträgt 66 °C. Bei PCR zur Temperaturoptimierung wird dieser Parameter ausgehend von den Herstellerangaben bezüglich der optimalen Temperatur variiert (60-70 °C).

**Tabelle 8: Standard-PCR-Programm** Thermocycler T3 (Biometra, Göttingen), Arbeitsschritte der PCR, Temperatureinstellung (°C), Dauer des jeweiligen Arbeitsschrittes und Zyklenzahl (Zyklen). Anlagerungstemperatur bei Testung der Primerspezifität: 66 °C, bei Temperaturoptimierung: 60- 70 °C (Steigerung in 2 °C Abständen).

Arbeitsschritt	Temperatureinstellung ( °C)	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95	10 min	1
Denaturierung	95	30 sec	45
Anlagerung	66 bzw. 60-70	30 sec	45
Elongation	72	10 sec	45
Elongation	72	7 min	1
Kühlen	4	-	1

### 2.2.2.6 Klonierung

Die klonspezifischen Rearrangements des TCR- $\beta$ -Genlocus (TCR- $\beta$ -R) werden zur selektiven Vervielfältigung mit dem Topo-TA-Kloning-Kit (Invitrogen, Hilden) kloniert. Das Kit enthält als Vektor ein Plasmid (pCR4TOPO-3956; Abbildung 8) mit Ampicillin- und Kanamycinresistenz, ein  $\beta$ -Galaktosidase-Gen (*lacZ-Gen*) mit Schnittstellen für eine Topoisomerase. Die Ampicillinresistenz dient als Selektionsmarker. Die Topoisomerase I, eine Helicase, isoliert aus dem *Vaccinia* Virus katalysiert die Linearisierung des Plasmids und die Ligation des Inserts. Das Enzym schneidet an palindromischen CCCTT Sequenzen innerhalb des *lacZ*-Gens. Bei Insertion eines DNS-Fragments wird das Gen unterbrochen. Es kodiert für das N-terminale  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase. Das Genprodukt zeigt in Verbindung mit dem vom Bakterium gebildeten C-terminalen  $\omega$ -Fragment Galaktosidaseaktivität. Der Farbstoffs X-Gal ist Substrat der Galakto-

sidase und führt zu einer sichtbaren Blaufärbung der Bakterienkulturen. Nach erfolgreicher Insertion eines DNS-Fragments, ist die Expression des  $\alpha$ -Fragments nicht mehr möglich, die Galaktosidaseaktivität und die Blaufärbung bleiben aus. Bei der Spaltung der Plasmid-DNS bildet das Enzym Thymin-Überhänge und bleibt kovalent an beiden freien Enden gebunden, was eine Selbstligation der Plasmidenden verhindert. Die PCR-Produkte besitzen Adenin-Überhänge zur Hybridisierung der jeweiligen Enden und zur Ligation.

Der Ligationsansatz hat ein Gesamtvolumen von 6  $\mu$ l. Er enthält: 1  $\mu$ l Vektor, 1  $\mu$ l Salzlösung, 0,5-4  $\mu$ l PCR-Produkt und einen Zusatz von Aqua dest. bis zum Erreichen des Gesamtvolumens. Die Salzlösung verhindert nach erfolgter Ligation weiteres Schneiden der DNS durch die Topoisomerase und eine eventuelle Zerstörung des Inserts bzw. des ligierten Plasmids. Für eine möglichst effiziente Ligation wird der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Vervielfältigung werden E.coli (TOP 10) verwendet. Zur Transformation werden 2  $\mu$ l des Ligationsansatzes zu den Bakterien gegeben. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 min werden die Bakterien einem Hitzeschock ausgesetzt. Hierfür werden die Proben für exakt 30 sec in ein Wasserbad, temperiert auf 42 °C, überführt und nach Ablauf der Zeit unmittelbar auf Eis gelagert. Anschließend wird zu jeder Probe 250  $\mu$ l SOC-Medium zupipettiert. Zur Inkubation werden die Proben für eine Stunde bei 37 °C und 800 rpm auf den Schüttler gegeben. Parallel werden die Bakterienplatten vorgewärmt. Verwendet werden Agarplatten mit einem Zusatz von Ampicillin in einer Konzentration von 1  $\mu$ l/ml. Jeweils 50  $\mu$ l der Zellsuspension werden auf einer Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Weiße Kolonien werden zur weiteren Anzucht in 3 ml LB-Medium mit Ampicillinzusatz überführt und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Die Extraktion der Plasmid-DNS aus den Bakterien wird mit dem Plasmid-dna-OLS-Kit von OMNI Life Science nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Plasmid-DNS liegt nach Isolation zirkulär vor. Zur Linearisierung der DNS werden Restriktionsendonukleasen verwendet. Diese Enzyme besitzen spezifische, oft palindromische Erkennungssequenzen. Die Enzyme werden so gewählt, dass die Schnittstellen außerhalb des Inserts gelegen sind. Für die Sequenzen der Patientenproben eignen sich die Enzyme Not I (Schnittstelle Not I 5'→3': GCG GGC CGC) und EcoR I. (Schnittstelle EcoR I 5'→3': GAA TTC). Die Enzyme, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet werden, werden von der Firma Promega (Madison WI, U.S.A.) bezogen. Pro 1  $\mu$ g DNS werden 0,5  $\mu$ l des Enzyms zugegeben, dies entspricht einer Menge von 5 U- 6 U. Dem Ansatz werden zusätzlich 10 % des Gesamtvolumens Reaktionspuffer und Bovines Serum Albumin

(BSA) in einer Konzentration von 100 µg/ ml zupipettiert (Tabelle 9). Es folgt die Inkubation bei 37 °C für mindestens 2 h. Eine erfolgreiche Linearisierung wird durch Auftragen einer Teilmenge (200 ng DNS) auf ein 0,8 %-Agarosegel kontrolliert.

**Tabelle 9: Ansatz zur Linearisierung von Plasmid-DNS** Reaktionskomponenten zur Linearisierung der Plasmid-DNS, in Klammern Konzentration des eingesetzten BSA bzw. Puffers, eingesetzte Menge der jeweiligen Lösung (Absolute Menge (µl)) und die Endkonzentration bzw. Menge im Ansatz (im Ansatz) bzw. Menge in µg für ein Endvolumen von 50 µl.

Reaktionskomponente	Absolute Menge (µl)	im Ansatz
DNS	20	1 µg DNS
Puffer 3 (10x)	5	1x
BSA (10 mg/ml)	5	100 µg/ml
NotI/ EcoI	1	5-6 U
Aqua dest.	19	Ad 50 µl

Um die linearisierte Plasmid-DNS aufzureinigen wird das Gel Extraction Kit von OMNI Life Science verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

### 2.2.2.7 Gelelektrophorese im Agarosegel

Zur Größenauftrennung der DNS, Kontrolle einer erfolgreichen Amplifikation nach PCR, so wie einer vollständigen Linearisierung der Plasmid-DNS, werden Gelelektrophoresen durchgeführt. Im Allgemeinen werden für Standardkontrollen Agarosegele verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit variiert die Konzentration zwischen 0,7 % und 2 % Agarose in TBE-Puffer. Zur Visualisierung der Nukleinsäurefragmente werden dem Ansatz GelRed (10 µl auf 100 ml) zugegeben, ein Farbstoff, welcher mit DNS interagiert und sich durch UV-Licht zur Fluoreszenz anregen lässt. Die DNS wird nach Zugabe von Ladepuffer in einem Verhältnis von 6 : 1 aufgetragen, um eine Verteilung in den Geltaschen zu gewährleisten. Bei jeder Gelelektrophorese wird ein Größenstandard mitgeführt. Bei der Auftrennung von Plasmid-DNS wird eine 1 kBp Leiter verwendet, bei allen weiteren Elektrophoresen eine 100 Bp Leiter. Die Auftrennung erfolgt in 1x TBE-Puffer bei 120 V für 1 h. Anschließend werden die Ergebnisse, nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes durch UV-Licht, photographisch dokumentiert.

Zur Extraktion der DNS aus Agarosegelen wird das Qiaquick Gel Extraction Kit von Qiagen verwendet und nach Protokoll des Herstellers verfahren. Das gewonnene Eluat kann bei - 20 °C gelagert werden.

### **2.2.2.8 Hochauflösende Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur genaueren Auftrennung der DNS-Abschnitte nach Amplifizierung der patientenspezifischen TCR- $\beta$ -R wird vor der Sequenzierung eine hochauflösende Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Heteroduplexbildung (hdPAGE) mit dem TGGE-Maxi-System (Whatman Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Bei der hdPAGE werden die Amplifikate durch definierte Temperaturschwankungen denaturiert und renaturiert, wobei die Formation zu Homo- bzw. Heteroduplices induziert wird. Mit Hilfe der Methode lässt sich zwischen PCR-Produkten einer monoklonalen T-Zell-Proliferation und einer polyklonalen T-Zell-Proliferation unterscheiden. Eine monoklonale Proliferation zeigt sich in der gelelektrophoretischen Auftrennung als einzeln abgrenzbare, dominante Bande von Homoduplices, bestehend aus PCR-Produkten mit identischer Basensequenz. Heteroduplices, bestehend aus PCR-Produkten mit unterschiedlicher Basensequenz der junktionalen Region, als Resultat einer polyklonalen T-Zell-Proliferation, wandern in der gelelektrophoretischen Auftrennung weniger schnell und ungleich weit, so dass sich diese in mehreren schwächeren Banden formieren (sog. Schmier) (Langerak et al., 1997). Die Methode eignet sich insbesondere für Proben mit starkem Hintergrundsignal oder zur Trennung mehrfach vorliegender klonaler Sequenzen in einer Probe. Zusätzlich lässt sich die Länge der PCR Produkte zur Amplifikation der monoklonalen TCR- $\beta$ -R im Vergleich zu mitgeführtem Größenstandard abschätzen.

Zur Heteroduplexbildung werden zu 8  $\mu$ l des Amplifikats 2  $\mu$ l Ladepuffer zugegeben. Es folgt ein Denaturierungsschritt bei 95 °C mit dem Thermocycler (T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen) für 5 min. Anschließend werden die Proben auf + 4 °C gekühlt und bei dieser Temperatur für 1 h gelagert.

Zum Gießen der Gele werden Platten mit einer Größe von 23,5 x 23,5 cm verwendet. Die Platten werden mit EtOH 70 % gereinigt und mit 2 ml Acryl Glide, einer hydrophoben Substanz, welche der besseren Ablösung der Gele von den Platten dient, poliert. Abschließend wird eine hydrophile Trägerfolie durch Reibung auf eine der Platten fixiert. Die Gellösung setzt sich wie in Tabelle 10 aufgeführt zusammen.

**Tabelle 10: Ansatz hdPAGE-Gellösung für MOPS/EDTA-Puffer-System** Zusammensetzung der Gellösung für die hdPAGE unter Verwendung des MOPS/EDTA-Puffer-System. Die einzelnen Substanzen des Reaktionsansatzes, in Klammern die Konzentrationen im Ansatz, Stammlösungen und deren Menge (ml) in einem Gesamtvolumen von 50 ml.

Substanz (Konzentration)	Stammlösungen	Menge (ml)
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (6 %)	40 % (37,5 : 1)	7,5
MOPS (1 x)	50 x (1M MOPS, 50 mM EDTA, pH 8)	1
Glycerol (2 %)	40 %	2,5
Aqua bidest.		ad 50 ml

Um die Polymerisierung der Gel-Lösung zu starten, werden 200 µl APS 4% (4% Ammoniumpersulfat in Aqua bidest.) und 110 µl TEMED (N, N, N', N' - Tetramethyldiamin) zugegeben. Nach 3-4 h ist die Polymerisierung abgeschlossen. Die Puffergefäße werden mit jeweils 500 ml Laufpuffer (1 M MOPS, 50 mM EDTA, pH 8.0) gefüllt. Zusätzlich werden 2 ml 0,1 %-Triton-Lösung zur besseren Wärmeübertragung auf die Thermoplatte gegeben. Es werden jeweils 7 µl der Heteroduplices mit 5 µl Laufpuffer aufgetragen. Bei allen Elektrophoresen wird ein Größenstandard (1 µl Böhlinger Standard V, 0,5 µl Ladepuffer, 3 µl 1x MOPS) mitgeführt, hiervon werden 2 µl aufgetragen. Zur Auftrennung wird eine Spannung von 150 V für 16 h angelegt. Die Färbung des Gels erfolgt nach dem Silver-Staining-Protokoll von Benbouza et al. (Benbouza et al., 2006) (Tabelle 11). Die Banden der gesuchten Größe werden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und können bei + 4 °C gelagert werden.

**Tabelle 11: Färbeprotokoll hdPAGE** Arbeitsschritte, die Zusammensetzung der eingesetzten Reaktionslösungen und die Dauer (min) der jeweiligen Arbeitsschritte (Benbouza et al., 2003).

Arbeitsschritt	Reaktionslösung	Dauer (min)
Fixierung	10% Etanol absol., 0,5% Essigsäure	5
Imprägnierung	pro 1 l: 1,5 g AgNO <sub>3</sub> 1,5 ml 37 % HCOH	6-7
Waschen	Aqua dest.	
Entwicklung	pro 1 l: 15 g NaOH. 2 ml 37 % HCOH	3-5
Stopp	10 % Ethanol absol., 0,5% Essigsäure	2

Zur Elution der DNS aus dem Polyacrylamid-Gel wird das QIAEX II Gel Extraction Kit verwendet. Die Proben werden nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Bei dieser Art der Elution wird durch ein spezielles Puffersystem ein pH-Wert von unter 7,5 geschaffen. Unter Hochsals-Bedingungen binden die Nukleinsäuren an eine Silikamatrix und können nach Aufrei-

nigung wieder gelöst werden. Nach Zugabe von 200 µl Diffusionspuffer, werden die Gelstück im Wasserbad bei + 50 °C für 30 min inkubiert. Anschließend werden die Proben bei höchster Geschwindigkeit, 13.000 rpm, für etwa 2 min zentrifugiert und der Überstand in ein steriles Gefäß überführt. Für DNS-Fragmente >100 Bp wird die dreifache Menge des Volumens an Puffer QX1 zugegeben. Alle Proben werden für 30 sec vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von jeweils 10 µl QIAEX 2-Matrix, folgt die Inkubation bei RT für 10 min, dabei sind die Proben alle 2 min durch Invertieren zu mischen. Durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 2 min werden die Proben pelletiert. Das Pellet wird zweifach mit 500 µl Puffer PE gewaschen und luftgetrocknet. Zur Elution der DNS werden jeweils 20 µl Aqua dest. zugegeben. Nach Inkubation bei RT für 5 min und einer Zentrifugation für 30 sec. bei 13.200 rpm, wird der Überstand in sterile Gefäße überführt und bei + 4 °C gelagert.

### **2.2.3 Nachweis der klonalen TCR-β-Rearrangements**

#### **2.2.3.1 Amplifikation des TCR-β-Genlokus**

Zum Nachweis und der Vervielfältigung der klonalen Rearrangements des TCR-β-Genlokus wird eine PCR nach dem 2003 von van Dongen et al. entwickelten biomed-2 BMH4-CT98-3936-Concerted Action Protokoll (van Dongen et al., 2003) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine multiplex-PCR zur Detektion klonaler T-Zellrezeptor-Rearrangements.

Zur Amplifikation des monoklonalen TCR-β-R wird die DNS auf drei multiplex Ansätze verteilt: Der erste Ansatz enthält 23 Vβ-spezifische 5'-Primer und neun Fluorochrom markierte Jβ-spezifische 3'-Primer. Der zweite Ansatz enthält 23 Vβ-spezifische 5'-Primer und vier Fluorochrom-markierte Jβ-spezifische 3'-Primer zur Amplifikation kompletter V-D-J-Rearrangements. Der dritte Ansatz umfasst 2 spezifische Dβ 5'-Primer und 13-Jβ 3'-Primer zur Amplifikation inkompletter Rearrangements. Jβ1- und Jβ2-3'-Primer sind, zur Unterscheidung beteiligter Gensegment bei Reaktionen, in welchen beide Primersets verwendet werden (Tube A und C) mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert (TET für Jβ1.1–1.6 und FAM für Jβ 2.1–2.7 Primer).

- Tube A: 23 Vβ Primer und 9 Jβ (Jβ1.1–1.6, 2.2, 2.6 und 2.7)
- Tube B: 23 Vβ Primer und 4 Jβ (Jβ2.1, 2.3, 2.4 und 2.5)
- Tube C: Dβ1, Dβ2 und alle 13 Jβ Primer

Die Sequenzen der Primer (Tabelle 4), die Zusammensetzung des PCR-Ansatz (Tabelle 12) und das PCR-Programm (Tabelle 13) wurden aus dem Protokoll übernommen (van Dongen et al., 2003).

Zur Sequenzierung wird die Reaktion unter identischen Bedingungen mit unmarkierten Primern durchgeführt. Bei allen Reaktionen werden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle wird DNS einer bekannten Probe verwendet.

**Tabelle 12: Reaktionsansatz biomed-2-PCR** Reaktionskomponenten der PCR nach biomed-2 BMH4-CT98-3936-Concerted Action Protokoll (van Dongen et al., 2003) und deren jeweilige Konzentration in einem Endvolumen von 50 µl.

Reaktionskomponenten	Konzentration in 50 µl Gesamtvolumen
DNS	100 ng
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Taq-Polymerase	1 U
dNTP	200 µM
Primer	Je 10 pmol
ABI II Gold Buffer	ad 50 µl

**Tabelle 13: PCR-Protokoll der biomed-2-PCR** biomed-2-PCR nach Protokoll der Concerted Action BMH4-CT98-3936 (van Dongen et al., 2003).

Arbeitsschritt	Temperatur ( °C)	Zeit (min)	Zyklenzahl (n)
Aktivierung	95	7	1
Denaturierung	95	7	34
Anlagerung	60	1	34
Elongation	72	1	34
Elongation	72	20	1
Kühlen	15	-	1

### 2.2.3.2 Fluoreszenzfragmentlängenanalyse mittels GeneScan

Die PCR-Produkte werden zum Nachweis der monoklonalen Proliferation mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer, einem Kapillarelektrophoresegerät (Applied Biosystems, Weiterstadt) mittels Fluoreszenzfragmentlängenanalyse (FFA) und der Software GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert.

In der Kapillare des Geräts findet eine elektrophoretische Größenauftrennung der PCR-Produkte statt. Die fluorchrommarkierten Stränge werden von einem Laser zur Fluoreszenz angeregt, die Intensität des Fluoreszenz-Signals wird vom Gerät detektiert. Bei der graphischen Darstellung durch das zugehörige Computerprogramm (GeneMapper 3.7 Software, Applied Biosystems) werden die Werte gegen die Größe der DNS-Moleküle aufgetragen. Liegt eine klonale Zellpopulation vor, zeigt sich ein einzelner dominanter Peak. Bei einer reaktiven Lymphozytenvermehrung liegt ein polyklonales Muster vor, was sich in vielen kleineren Peaks zeigt. Die Methode erlaubt den Nachweis des Zellklons in der Probe und eine Bestimmung der Stranglänge des amplifizierten Abschnitts des klonalen TCR- $\beta$ -R.

Die Analysen des Genetic Analyzer zum Klonalitätsnachweis werden bei einer Temperatur von 60 °C, einer Injektionszeit von 10 sec und einer Injektionsspannung von 15 kV durchgeführt. Die Auftrennung erfolgt innerhalb von 40 min.

## **2.2.4 Analyse der TCR- $\beta$ -Rearrangements**

### **2.2.4.1 Sequenzierungs-PCR**

Die Sequenzierung des TCR- $\beta$ -R wird nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt. Hierbei werden dem PCR-Ansatz 2'-3'-Didesoxynukleotide zugegeben. Diesen fehlt die, für die von der Polymerase katalysierte Elongation essenzielle, 3'-Hydroxylgruppe, so dass die Moleküle zum namensgebenden Kettenabbruch führen. Die Didesoxynukleotide sind mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Das jeweilige Fluorchrom ist für eine der vier Basengruppen (Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin) spezifisch. Man geht davon aus, dass jede Base der *template*-DNS mindestens einmal mit einem Didesoxynukleotid hybridisiert und es dort zum Kettenabbruch kommt. Folglich ergeben sich Fragmente jeder Länge, welche am Ende einen Fluoreszenzfarbstoff tragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung kann die Sequenz mittels eines Fluoreszenzdetektors abgelesen werden.

Die Sequenzierungs-PCR wird mit dem Big Dye Terminator v 1.1. Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems durchgeführt (Tabelle 14). Pro Probe werden zwei Ansätze, zur separaten Sequenzierung durch BW- und FW- Primer, angesetzt. Im Vergleich der Duplikate lassen sich eventuell entstandene Fehler, korrigieren bzw. fehlende Basen ergänzen.

Der Reaktionsansatz enthält 150 ng gereinigte *template*-DNS, 2  $\mu$ l Big Dye Ready Reaction Mix (dNTP, ddNTP, Puffer, MgCl<sub>2</sub>, Polymerase) und 1  $\mu$ l Primer. Dies entspricht bei Sequenzierung



des TCR- $\beta$ -R unter Verwendung der Primer mit den Sequenzen des biomed-2-Protokolls (van Dongen et al., 2003) einer Menge von 41 pmol. Bei Sequenzierung der Plasmid-DNS unter Verwendung des M13 FW-Primers einer Menge von 100 ng bzw. 0,1  $\mu$ g des M13 BW-Primers in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l.

**Tabelle 14: PCR-Programm der Sequenzierungs-PCR** Arbeitsschritte, Dauer in Sekunden (sec) und Temperatureinstellungen (Temperatur (C°)), Reaktionszyklen: 45, abschließend Kühlung auf + 4°C.

Arbeitsschritt	Dauer	Temperatur (°C)
Denaturierung	30 sec	96
Anlagerung	15 sec	50
Elongation	4 min	60

#### 2.2.4.2 Ethanol/EDTA/Natriumacetat-Fällung

Vorbereitend auf die Sequenzanalyse werden die PCR-Produkte nach der Sequenzierungs-PCR gefällt. In jede Probe wird jeweils 1  $\mu$ l Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) gegeben. Anschließend wird ein Mix hergestellt, welcher pro Probe mit einem Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l, 1  $\mu$ l Natriumacetat (3 M) und 25  $\mu$ l EtOH (absol.) enthält. Von diesem Mix wird ein Volumen von 26  $\mu$ l zu jeder Probe pipettiert. Nach mehrmaligem Invertieren und einer Inkubation von 15 min bei RT werden die Proben bei RT und 16.000 g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird möglichst vollständig verworfen, das Pellet mit 35  $\mu$ l EthOH (70 %) gewaschen und erneut bei RT und 16.000 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die DNS für 15-20 min im Exsikkator vakuumgetrocknet.

#### 2.2.4.3 Kapillarelektrophorese

Die geelektrophoretische Auftrennung und Kontrolle der Sequenzier-Reaktion erfolgte mit dem Genescan ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Göttingen) und der DNA sequencing Analysis Software 5.1 (Applied Biosystems, Weiterstadt).

Unmittelbar vor der Kapillarelektrophorese wird die DNS in 12,5  $\mu$ l *highly deionized Formamide* (HiDi) gelöst und 0,5  $\mu$ l fluoreszenzmarkierter Größenstandard mit Fragmenten zwischen 35 Bp und 500 Bp zugegeben. Zur Strangtrennung wird die Lösung für 5 min auf 94 °C aufgeheizt und anschließend auf Eis gekühlt.

Bei der Sequenzanalyse werden die Fluorochrome, welche endständig an den DNS-Fragmenten gebunden sind, durch den Laser angeregt. Die Software wertet das basenspezifische Fluoreszenzsignal aus. Aufgrund der Fragmentlänge kann die jeweilige Base einer Position in der Sequenz zugeordnet werden. Unter der Annahme, dass an jeder Stelle des DNS-Stranges ein Kettenabbruch durch Hybridisierung eines Didesoxynukleotids stattgefunden hat, lässt sich die Sequenz des DNS-Stranges bestimmen. Die Sequenzen lassen sich mit Hilfe der Software graphisch darstellen.

#### **2.2.4.4 Sequenzanalyse**

Weitere Analysen und die Bearbeitung der Sequenzdaten werden mit dem Programm Vector NTI Advance 1-1 vorgenommen. Zur Identifikation der N-D-N-Regionen innerhalb der ermittelten Basensequenz werden die Sequenzen mit öffentlichen Gendatenbanken verglichen. Angewandt wird das von Brochet 2008 beschriebene System IMGT/V-Quest ([http://imgt.cines.fr/IMGT\\_vquest/share/textes/](http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/share/textes/), Brochet et al., 2008). Dieses System ermöglicht neben der Identifizierung der V $\beta$ -, D $\beta$ - und J $\beta$ -Segmente auch das Erkennen klonspezifischer Deletionen bzw. Insertionen. Diese, sowie die Größe der jeweiligen N-D-N-Regionen, werden für alle Proben erfasst und dokumentiert.

#### **2.2.5 Primerdesign für die RT-Q-PCR**

Zum Primerdesign wird das Programm Primer 3 Plus ([www.bioinformatics.nl](http://www.bioinformatics.nl)) verwendet. Wir definieren, analog dem Protokoll von Brüggemann et al. zur Quantifizierung von Tumorzellen im Blut von Patienten mit akuter lymphatischer T-Zell-Leukämie (T-ALL) (Brüggemann et al., 2004), die junktionale N-D-N-Region als Primerbindungsstelle.

Folgende Kriterien werden zur Generierung der Primer definiert:

- Primergröße zwischen 18 Bp und 27 Bp.
- Gehalt der Basen Guanin und Cytosin (GC-Gehalt) zwischen 20 % und 80 %.
- Schmelztemperatur der Primer zwischen 57 °C und 63 °C.
- Maximale Selbstligation von 8. (Die Selbstligation gibt die Fähigkeit der Primer an, aufgrund ihrer Basensequenzen untereinander Hybride zu bilden. Das Programm verwendet zur Berechnung der Werte ein Scoringsystem, bei welchem komplementäre Basen einen Punktwert von 1 besitzen, -1 für ein Basenmismatch, -2 für eine fehlende Base).

## 2.2.6 Quantifizierung

### 2.2.6.1 Quantitative Real-Time-PCR

Zur Durchführung der RT-Q-PCR orientieren wir uns an dem PCR-Protokoll von Brüggemann et al. zur Quantifizierung von Tumorzellen im Blut bei Patienten mit T-ALL (Brüggemann et al., 2004). Die Sequenzen der TaqMan-Sonden (mit Hybridisierung im Bereich der J $\beta$ -Regionen) werden aus dem PCR-Protokoll von Brüggemann et al. übernommen. Die Sonden sind am 5'-Ende mit dem Farbstoff FAM und am 3'-Ende mit dem Farbstoff TAMRA markiert. Die FW-Primer sind komplementär zu den patientenspezifischen N-D-N-Regionen, die BW-Primer zu den J $\beta$ -Segmenten. Die Sequenzen der BW-Primer werden ebenfalls aus dem PCR-Protokoll übernommen. Die FW-Primer werden für jeden Patienten nach zuvor genannten Kriterien (siehe 2.2.5.) designt.

Der Reaktionsansatz enthält 10-500 nM Primer, 100 nM Sonde und 6,6- 660 ng DNS (Tabelle 15). Der Mastermix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) enthält weitere Reaktionskomponenten wie dNTP und Puffer.

Als Negativ- bzw. Polyklonalkontrolle für die klonspezifische RT-Q-PCR, wird polyklonale, genomische DNS aus PBMC gesunder Probanden gewonnen. Die DNS wird extrahiert, aufgereinigt und von 6-10 gesunden Probanden zu gleichen Anteilen gepoolt.

Alle Reaktionen werden, wenn nicht explizit aufgeführt, nach einem Standardprogramm (Tabelle 16) mit einem Lightcycler 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Die Daten werden mit dem Programm Lightcycler Software Version 3.5. (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gespeichert und analysiert.

**Tabelle 15: Reaktionsansatz RT-Q-PCR** Mengen (Mengen ( $\mu$ l)) der jeweiligen Reaktionskomponenten in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l. In Klammern die absoluten Mengen in Molar bzw. ng.

Mengen ( $\mu$ l)	Reaktionskomponente
4	Mastermix
2	FW-Primer (10-500 nM)
2	BW-Primer (10-500 nM)
2	Sonde (100 nM)
5	Template DNS (6,6 – 660 ng)
0- 5	Genomische DNS (6,6 – 660 ng)
ad 20 $\mu$ l	Aqua dest.

**Tabelle 16: Standardprogramm der RT-Q-PCR** Arbeitsschritte, Temperatureinstellung (Temperatur (C°) und Dauer des jeweiligen Arbeitsschrittes).

Arbeitsschritt	Temperatur (°C)	Dauer
Denaturierung	95	10 min
Denaturierung	95	10 sec
Anlagerung	variabel	15 sec
Elongation	72	2 sec
Kühlen	36	-

Die Definition der Sensitivität der Reaktion und des quantifizierbaren Bereichs, so wie die Evaluation der Effizienz der Reaktion, erfolgen anhand von Standardkurven mit Verdünnungsstufen bekannter Genkopienzahlen. Kriterien zur Evaluation der Standardkurve für eine zuverlässige Quantifizierung werden von van der Velden übernommen und später näher erläutert (van der Velden, 2007; siehe 3.4.1.).

Die Standardkurve wird durch logarhythmisches Auftragen der  $C_t$ -Werte (*Cycle Threshold* oder Schwellenwertzyklus) einer Verdünnungsreihe mit bekannter Genkopienzahl gegen die Zyklenzahl generiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die sog. *second derivative maximum method* verwendet, hierbei berechnet das Gerät den  $C_t$ -Wert mit Hilfe der zweiten Ableitung der Fluoreszenzkurve. Der Wert entspricht dem Reaktionszyklus bei welchem sich die Steigung der Kurve am stärksten ändert.

Die Verdünnungsreihen zur Quantifizierung der absoluten Tumorzellzahl werden durch serielle Verdünnung der klonierten, patientenspezifischen TCR- $\beta$ -R-Sequenzabschnitte hergestellt. Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl wird eine Verdünnungsreihe mit kommerziell erworbener, genomischer DNS hergestellt (siehe 2.2.6.3 und 2.2.6.4).

Zur Berechnung der Volumina für die korrekte Zusammensetzung einer Verdünnungsstufe mit definierter Kopienzahl, wird das Gewicht des jeweiligen Plasmids nach Insertion des klonenspezifischen TCR- $\beta$ -Sequenzabschnittes berechnet. Es ergibt sich aus der Multiplikation der Anzahl der Basenpaare mit dem durchschnittlichen Gewicht eines Basenpaares ( $1,096 \times 10^{-12}$  ng). Durch die Konzentrationsmessung der Ausgangslösung (ng/  $\mu$ l) und dem errechneten Gewicht des Plasmids nach Insertion des TCR- $\beta$ -R bzw. einer Genkopie (ng), ergibt sich die Anzahl der Genkopien pro  $\mu$ l. Ausgehend von diesen Berechnungen kann der Verdünnungsfaktor, bzw. das Volumen der Ausgangslösung ( $\mu$ l), das für die Herstellung einer Verdünnung mit definierter

Genkopienzahl notwendig ist, bestimmt werden. Die Proben werden mit Aqua bidest. verdünnt. Die Verdünnungsreihe umfasst folgende Verdünnungsstufen:  $10^5/10^4/10^3/10^2/10^1/1/0,1/0,01$  Genkopien in jeweils 5  $\mu$ l Gesamtvolumen.

Zur Generierung der Standardkurve wird die RT-Q-PCR mit der Verdünnungsreihe als Positivkontrolle nach Standardprogramm (Tabelle 16) durchgeführt. Dem Reaktionsansatz wird ein Volumen mit einer Menge von 660 ng polyklonaler DNS zugegeben. Es wird eine patientenspezifische Primermenge und die Sonde in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt. Alle Bestimmungen erfolgen dreifach. Zusätzlich werden eine polyklonale Negativkontrolle und eine Aqua-Negativkontrolle mitgeführt.

### **2.2.6.2 Optimierung der PCR-Bedingungen**

Vor Durchführung der Quantifizierungsläufe werden verschiedene Reaktionsbedingungen zur Optimierung variiert: Anlagerungstemperatur der Primer, Primerkonzentration, Magnesiumchloridkonzentration im Reaktionsansatz und die Sondenkonzentration. Alle Reaktionen werden mit dem Standardprogramm des LightCycler (Tabelle 16) durchgeführt.

### **2.2.6.3 Klonspezifische PCR**

Zur Bestimmung der absoluten Tumorzellzahlen werden patientenspezifische Primer, komplementär zu den klonalen TCR- $\beta$ -R, eingesetzt. Bei maximaler Spezifität und Sensitivität wird ausschließlich das klonale TCR- $\beta$ -R amplifiziert. Zur Generierung der Standardkurve wird eine Verdünnungsreihe der klonierten TCR- $\beta$ -Sequenzabschnitte verwendet. Den Reaktionsansätzen zur Generierung der Standardkurve werden 6,6 ng polyklonale DNS zugefügt. Die absoluten Tumorzellzahlen der Patientenproben, werden im Vergleich der  $C_t$ -Werte der Proben und der  $C_t$ -Werte der Standardkurve bestimmt. Es wird ein Volumen von 5  $\mu$ l der Patientenproben, entsprechend einer DNS-Menge von 6,6 ng, eingesetzt. Konzentrationsunterschiede werden durch Zugabe von TE-Puffer ausgeglichen. Zur Generierung der Standardkurve wird dem Ansatz alternativ zur *template* DNS ein Volumen von 2,5  $\mu$ l bzw. 5  $\mu$ l der jeweiligen Verdünnungsstufe zugegeben. Allen Reaktionsansätzen wird  $MgCl_2$  in einer Konzentration von 0,5 mM zupipettiert (Tabelle 17). Die Reaktion wird, unter zuvor optimierten Bedingungen, für die Verdünnungsreihe in Doppelbestimmung und für die Patientenproben in Dreifachbestimmung durchgeführt. Zusätzlich werden polyklonale Negativkontrollen in dreifacher Bestimmung (Zugabe eines Volumens

mit 6,6 ng polyklonaler DNS im Ansatz) und Wassernegativkontrollen in Doppelbestimmung mitgeführt.

**Tabelle 17: Ansatz zur Quantifizierung von Patientenproben** Endvolumen 20 µl. Menge (µl), Reaktionskomponenten und Konzentration bzw. Menge (in Klammern), Primer in zuvor optimierten Konzentrationen.

Mengen (µl)	Reaktionskomponente
4	Mastermix
2	FW-Primer
2	BW-Primer
2	Sonde (Konzentration im Stock 100 nM)
5	Template-DNS (6,6 ng)
0,4	MgCl <sub>2</sub> (0,5 mM)
ad 20 µl	Aqua dest.

#### 2.2.6.4 β- Aktin-PCR

Zur Quantifizierung der Gesamtzellzahl wird eine RT-Q-PCR mit einem Referenzgen durchgeführt. Bei Kenntnis der Gesamtzellzahl lässt sich mit den Ergebnissen der patientenspezifischen Quantifizierung die relative Tumorzellzahl bzw. den Anteil an Tumorzellen an der Gesamtzellzahl kalkulieren. Als Referenzgen wird das β-Aktin-Gen (ACTB) verwendet.

Die Primer sind ACTB spezifisch. Bei der Quantifizierung der Gesamtzellzahl wird eine Standardkurve aus einer Verdünnungsreihe kommerziell erworbener, gepoolter genomischer, humaner DNS generiert. Die Reaktionsansätze setzen sich analog der zuvor detailliert beschriebenen Ansätze der patientenspezifischen PCR zusammen (Tabelle 17). Es sind 100 pmol Primer, 0,5 M MgCl<sub>2</sub> und die Sonde in einer Konzentration von 100 nM enthalten. Dem Reaktionsansatz wird ein Volumen mit 6,6 ng *template* DNS und Aqua bidest. bis zu einem Gesamtvolumen von 20 µl zugegeben. Die Bestimmung erfolgt für die Verdünnungsreihe doppelt, für die Patientenproben dreifach.

#### 2.2.7 Statistische Auswertung

Zur Beurteilung einer möglichen Korrelation intervallskaliertter Stichproben wird die Korrelationsanalyse nach Pearson angewandt (Steiger et al, 1980). Ein signifikanter Zusammenhang besteht bei  $P < 0.05$ , ein hochsignifikanter Zusammenhang bei  $P < 0.01$ . Dieses Auswertungsverfahren wird zur Beurteilung einer Korrelation zwischen dem Hybridisierungsbereich der Primer innerhalb der N-D-N-Region und der erreichten Sensitivität, so wie zur Analyse einer Korrelati-

on zwischen der Länge der N-D-N-Region bzw. GC-Gehalt und erreichter Sensitivität angewandt.

Zur Beurteilung einer Korrelation der Bindung der klonspezifischen Primer innerhalb oder außerhalb der N-D-N-Region und der erreichten Sensitivität wird der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben, die nicht normalverteilt vorliegen, angewandt (Mann et al., 1947).

Zur Analyse unabhängiger, normalverteilter Stichproben wird der T-Test genutzt (Bonnet et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit werden die Längenunterschiede der N-D-N-Region der Patienten mit SéS und der Patienten mit T-ALL mit Hilfe des T-Test auf Signifikanz getestet.

Das Vorliegen einer Normalverteilung als Voraussetzung zur Wahl des geeigneten Analyseverfahrens wird mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Test evaluiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung des klonalen TCR-β-Rearrangement

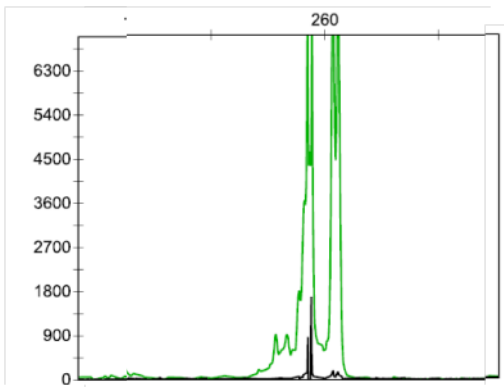
##### 3.1.1 Klonalitätsnachweis

Es wurden 30 Proben von 14 Patienten mit Sézary Syndrom (Sés) in die Arbeit eingeschlossen. Voraussetzung waren die Diagnosestellung gemäß den WHO-EORTC Kriterien (Willemze et al., 2005) und der sichere Nachweis eines klonalen TCR-β-Rearrangement (TCR-β-R).

##### 3.1.1.1 Fluoreszenzfragmentlängenanalyse mittels GeneScan

In allen Patientenproben wurde ein komplettes, klonales Rearrangement nachgewiesen. Zum Nachweis und der Vervielfältigung der Gensequenzen der monoklonalen TCR-β-R wurde eine PCR nach dem 2003 von van Dongen et al. entwickelten biomed-2 BMH4-CT98-3936 Concerted Action Protokoll durchgeführt (van Dongen et al., 2003). Die PCR-Produkte wurden mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer, einem Kapillarelektrophoresegerät (Applied Biosystems, Weiterstadt), mittels Fluoreszenz-Fragmentlängen-Analyse (FFA) und der Software GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert (Tabelle 18). Bei zwei Amplifikaten unterschiedlicher Fragmentlängen in einem oder zwei *tubes* liegt ein biallelisches Rearrangement der monoklonalen Zellpopulation vor.

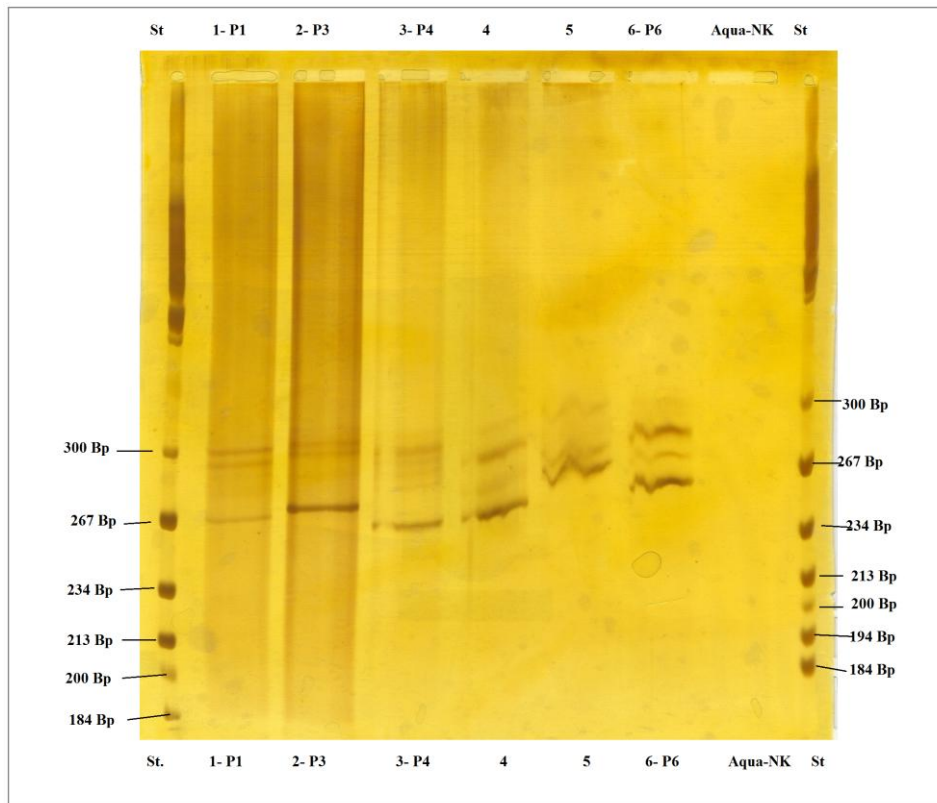
**Tabelle 18: Größe der amplifizierten Bereiche der klonalen TCR-β-R** Größe (Bp) des amplifizierten Bereichs (biomed-2 PCR van Dongen et al., 2003), PCR-Ansatz (tube).

Patient	Tube A	Tube B	TubeC	Biallelisches Rearrangement Patient 3 in Tube A (261Bp/ 258 Bp):
1		262		
2		261		
3	261/ 258		176	
4	258/ 262			
5		271	300	
6		260	311	
7	267	267		
8	252	260		
9	252		300	
10	256		295	
11	257		190	
12	261			
13	252		187	
14	263		308	



### 3.1.1.2 Hochauflösende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Vor Sequenzierung der patientenspezifischen TCR- $\beta$ -R wurden die PCR Produkte aus 6 Proben von 4 Patienten (Patient 1, 3, 4 und 6) mit starkem polyklonalem Hintergrundsignal mittels hochauflösender Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Heteroduplexbildung (hdPAGE) aufgetrennt:



**Abbildung 9: Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Heteroduplexbildung** Elektrophoretische Auftrennung nach Heteroduplexbildung und Silberfärbung der DNS aus 6 Proben (Nummerierung). Proben von vier Patienten des Kollektivs (Patient 1,3,4 und 6; Proben 1- P1, 2-P3, 3-P4 und 6-P6), Wasser negativkontrolle (Aqua-NK), Größenstandards (St.) (Mischung aus Böhlinger Größenstandard V und einer 100 Bp DNS Leiter).

Die Auftrennung der Proben 1-5 zeigt eine dominante Bande. In Probe 6 fallen zwei dominante Banden auf, obwohl in der entsprechenden TCR- $\beta$ -PCR nur ein klonales TCR- $\beta$ -R nachgewiesen wurde. Die Banden wurden separat isoliert und sequenziert. Bei der Sequenzierung ergab sich die identische Sequenz. Damit handelt es sich um einen Artefakt der Heteroduplexanalyse.

### 3.1.2 Sequenzierung und Charakterisierung der N-D-N-Regionen

Für alle Proben der 14 Patienten wurden die Sequenzen der junktionalen Region der TCR- $\beta$ -R der monoklonalen T-Zell-Population ermittelt (Tabelle 19).

**Tabelle 19: Sequenzen der N-D-N-Region und Bindungsbereiche der patientenspezifischen Primer** Basensequenzen der N-D-N-Regionen (3' V $\beta$ -Region, D $\beta$ -Region und 5' -J $\beta$ -Region) für jeden Patienten (P). Klonenspezifischen Insertionen (N1 und N2). ... kennzeichnet die deletierten Basen. Die Unterstrichung zeigt die Bindungsbereiche der klonenspezifischen Primer: V $\beta$ -, D $\beta$ - und J $\beta$  die jeweilige Gensegmente entsprechend der IMGT Nomenklatur (Folch et al., 2000). Prozentualer Anteil der Basen Guanin und Cytosin (GC (%)) der N-D-N-Region.

Patient	3' V $\beta$ -Region	N1	D $\beta$ -Region	N2	5'-J $\beta$ -Region	V $\beta$	D $\beta$	J $\beta$	GC-(%)
1	TGT GCC AGC AGC C...	CTC GT	...CT AGC GGG AG...	AGA T	..... CAT TCA GTA CTT C	3-1	2	2-4	55,6
2	TGT GCC AGC AGT TAC ..	CC	...CA G.....		CTC CTA CAA TGA GCA GTT CTT C	6-6	1	2-1	50
3	TGT GCC AGC TCA CCA C...		...T AGC GGG AGG G	C	..... CCG GGG AGC TGT TTT TT	18	2	2-2	62,2
4	TGT GCC AGC AG.....	CCCC	..GGACA GGG G..		...TA ATG AAA ACT GTT TTT	6-6	1	1-4	51,2
5	TGT GCC AGC AGC CAA G.	GGG CTC CG	...CT AGC GGG AG..	AAG GTT	..... A TGA GCA GTT CTT C	4-2	2	2-1	59,3
6	TGT GCC AGC AGC TTG G	CCA CCC	...CT AG.....		..... CAA TGA GCA GTT CTT C	5-4	2	2-1	57,1
7	TGT GCC AGT AGT ...	CTC C	..GGACA GGG ...	AG	CTC CTA TAA TTC ACC CCT CCA CTT T	19	1	1-6	52,9
8	TGT GCC AGC AGC .....	CCA	.....AGC GGA G..		..... CAA TGA GCA GTT CTT C	11-3	2	2-1	57,9
9	TGT GCC AGC AGC TTG G	CAA G			...CA CTG AAG CTT TCT TT	5-6		1-1	51,4
10	TGT GCC AGC AGC C..	CCA	..GGACA GGG...	CG	...T ATG GCT ACA CCT TC	3-1	1	1-2	64,3
11	TGT GCC AGC AGT TTA G.	GG	...CA GGG ...		...CA CTG AAG CTT TCT TT	12-3	1	1-1	53,8
12	TGT GCC AGC AGC TTG G		..GGACA GG.....	CCT	CTC TGG AAA CAC CAT ATA TTT T	5-4	1	1-3	50
13	TGT GCC AGC AGT .....	CCA ACT TT			..... TTC ACC CCT CCA CTT T	6-5		1-6	77,8
14	TGT GCC AGC ... ..	TCA CGT CGA GTG A	.....C GGG AGG G	C TT	...TA CGA GCA GTA CTT T	27	2	2-7	56,8

Neben der Gesamtlänge wurden die Länge der einzelnen Segmente, Deletionen und Insertionen dokumentiert (Tabelle 20). Der errechnete Mittelwert der N-D-N-Regionen betrug 13 Bp (0 Bp- 24 Bp). Durchschnittlich lagen Deletionen am 3'-Ende der V $\beta$ -Regionen mit einer Länge von 3 Bp (0 Bp- 8 Bp), am 5'-Ende von 2,5 Bp (0 Bp- 8 Bp) und Deletionen am 5'-Ende der J $\beta$ -Region von 4,2 Bp (0 Bp- 9 Bp) vor. Insertionen, bezeichnet als N1- und N2-Region, betragen im Mittel 4,4 Bp (0 Bp- 13 Bp) und 1,9 Bp (0 Bp- 6 Bp).

**Tabelle 20: Charakterisierung der N-D-N-Region** Anzahl der deletierten Basenpaare am 3'-Ende des V $\beta$ -Segments (V $\beta$ 3'-Del), Insertionen zwischen den Regionen (N1 bzw. N2), Länge der D $\beta$ -Region (D $\beta$ ), Deletionen am 3'-und am 5'-Ende der D $\beta$ -Region (D $\beta$ 5'-del und D $\beta$ 3'-del), sowie Deletionen des 5'-Endes der J $\beta$ -Region (J $\beta$ 5'-del). Gesamtlänge der identifizierten N-D-N-Region (N-D-N). Angegeben sind jeweils die Anzahl der Basenpaare. Zusätzlich sind die Minimal-, Maximalwerte (Range) und die Mittelwerte (MW) aller Sequenzen angegeben.

Patient	V $\beta$ 3'Del	N1	D $\beta$ 5'del	D $\beta$	D $\beta$ 3'del	N2	J $\beta$ 5'del	N-D-N
1	4	5	4	10	2	4	9	19
2	2	2	4	3	5	0	0	5
3	1	0	5	11	1	6	0	12
4	6	4	1	9	2	0	4	13
5	1	8	4	10	2	6	8	24
6	0	6	4	4	8	0	6	10
7	5	4	1	8	3	2	0	14
8	5	3	6	8	2	0	6	11
9	0	3	0	0	0	0	4	3
10	4	4	1	8	3	2	5	14
11	1	2	4	5	3	0	4	7
12	0	0	1	7	4	3	0	10
13	5	8	0	8	0	0	9	16
14	8	13	8	8	0	3	4	24
Range	0 bis 8	0 bis 13	0 bis 8	0 bis 11	0 bis 8	0 bis 6	0 bis 9	4 bis 24
MW	3	4,4	3,1	7,1	2,5	1,9	4,2	13

Um die RT-Q-PCR bezüglich Anwendbarkeit, Sensitivität und Spezifität bei SéS und T-ALL zu vergleichen, wurden die N-D-N-Regionen weiterer Patienten mit SéS bezüglich obengenannter Eigenschaften ausgewertet und mit denen der Patienten mit T-ALL des Kollektivs der Studie von Brüggemann et al. verglichen (Brüggemann et al., 2004) (Tabelle 21).

Im Bereich der junktionalen Regionen der N-D-N-Regionen der Proben des ursprünglichen SéS-Patientenkollektivs (N1 SéS 4,4 Bp; N1 T-ALL 8,5 Bp; N2 SéS 1,9 Bp; N2 T-ALL 6,2 Bp) und des erweiterten Kollektivs (N1 SéS 4,58 Bp; N2 SéS 2,62 Bp) fallen kürzere Insertionen auf. Im Vergleich der Gesamtlänge der N-D-N-Regionen zeigen sich nur geringe Unterschiede zwischen den Daten der Patienten des ursprünglichen Kollektivs und den Patienten mit T-ALL. In der Betrachtung des erweiterten Kollektivs der Patienten mit SéS zeigt sich ein deutlicher Längenunterschied von im Mittel 4 Bp (N-D-N-Länge SéS 13,5 Bp; N-D-N-Länge T-ALL 17,7 Bp).

**Tabelle 21: Auswertung der N-D-N-Regionen des erweiterten Patientenkollektivs und Patienten mit T-ALL** Eigenschaften der N-D-N-Regionen für 14 Patienten des Kollektivs (Patient (Koll.)), 20 zusätzliche Patienten mit SéS (Patienten (add.)) und der Patienten mit T-ALL (Patienten (T-ALL)) (Brüggemann et al., 2004). Anzahl der deletierten Basenpaare am 3'-Ende des V $\beta$ -Segments (V $\beta$ 3'-Del), klonspezifische Insertionen (N1 bzw. N2), Länge der D $\beta$ -Region (D $\beta$ ), Deletionen am 3'-und am 5'-Ende der D $\beta$ -Region (D5'-del und D3'-del), Deletionen des 5'-Endes der J $\beta$ -Region (J $\beta$ 5'-del). Gesamtlänge der N-D-N-Region (N-D-N). Minimal- und Maximalwert (Range), Mittelwerte (MW).

	V3'Del	Insert N1	D5'del	D-Länge	D3'del	Insert N2	J5'del	N-D-N
Patienten (Koll.)								
Range	0 bis 8	0 bis 13	0 bis 8	0 bis 11	0 bis 8	0 bis 6	0 bis 9	4 bis 24
Mittelwert	3	4,4	3,1	7,1	2,5	1,9	4,2	13
Patienten (add.)								
Range	0 bis 8	0 bis 13	0 bis 8	0 bis 13	0 bis 8	0 bis 10	0 bis 17	4 bis 27
Mittelwert	3,03	4,58	2,58	6,56	3,82	2,62	5,03	13,56
Patienten (T-ALL)								
Range	0 bis 23	0bis47	0 bis 11	5 bis 16	0 bis 21	0 bis 25	0 bis 10	0 bis 47
Mittelwert	4,4	8,5	3,8	7,2	3	6,2	4	17,7

### 3.2 Primerdesign

Für die 14 Patienten wurden 20 N-D-N-spezifische Primer kreiert. Für 5 TCR- $\beta$ -R konnten die ursprünglichen Kriterien (siehe 2.2.5) zur Generierung N-D-N-komplementärer Primer nicht eingehalten werden. In diesen Fällen wurden die Kriterien modifiziert. Folgend sind die Primersequenzen, so wie Herstellerangaben zu Schmelztemperatur, Gehalt der Basen Guanin und Cytosin (GC-Gehalt), Gesamtlänge und Möglichkeit der Selbstligation angegeben (Tabelle 22).

**Tabelle 22: N-D-N-spezifische Primer** Schmelztemperatur (Sch (°C)) entsprechend den Herstellerangaben, Gehalt der Basen Guanin und Cytosin (GC(%)), Länge des Primers (L (Bp)) und Anzahl der potentiellen Selbstligationen (S (n)).

Patient	Sequenz 5'→3'	Sch (°C)	GC (%)	L (Bp)	S (n)
1	CCT CGT CTA GCG GGA GAG AT	64	60	20	2
2	CAG CAG TTA CCC CAG CTC CT	64	60	20	1
3	TCA CCA CTA GCG GGA GGG	60	67	18	2
4	AGC CCC GGA CAG GGG TA	58	71	17	4
5	GCC AAG GGG CTC CGC TAG	62	72	18	4
6	GCT TGG CCA CCC CTA GCA	60	67	18	0
7	CGG ACA GGG AGC TCC TAT AAT TC	70	52	23	0
8	CTG TGC CAG CAG CCC AAG	60	67	18	2
9	CTT GGC AAG CAC TGA AGC	56	56	18	2
10	CCA GGA CAG GGC GTA TGG	60	67	18	0
11	TTC TGT GCC AGC AGT TTA GG	60	50	20	0
12	GGA CAG GCC TCT CTG GAA AC	64	60	20	0
13	CCA GCA GTC CAA CTT TTT CAC C	66	50	22	1
14	GAG TGA CGG GAG GGC TTT AC	64	60	20	0

Ziel war die möglichst komplette Bindung der N-D-N-Region durch die patientenspezifischen Primer. Zur Einhaltung der definierten Kriterien bezüglich der Primerbedingungen (siehe 2.2.5) musste von diesem Optimum abgewichen werden. Die genauen Bindungsbereiche innerhalb der N-D-N-Region sind in Tabelle 19 durch Unterstreichung markiert.

### 3.3 Optimierung der PCR-Bedingungen

Vor Durchführung der Quantifizierungsläufe wurde die Auswirkung einer Variation einzelner Untersuchungsbedingungen auf den Ablauf der PCR evaluiert und diese hiernach optimiert.

### 3.3.1 Temperatur

Durch Steigerung der Anlagerungstemperatur (*Annealingtemperatur*) kann die Spezifität und Effizienz der PCR, durch Minimierung unspezifischer Amplifikation und Dimerbildung, maximiert werden. Übersteigt hingegen die Anlagerungstemperatur ein primerspezifisches Optimum, sinkt die Effizienz der PCR durch eine schlechtere Primerbindung.

#### 3.3.1.1 Temperaturoptimierung mit der konventionellen PCR

Die Temperaturoptimierung wurde zunächst mit einer konventionellen PCR nach Standardprogramm (Tabelle 14) durchgeführt. Ausgehend von den Herstellerangaben bezüglich der Schmelztemperatur (Tabelle 22) wurde die Temperatur in 2° C Schritten mindestens viermal gesteigert. Eingesetzt wurden 330 ng genomische DNS aus *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) der Patienten und die Primer in einer Konzentration von 500 nM. Zur Kontrolle der Spezifität wurde eine polyklonale Negativkontrolle mitgeführt. Kontaminationen wurden durch ein negatives Signal der Wassernegativkontrolle ausgeschlossen.

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als optimale Temperatur wurde die Temperatureinstellung definiert, bei welcher das optisch intensivste Signal bei fehlendem Signal in der polyklonalen Negativkontrolle auftrat.

Die Temperaturoptimierung mit Hilfe der konventionellen PCR wurde für 12 der 14 Patienten durchgeführt (Tabelle 23).

#### 3.3.1.2 Temperaturoptimierung mit der RT-Q-PCR

Die Versuchsbedingungen der RT-Q-PCR zur Temperaturoptimierung entsprechen denen der Quantifizierungs-PCR eher, als die der konventionellen PCR. So wurde angenommen, dass die Temperaturoptimierung mittels RT-Q-PCR die tatsächliche Auswirkung der Temperaturvariation auf die Quantifizierungs-PCR besser darstellt. Hiernach wurde die Temperaturoptimierung mittels RT-Q-PCR für die 20 Primer der 14 Patienten durchgeführt.

Der Reaktionsansatz enthielt eine kalkulierte Menge von 10 Kopien klonierte TCR- $\beta$ -R-Sequenz, 500 nM Primer und die Gensonde in einer Konzentration von 100 nM. Zur Kontrolle der Spezifität und dem Ausschluss von Kontaminationen wurden Ansätze mit polyklonaler DNS in Dreifachbestimmung und Wassernegativkontrollen in doppelter Bestimmung mitgeführt. Die einge-

setzte DNS-Menge der polyklonalen Negativkontrolle betrug 660 ng. Diese Menge entspricht etwa einer Menge genomischer DNS von  $5 \times 10^5$  humanen Zellen.

Die optimale Temperatur ist definiert durch den niedrigsten  $C_t$ -Wert bei fehlendem Signal der polyklonalen Negativkontrolle und Wassernegativkontrolle. Waren bei mehreren getesteten Temperaturen die erreichten  $C_t$  Werte nahezu identisch ( $\Delta C_t < 0,25$ ), wurde die Temperatureinstellung gewählt, bei welcher eine höhere Signalintensität erreicht werden konnte. Die optimalen Temperaturen lagen in einem Bereich zwischen 65 °C-72 °C (Mittelwert 70 °C) und im Mittel um 3,5 °C höher als die optimale Temperatur, welche mit Hilfe der konventionellen PCR ermittelt ( $Opt_K$ ) wurde (Tabelle 23). Bei fünf der getesteten Primerpaare trat bei dem mittels konventioneller PCR definiertem Temperaturoptimum ( $Opt_K$ ) eine unspezifische Amplifikation auf. Diese wurde mit Hilfe der gelelektrophoretischen Auftrennung zur Auswertung der Ergebnisse der konventionellen PCR nicht detektiert. Bei vier weiteren Primerpaaren waren nur minimale Differenzen der  $C_t$ -Werte messbar ( $|\Delta C_t \text{ Temperaturoptima}| \leq 0,18$ ). Bei einem der Primerpaare war in der RT-Q-PCR bei dem mit Hilfe der konventionellen PCR ermittelten Temperaturoptimum ( $Opt_K$ ) kein Signal detektierbar.

**Tabelle 23: Temperaturoptima** nach Ermittlung mittels RT-Q-PCR ( $Opt_O$  (°C)) und konventioneller PCR ( $Opt_K$ (°C)), die entsprechenden  $C_t$ -Werte ( $C_t \text{ Opt}_O$  und  $C_t \text{ Opt}_K$ ) in Doppelbestimmung (1. und 2.), so wie die errechneten Mittelwerte. Zusätzlich ist die Differenz ( $C_t \text{ Opt}_O - C_t \text{ Opt}_K$ ) aufgeführt ( $\Delta C_t \text{ Temperaturoptima}$ ). x bezeichnet einen nicht durchgeführten Versuch, neg. das Fehlen eines spezifischen Signals. Unspezifische Amplifikation (u.A.) bezeichnet das Auftreten eines Signals in der polyklonalen Negativkontrolle.

Primer	$Opt_O$ (°C)	$Opt_K$ (°C)	$C_t \text{ Opt}_O$			$C_t \text{ Opt}_K$			$\Delta C_t \text{ Temperaturoptima}$
			1.	2.	MW	1.	2.	MW	
1	70	68	29.56	29.65	<b>29.60</b>	29.59	29.48	<b>29.54</b>	+ 0.06
2	69	66	32.78	32.62	<b>32.7</b>	neg.	neg.	<b>neg.</b>	x
3	69	62	27.51	27.51	<b>27.51</b>	x	x	<b>x</b>	x
4	65	62	31.81	31.69	<b>31.75</b>	31.89	31.71	<b>31.80</b>	- 0.05
5	69	66	31.50	31.22	<b>31.36</b>	u. A.	u. A.		
6	70	66	31.35	31.37	<b>31.36</b>	31.28	31.36	<b>31.32</b>	+ 0.04
7	72	x	25.54	25.50	<b>25.52</b>	x	x	<b>x</b>	x
8	71	68	27.84	27.82	<b>27.83</b>	u. A.	u. A.		
9	68	64	27.74	27.58	<b>27.66</b>	x	x	<b>x</b>	x
10	71	68	25.22	25.16	<b>25.19</b>	u. A.	u. A.		
11	70	66	26.49	26.67	<b>26.58</b>	u. A.	u. A.		
12	71	68	25.65	25.67	<b>25.66</b>	25.81	25.87	<b>25.84</b>	- 0.18
13	70	68	26.12	26.13	<b>26.13</b>	u. A.	u. A.		
14	72	x	28.64	28.55	<b>28.60</b>	x	x	<b>x</b>	x

### 3.3.2 Primerkonzentration

Die Optimierung der Primerkonzentration ist maßgeblich, um eine größtmögliche Effizienz der Reaktion zu erreichen. Ist die Primerkonzentration zu hoch gewählt, interagieren die Primer vermehrt untereinander und hybridisieren unspezifisch. Bei einer zu niedrigen Primerkonzentration wird das Reaktionspotential der PCR nicht vollständig genutzt und die Amplifikationsrate ist geringer als theoretisch möglich.

Zur Bestimmung der optimalen Primerkonzentration wurden für jeden Patienten fünf Primerkonzentrationen getestet (1  $\mu$ M, 758 nM, 500 nM, 250 nM, 125 nM). Bei allen möglichen Kombinationen der angegebenen Konzentrationen für *forward*-(FW) und *backward*-(BW)-Primer ergeben sich insgesamt 25 Reaktionsansätze. Jedem Reaktionsansatz wurden 330 ng gepoolte polyklonale genomische DNS aus PBMC und das klonierte TCR- $\beta$ -R zugegeben. Die DNS wurde in einem Verhältnis von einer Genkopie des monoklonalen TCR- $\beta$ -R unter 5 Gesamtzellen (polyklonale, genomische DNS) eingesetzt. Das notwendige Volumen der TCR- $\beta$ -R-DNS-Lösung wurde mit Hilfe des spezifischen Gewichts des Plasmids und der Konzentration der Lösung berechnet. Die Sonde wurde in einer Konzentration von 100 nM zugegeben. Alle Reaktionen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt, zusätzlich wurde eine polyklonale Negativkontrolle in Dreifachbestimmung, so wie eine Wassernegativkontrolle mitgeführt.

Die optimale Primerkonzentration wurde durch den niedrigsten  $C_t$ -Wert bei fehlender unspezifischer Amplifikation definiert.

Die optimalen Konzentrationen wurden für 14 Primerpaare bestimmt. Diese waren im Mittel für die BW-Primer höher, als für die FW-Primer. So wurden die FW-Primer für 1 Probe mit einer Konzentration von 758 nM eingesetzt, bei 8 Proben mit 500 nM, 3 Proben mit 250 nM und 2 Proben mit 125 nM. Hingegen wurden die BW-Primer für 5 Proben mit einer Konzentration von 1000 nM eingesetzt, für weitere 5 Proben mit 758 nM, für 3 Proben mit 500 nM und für 1 Probe mit 250 nM (Tabelle 24).



**Tabelle 24: Optimale Primerkonzentrationen** der jeweiligen FW-Primer (K-FW (nM)) und BW-Primer (K-BW (nM)).

Patient	K-FW (nM)	K-BW (nM)
1	500	758
2	125	1000
3	500	758
4	758	758
5	500	1000
6	500	758
7	500	250
8	250	1000
9	500	500
10	250	500
11	500	1000
12	500	500
13	125	758
14	250	1000

### 3.3.3 MgCl<sub>2</sub> Konzentration

Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>) bzw. Mg<sup>2+</sup> im PCR-Ansatz ist als Reaktionskomponente der Polymerase für die Amplifikation notwendig. Zusätzlich beeinflusst die Konzentration von Mg<sup>2+</sup> die Primeranlagerung, die Stranglösung bei der Denaturierung, die Produktspezifität, die Bildung von Primerdimeren und die Fehlerrate der PCR. EDTA, das Tetraanion der Ethylendiamintetraessigsäure, bildet mit zweiwertigen Kationen Chelatkomplexe und mindert die Konzentration von Mg<sup>2+</sup> im Reaktionsansatz. Nach Aufreinigung und Fällung der DNS mit Hilfe EDTA-haltiger Puffer ist eine Restmenge an EDTA im Reaktionsansatz vorhanden. Um eine mögliche Effizienzsteigerung der PCR durch Zugabe von MgCl<sub>2</sub> zu untersuchen, wurde dieser Parameter repräsentativ für eine Probe von Patient 1 variiert.

Die Reaktion wurde unter Zugabe drei verschiedener Konzentrationen MgCl<sub>2</sub> (0 mM, 0,5 mM, 1 mM) für drei unterschiedliche Genkopienzahlen der klonierten TCR-β-R durchgeführt. Die Primerkonzentration wurde in der zuvor bestimmten optimalen Verdünnung gewählt, ebenso die zuvor ermittelte optimale Temperatureinstellung. Dem Reaktionsansatz wurden 6,6 ng polyklonale, genomische DNS zugegeben.

Eine bessere Effizienz der Reaktion wurde mit einem niedrigeren C<sub>t</sub>-Wert bei fehlender unspezifischer Amplifikation angenommen. Bei allen eingesetzten Kopienzahlen zeigte sich eine nur

geringfügige Änderung des  $C_t$ -Wertes durch die Zugabe von  $MgCl_2$  (Tabelle 25). Bei Einsatz der höchsten Kopienzahl lag der  $C_t$ -Wert unter Zusatz von  $1 \mu M MgCl_2$  0,17 Reaktionszyklen früher. In den weiteren Lösungen zeigte sich der Einfluss einer höheren  $Mg^{2+}$  Konzentration im Ansatz weniger deutlich: der  $C_t$ -Wert war jeweils um 0,04 Reaktionszyklen früher messbar. Insgesamt zeigte sich jedoch unter Zugabe von  $1 \mu M MgCl_2$  ein früheres Signal bei gleichbleibender Spezifität, weshalb weiteren Reaktionsansätzen  $1 \mu M MgCl_2$  beigefügt wurden.

**Tabelle 25: Variation der  $MgCl_2$ -Konzentration** R1, R2, R3 stellt die jeweiligen Kombinationen der eingesetzten Lösungen mit unterschiedlicher Kopienzahl der TCR- $\beta$ -R-Gensequenz unter der zugegebenen Menge an  $MgCl_2$  ( $0 \mu M$ ,  $0,5 \mu M$ ,  $1 \mu M$ ) dar. Bewertet wurden die Ergebnisse anhand des  $C_t$ -Wertes ( $C_t$ ) unter Berücksichtigung der Spezifität. Differenz der  $C_t$ -Werte ( $\Delta C_t$ ) ohne und mit Zugabe der höchsten Konzentration von  $MgCl_2$ .

R1	$C_t$	R2	$C_t$	R3	$C_t$	$\Delta C_t$
$10^1/0 \mu M$	36.21	$10^1/0,5 \mu M$	36.12	$10^1/1 \mu M$	36.04	0,17
$10^2/0 \mu M$	33.35	$10^2/0,5 \mu M$	33.46	$10^2/1 \mu M$	33.31	0,04
$10^3/0 \mu M$	30.71	$10^3/0,5 \mu M$	30.71	$10^3/1 \mu M$	30.67	0,04

### 3.3.4 Sondenkonzentration

Eine ausreichend hohe Sondenkonzentration ist Voraussetzung für die Nutzung des Reaktionspotentials der PCR, bei Übersteigerung eines Optimums kommt es zu Interaktionen mit anderen Reaktionskomponenten und Inhibition der PCR. Dieser Parameter wurde repräsentativ für eine Probe (Patient 5) variiert.

Der Reaktionsansatz zur Optimierung der Sondenkonzentration setzt sich aus den klonierten TCR- $\beta$ -R-Gensequenzen, gepoolter, polyklonaler DNS, den Primern in zuvor ermittelten optimalen Konzentrationen und der Sonde in vier verschiedenen Konzentrationen ( $25 \text{ nM}$ /  $50 \text{ nM}$ /  $75 \text{ nM}$ / $100 \text{ nM}$ ) zusammen. Zusätzlich wurden polyklonale Negativkontrollen und Wassernegativkontrollen in doppelter Bestimmung mitgeführt, hier wurde die höchste Sondenkonzentration ( $100 \text{ nM}$ ) eingesetzt.

Die Variation der Sondenkonzentration zeigte nur eine geringe Veränderung des detektierten  $C_t$ -Wertes (Tabelle 26). Auch bei höchster eingesetzter Sondenkonzentration ( $100 \text{ nM}$ ) zeigte sich erst spät eine unspezifische Amplifikation, so dass die höchste Konzentration ( $100 \text{ nM}$ ) bei folgenden PCR beibehalten wurde.

**Tabelle 26: Variation der Sondenkonzentration** Sondenkonzentration (nM) und Ct-Werte in Doppelbestimmung (Ct). Polyklonale DNS als Negativkontrolle (Poly-NK), Wassernegativkontrolle (Aqua-NK).

Probe	Sondenkonzentration (nM)	Ct
1	25	28.06
1	25	28.68
2	50	28.96
2	50	28.77
3	75	29.06
3	75	28.75
4	100	29.06
4	100	29.17
Poly-NK		>41

### 3.4 Sensitivität und quantifizierbare Bereiche

Die Sensitivität und der quantifizierbare Bereich wurden für alle 14 Patienten anhand einer Standardkurve definiert, welche durch die RT-Q-PCR einer Verdünnungsreihe mit bekannten Genkopienzahlen generiert wurde.

#### 3.4.1 Kriterien der Standardkurve

Um eine zuverlässige Quantifizierung zu gewährleisten, muss die RT-Q-PCR zur Generierung der Standardkurve mit ausreichender Effizienz und Reliabilität ablaufen. Zur Evaluation wurden folgende Kriterien definiert:

- Steigung der Standardkurve (*Slope*) zwischen  $S = -3,1$  und  $-3,9$ . Die Steigung bewertet die Effizienz der PCR.
- Regressionskoeffizient  $r \geq 0,98$ . Der Regressionskoeffizient ( $r$ ) ist das Maß der Linearität der Standardkurve. Bei einem Wert von  $r = 1$  liegt die Linearität der Standardkurve bei 100 %, die Amplifikation ist damit uneingeschränkt exponentiell.
- Mindestens 3 Verdünnungsstufen der Standardkurve.

Der Fehler der Reaktion entspricht einer Abweichung der Einzelwerte von der Standardkurve. Ein Wert von 0,6 bedeutet eine Abweichung von 50%. Der Fehler sollte möglichst gering sein, wurde jedoch nicht als festes Kriterium definiert.

### 3.4.2 Sensitivität und quantifizierbarer Bereich

Van der Velden et al. entwickelten 2007 Leitlinien zur Interpretation von Ergebnissen der RT-Q-PCR (van der Velden et al., 2007). Diese Leitlinien wurden zur Definition der Sensitivität und des quantifizierbaren Bereichs der klonspezifischen RT-Q-PCR angewandt.

Die Sensitivität ist als der Bereich definiert, in welchem die niedrigste Verdünnungsstufe detektierbar ist. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in den Doppelbestimmungen ist keine Bedingung.

Zusammenfassend lassen sich folgende Kriterien aufführen:

- Spezifische Amplifikation.
- Mindestens eine der Doppelbestimmungen positiv.
- Diejenige Verdünnungsstufe deren niedrigster  $C_t$ -Wert mindestens 1 PCR-Zyklus vor dem Hintergrundsignal bzw. der polyklonalen Negativkontrolle liegt.

Der quantifizierbare Bereich ist definiert als der Bereich, in welchem reproduzierbare Ergebnisse generiert werden können.

Folgende Kriterien müssen erfüllt sein:

- Spezifische Amplifikation.
- Differenz der  $C_t$ -Werte der Mehrfachbestimmungen weniger als 1,5 Zyklen.
- Der  $C_t$ -Wert der höchsten Verdünnungsstufe, welche die Grenze des quantifizierbaren Bereiches definiert, muss mindestens 3 Zyklen vor dem Hintergrundsignal bzw. dem der polyklonalen Negativkontrolle liegen.

Die Sensitivität und der quantifizierbare Bereich der klonspezifischen RT-Q-PCR für alle 14 Patienten sind in Tabelle 27 dargestellt.

**Tabelle 27: Sensitivität und Quantifizierbare Bereiche** Steigung der Standardkurve (Slope), Fehler der Reaktion, die Linearität der Standardkurve (*regression coefficient* oder Regressionskoeffizient), die erreichte Sensitivität (Sens.) und der quantifizierbare Bereich (Quant.) für alle 14 Patienten. Der Wert der Sensitivität bzw. des quantifizierbaren Bereichs entspricht jeweils der Gesamtzellzahl unter der eine Kopie des TCR-β-R nachweisbar ist. Log bezeichnet, wie viele Verdünnungsstufen zur Generierung der Standardkurve einbezogen werden konnten.

Patient	1	2	3	4	5	6	7
Steigung	3.803	3.965	3.230	3.566	3.344	3.177	3.421
Fehler	0.318	0.406	0.142	0.180	0.121	0.253	0.116
Linearität	0.99	0.97	0.99	0.99	1.00	0.98	1.00
<b>Sens.</b>	<b>10<sup>5</sup></b>	<b>10<sup>2</sup></b>	<b>10<sup>5</sup></b>	<b>10<sup>5</sup></b>	<b>10<sup>3</sup></b>	<b>10<sup>5</sup></b>	<b>10<sup>4</sup></b>
<b>Quant.</b>	<b>10<sup>5</sup></b>	<b>10<sup>1</sup></b>	<b>10<sup>3</sup></b>	<b>10<sup>4</sup></b>	<b>10<sup>3</sup></b>	<b>10<sup>3</sup></b>	<b>10<sup>2</sup></b>
Log	6	5	5	6	6	6	5

Patient	8	9	10	11	12	13	14
Steigung	3.277	3.178	3.429	3.792	3.451	3.389	1.646
Fehler	0.0602	0.113	0.0990	0.232	0.239	0.0704	0.212
Linearität	1.00	1.00	1.00	0.98	0.99	1.00	0.90
<b>Sens.</b>	<b>10<sup>3</sup></b>	<b>10<sup>4</sup></b>	<b>10<sup>4</sup></b>	<b>10<sup>3</sup></b>	<b>10<sup>5</sup></b>	<b>10<sup>3</sup></b>	<b>10<sup>3</sup></b>
<b>Quant.</b>	<b>10<sup>2</sup></b>	<b>10<sup>3</sup></b>	<b>10<sup>3</sup></b>	<b>10<sup>2</sup></b>	<b>10<sup>3</sup></b>	<b>10<sup>2</sup></b>	<b>1</b>
Log	4	5	4	3	6	4	3

Bei einem Patienten (Patient14) konnten die Kriterien zur Generierung der Standardkurve, nicht eingehalten werden, so dass eine korrekte Bestimmung der Sensitivität, so wie des quantifizierbaren Bereichs nicht möglich war. Bei Verwendung der Probe von Patient 14 war keine ausreichende Effizienz der PCR zu erreichen. Bei einer Steigung der Standardkurve von  $S = 1.646$ , betrug die Effizienz lediglich  $E = 30,5\%$ . Ebenso war die Linearität der Standardkurve mit einem Regressionskoeffizienten von maximal  $r = 0.90$  zu gering, um vorgegebene Kriterien zu erfüllen. Für die weiteren 13 Proben konnten Standardkurven unter definierten Kriterien erstellt werden.

Die Sensitivität lag bei fünf Proben bei einer Nachweisbarkeit einer Genkopie des monoklonalen Rearrangements unter  $10^5$  Zellen insgesamt, bei drei Proben bei einer Nachweisbarkeit einer Genkopie des monoklonalen Rearrangements unter  $10^4$  Zellen und bei fünf Proben bei einer Kopie unter  $10^3$  Zellen im Ansatz. Eine Probe erreichte lediglich eine Sensitivität von einer Genkopie des monoklonalen Rearrangements unter  $10^2$  Zellen. Gründe für eine geringere Sensitivität war eine frühe unspezifische Amplifikation.

Die quantifizierbaren Bereiche wurden nach oben genannten Kriterien bestimmt. Diese lagen für eine Probe bei einer Kopie des monoklonalen Rearrangements unter  $10^5$  Zellen im Ansatz, für eine Probe bei einer Kopie unter  $10^4$  Zellen insgesamt, für sechs Proben bei einer Kopie unter  $10^3$  Zellen und für vier Proben bei einer Nachweisbarkeit einer Zelle unter  $10^2$  Zellen. Bei zwei Proben erfüllte die Standardreihe zur Definition des quantifizierbaren Bereichs die Kriterien lediglich bis zu einer Verdünnungsstufe von einer Kopie des monoklonalen Rearrangements unter  $10^1$  Zellen bzw. eine Zelle. Gründe für einen geringen Bereich, in welchem eine zuverlässige Quantifizierung möglich ist, waren eine unspezifische Amplifikation, so wie eine schlechte Reproduzierbarkeit der Doppelbestimmungen.

### **3.4.3 Eigenschaften der N-D-N-Regionen und Sensitivität**

Nach Charakterisierung der N-D-N-Regionen, Generierung N-D-N-spezifischer Primer und Bestimmung der Sensitivität, wurden die Ergebnisse bezüglich einer möglichen Korrelation analysiert. Zur Darstellung wurden die folgenden Eigenschaften der N-D-N-Regionen mit der erreichten Sensitivität der klonspezifischen RT-Q-PCR verglichen: Insertionen, Deletionen, Länge der Gensegmente und der Gehalt der Basen Guanin und Cytosin (GC-Gehalt %) (Tabelle 28 und 29).

**Tabelle 28: N-D-N-Region und Sensitivität** Sensitivität (Sens.) unter Angabe der Gesamtzahl im Ansatz unter welcher die Detektion einer Genkopie des monoklonalen TCR- $\beta$ -R möglich ist für jeden Patienten (P), Deletionen am 3'-Ende des V $\beta$ -Segments (V3'Del), Insertionen (N1 und N2), Deletionen am 5'-Ende des D $\beta$ -Segments (D5'del), Länge des D $\beta$ -Segments (D $\beta$ ), Deletionen am 3'-Ende des D $\beta$ -Segments (D3'del), Anzahl der Deletionen am 5'-Ende des J $\beta$ -Segments (J5'del) und Gesamtlänge der N-D-N-Regionen bzw. errechneter Mittelwert der Gesamtlänge der N-D-N-Regionen (NDN und MW<sub>NDN</sub>).

P	Sens.	V3'Del	N1	D5'del	D $\beta$	D3'del	N2	J5'del	NDN	MW <sub>NDN</sub>
1	10 <sup>-5</sup>	4	5	4	10	2	4	9	19	12,8
3	10 <sup>-5</sup>	1	0	5	11	1	6	0	12	
4	10 <sup>-5</sup>	6	4	1	9	2	0	4	13	
6	10 <sup>-5</sup>	0	6	4	4	8	0	6	10	
12	10 <sup>-5</sup>	0	0	1	7	4	3	0	10	
7	10 <sup>-4</sup>	5	4	1	8	3	2	0	14	10,3
9	10 <sup>-4</sup>	0	3	0	0	0	0	4	3	
10	10 <sup>-4</sup>	4	4	1	8	3	2	5	14	
5	10 <sup>-3</sup>	1	8	4	10	2	6	8	24	16,4
8	10 <sup>-3</sup>	5	3	6	8	2	0	6	11	
11	10 <sup>-3</sup>	1	2	4	5	3	0	4	7	
13	10 <sup>-3</sup>	5	8	0	8	0	0	9	16	
14	10 <sup>-3</sup>	8	13	8	8	0	3	4	24	
2	10 <sup>-2</sup>	2	2	4	3	5	0	0	5	5

Nach statistischer Auswertung mit Hilfe der Analyse nach Pearson, zeigt keine signifikante Korrelation ( $P = 0.450$ ; Korrelation = 0.037) sich zwischen der Länge der N-D-N-Region und der erreichten Sensitivität.

**Tabelle 29: Gensegmente, GC-Gehalt und Sensitivität** Erreichte Sensitivität (Sens.) in Korrelationen zu den Genfamilien entsprechend der IMGT Nomenklatur (Folch et al., 2000) (V $\beta$  (Bp), D $\beta$  (Bp), J $\beta$  (Bp)) und dem prozentualen Anteil der Basen Guanin und Cytosin (GC (%)) der N-D-N-Regionen.

Patient	Sens. (n)	V $\beta$ (Bp)	D $\beta$ (Bp)	J $\beta$ (Bp)	GC (%)	MW <sub>GC (%)</sub>
1	10 <sup>-5</sup>	3-1	2	2-4	55,6	55,2
3	10 <sup>-5</sup>	18	2	2-2	62,2	
4	10 <sup>-5</sup>	6-6	1	1-4	51,2	
6	10 <sup>-5</sup>	5-4	2	2-1	57,1	
12	10 <sup>-5</sup>	5-4	1	1-3	50	
7	10 <sup>-4</sup>	19	1	1-6	52,9	56,2
9	10 <sup>-4</sup>	5-6		1-1	51,4	
10	10 <sup>-4</sup>	3-1	1	1-2	64,3	
5	10 <sup>-3</sup>	4-2	2	2-1	59,3	61,12
8	10 <sup>-3</sup>	11-3	2	2-1	57,9	
11	10 <sup>-3</sup>	12-3	1	1-1	53,8	
13	10 <sup>-3</sup>	6-5		1-6	77,8	
14	10 <sup>-3</sup>	27	2	2-7	56,8	
2	10 <sup>-2</sup>	6-6	1	2-1	50	50

Eine Korrelation zwischen der erreichten Sensitivität und den vorliegenden Gensegmente nach IMGT Nomenklatur (Folch et al., 2000) konnte nicht gezeigt werden. Das Ergebnis ist aufgrund der geringen Probenzahl und der relativ großen Zahl verschiedener V $\beta$ -Segmente nicht repräsentativ und müsste in einem größeren Kollektiv evaluiert werden. Für jede Gruppe wurde der mittlere GC-Gehalt berechnet. Dieser lag bei einer Nachweisbarkeit einer Genkopie unter  $10^5$  Zellen bei 55,22 %, in der Gruppe mit einer Nachweisbarkeit von einer Genkopie unter  $10^4$  Zellen mit 56,20 % etwas höher, bei einer Nachweisbarkeit einer Genkopie unter  $10^3$  bei 61,12 % (n= 5). Damit zeigt sich ein tendenziell geringerer GC-Gehalt bei höherer Sensitivität. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang besteht nicht (P= 0,464; Korrelation= -0,213). Den geringsten GC-Gehalt, 50 % (n= 1) weist die Probe von Patient 2 auf. Hier ist die Sensitivität mit der Nachweisbarkeit einer Genkopie des monoklonalen TCR- $\beta$ -R unter  $10^2$  Gesamtzellen am geringsten.

#### **3.4.4 Primerbindungsstellen und Sensitivität der PCR**

Zur Analyse eines Zusammenhangs zwischen der erreichten Sensitivität und der Hybridisierung des Primerendes innerhalb der N-D-N-Region, wurde die Anzahl der Basenpaare der N-D-N-Region, welche den Primer binden, ausgezählt und als absolute Hybridisierungszahl (*Hybrid absolut n (Bp)*) definiert. Zusätzlich wurde die relative Hybridisierungszahl (*Hybrid relativ n (Bp)*) bzw. der prozentuale Anteil des Primers, welcher mit der N-D-N-Region in Bindung geht errechnet (Tabelle 30).

Insgesamt zeigt sich, je größer der Anteil des Primers ist, welcher innerhalb der N-D-N-Region hybridisiert, desto höher war die erreichte Sensitivität. Bei fünf Proben konnte eine Nachweisbarkeit einer Genkopie des TCR- $\beta$ -R unter  $10^5$  Zellen insgesamt erreicht werden. Die absolute Hybridisierungszahl beträgt in dieser Gruppe im Mittel 12,6 Bp, die relative Hybridisierungszahl 67 %. Bei drei Proben wurde eine Sensitivität von einer Genkopie unter  $10^4$  Zellen im Reaktionsansatz erreicht. Hier lagen die relative Hybridisierungszahl mit 51 % und die absolute Hybridisierungszahl mit 9,6 Bp geringer. In der Gruppe von fünf Proben, bei welcher eine Nachweisbarkeit einer Genkopie des TCR- $\beta$ -R unter  $10^3$  Gesamtzellen erreicht wurde, nahmen die relative Hybridisierungszahl mit 45 % und die absolute Hybridisierungszahl mit 8,8 Bp weiter ab. Bei Patient 2, wurde lediglich eine Nachweisbarkeit von einer Genkopie unter  $10^2$  erreicht, diese wurde aus zuvor vergleichenden Aussagen ausgenommen. Hier umfasst die relative Hybridisierungszahl 25 % und die absolute Hybridisierungszahl 5 Bp.

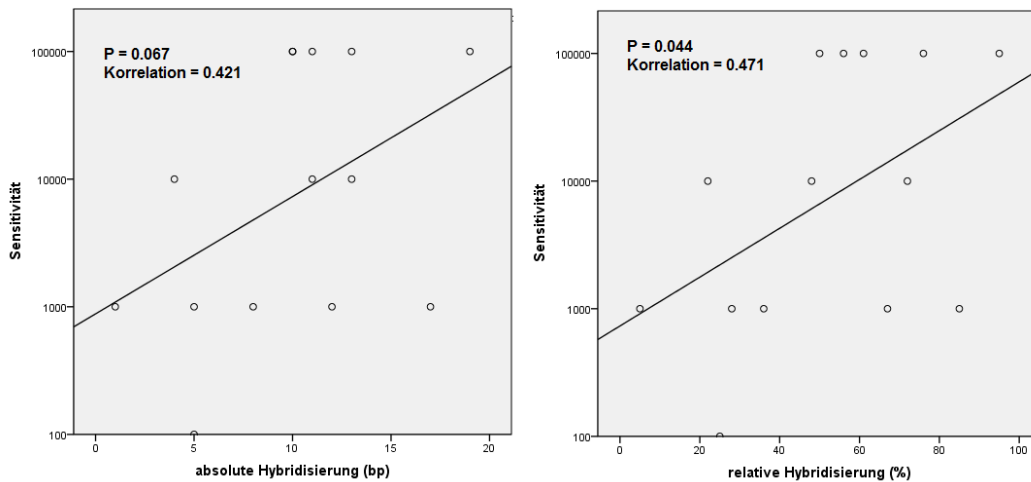


Bezüglich der Bindungslokalisation des 3'-Endes des J $\beta$ -Primers innerhalb der N-D-N-Region (*3'-Ende Primer Ja/Nein*) und der Anzahl der Basenpaare des Primers, welche außerhalb der N-D-N-Region hybridisieren (*J $\beta$  n (Bp)*) lässt sich kein Trend bezüglich der erreichten Sensitivität ablesen. Die Gruppe, bei welcher die letzte Base der klonspezifischen Primer innerhalb der N-D-N-Region hybridisiert (*3'-Ende Primer Ja*), umfasst fünf Patientenproben (Patient 1, 3, 5, 8, 11). Hier wurde eine durchschnittliche Nachweisbarkeit einer Genkopie des TCR- $\beta$ -R unter  $4,06 \times 10^4$  Gesamtzellen erreicht. In der Gruppe der Proben, bei welcher die letzte Base außerhalb der N-D-N-Region hybridisiert (*3'-Ende Nein*) (Patient 4, 6, 12, 7, 9, 10, 13, 14, 2), lag die Nachweisbarkeit einer Genkopie des TCR- $\beta$ -R bei durchschnittlich  $3,69 \times 10^4$  Gesamtzellen.

**Tabelle 30: Hybridisierungsbereiche N-D-N-spezifischer Primer und Sensitivität** Erreichte Sensitivitäten (Sens.) für alle Patienten (P). Die Sensitivität (Sens.) ist an der Gesamtzellzahl unter welcher eine Genkopie des monoklonalen TCR- $\beta$ -R detektierbar ist gemessen. Jeweils absolute Hybridisierungszahl (Hybrid absolut (n (Bp))) und die relative Hybridisierungszahl (Hybrid relativ (%)). 3'-Ende Primer bezeichnet, ob die Bindung des 3'-Endes des Primers innerhalb (Ja) oder außerhalb (Nein) der N-D-N-Region liegt. Bei Bindung des 3'-Endes außerhalb der N-D-N-Region ist die Anzahl der hybridisierenden Basen innerhalb der J $\beta$ -Region (J $\beta$  n (Bp)) angegeben. Zusätzlich wurden die jeweiligen Mittelwerte errechnet (MW Hybrid. (Bp) und MW J $\beta$  n(Bp)).

P	Sens.	Hybrid (n (Bp))		3'-Ende Primer		MW Hybrid (n (Bp))		3'-Ende Primer	
		absolut	relativ (%)	Ja/nein	J $\beta$ n(Bp))	absolut	relativ (%)	Ja/nein	MW J $\beta$ n(Bp))
1	$10^{-5}$	19	95	Ja		12,6	67	Ja: 2	4,6
3	$10^{-5}$	11	61	Ja				Nein: 3	
4	$10^{-5}$	13	76	Nein	2				
6	$10^{-5}$	10	55	Nein	2				
12	$10^{-5}$	10	50	Nein	10				
7	$10^{-4}$	12	52	Nein	12	9,6	51	Ja: 0	8
9	$10^{-4}$	4	22	Nein	7			Nein:3	
10	$10^{-4}$	13	78	Nein	5				
5	$10^{-3}$	12	67	Ja		8,8	45	Ja: 3	4,5
8	$10^{-3}$	5	28	Ja				Nein: 2	
11	$10^{-3}$	1	5	Ja					
13	$10^{-3}$	8	36	Nein	6				
14	$10^{-3}$	18	90	Nein	3				
2	$10^{-2}$	5	25	Nein	5	5	25	Nein: 1	5

Zur statistischen Auswertung wurde eine Analyse nach Pearson durchgeführt. Hiernach ergibt sich eine signifikante Korrelation zwischen der erreichten Sensitivität und der relativen Hybridisierungszahl ( $P = 0.044$ ; Korrelation = 0.471). Hingegen besteht keine signifikante Korrelation zwischen der erreichten Sensitivität und der absoluten Hybridisierungszahl ( $P = 0.067$ ; Korrelation = 0.421) (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Graphische Darstellung der Korrelation zwischen der erreichten Sensitivität und den Hybridisierungszahlen** In den Grafiken sind jeweils die Hybridisierungszahlen (absolute Hybridisierung (bp) linke Seite; relative Hybridisierung (%) rechte Seite) auf der x-Achse gegen die erreichte Sensitivität auf der y-Achse aufgetragen. Der P-Wert entspricht der Steigung der resultierenden Geraden und ist Maß einer statistischen Signifikanz; Korrelation.

Nach Auswertung durch den Man-U-Whitney-Test ergibt sich kein signifikanter Unterschied der erreichten Sensitivität zwischen der Gruppe in welcher das 3'-Ende innerhalb und in welcher das 3'-Ende außerhalb der N-D-N-Region bindet ( $P = 0.833$ ).

### 3.5 Quantifizierungen

Ziel war die Quantifizierung der Tumorzellen in den Proben von drei Patienten (Patient 1, 4 und 14), die im Verlauf der Erkrankung zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen wurden. Für zwei Patienten (Patient 1 und 4) wurde die Quantifizierung unter zuvor optimierten Bedingungen mit den klonspezifischen Primern durchgeführt. Bei einem Patienten (Patient 14) konnte die Quantifizierung nicht durchgeführt werden, da trotz Optimierung der PCR Bedingungen und

Testung mehrerer Primerpaare, die Sensitivität und die Effizienz der Reaktion zu gering waren, um die Kriterien zur zuverlässigen Quantifizierung zu erfüllen.

Folgend sind die Ergebnisse der Quantifizierungsläufe dargestellt. Die Proben von Patient 1 wurden in einem Zeitraum von drei Monaten und für Patient 4 in einem Zeitraum von elf Monaten gewonnen. Die Proben von Patient 4 wurden, zur Evaluation der Reproduzierbarkeit der Reaktionsergebnisse, in einem unabhängigen Ansatz doppelt bestimmt.

### 3.5.1 Bestimmung der absoluten Tumorzellzahl

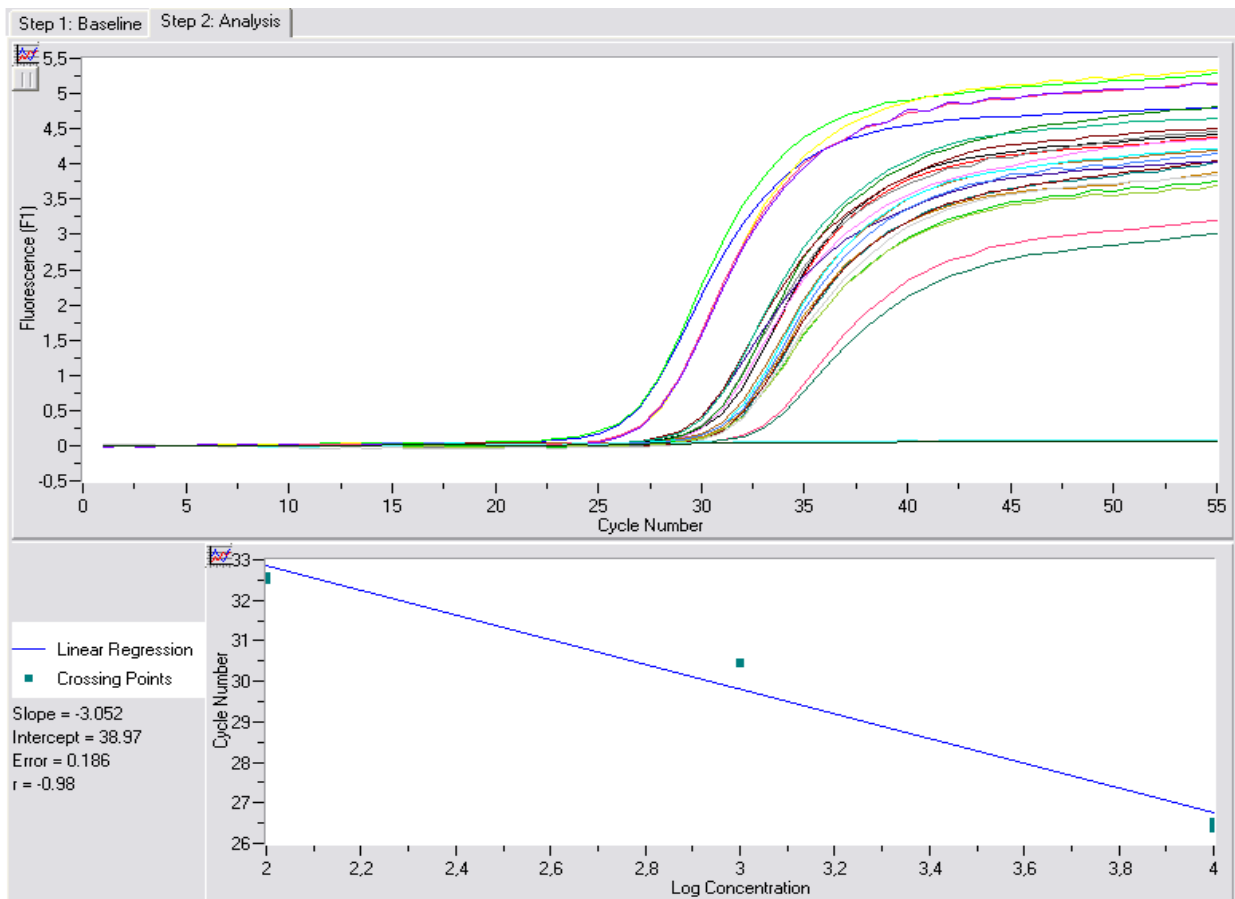
Zur Bestimmung der absoluten Tumorzellzahl, wurde eine RT-Q-PCR mit klonspezifischen Primern durchgeführt. Bei fehlender unspezifischer Amplifikation wird ausschließlich genetisches Material von Zellen, die das klonale TCR- $\beta$ -R aufweisen, amplifiziert. Die Quantifizierungsergebnisse entsprechen der absoluten Tumorzellzahl im Reaktionsansatz (Tabelle 31).

**Tabelle 31: Absolute Tumorzellzahlen** (Zellzahl (n)) in sechs Proben von Patient 1 (P1) und 12 Proben von Patient 4 (P4). Standardabweichung der Tumorzellzahl von der Standardkurve als Absolutwert (SD (n)), der prozentuale Anteil der Standardabweichung von der absoluten Tumorzellzahl (SD (%)), Ct-Wert ( $C_t$ ).

P 1	Zellzahl (n)	SD (n)	SD (%)	$C_t$	P 4	Zellzahl (n)	SD (n)	SD (%)	$C_t$
1	4,23 <sup>+02</sup>	2,214 <sup>+01</sup>	5,24%	30.96	1	3,622 <sup>+03</sup>	1,884 <sup>+03</sup>	52	27.84
2	3,87 <sup>+02</sup>	6,600	1,71%	31.07	2	6,834 <sup>+02</sup>	2,718 <sup>+01</sup>	4	30.11
3	6,49 <sup>+03</sup>	4,790 <sup>+02</sup>	7,38%	27.34	3	1,510 <sup>+01</sup>	5,474	36,2	35.12
4	1,41 <sup>+03</sup>	2,000 <sup>+02</sup>	14,23%	29.37	4	2,644 <sup>+01</sup>	8,116	30,7	34.53
5	4,62 <sup>+02</sup>	4,322 <sup>+01</sup>	9,36%	30.84	5	2,529 <sup>+02</sup>	4,222 <sup>+01</sup>	16,7	31.46
6	9,39 <sup>+02</sup>	5,390 <sup>+01</sup>	5,74%	29.90	6	1,841 <sup>+01</sup>	1,164 <sup>+01</sup>	62,5	35.10
					7	6,181 <sup>+02</sup>	5,699 <sup>+01</sup>	9,3	30.09
					8	2,002 <sup>+03</sup>	1,371 <sup>+02</sup>	6,8	28.67
					9	5,905 <sup>+01</sup>	4,406	7,7	33.40
					10	1,338	2,640 <sup>-01</sup>	5	38.33
					11	2,822 <sup>+01</sup>	4,300	15,24	34.80
					12	4,439	2,584	58,13	37.70

Die Anzahl der Tumorzellen in den Proben von Patient 1 variiert zwischen  $3,87^{+02}$  und  $6,49^{+03}$ . Die Standardabweichung der Ergebnisse liegt im Mittel bei 7,27% (Minimalwert: 1,71%; Maximalwert: 14,23%) (Abbildung 11).

Die Tumorzellzahl in den Proben von Patient 4 liegt zwischen 1,338 und  $3,622^{+03}$ . Die Standardabweichung ist im Mittel bei 25% (Minimalwert: 4%, Maximalwert: 62,5%).



**Abbildung 11: Quantifizierung Patient 1** Quantifizierungsergebnisse der klonspezifischen RT-Q-PCR von Patient 1. Oberer Bildhälfte zeigt die Intensität des Fluoreszenzsignals (Fluorescence (F1)) auf der y-Achse zum jeweiligen Reaktionszyklus (Cycle number). In unterer Bildhälfte ist die Standardkurve gezeigt, welche sich durch Auftragen der Ct-Werte auf der y-Achse (Cycle number) gegen die Verdünnungsstufen auf der x-Achse (Log Concentration) ergibt. Neben der graphischen Darstellung sind die Kriterien der Standardkurve aufgeführt: die Steigung (Slope) beträgt -3.052, die theoretische Menge an DNS im Ansatz zum Zyklus 1 der PCR (Intercept) 38.97, der Fehler (Error) 0.186 und die Linearität (r, regression coefficient) 0.98.

Bezüglich der absoluten Tumorzellzahl zeigt die Doppelbestimmung in beiden Proben nur geringe Abweichungen, sie beträgt weniger als eine Zehnerpotenz (Tabelle 32).

**Tabelle 32: Doppelbestimmung der absoluten Tumorzellzahl Patient 4** Doppelbestimmung der absoluten Tumorzellzahl von Patient 4. Differenz ( $\Delta$ ) der jeweiligen Werte der Doppelbestimmungen.

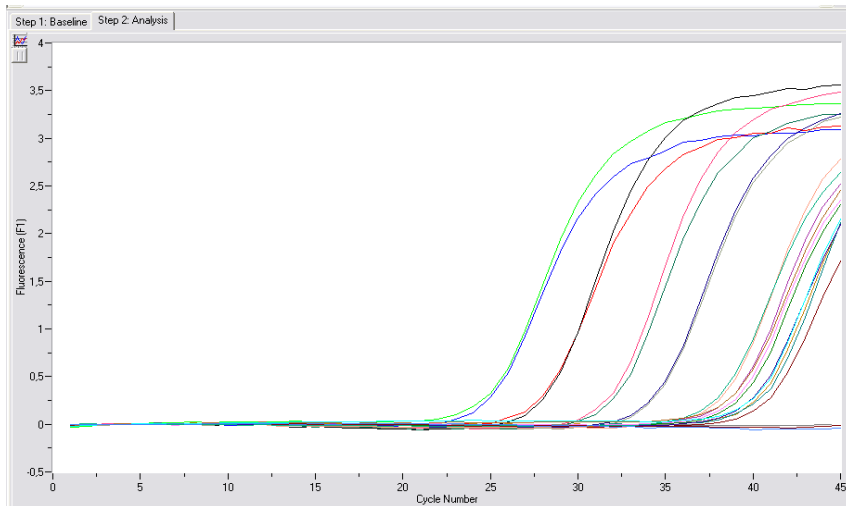
Probe	Zellzahl (n)	SD (n)	SD (%)	C <sub>t</sub>	Probe	Zellzahl (n)	SD (n)	SD (%)	C <sub>t</sub>
2.1	6,834 <sup>+02</sup>	2,718 <sup>+01</sup>	4	30,11	5.1	2,529 <sup>+02</sup>	4,222 <sup>+01</sup>	16,7	31,46
2.2	8,570 <sup>+02</sup>	5,391 <sup>+01</sup>	6,29	29,83	5.2	3,706 <sup>+02</sup>	2,394 <sup>+01</sup>	6,46	31,05
$\Delta_{2.1-2.1}$	<b>1,736</b>	<b>2,673</b>	<b>2,29</b>	<b>-0,28</b>	$\Delta_{5.1-5.2}$	<b>1,177</b>	<b>-1,828</b>	<b>-10,24</b>	<b>-0,41</b>

### 3.5.2 Quantifizierung der Gesamtzellzahl

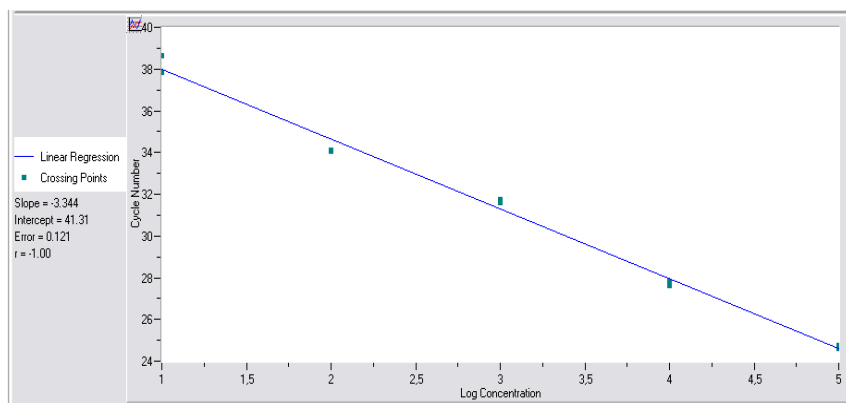
Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde eine RT-Q-PCR unter Verwendung  $\beta$ -Aktin (ACTB) spezifischer Primer durchgeführt. Bei dieser Reaktion wird genetisches Material aller Zellen, die im Ansatz vorhanden sind amplifiziert. Das Ergebnis entspricht der Gesamtzahl der im Ansatz vorhandenen amplifizierten Genkopien (Tabelle 33) (Abbildungen 12 und 13).

**Tabelle 33:  $\beta$ -Aktin-spezifische RT-Q-PCR** für sechs Proben von Patient 1 (P1) und 12 Proben von Patient 4 (P4). Absolute Anzahl der Zellen im Ansatz (Zellzahl (n)), Standardabweichung der Zellzahl von der Standardkurve als Absolutwert (SD (n)), der prozentuale Anteil der Standardabweichung von der absoluten Zellzahl (SD (%)) und Ct-Wert (C<sub>t</sub>).

P 1	Zellzahl (n)	SD (n)	SD (%)	C <sub>t</sub>	P 4	Zellzahl (n)	SD (n)	SD (%)	C <sub>t</sub>
1	5,80 <sup>+01</sup>	7,043	12,1	30,37	1	4,315 <sup>+03</sup>	6,759 <sup>+01</sup>	1,6	23,83
2	2,48 <sup>+02</sup>	9,800	3,95	28,16	2	1,038 <sup>+03</sup>	1,138 <sup>+02</sup>	11	26,00
3	3,90 <sup>+03</sup>	5,400 <sup>+01</sup>	1,6	23,98	3	1,499 <sup>+02</sup>	3,892 <sup>+01</sup>	25,9	28,89
4	2,64 <sup>+03</sup>	4,800 <sup>+01</sup>	1,81	24,57	4	2,253 <sup>+02</sup>	3,319	1,5	28,29
5	3,54 <sup>+03</sup>	6,300 <sup>+01</sup>	1,8	24,13	5	1,085 <sup>+03</sup>	1,089 <sup>+02</sup>	10	25,93
6	1,30 <sup>+03</sup>	9,900	0,76	25,64	6	3,704 <sup>+02</sup>	1,456 <sup>+02</sup>	39,4	27,50
					7	1,878 <sup>+03</sup>	2,213 <sup>+02</sup>	11,8	25,080
					8	4,252 <sup>+03</sup>	2,530 <sup>+02</sup>	6	23,87
					9	3,798 <sup>+03</sup>	1,791 <sup>+02</sup>	4,7	24,00
					10	1,854 <sup>+02</sup>	1,717 <sup>+01</sup>	9,3	28,59
					11	5,208 <sup>+03</sup>	3,594 <sup>+02</sup>	6,9	23,44
					12	2,192 <sup>+04</sup>	5,214 <sup>+02</sup>	2,38	21,18



**Abbildung 12: Ergebnisse der Quantifizierung der Verdünnungsreihe zur Generierung der Standardkurve.** Die Intensität des Fluoreszenzsignals (Fluorescence (F1)) ist auf der y-Achse zum jeweiligen Reaktionszyklus (Cycle number) für alle Verdünnungsstufen, so wie die Negativkontrollen aufgetragen.



**Abbildung 13: Standardkurve der RT-Q-PCR** unter Verwendung ACTB-spezifischer Primer, welche sich durch Auftragen der Ct-Werte auf der y-Achse (Cycle number) gegen die einbezogenen Verdünnungsstufen zur Generierung auf der x-Achse (Log Concentration) ergibt. Steigung (Slope) -3.344, theoretische Menge an DNS im Ansatz zum Zyklus 1 der PCR (Intercept) 41.31, Fehler (Error) 0.121, Linearität (r, regression coefficient) 1.00.

Die Werte der amplifizierten Genomäquivalente in den Proben von Patient 1 zeigen eine Variation von maximal  $3,842^{+01}$  (Minimalwert:  $5,80^{+01}$ ; Maximalwert:  $3,90^{+03}$ ). Die Standardabweichung beträgt im Mittel 3,67%. Die Ergebnisse der Proben von Patient 4 weisen mit einer maximalen Differenz von  $6,92^{+02}$  deutlichere Schwankungen auf (Minimalwert:  $1,499^{+02}$ ; Maximalwert:  $2,192^{+04}$ ). Die Standardabweichung beträgt im Mittel 10,9%.

Die Doppelbestimmung der ersten Probe zeigt eine Abweichung von  $8,248^{+01}$  Zellen. Die Doppelbestimmung der zweiten Probe weist eine geringere Abweichung von  $0,275^{+01}$  Zellen auf (Tabelle 34).

**Tabelle 34: Doppelbestimmung  $\beta$ -Aktin-spezifische RT-Q-PCR** von 2 Proben von Patient 4 der  $\beta$ -Aktin-spezifischen RT-Q-PCR. Zellzahl (n), Absolutwert der Standardabweichung (SD (n)), relative Standardabweichung (SD (%)),  $C_t$ -Wert.

Probe	Zellzahl (n)	SD (n)	SD (%)	$C_t$	Probe	Zellzahl (n)	SD (n)	SD (%)	$C_t$
2.1	$1,038^{+03}$	$1,138^{+02}$	11	26,00	5.1	$1,085^{+03}$	$1,089^{+02}$	10	25,93
2.2	$9,286^{+02}$	$2,296^{+01}$	2,47	26,14	5.2	$1,360^{+04}$	$3,437^{+02}$	2,53	21,93
$\Delta_{2.1-2.2}$	<b><math>8,248^{+01}</math></b>	<b><math>1,158^{-01}</math></b>	<b>8,53</b>	<b>0,14</b>	$\Delta_{5.1-5.2}$	<b><math>0,275^{+01}</math></b>	<b>2,258</b>	<b>-7,47</b>	<b>-4,00</b>

### 3.5.3 Kalkulation der relativen Tumorzellzahl

Die relative Tumorzellzahl bzw. der Anteil an Tumorzellen an der Gesamtzellzahl wurde aus dem Quotienten der Gesamtzellzahl (G) und der absoluten Tumorzellzahl (T) errechnet (Tabelle 35).

**Tabelle 35: Kalkulierte relative Tumorzellzahlen (T/G (%))** aus dem Quotient der absoluten Tumorzellzahl (T) und der Gesamtzellzahl (G) für Patient 1 (P1) und Patient 4 (P4).

P 1	G	T	T/G (%)	P 4	G	T	T/G (%)
1	$5,80^{+01}$	$4,228^{+02}$	729,00%	1	$4,32^{+03}$	$3,622^{+03}$	84,03
2	$1,30^{+03}$	$9,39^{+02}$	72,10%	2	$1,03^{+03}$	$6,834^{+02}$	65,80
3	$2,64^{+03}$	$1,41^{+03}$	53,20%	3	$1,49^{+02}$	$1,510^{+01}$	10,10
4	$3,54^{+03}$	$4,62^{+02}$	13,10%	4	$2,25^{+02}$	$2,644^{+01}$	11,74
5	$3,90^{+03}$	$6,49^{+03}$	166,40%	5	$1,08^{+03}$	$2,529^{+02}$	23,31
6	$2,48^{+02}$	$3,87^{+02}$	155,80%	6	$3,70^{+02}$	$1,841^{+01}$	4,97
				7	$1,88^{+03}$	$6,181^{+02}$	32,89
				8	$4,25^{+03}$	$2,002^{+03}$	47,17
				9	$3,79^{+03}$	$5,905^{+01}$	64,30
				10	$1,85^{+02}$	1,338	0,72
				11	$5,21^{+03}$	$2,820^{+01}$	0,54
				12	$2,19^{+04}$	4,440	0,02

Bei Errechnung der relativen Tumorzellzahl aus den Bestimmungen der Quantifizierungsläufe der Proben von Patient 1, ergeben sich mehrfach Werte über 100 %, d.h. der errechnete Anteil der Tumorzellen übersteigt die Gesamtzahl der in der Probe vorhandenen Zellen, mit einem Maximalwert von 729%. Diese Werte sind theoretisch nicht möglich und müssen durch eine Fehlbestimmung verursacht sein. Die kalkulierten relativen Tumorzellzahlen in den Proben von Patient 4 liegen alle unter 100%. Insgesamt ergeben sich ein Maximalwert von 84,03% und ein Minimalwert von 0,02%. Die Doppelbestimmungen der relativen Tumorzellzahlen sind mit Werten von 20,5% und 26,5% deutlich abweichend (Tabelle 36). Wird die Differenz der Doppelbestimmungen der Werte für die Gesamtzellzahl und der Tumorzellzahl isoliert betrachtet zeigt sich, dass die Differenzen der Doppelbestimmungen der Gesamtzellzahl höher sind (Minimalwert  $0,28^{+01}$  Zellen, Maximalwert  $8,26^{+01}$  Zellen), als die der absoluten Tumorzellzahl (Minimalwert 1,181 Zellen, Maximalwert 1,736 Zellen).

**Tabelle 36: Doppelbestimmung der relativen Tumorzellzahl von Patient 4** Gesamtzellzahl (G); absolute Tumorzellzahl (T); kalkulierte, relative Tumorzellzahl (T/G (%)); Differenz der jeweiligen Doppelbestimmungen ( $\Delta$ ).

Probe	G	T	T/G (%)	Probe	G	T	T/G (%)
2.1	1,03 <sup>+03</sup>	6,834 <sup>+02</sup>	65,80	5.1	1,08 <sup>+03</sup>	2,529 <sup>+02</sup>	23,31
2.2	9,29 <sup>+02</sup>	8,57 <sup>+02</sup>	92,30	5.2	1,36 <sup>+04</sup>	3,710 <sup>+02</sup>	2,75
$\Delta_{2.1-2.2}$	<b>8,26<sup>+01</sup></b>	<b>1,736</b>	<b>26,50</b>	$\Delta_{5.1-5.2}$	<b>0,28<sup>+01</sup></b>	<b>1,181</b>	<b>20,56</b>

### 3.6 Quantifizierungsergebnisse und klinische Daten von Patient 4

Die Erstdiagnose eines SéS wurde bei Patient 4 im Mai 2005 gestellt. Durchgeführte Therapie-maßnahmen vor Studieneinschluss (SE) umfassen: eine extrakorporale Photopherese (ECP), Psoralen-UV-A-Behandlung (PUVA) und eine medikamentöse Therapie mit Bexaroten und Vorinostat (Histondeacetylase-Hemmer). Bei SE erfolgte die erste Probeentnahme zur Quantifi-zierung (34,9 Monate nach Erstdiagnose (ED)), gleichzeitig wurde eine Therapie mit Alemtuzu-mab (CD52-Antikörper) begonnen. Die initiale Dosis lag bei 3 x 10 mg/ Woche (intravenöse Applikation). Aufgrund einer CMV-Reaktivierung nach 4 Monaten, erfolgte eine Dosisreduktion auf 3 x 5 mg/ Woche (intravenöse Applikation). Zur Beurteilung möglicher Korrelationen zwi-schen dem Krankheitsverlauf und den Quantifizierungsergebnissen wurden ausgesuchte Labor-parameter (Gesamtleukozytenzahl, Hämatokrit (Hkt), Lymphozytenzahl und Laktatdehydrogena-se (LDH)), so wie die Hautmanifestationen, mit der relativen Tumorzellzahl verglichen (Tabelle 37).



**Tabelle 37: Laborparameter im Vergleich zu relativen Tumorzellzahlen von Patient 4**  
 Leukozytenzahl (LK (/nl)), Lymphozytenzahl (LZ (/nl)), der relative Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten (LZ/LK (%)) Hämatokrit (Hkt (l/l)), Laktatdehydrogenase (LDH (U/l)), relative Tumorzellzahl (T/G (%)). Alemtuzumabdosis. Zeitpunkte der Probenentnahme (Monate ab Erstdiagnose ED bzw. Monate ab Studieneinschluss SE). Nicht erhoben (n.e.).

Probe	Monate ED	Monate SE	LK (/nl)	LZ (/nl)	LZ/LK	Hkt (l/l)	LDH (U/l)	T/ G	Alemtuzumab
9	34,9	0	7	4,34	62 %	0,4	252	84,03%	3x10mg
5	35,1	0,2	5,44	n.e.	n.e.	0,4	306	11,74%	3x10mg
4	35,53	0,63	4,02	0,27	6,7 %	0,39	265	23,31%	3x10mg
8	35,76	0,86	3,22	0,66	20,5 %	0,38	199	4,97%	3x10mg
10	36,46	1,56	4,27	n.e.	n.e.	0,4	n.e.	32,89%	3x10mg
3	36,53	1,63	3,21	n.e.	n.e.	0,4	207	47,17%	3x10mg
2	40,26	5,36	4,98	0,28	5,6 %	0,41	n.e.	64,30%	3x5mg
6	40,59	5,69	4,08	0,36	8,8 %	0,41	n.e.	0,72%	3x5mg
11	44,86	9,96	4,3	0,22	5,1 %	0,41	n.e.	0,54%	3x5mg
12	45,63	10,73	4,37	0,56	12,8 %	0,41	n.e.	0,02%	3x5mg

### 3.6.1 Laborparameter

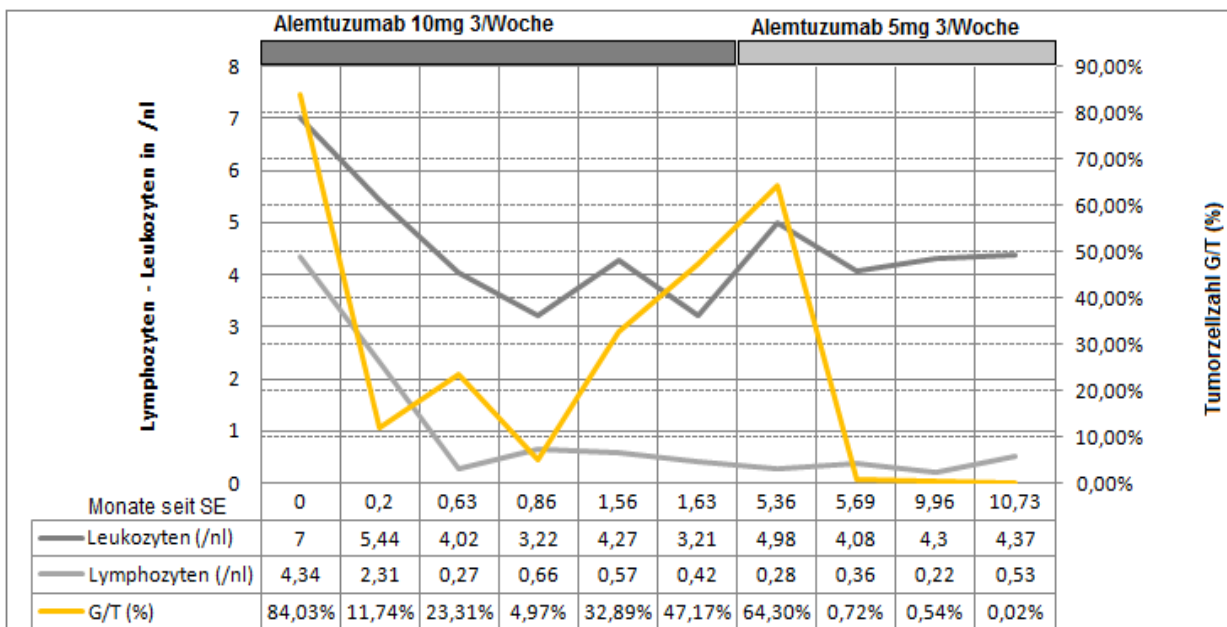
Vor Studieneinschluss bzw. vor Beginn der Medikation mit Alemtuzumab ist eine deutlich erhöhte CD4/CD8-Ratio dokumentiert (10,9 Monate vor SE und 24,9 Monate nach ED: 32,74). Unter der eingeleiteten Therapie zeigt sich eine Abnahme der CD4/CD8-Ratio (3,66 1,6 Monate nach SE und 36,5 Monate nach ED).

Die Maximalwerte der relativen Tumorzellzahl im Blut liegen bei 84,03 % bei SE und 64,30 % 5,36 Monate nach SE. Unter einer höheren Alemtuzumabdosis (3 x 10 mg/ Woche) ist ein Abfall der relativen Tumorzellzahl im Blut auf 4,97 % 0,86 Monate nach SE messbar. Nach Dosisreduktion 5,36 Monate nach SE ist zunächst ein höherer Wert (64,3 % 5,36 Monate nach SE) dokumentiert. Folgende Werte sind bei fortgeführter Therapie in reduzierter Dosis anhaltend fallend und insgesamt die niedrigsten gemessenen Werte der relativen Tumorzellzahl im Blut (0,72 % 5,69 Monate nach SE; 0,54 % 9,96 Monate nach SE; 0,02 % 10,73 Monate nach SE).

Die Gesamtleukozyten zeigen einen Höchstwert von 7 / nl bei SE. Anschließend fallen die Werte kontinuierlich (3,22 / nl 0,86 Monate nach SE), im Verlauf liegen die Werte relativ konstant zwischen 4,98 / nl 5,36 Monate nach SE und 3,21 / nl 1,63 Monate nach SE. Die Gesamtleukozyten-

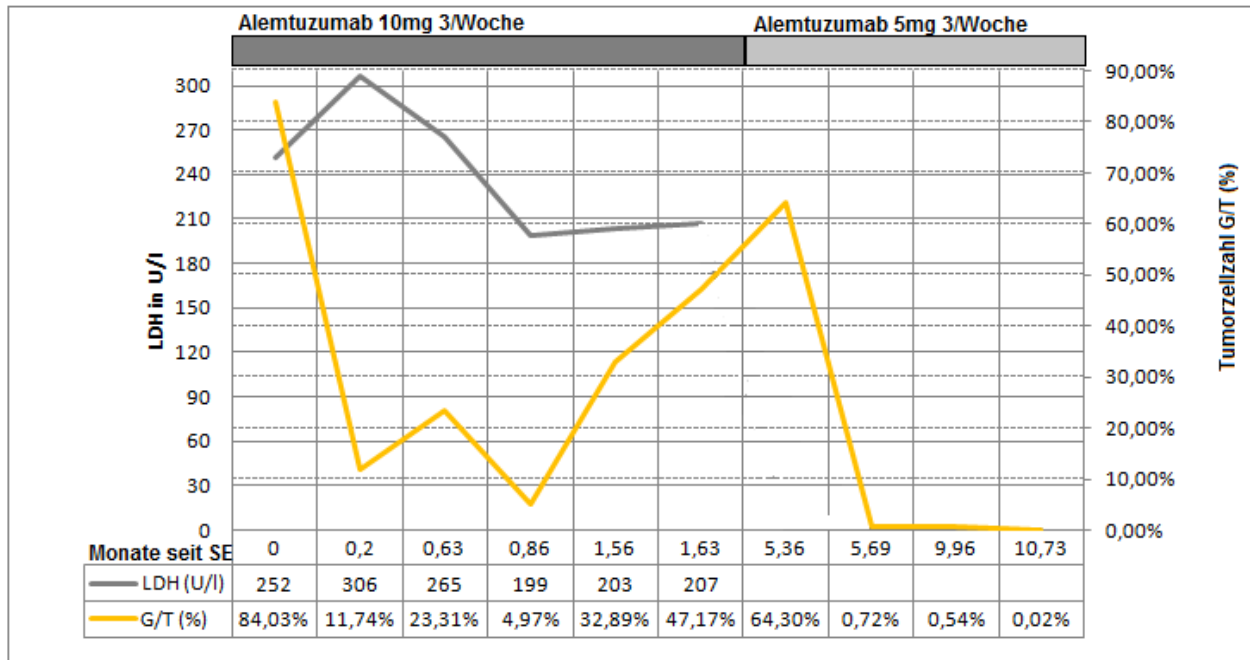
zahl und die relative Tumorzellzahl zeigen zwei Peaks die übereinstimmend sind (bei SE und 5,36 Monate nach SE). Messpunkte im Verlauf sind im Trend abweichend: 0,63 Monate nach SE ist ein Anstieg der relativen Tumorzellzahl von 11,74 % 0,2 Monate nach SE auf 23,31 % bei sinkender Leukozytenzahl messbar. 1,63 Monate nach SE ist eine fallende Leukozytenzahl messbar, wobei die relative Tumorzellzahl von 32,89 % 1,56 Monate nach SE auf 47,17 % 1,63 Monate nach SE konstant ansteigend ist. Nach Erreichen des zweiten Peak 5,36 Monate nach SE liegt die relative Tumorzellzahl konstant niedrig, die Leukozytenzahl zeigt erneut einen leichten Anstieg (Abbildung 14).

Die Maximalwerte der Gesamtlymphozytenzahl (4,34 / nl) und der relativen Tumorzellzahl liegen bei SE. Im Verlauf fallen die Gesamtlymphozyten auf 0,27 / nl 0,63 Monate nach SE, hier ist ein Anstieg der relativen Tumorzellzahl von 11,74 % 0,2 Monate nach SE auf 23,31 % messbar. Nach einem leichten Anstieg der Gesamtlymphozyten auf 0,66 / nl 0,86 Monate nach SE liegen die Werte in einem Bereich zwischen 0,22 / nl und 0,56 / nl. Bei einem zweitem Peak der relativen Tumorzellzahl 5,36 Monate nach SE liegt die Lymphozytenzahl bei 0,28 / nl. In den Proben 9,96 und 10,73 Monate nach SE zeigt die relative Tumorzellzahl einen Abfall, wobei die Lymphozytenzahlen von 0,22 / nl auf 0,53 / nl ansteigen (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Gesamtleukozyten- und Lymphozytenzahlen im Vergleich zur relativen Tumorzellzahl unter Alemtuzumabtherapie** Die Skalierung der primären y-Achse (linke Seite) gibt die Gesamtleukozyten- bzw. Lymphozytenzahl / nl an. Die Sekundär-y-Achse (rechte Seite) gibt die Skalierung der relativen Tumorzellzahlen (T/G (%)) an. Die x-Achse zeigt die Zeitpunkte der Probeentnahme, gemessen in Monaten nach Studieneinschluss. Die Werte sind zusätzlich tabellarisch gezeigt.

Die LDH ist 0,2 Monate nach SE mit 306 U / l am höchsten messbar. Dieser Peak folgt einem Abfall der Tumorzellzahl von 84,03 % bei SE auf 11,74 % 0,2 Monate nach SE (Abbildung 15). Der Hkt zeigt durchgehend geringe Schwankungen zwischen Werten von 0,38 und 0,41 l / l.



**Abbildung 15: LDH im Vergleich zur relativen Tumorzellzahl** Laktatdehydrogenasewerte (LDH in U/l), Skalierung durch die Primär-y-Achse (linke Seite). Sekundäre y-Achse (rechte Seite) Skalierung der relativen Tumorzellzahl (T/G (%)). Die x-Achse gibt die Zeitpunkte der Probeentnahmen an Monate seit Studieneinschluss). Die Werte sind zusätzlich tabellarisch aufgeführt.

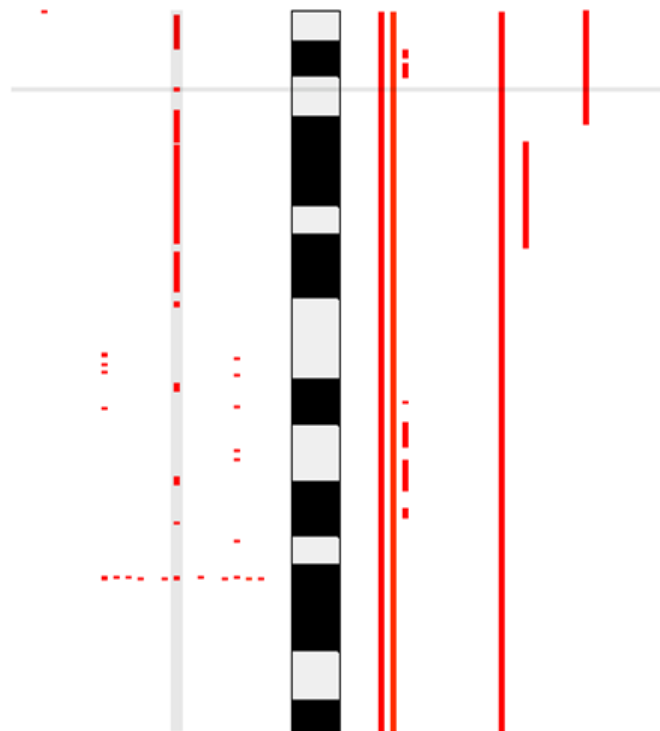
### 3.6.2 Hautbefund

Bei SE bestand bei der Patientin 4 eine generalisierte Erythrodermie. Gleichzeitig liegt bei SE der Höchstwert der relativen Tumorzellzahl im Blut (84,03 %). 1,6 Monate nach SE ist eine Suberythrodermie bzw. Besserung des Hautbefundes dokumentiert. Die relative Tumorzellzahl im Blut ist ebenfalls fallend. 5,36 Monate nach SE ist eine weitere Besserung des klinischen Befundes im Sinne einer Rückbildung der Erythrodermie zu einzelnen erythematösen Papeln beschrieben. Hingegen ist die relative Tumorzellzahl im Blut auf 64 % angestiegen. 5,36 Monaten nach SE wurde die Alemtuzumabdosis auf 3 x 5mg / Woche reduziert. Hierunter ist eine Aggravierung des Hautbefundes: eine erneute Erythrodermie, so wie eine generalisierte Lymphadenopathie dokumentiert, wobei die relative Tumorzellzahl im Blut nach einem leichten Anstieg (5,36 Monate nach SE 64,3 %) konstant niedrig und sogar weiter fallend messbar war (0,72 % 5,69 Monate nach SE und 0,02 % 10,73 Monate nach SE).

### 3.7 Darstellung von CGH Analysen des $\beta$ -Aktin-Genlocus

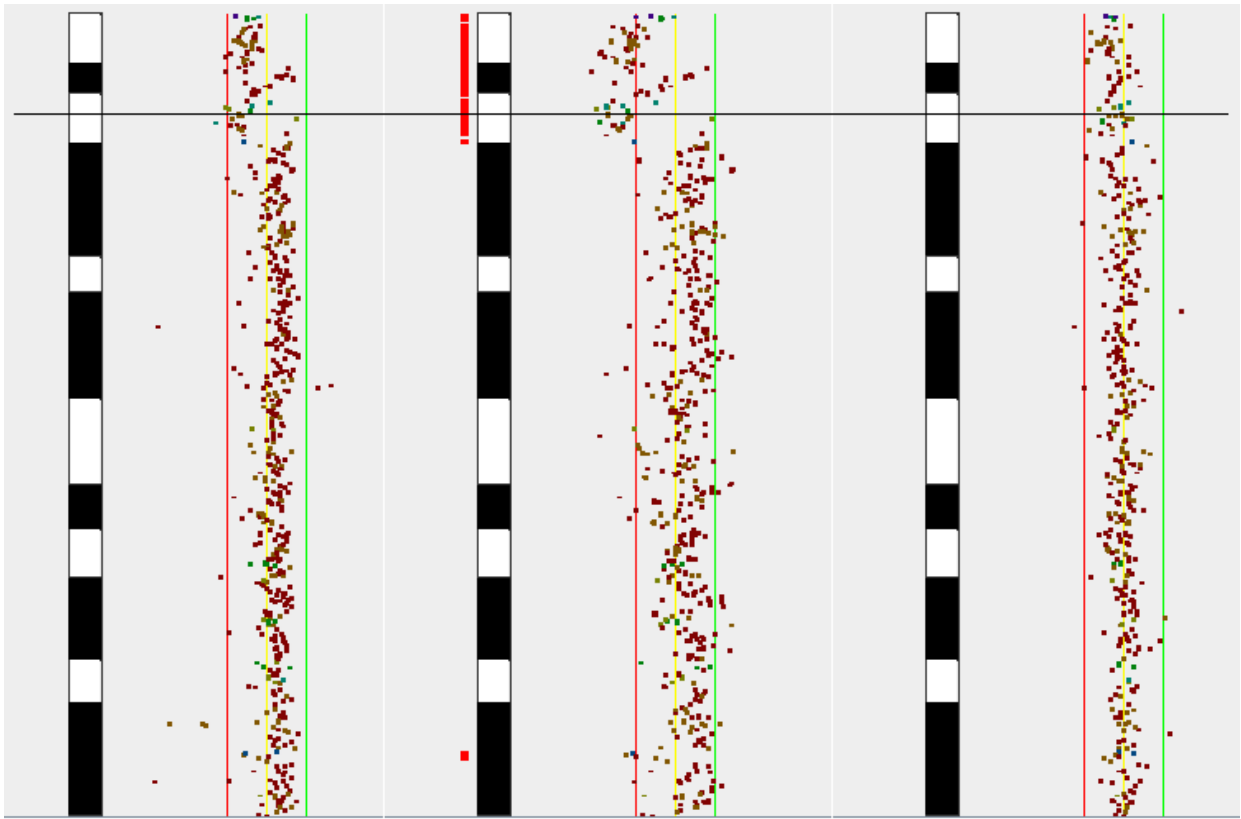
In den Proben von Patient 1 überstieg die kalkulierte relative Tumorzellzahl die Gesamtzellzahl. Genetische Aberrationen im Bereich des  $\beta$ -Aktin-Gens, welches zu Quantifizierung der Gesamtzellzahl verwendet wurde, können Erklärung für die theoretisch nicht möglichen Untersuchungsergebnisse von Patient 1 sein: Deletionen oder ein Gewinn genetischen Materials resultieren in zu niedrigen oder zu hohen Werten der mittels RT-Q-PCR quantifizierten Gesamtzellzahl und folglich der kalkulierten relativen Tumorzellzahl.

Zur Analyse genetischer Veränderungen des  $\beta$ -Aktin-Gens und einer Untersuchung der obengenannten Hypothese, wurden Daten der vergleichenden, genomischen Hybridisierung oder *comparative genomic hybridization* (CGH) einer Studie von Steininger et al. ausgewertet. Für die Studie wurden Proben von 18 Patienten mit SéS verwendet. Eingeschlossen waren Proben der Patienten 1 und 3 des Patientenkollektivs. Die CGH Analysen des kurzen Arms von Chromosom 7 zeigen chromosomale Aberrationen mehrerer Genloci. Insbesondere im Bereich des  $\beta$ -Aktin Gens sind sowohl Deletionen, als auch ein Gewinn genetischen Materials nachweisbar (Steininger et al., 2011) (Abbildung 16).



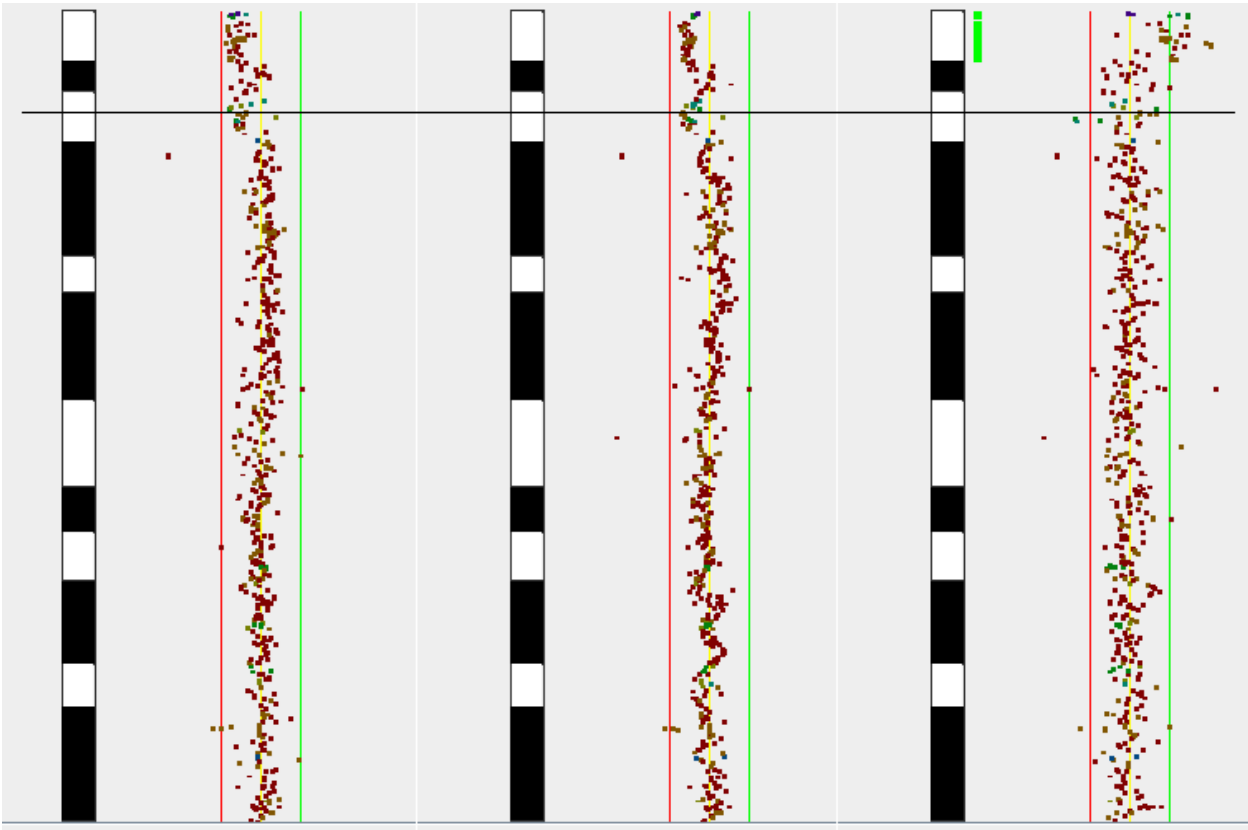
**Abbildung 16: CGH Analyse des kurzen Arms von Chromosom 7 (7p)** von insgesamt 18 Patienten mit SéS. Hierbei ist in der Mitte das Chromosom schematisch dargestellt. Jeder rote Balken zeigt eine Deletion (links) oder einen Gewinn genetischen Materials an (rechte Seite). Im oberen Bereich ist der  $\beta$ -Aktin-Genlocus gekennzeichnet (grauer, horizontaler Balken).

Folgend sind die Ergebnisse der Analysen des  $\beta$ -Aktin-Genlocus für die Patienten 1 und 3 im zeitlichen Verlauf gezeigt (Abbildungen 17 und 18).



**Abbildung 17: CGH-Analyse kurzer Arm Chromosom 7 (Patient 1)** Schematische Darstellung des kurzen Arms von Chromosom7 (linke Seite), Auswertung der Patientenprobe (rechte Seite). Die rote Linie markiert einen signifikanten Verlust, die Grüne einen signifikanten Zugewinn genetischen Materials (eine Abweichung ist als signifikant definiert überschreitet die DNS Kopienzahl einen logarithmischen Schwellenwert von  $+0.2/-0.2$ ). Durch die schwarze, horizontale Linie ist der  $\beta$ -Aktin-Genlocus gekennzeichnet.

Die ersten beiden Analysen der Proben von Patient 1 zeigen einen Verlust genetischen Materials im Bereich des  $\beta$ -Aktin Genlocus. Dieser ist in zweiter Untersuchung signifikant. In der dritten Untersuchung weist die Analyse keine Veränderungen auf.



**Abbildung 18: CGH Analyse Kurzer Arm Chromosom 7 (Patient 3)** Schematische Darstellung des kurzen Arms von Chromosom 7 (linke Seite), Auswertung der Patientenprobe (rechte Seite). Die rote Linie markiert einen signifikanten Verlust, die Grüne einen signifikanten Gewinn genetischen Materials (eine Abweichung ist als signifikant definiert überschreitet die DNS Kopienzahl einen logarithmischen Schwellenwert von  $+0.2/-0.2$ ). Durch die schwarze, horizontale Linie ist der  $\beta$ -Aktin-Genlocus gekennzeichnet.

In den Proben von Patient 3 sind zunächst keine signifikanten Veränderungen detektiert, wobei in den ersten beiden Proben ein leichter Verlust genetischen Materials im Bereich des  $\beta$ -Aktin Genlocus zu erkennen ist. In dritter Probe ist ein signifikant positives Signal mehrerer Genloci zu erkennen. Der  $\beta$ -Aktin Genlocus ist nicht betroffen.

## 4 Diskussion

Das Sézary Syndrom (SéS) ist eine aggressive Form der kutanen T-Zell-Lymphome (CTCL). Charakteristikum ist, neben einer Erythrodermie und generalisierten Lymphadenopathie, die Zirkulation von Tumorzellen in das Blutkompartiment. Die Tumorzellen gehen durch monoklonale Proliferation aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle hervor. Folglich weisen die Tumorzellen ein identisches Rearrangement der T-Zell-Rezeptor codierenden Gensegmente auf, was in dieser Arbeit, als monoklonales Rearrangement bezeichnet wird.

Eine hohe Tumorlast im Blut, erhöhte Laktatdehydrogenaselevel (LDH), so wie eine hohe CD4/ CD8-Ratio sind u. A. als Marker für eine schlechtere Prognose beim SéS beschrieben (Vonderheid et al., 2006; Bernengo et al., 1998; Foulc et al., 2003; Scarisbrick et al., 2001). Die Quantifizierung der Tumorzellen im Blut bei Patienten mit SéS besitzt somit prognostische Bedeutung und könnte zur Erkennung sog. *minimal residual disease* (MRD) oder minimaler Rest-erkrankung nach inkompletter Remission, so wie zur Evaluation verschiedener Therapieoptionen bezogen auf das Tumoransprechen, relevant sein.

### 4.1 Korrelation der Quantifizierungsergebnisse zu klinischen Daten

Diesbezüglich wurden die kalkulierten, relativen Tumorzellzahlen eines Patienten (Patient 4) mit der Gesamtleukozytenzahl, LDH und der CD4/ CD8-Ratio, unter Berücksichtigung der Therapie mit Alemtuzumab in zwei unterschiedlichen Dosierungen, verglichen.

Insgesamt wurden in 6 Proben von Patient 1 und in 12 Proben von Patient 4 die Tumorzellzahl und die Gesamtzellzahl bestimmt. Aus beiden Werten wurde die relative Tumorzellzahl berechnet. Zur Auswertung der klinischen Daten wurden die Quantifizierungsergebnisse von Patient 4 herangezogen. Die Proben wurden in einem Zeitraum von 11 Monaten gewonnen. Bei Studieneinschluss (SE) wurde eine Therapie mit Alemtuzumab eingeleitet (3 x 10mg/ Woche, intravenös), welche nach 5,36 Monaten aufgrund einer CMV-Reaktivierung in der Dosis reduziert wurde (3 x 5mg/ Woche, intravenös).

Zunächst sinkt die relative Tumorzellzahl im Blut unter der eingeleiteten Therapie. Nach einem Anstieg 5,36 Monate nach SE fallen die Werte trotz Dosisreduktion stetig und sind niedriger als zuvor messbar. Die Ergebnisse sprechen für eine gleichbleibend gute Wirksamkeit von Alemtuzumab bezüglich der Reduktion der Tumorlast in einer niedrigeren Dosierung.

Ebenfalls zeigt sich eine gute Korrelation der Messergebnisse zur CD4/CD8-Ratio: die Werte waren vor eingeleiteter Therapie deutlich erhöht, anschließend ist parallel ein Abfall der Tumorzellzahl und der CD4/CD8-Ratio messbar.

Der Höchstwert der LDH folgt einem Abfall der relativen Tumorzellzahl im Blut und steht hier eher in Zusammenhang mit dem Tumorzellerfall (Tumorlyse).

Die Gesamtleukozytenzahl und die relative Tumorzellzahl zeigen zwei übereinstimmende Peaks (bei SE und 5,36 Monate nach SE), Messwerte im Verlauf sind abweichend. Ein Anstieg der Leukozyten, so wie der Lymphozyten, kann durch viele krankheitsunspezifische Einflüsse bedingt sein. Die RT-Q-PCR hingegen ermöglicht eine spezifische Detektion der relativen Tumorzellzahl und zeigt einen unterschiedlichen Anteil von Tumorzellen an den Gesamtleukozyten bzw. Lymphozyten an. Nach Dosisreduktion der Alemtuzumabtherapie ist ein Anstieg der Lymphozyten bei einem weiteren Abfall der relativen Tumorzellzahl messbar. Diese Messergebnisse suggerieren eine gewisse Selektivität von Alemtuzumab bezüglich der Tumorzellen und eine geringere allgemeine Lymphozytendepletion als Nebenwirkung.

Um einen Zusammenhang zwischen den Hautmanifestationen und der relativen Tumorzellzahl des Blutes im zeitlichen Verlauf zu analysieren, wurden die Quantifizierungsergebnisse mit dem klinischen Erscheinungsbild korreliert. Anfangs (bei SE und 5,36 Monate nach SE) zeigt sich eine gute Korrelation der Quantifizierungsergebnisse zu dem Hautbefund bzw. einer klinischen Lymphknotenvergrößerung. 5,36 Monate nach SE ist eine Besserung des Hautbefundes bei einem Anstieg der relativen Tumorzellzahl im Blut dokumentiert. Nach der Dosisreduktion von Alemtuzumab besteht allerdings eine gegenläufige Entwicklung: es traten erneut eine Erythrodermie, so wie eine generalisierte Lymphadenopathie auf, wobei die relativen Tumorzellzahlen im Blut niedriger als zuvor und konstant niedrig messbar waren. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Alemtuzumabtherapie in reduzierter Dosis einen ausreichenden Effekt auf das Blutkompartiment, nicht aber auf die Haut zeigt. Die zunächst gleichsinnigen Veränderungen, ein Abfall der relativen Tumorzellzahlen im Blut und eine Besserung der Hautmanifestationen unter der höherdosierten Alemtuzumabtherapie, sprechen für eine tatsächliche Reduktion der Gesamtumorlast in beiden Kompartimenten- Haut und Blut. Nach Dosisreduktion zeigen die Hautmanifestationen und die Quantifizierungsergebnisse einen gegensinnigen Verlauf, was für eine unzureichende Wirksamkeit von Alemtuzumab in reduzierter Dosis auf das Hautkompartiment, bei gleichzeitiger Reduktion der relativen Tumorzellzahl im Blut, spricht.



*Ein Befall der Haut ist Teil des SéS- die Migration der malignen Zellen in das Hautkompartiment ist bei prognostischen Aussagen, basierend auf Messungen zur Tumorlast im Blut, zu bedenken.*

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden ausschließlich Blutproben für die Quantifizierung verwendet. Somit ist die Aussagekraft der Methode auf das Blutkompartiment beschränkt. Tumorzellen, welche in die Haut migriert sind, werden nicht erfasst. Dies bedingt bei einem Hautlymphom, im Gegensatz z. B. zu einer Leukämie, möglicherweise falsch-niedrige Angaben bezüglich der Gesamttumorlast eines Patienten. Bei SéS Patienten sind per Definition Tumorzellen im Blut nachweisbar und es findet ein ständiger Austausch von Tumorzellen zwischen Blut und Haut statt. Fraglich ist daher, ob die tatsächliche Anzahl der Zellen im Blutkompartiment allein maßgeblich für die Prognose ist. Zur differenzierten Beurteilung des Ansprechens auf eine Therapie ist somit die Erfassung aller Kompartimente unumgänglich, da insbesondere lokale Therapiemaßnahmen keinen realen Abfall der Tumorzellzahl im Organismus, sondern lediglich eine Migration maligner Zellen in die Haut oder sekundäre lymphatische Organe bedeuten können. Bei einem Abfall der Tumorzellzahl, welcher auf eine Migration der Zellen in die Haut beruht, wäre eine reziproke Korrelation der Hauterscheinungen und der Quantifizierungsergebnisse zu erwarten, d.h. ein Abfall der Tumorzellzahl im Blut, so wie eine Aggravierung der Hautmanifestationen und vice versa. Dies zeigt die Notwendigkeit den klinischen Hautbefund neben dem Quantifizierungsbefund des Blutes bei der Frage eines Ansprechens auf die Therapie zu berücksichtigen.

Diese Hypothese wird durch eine aktuelle Studie von Clark et al. untermauert (Clark et al., 2012). Hier war eine durch Alemtuzumab induzierte T-Zelldepletion im Blut, bei ausbleibender T-Zellreduktion in der Haut, nachweisbar. In einem Mausmodell wurde ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Neutrophilen und dem therapeutischen Ansprechen unter der Medikation mit Alemtuzumab gezeigt. Neutrophile sind im Blut in größerer Menge vorhanden, als in der Haut. Das gute Therapieansprechen auf Alemtuzumab im Rahmen des SéS und ein beobachtetes Therapieversagen bei der MF ist durch die Zirkulation der malignen Tumorzellen zwischen Haut- und Blutkompartiment erklärt, wobei die Tumorzellen bei der MF in der Haut verbleiben. Im Blut kommt es zu einer neutrophilenvermittelten T-Zelldepletion unter Alemtuzumabtherapie, die in der Haut verbleibenden T-Zellen werden weniger erfasst. Diese Daten erklären und stehen im Einklang zu den Ergebnissen der vorgelegten Arbeit, die eine Reduktion der Tumorzellen im Blut unter der Alemtuzumabtherapie in beiden Dosierungen, bei einer Aggravierung des Hautbefundes unter reduzierter Dosierung, zeigen. Der Unterschied der T-Zelldepletion

im Hautkompartiment unter reduzierter Dosierung ist gegebenenfalls Hinweis für ein verändertes Zirkulationsverhalten der T-Zellen unter reduzierter Dosis bzw. einer Akkumulation der Tumorzellen in der Haut.

## 4.2 Diskussion der Methodik

*Die RT-Q-PCR als hochspezifische und sensitive Quantifizierungsmethode monoklonaler Zellen bei Patienten mit SéS.*

Die quantitative Real-time-PCR (RT-Q-PCR) nutzt den monoklonalen Genotyp der Tumorzellpopulation zur Zellquantifizierung. Damit umgeht sie einige Limitationen der auf dem Phänotyp basierenden Quantifizierungsmethoden. Diese umfassen: einen variablen Immunphänotyp innerhalb der Tumorzellpopulation (Steinhoff et al., 2009; Klemke et al., 2008), eine mögliche Veränderung des Phänotyps im Krankheitsverlauf (unter Therapiemaßnahmen oder einen differenten Phänotyp bei Ersterkrankung und bei einem Rezidiv). Zusätzlich ist die Methode durch die Nutzung der klonspezifischen monoklonalen Rearrangments der  $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors (TCR- $\beta$ -R) als PCR *target* hochspezifisch für die jeweilige Tumorzellpopulation. Insbesondere ist bei Nutzung des TCR- $\beta$ -R im Vergleich zu dem Rearrangement der  $\gamma$ -Kette von einer höheren Spezifität auszugehen, da das sog. rekombinatorische Repertoire bzw. die Anzahl möglicher Kombinationen der Gensegmente während der T-Zell-Reifung für die  $\beta$ -Kette größer ist, als für die  $\gamma$ -Kette (Lukowsky et al., 2010).

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit konnte eine hochspezifische RT-Q-PCR zur Quantifizierung der Tumorzellen im Blut bei Patienten mit SéS entwickelt werden. Zunächst wurden die Sensitivität und der quantifizierbare Bereich anhand einer Standardkurve mit Hilfe definierten Kriterien (van der Velden et al., 2007; siehe 3.4.1.) ermittelt. Dann erfolgte Quantifizierung unbekannter DNS-Mengen im Vergleich der gemessenen  $C_t$ -Werte zu  $C_t$ -Werten von Standardreihen, welche durch Verdünnungsstufen bekannter *template*-DNS-Mengen generiert wurden. Bei 35,5 % der Patienten konnte eine Nachweisbarkeit einer Zelle mit monoklonalem TCR- $\beta$ -R unter  $10^5$  Gesamtzellen erreicht werden. Bei 21,4 % der Patienten lag die Sensitivität bei einer Zelle unter  $10^4$ , bei 35,5 % der Patienten unter  $10^3$  und bei einem Patienten (7,2 %) unter  $10^2$  Gesamtzellen. Der quantifizierbare Bereich, u. A. definiert durch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, liegt insgesamt etwas niedriger: Bei einem Patienten lag der quantifizierbare Bereich bei einer Zelle des monoklonalen TCR- $\beta$ -R unter  $10^5$  Gesamtzellen (7,2 %) und bei einem Patient unter  $10^4$  Gesamtzellen (7,2 %). Bei 43 % der Patienten lag der quantifizierbare Bereich bei einer Tumor-

zelle unter  $10^3$  Gesamtzellen, bei 29 % unter  $10^2$  Gesamtzellen und bei einem Patienten unter  $10^1$  Gesamtzellen. Gemäß den angewandten Kriterien zur Generierung der Standardkurven (van der Velden et al., 2007; siehe 3.4.1.) sind mindestens drei Verdünnungsstufen miteinzubeziehen. Die Zahl weiterer Verdünnungsstufen korreliert positiv mit der Zuverlässigkeit der Reaktion. Bei den durchgeführten Reaktionen konnten bei 86 % der Proben mehr als drei Verdünnungsstufen verwendet werden: bei 35,5 % sechs, bei 28 % fünf, bei 21 % vier und bei 14 % drei Verdünnungsstufen. Dies demonstriert eine gute Zuverlässigkeit der generierten Standardkurven.

*Die RT-Q-PCR zur Quantifizierung monoklonaler Zellen beim SéS ist als hochspezifisch und sensitiv beschrieben.*

In der Literatur ist die Anwendung der RT-Q-PCR bei Patienten mit SéS einmal beschrieben (Steinhoff et al., 2009).

Steinhoff und Kollegen führten eine klonspezifische, quantitative RT-Q-PCR nach Vorsortierung der T-Zellen in phänotypische Subgruppen (CD3+/CD7+; CD3+/CD7-; CD3+/CD26+ und CD3+/CD7-) mittels FACS durch. Ziel der Arbeit war eine genauere Charakterisierung des Immunphänotyps der Tumorzellpopulation. Als PCR-target (*in-house* PCR, nicht standardisiert) wurden sowohl die klonspezifische N-D-N-Regionen der TCR- $\beta$ -R, als auch der TCR- $\gamma$ -R der monoklonalen Zellen, definiert und je komplementäre Primer designet. Es wurden 15 Proben von 5 Patientinnen einbezogen. Nach Aufteilung in die 4 phänotypischen Subgruppen ergaben sich insgesamt 60 Reaktionen. Die Quantifizierung unbekannter DNS Mengen erfolgte im Vergleich zu Standardreihen mit bekannten DNS Mengen. Zur Generierung der Standardreihen wurden Verdünnungen von Genkopien des monoklonalen Rearrangements (PCR Produkt nach biomed-2-PCR) verwendet, diese umfassten  $10^2$  -  $10^6$  Genkopien in  $5 \times 10^3$  Gesamtzellen. Ein Quantifizierungsergebnis von 0 wurde als Unterschreiten der Detektionsgrenze von einer Tumorzelle unter 50 Gesamtzellen gewertet. Eine Unterscheidung, ob keine Tumorzellen oder weniger als eine Tumorzelle in 50 Gesamtzellen in der Probe vorhanden waren, wurde nicht vorgenommen. Bei 26,6 % der Proben (16/ 60) wurde ein Quantifizierungsergebnis von 0 detektiert. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit erfolgte die Quantifizierung ebenfalls durch den Vergleich der gemessenen  $C_t$ -Werte zu den  $C_t$ -Werten der Standardreihen, jedoch umfassten die Standardreihen auch deutlich stärkere Verdünnungsstufen mit bis zu einer Kopie des monoklonalen TCR- $\beta$ -R unter  $5 \times 10^5$  Gesamtzellen, was die Quantifizierung im Bereich geringerer Tumorzellzahlen ermöglicht. Insgesamt konnte in der Studie von Steinhoff et al. in 65 % (39/ 60 Reaktionen) ein spezifisches

PCR Produkt sicher nachgewiesen werden, zieht man die Reaktionen mit einem Quantifizierungsergebnis von 0 mit ein, kann in 91,6 % von einer spezifischen Detektion in den vorsortierten Tumorzellen ausgegangen werden. In 8,3 % der Reaktionen (5/ 60 Reaktionen) waren die Ergebnisse nicht reproduzierbar. Der Nachweis eines spezifischen PCR Produkts war im Rahmen der vorgelegten Arbeit noch höher: in 100 % der Reaktionen konnte ein spezifisches PCR Produkt nachgewiesen werden und alle Reaktionen waren reproduzierbar. Die höhere Spezifität unserer Methode ist wahrscheinlich durch die Verwendung von TaqMan Sonden bedingt. Diese hybridisieren die J $\beta$ -Region des TCR- $\beta$ -R hochspezifisch im Gegensatz zu den von Steinhoff und Kollegen verwendetem Farbstoff SYBRGreen, welcher unspezifisch an doppelsträngige DNS bindet. Die durchgehende Verwendung des TCR- $\beta$ -R als PCR *target* in der vorgelegten Arbeit bedingt, im Vergleich zur häufigeren Anwendung des TCR- $\gamma$ -R bei Steinhoff et al., ebenfalls eine höhere Spezifität, da das rekombinatorische Repertoire größer ist, als bei dem TCR- $\gamma$ -R.

Die Sensitivität und der quantifizierbare Bereich wurden in der Studie von Steinhoff et al. nicht unabhängig getestet, was den Vergleich beider Studien insgesamt erschwert. Basis der vorgelegten Arbeit ist u. A. eine fundierte Bewertung der RT-Q-PCR bezüglich der Sensitivität, Spezifität und Anwendbarkeit. Diesbezüglich wurden die Sensitivität und der quantifizierbare Bereich, welcher u. A. die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse voraussetzt, anhand definierter Kriterien mit Hilfe von Standardkurven für alle 14 Patienten ermittelt (van der Velden et al., 2007; siehe 3.4.1.). Die einheitliche Bewertung ermöglicht eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse und Analyse der RT-Q-PCR jedes Patienten bezüglich potentieller prädiktiver Faktoren für das Funktionieren der Reaktion (z. B. Aufbau der klonspezifischen N-D-N-Region, Primerbindungsstellen, etc.).

*Im Vergleich zu den Ergebnissen der Studie von Brüggemann et al. zur Quantifizierung monoklonaler Zellen bei Patienten mit T-ALL, zeigt die im Rahmen vorgelegter Arbeit entwickelte RT-Q-PCR, eine geringere Sensitivität und einen geringeren quantifizierbaren Bereich.*

Brüggemann und Kollegen entwickelten 2004 eine RT-Q-PCR zum Nachweis kleinster Mengen von Tumorzellen bzw. der frühzeitigen Erkennung sog. minimaler Resterkrankung oder *minimal residual disease* nach inkompletter Remission bei Patienten mit akuter lymphatischer T-Zell-Leukämie (T-ALL) (Brüggemann et al., 2004). Als PCR-*target* wurde die klonspezifische, junctionale N-D-N-Region des TCR- $\beta$ -R gewählt. Die PCR Produkte der biomed-2-PCR zum Klonalitätsnachweis (van Dongen et al., 2003) wurden sequenziert und die N-D-N-Regionen der

monoklonalen Rearrangements im Vergleich zu öffentlichen Gendatenbanken identifiziert. Anschließend wurden klonspezifische Primer komplementär zur N-D-N-Region, J $\beta$ -spezifische TaqMan-Sonden und J $\beta$ -spezifische *reverse* Primer designt. Auch in dieser Studie konnte eine hohe Spezifität und Sensitivität zur Quantifizierung der monoklonalen Zellen erreicht werden: Bei allen Reaktionen konnte mindestens eine Nachweisbarkeit einer Genkopie der monoklonalen Zellen unter  $10^3$  Gesamtzellen erreicht werden und in 80 % der Fälle waren die Ergebnisse bis zu einer Verdünnungsstufe von  $10^4$  gut reproduzierbar. In 93 % der Fälle war eine Tumorzelle unter  $10^4$  Gesamtzellen nachweisbar (Brüggemann et al., 2004).

Aufgrund der guten Erfahrung von Brüggemann et al. wurde in der vorliegenden Arbeit zur Entwicklung der klonspezifischen RT-Q-PCR für Patienten mit SéS analog dem Protokoll dieser Studie verfahren. Als PCR *target* wurde die N-D-N-Region definiert, die Sequenzen der TaqMan-Sonden und der *backward*-Primer (komplementär zu den J $\beta$ -Regionen) wurden übernommen. Im Vergleich beider Arbeiten sind die Sensitivität und der quantifizierbare Bereich der RT-Q-PCR bei Patienten mit SéS geringer. Neben technischen Herausforderungen zur Etablierung der RT-Q-PCR können krankheitsspezifische Unterschiede zwischen Patienten mit T-ALL und dem SéS ursächlich sein.

*Eignet sich die klonspezifische RT-Q-PCR aufgrund des weniger komplexen Aufbaus der N-D-N-Regionen bei Patienten mit SéS weniger zur MRD Bestimmung als bei Patienten mit T-ALL?*

Die Analyse der N-D-N-Regionen bezüglich Länge, Deletionen und Insertionen von Patienten mit T-ALL und der Patienten mit SéS eines erweiterten Kollektivs (insgesamt 34 Patienten) zeigt eine im Mittel kürzere N-D-N-Regionen bei Patienten mit SéS (Tabelle 21). Die kürzeren N-D-N-Regionen bei Patienten mit SéS im Vergleich der N-D-N-Regionen bei Patienten mit T-ALL schränken die Möglichkeit zum Primerdesign ein und sind vermutlich Grund für die geringere Sensitivität der Reaktion.

Der Längenunterschied der N-D-N-Regionen ist, nach statistischer Auswertung mit Hilfe des T-Tests, als nicht signifikant zu werten ( $P = 0.332$ ), ebenso wie die Korrelation der Länge der N-D-N-Regionen und der erreichten Sensitivität ( $P = 0.450$ ). Die Signifikanztestung ist aufgrund des kleinen Patientenkollektivs jedoch möglicherweise nur eingeschränkt aussagekräftig und sollte anhand eines größeren Kollektivs wiederholt werden.

Basierend auf Überlegungen zur „Reife und Unreife“ der Vorläuferzellen der jeweiligen Tumorzellpopulation im Rahmen der T-ALL und des SéS, liegt ebenfalls eine größere Vielfalt der N-D-N-Regionen bei der T-ALL nahe: Die Tumorzellpopulation der T-ALL geht durch monoklonale Proliferation unreifer T-Zellen aus, diese haben die Positiv- und Negativselektion der T-Zell-Reifung noch nicht durchlaufen. Folglich können auch Zellen beteiligt sein, die ein unproduktives Rearrangement aufweisen oder ein Rearrangement, welches Selbst-Antigene erkennt. Die Tumorzellen im Rahmen des SéS gehen von reifen T-Zellen aus, T-Zellen mit unproduktivem Rearrangement oder autoimmunogene Rearrangements wurden bereits selektiert. Dieser Zusammenhang könnte insgesamt ein kleineres Repertoire der N-D-N-Regionen beim SéS und damit die Einschränkung des Primerdesign erklären.

### **4.3 Limitationen der Anwendung der RT-Q-PCR beim SéS**

Zusätzlich zu den genannten Einschränkungen, bestehen Herausforderungen bezüglich der eindeutigen Identifikation des Tumorzellklons und einer möglichen Veränderung des Tumorzellklons im Krankheitsverlauf.

*Subklone könnten die Anwendbarkeit der RT-Q-PCR einschränken.*

Die Anwendung von PCR-Methoden zur Quantifizierung der Tumorzellen basiert auf dem Vorhandensein einer monoklonalen Zellpopulation, die durch klonale Expansion einer Ursprungszelle hervorgegangen ist. Die Methode kann nur zuverlässig sein, kann die Tumorzellpopulation eindeutig identifiziert werden und repräsentiert die klonale Population die malignen Zellen komplett, d. h. einerseits dass keine der physiologischen Zellen den Immunrezeptor-Genotyp der malignen Zellen aufweisen und andererseits, dass alle Tumorzellen mindestens im Bereich des Genlocus, der als PCR *target* genutzt wird, eine exakt identische Basensequenz aufweisen. Abweichungen von dieser Annahme bedingen falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse.

Bei CTCL wurden klonal proliferierte T-Zell-Populationen nachgewiesen, welche nicht der Tumorzellpopulation entsprechen (Dippel et al., 2001; Humme et al., 2009; Fierro et al., 2010). Fierro et al. detektierten in 80 % der Proben von Patienten mit SéS mehrere klonale T-Zell-Populationen. Dies wird im Rahmen der Studie als heterogene Klonalität bezeichnet und als die Koexistenz von zwei oder mehreren T-Zell-Klonen in verschiedenen Proben eines Patienten definiert (Fierro et al., 2010). Allerdings ist anzumerken, dass hier Peaks aufgrund ihrer relativen Höhe als klonale Population gewertet wurden und nicht nach einem standardisierten PCR Proto-

koll verfahren wurde. Folglich ist eine Überinterpretation zur klonalen Heterogenität, aufgrund einer unterschiedlichen Effizienz der PCR und der mangelnden Unterscheidung zu einem biallelischen Rearrangement, denkbar. Der Nachweis eines identischen Zellklons in Hautbiopsien und im Blut der Patienten, gilt jedoch als sicheres Kriterium zur Identifikation des Tumorklons (Fierro et al., 2010).

Ebenso waren klonale T-Zell-Populationen unter benignen Konditionen, wie dem Lichen sclerosus et atrophicus (Lukowsky et al., 2000) und im Blut gesunder Individuen, insbesondere älterer Probanden (Delfau-Larue et al., 2000; Muche et al., 2003), nachweisbar. Hieraus entstand der Begriff der *T-cell expansion of undetermined significance* (TEXUS). Dippel et al. betonen, dass es aufgrund unterschiedlicher Sensivitäten der Detektionsmethoden und Beeinflussung durch inflammatorische Prozesse bzw. einer T-Zell-Proliferation als reaktiver Prozess zu einer unterschiedlichen Detektion von klonalen T-Zellpopulationen kommen kann. Um eine Überinterpretation des Klonalitätsnachweises im Sinne eines falsch positiven Malignitätsbefundes zu vermeiden, werden eine wiederholte Sequenzierung des Klons oder die Fluoreszenz-Fragmentlängen-Analyse mittels GeneScan (FFA-GS), empfohlen. Bei Vorliegen einer als klonal detektierten, reaktiven T-Zell-Expansion ist eine Veränderung der T-Zell-Rezeptor-Sequenz der klonalen Population im zeitlichen Verlauf zu erwarten. Hingegen ist die Sequenz bei einer monoklonalen Expansion von Tumorzellen konstant und reproduzierbar nachweisbar. T-Zell-Populationen, welche nicht reproduzierbar nachweisbar sind, werden als pseudomonoklonal abgegrenzt (Dippel et al., 2001). Auch hier wird der Nachweis einer identischen klonalen Zellpopulation in Blut- und Hautproben, als Basis zur Identifikation der Tumorzellpopulation akzeptiert (Dippel et al., 2001; Delfau-Larue et al., 2000).

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde für alle Patienten des Kollektivs eine identische, klonale Zellpopulation mit TCR- $\beta$ -R in Blut- und Hautproben durch eine FFA-GS nachgewiesen, als Hinweis darauf, dass es sich tatsächlich um die Tumorzellpopulation der läsionalen Haut handelt.

Das Auftreten von oligoklonalen Populationen könnte durch eine reaktive Expansion im Rahmen einer chronischen Antigenstimulation eines bislang unbekanntes Antigens (Jackow et al., 1997) oder des Tumors selbst, bei insgesamt eingeschränktem T-Zell-Repertoire, bedingt sein. Der Nachweis oligoklonaler Populationen und einem reduzierten T-Zell-Repertoire ist für chronisch entzündliche Erkrankungen, beispielsweise der rheumatoiden Arthritis (Wagner et al., 1998),

beschrieben. Ebenfalls wird das T-Zell-Repertoire im Alter bei gesunden Menschen kleiner, so dass hier häufiger oligoklonale Populationen detektiert werden. Dies muss bei der Auswertung, wie in der vorliegenden Arbeit z. B. durch den Vergleich zu den Tumorerläsionen der Haut, berücksichtigt werden (Vallejo et al. 1998, Gniadecki et al., 2005, Muche et al., 2003).

Bei einer tatsächlichen Existenz mehrerer Zellklone, d. h. klonale Tumorzellpopulationen, welche aus der malignen Transformation und anschließenden monoklonalen Proliferation verschiedener Vorläuferzellen hervorgehen, würde man eventuell von einer familiären Häufung bzw. einer erblichen Prädisposition ausgehen. Hinweise gibt u. A. die Assoziation zu bestimmten HLA-Klassen, welche auch für das SéS nachgewiesen werden konnte (Jackow et al., 1996). Ein Zusammenhang bestimmter HLA Klassen zur Manifestation des SéS, ist aufgrund der niedrigen Inzidenz jedoch kaum zu beweisen.

Valide Daten bezüglich eines möglichen Wandels des Tumorklons bzw. verschiedener klonaler Populationen, welche aus einer ursprünglichen Vorläuferzelle hervorgehen, liegen bislang nicht vor. Mehrere klonale Populationen bzw. Subklone könnten sich aus transformierten Tumorzellen, welche sich beispielsweise durch Mutationen verschiedener Genloci, einen Selektionsvorteil gegenüber bestimmten Therapien erworben haben, oder ein gesteigertes Wachstumsverhalten zeigen, ergeben. Ebenso könnte der Genotyp der neoplastischen Zellen im Falle eines Rezidivs von dem der ursprünglichen Population abweichen. Auch wenn diesbezügliche Daten für Patienten mit SéS bislang nicht vorliegen, ist geschilderter Zusammenhang aufgrund der Vielzahl genetischer Aberrationen verschiedener Genloci (Scarisbrick et al., 2001, Mao et al., 2003; Whittacker et al., 2007; Vermeer et al., 2008; Steininger et al. 2011) wahrscheinlich. Beträfen genetische Veränderungen Sequenzabschnitte, welche als PCR *target* verwendet werden, hätte dies ebenfalls Konsequenzen für die Quantifizierung mittels RT-Q-PCR.

*Die chromosomale Instabilität, auch mit Beeinflussung der Kontrollgene, im Rahmen des Sézary Syndroms könnte die Quantifizierung der Gesamtzellzahl und die Kalkulation der relativen Tumorzellzahl erschweren.*

Es wird angenommen, dass sich sog. *house keeping* Gene zur Quantifizierung der Gesamtzellzahl eignen, da Aberrationen im Bereich der betreffenden Genloci aufgrund einer ubiquitären Expression weniger toleriert werden.



Genetische Veränderungen im Bereich des Genlocus, welcher als Referenzgen bzw. zur Quantifizierung der Gesamtzellzahl in der RT-Q-PCR genutzt wird, verfälschen die Quantifizierungsergebnisse: Deletionen im Bereich des Referenzgens verursachen falsch niedrige Werte der Gesamtzellzahl, in der Kalkulation der relativen Tumorzellzahl ergeben sich falsch zu hohe Werte. Bei einer Amplifikation im Bereich des Referenzgens verhält es sich umgekehrt, die detektierte Gesamtzellzahl wird falsch zu hoch gemessen und entsprechend die relative Tumorzellzahl zu niedrig.

Zur Bestimmung der relativen Tumorzellzahl im Blut, wurde die Gesamtzellzahl mit Hilfe einer RT-Q-PCR unter Verwendung  $\beta$ -Aktin spezifischer Primer bestimmt und der Anteil der Tumorzellen aus dem Quotienten der Gesamtzellzahl und der absoluten Tumorzellzahl errechnet. Die Amplifikation des  $\beta$ -Aktin-Genlocus, ein in allen humanen Zellen exprimiertes *house keeping* Gen, repräsentiert die Gesamtzahl aller im Reaktionsansatz vorhandenen Zellen. Ziel der Arbeit war die Quantifizierung der Tumorzellen in Proben von drei Patienten (Patient 1, 4 und 14). Tatsächlich war die Quantifizierung für die Proben von zwei Patienten möglich (Patient 1 und 4). Patient 14 musste vor Durchführung der Quantifizierungsläufe ausgeschlossen werden, da die Kriterien zur Generierung einer Standardkurve nicht eingehalten werden konnten. Bei der Quantifizierung der relativen Tumorzellzahl aus 3 Proben von Patient 1 ergaben sich theoretisch falsch zu hohe Werte. Der kalkulierte Wert für die Tumorzellen überschritt die anhand der  $\beta$ -Aktin-PCR bestimmte Gesamtzellzahl.

Um das Vorliegen einer genetischen Aberrationen im Bereich des  $\beta$ -Aktinens zu analysieren, wurden Daten der vergleichenden, genomischen Hybridisierung oder *comparative genomic hybridization* (CGH) von Patienten mit SéS aus der Studie von Steininger und Kollegen (Steininger et al., 2011) herangezogen. Im Rahmen der Studie waren Proben der Patienten 1 und 3 eingeschlossen (siehe 3.7). Die CGH-Analysen der Patienten 1 und 3 zeigen inter- und intra-individuell unterschiedliche Veränderungen des Chromosoms 7. Es liegen sowohl Deletionen, als auch ein Gewinn genetischen Materials vor und die Veränderungen sind im zeitlichen Verlauf variabel. In den Proben von Patient 1 ist der  $\beta$ -Aktin Genlocus nachweislich betroffen. Bezogen auf die Quantifizierungsergebnisse von Patient 1 erklärt die Deletion im Bereich des  $\beta$ -Aktin-Gens, unseres Referenzgens, die theoretisch falsch hohen Werte der kalkulierten, relativen Tumorzellzahl. Insgesamt demonstriert die Darstellung der genetischen Veränderungen die chromosomale Instabilität bei Patienten mit SéS und die Schwierigkeit ein geeignetes Referenzgen zur Quantifizierung der Gesamtzellzahl zu identifizieren.

Vor Durchführung der RT-Q-PCR müssten die Genloci potentieller Referenzgene auf Veränderungen untersucht werden. Doch ließe sich auch dann in Studien ohne vorhergehende Analyse der jeweiligen Proben, dieser Fehler nicht mit Sicherheit ausschließen.

*Genetische Veränderungen im Bereich der Primerbindungsstelle verhindern ebenfalls eine Amplifikation.*

Auch genetische Veränderungen im Bereich der Primerbindungsstelle würden eine tumorspezifische Amplifikation verhindern. In diesem Fall wäre die detektierte Zahl der Tumorzellen falsch zu niedrig.

#### **4.4 Fazit**

Die quantitative Real-Time-PCR (RT-Q-PCR) ist als sensitive Methode zur Quantifizierung kleinster Mengen residueller Tumorzellen sog. *minimal residual disease* oder minimaler Resterkrankung (MRD) für Patienten mit akuter lymphoblastischer T-Zell-Leukämie (T-ALL) etabliert. Die MRD Diagnostik ist für eine individuelle Therapiegestaltung, Evaluation verschiedener Therapieoptionen von Bedeutung und kann helfen Risikogruppen mit schlechter Prognose zu identifizieren. Das Sézary Syndrom (SéS) ist eine aggressive Form der kutanen T-Zell-Lymphome (CTCL) charakterisiert durch die Aussaat atypischer Zellen in das Blut, eine Erythrodermie und einer generalisierten Lymphadenopathie. Aktuell existiert keine Methode zur spezifischen Quantifizierung neoplastischer Zellen bei Patienten mit SéS.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit entwickelten wir eine hochempfindliche RT-Q-PCR für Patienten mit SéS. Als PCR *target* wurde das T-Zell-Rezeptor-Gen der  $\beta$ -Kette (TCR- $\beta$ -R) der monoklonal expandierten Tumorzellpopulation gewählt. Das T-Zell-Rezeptor-Gen besteht aus mehreren Gensegmenten. Während der physiologischen T-Zell-Proliferation werden verschiedene Gensegmente des T-Zell-Rezeptorgens kombiniert (kombinatorische Diversität). Durch zusätzliche Deletionen und Insertionen an den Junktionszonen (junktionale Diversität) ergibt sich ein weites Spektrum an unterschiedlichen Gensequenzen. Bei dem SéS liegt eine monoklonale Expansion von atypischen T-Zellen vor. Diese Tumorzellpopulation weist ein identisches Rearrangement des T-Zell-Rezeptorgenlocus auf, das z. B. mittels PCR nachgewiesen werden kann.

In die Studie wurden 30 Proben von 14 Patienten eingeschlossen. Für alle Patienten wurde ein monoklonales TCR- $\beta$ -R mittels Fluoreszenz-Fragmentlängen-Analyse nachgewiesen, nach stan-

dardisiertem biomed-2-Protokoll amplifiziert (van Dongen et al., 2004) und sequenziert. Insgesamt wurden 20 N-D-N-spezifische Primer designt (Primer 3 Plus; www.bioinformatics.nl). Die RT-Q-PCR wurden mit der LightCycler Technologie unter Verwendung sequenzspezifischer TaqMan Sonden durchgeführt. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden für alle 20 Primerpaare die Anlagerungstemperatur und die Primerkonzentration variiert. Zusätzlich wurde der Einfluss der Magnesium- und Sondenkonzentration im Reaktionsansatz untersucht.

Die Quantifizierung der absoluten Tumorzellzahl erfolgte im Vergleich der  $C_t$ -Werte der Proben zu den  $C_t$ -Werten einer Verdünnungsreihe mit bekannter Genkopienzahl. Zur Herstellung der Verdünnungsreihen für alle Patienten wurden die Amplifikate der qualitativen PCR kloniert und seriell verdünnt. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl in den Patientenproben wurde kommerziell erworbene, polyklonale DNS und  $\beta$ -Aktin-spezifische Primer verwandt. Der  $\beta$ -Aktin-Genlocus ist ein sog. *housekeeping* Gen und in humanen Zellen ubiquitär exprimiert. Aus beiden Bestimmungen wurde die relative Tumorzellzahl berechnet.

Für alle 14 Patienten konnte eine hochspezifische und sensitive RT-Q-PCR etabliert werden. Die Nachweisbarkeit lag bei fünf Patienten bei einer Zelle mit dem klonalen TCR- $\beta$ -R unter  $10^5$  Gesamtzellen, ansonsten wurde, bis auf für einen Patienten des Kollektivs, mindestens eine Nachweisbarkeit von einer Zelle des klonalen TCR- $\beta$ -R unter  $10^3$  Gesamtzellen erreicht. Insgesamt war Sensitivität geringer, als bei Patienten mit T-ALL (Brüggemann et al., 2004). Zur weiteren Analyse wurden die N-D-N-Regionen eines erweiterten Patientenkollektivs (34 Patienten mit SéS) bezüglich Gesamtlänge und Länge der Gensegmente ausgewertet. Hier zeigte sich eine kürzere N-D-N-Region bei Patienten mit SéS, was allgemein das Primerdesign unflexibler gestaltet. In 18 Proben von zwei Patienten wurden die Tumorzellzahl und die Gesamtzellzahl quantifiziert. Zur Beurteilung der Reliabilität wurde für zwei Proben eine Doppelbestimmung aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen durchgeführt. Bei drei Proben von einem Patienten lag die ermittelte Tumorzellzahl höher als die Gesamtzellzahl. Die CGH-Analyse des  $\beta$ -Aktin-Gens in Proben des Patienten zeigte eine Deletion. Diese genetische Veränderung kann in diesem Fall als ursächlich für eine falsch zu niedrig quantifizierte Gesamtzellzahl angesehen werden. In den übrigen Proben konnte die absolute und relative Tumorzellzahl bestimmt werden.

Die Quantifizierungsergebnisse wurden mit relevanten Laborparametern und dem Hautbefund, unter Berücksichtigung der Therapie mit Alemtuzumab in zwei unterschiedlichen Dosierungen, verglichen. Insgesamt zeigte sich eine gute Korrelation zur CD4/CD8-Ratio. Unter der höher-

dosierten Medikation mit Alemtuzumab ist eine fallende Tumorzellzahl im Blut bei einer Besserung des Hautbefundes messbar. Nach der Dosisreduktion sind die Parameter jedoch gegenläufig: Die relative Tumorzellzahl im Blut ist niedriger als zuvor messbar, bei einer Verschlechterung des Hautbefundes. Dies lässt eine unzureichende Wirkung von Alemtuzumab auf das Hautkompartiment in reduzierter Dosis annehmen. Der Abfall der relativen Tumorzellzahl im Blut bei Verschlechterung des Hautbefundes spricht eher für eine Migration der Lymphozyten, statt für einen realen Abfall der Tumorlast. Aufgrund der Migration im Blut zirkulierender Tumorzellen in das Hautkompartiment und gegebenenfalls sekundäre lymphatische Organe ergibt sich die Notwendigkeit, die Methode zur Beantwortung klinischer Fragestellungen und der Evaluation verschiedener Therapien auch für Gewebebiospien zu etablieren. Anderenfalls kann eine tatsächliche Reduktion bzw. ein tatsächlicher Anstieg der Tumorzellen von Schwankungen der Quantifizierungsergebnisse aufgrund von einem Übergang in die Haut nicht unterschieden werden.

Insgesamt konnte eine hohe Spezifität und Sensitivität der RT-Q-PCR zur Quantifizierung von Tumorzellen bei Patienten mit SéS demonstriert werden. Gleichzeitig erwies sich die Methode als technisch anspruchsvoll und nicht für alle Patienten gleichwertig anwendbar. So wird die RT-Q-PCR für Studienzwecke interessant bleiben, auch wenn sie für die Routinediagnostik weniger geeignet scheint.

#### **4.5 Ausblick**

Eine Weiterentwicklung der bisherigen PCR basierten Klonalitätsdiagnostik ist die Quantifizierung klonaler T-Zellen mittels Hochdurchsatzsequenzierung oder *next generation sequencing*. Bei dieser hocheffizienten Methode werden Millionen DNS Fragmente in einem Sequenzierungslauf parallel amplifiziert und sequenziert (Robins et al., 2009). Durch nahezu komplette Sequenzierung des T-Zell-Repertoires und die Auszählung klonaler Sequenzen ist die Erfassung von MRD bei Patienten mit lymphoproliferativen Erkrankungen möglich und für die T-ALL bereits als sensitives Verfahren beschrieben (Wu et al., 2012). Vorteile gegenüber klassischen PCR-basierten Methoden sind u. A., dass keine patientenspezifischen Primer und Sonden notwendig sind. Ebenso ist die genaue Unterscheidung kleinster Mengen der in der Probe vorhandenen Genkopien des klonalen Rearrangements möglich, da die Sequenzen einzeln ausgezählt werden. Bei der RT-Q-PCR hingegen erfolgt die Quantifizierung anhand von Standardreihen einer Verdünnungsreihe, die „Diskriminierungsfähigkeit“ ist hier technisch bedingt geringer.

## Literaturverzeichnis

Abrams JT, Balin BJ, Vonderheid AC. Association between Sézary T Cell-activating Factor, Chlamydia pneumoniae, and Cutaneous T Cell Lymphoma. *Ann N Y Acad Sci* 2001;941:69-85.

Alt FW, Oltz EM, Young F, et al. VDJ recombination. *Immunol Today* 1992;13:306-314.

Arden B, Clark SP, Kabelitz D, et al. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 1995;42:455-500.

Asadullah K, Döcke WD, Häussler A, et al. Progression of mycosis fungoides is associated with increasing cutaneous expression of interleukin-10 mRNA. *J Invest Dermatol* 1996;107:833-837.

Assaf C, Hummel M, Steinhoff M, et al. 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*. 2005;105:503-10.

Assaf C, Bagot M, Dummer R. Minimizing side-effects of oral bexarotene in cutaneous T-cell lymphoma: an expert opinion. *Br J Dermatol* 2006;15: 261-6.

Assaf C. The clinical impact of t-cell receptor rearrangement analysis in cutaneous t cell lymphoma. *Front Radat Ther Oncol* 2006;39:16-24.

Assaf C. Denileukin difitox therapy for patients with tumor-stage mycosis fungoides. *Dermatol Clin* 2008;26:21-2.

Bahler DW, Hartung L, Hill S, et al. CD158k/KIR3DL2 Is a Useful Marker for Identifying Neoplastic T-Cells in Sézary Syndrome by Flow Cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74:156-162.

Ballanger F, Bressollette C, Volteau C, et al. Cytomegalovirus: its potential role in the development of cutaneous T-cell lymphoma. *Exp Dermatol* 2009;18:574-576.

Benbouza H, Jacquemin JM, Baudoin JP, et al. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *BASE Biotechnol Agron Soc Environ* 2006;10:77-81

Bernengo MG, Quaglino P, Novelli M, et al. Prognostic factors in Sezary syndrome: A multivariate analysis of clinical, haematological and immunological features. *Ann Oncol* 1998;9:857-868.

Berger C, Tigelaar R, Cohen J, et al. Cutaneous T-cell lymphoma: malignant proliferation of T-regulatory cells. *Blood* 2005;105:1640-1647.

Bonnet DG, Price RM. Statistical inference for a linear function of medians: Confidence intervals, hypothesis testing, and sample size requirements. *Psychological Methods* 2002; 3.

- Booken N, Nicolay JP, Weiss C. Cutaneous tumor cell load correlates with survival in patients with Sézary syndrome. *J Dtsch Dermatol Ges* 2013;11:67-79.
- Braun FK, Fecker LF, Schwarz C, et al. Blockade of death receptor-mediated pathways early in the signaling cascade coincides with distinct apoptosis resistance in cutaneous T-cell lymphoma cells. *J Invest Dermatol* 2007;127:2425–2437.
- Brochet X, Lefranc MP, Guideicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 2008;36:503-508.
- Brüggemann M, van der Velden VHJ, Raff, T, et al. Rearranged T-cell-receptor beta genes represent powerful targets for quantification of minimal residual disease in childhood and adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18:709-719.
- Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, et al. Sézary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood* 2010;116:767-771.
- Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, et al. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Nat Acad Sci USA* 1998;85: 8790-8794.
- Capriotti E, Vonderheid EC, Thoburn CJ, et al. Expression of T-plastin, FoxP3 and other tumor-associated markers by leukemic T-cells of cutaneous T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2008;49:1190 - 1201.
- Capriotti E, Vonderheid EC, Thoburn CJ, et al. Chemokine Receptor Expression by Leukemic T Cells of Cutaneous T-Cell Lymphoma: Clinical and Histopathological Correlations. *J Invest Dermatol* 2007;127:2882–2892.
- Clark RA, Watanabe R, Teague JE, et al., Skin Effector Memory T Cells Do Not Recirculate and Provide Immune Protection in Alemtuzumab-Treated CTCL Patients. *Sci Transl Med* 2012;4:117ra7.
- Criscione VD, Weinstock MA. Incidence of cutaneous T-Cell Lymphoma in the United States, 1973-2002. *Arch Dermatol* 2007;143:854-859.
- Delfau-Larue MH, Laroche L, Wechsler J, et al. Diagnostic value of dominant T-cell clones in peripheral blood in 363 patients presenting consecutively with a clinical suspicion of cutaneous lymphoma. *Blood* 2000;96:2987-2992.
- Dippel E, Klemke D, Hummel M, et al. T-cell clonality of undetermined significance. *Blood* 2001;98:247-248.
- Dummer R, Beyer M, Hymes K. Vorinostat combined with bexarotene for treatment of cutaneous T-cell lymphoma: in vitro and phase I clinical evidence supporting augmentation of retinoic acid receptor/retinoid X receptor activation by histone deacetylase inhibition. *Leuk Lymphoma* 2012;53:1501-8.

- Duvic M, Hymes K, Heald P, et al. Bexarotene Is Effective and Safe for Treatment of Refractory Advanced-Stage Cutaneous T-Cell Lymphoma: Multinational Phase II-III Trial Results. *J Clin Oncol* 2001;19:2456-2471.
- Duvic M, Talpu R, Ni X. Phase 2 trial of oral vorinostat (superoylanilide hyperoxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T- cell lymphoma (CTCL). *Blood* 2007;109:31-9.
- Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, et al. Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev* 1999;13:2658-69.
- Evans AV, Wood BP, Scarisbrick JJ, et al. Extracorporeal photopheresis in Sézary syndrome: hematologic parameters as predictors of response. *Blood* 2001;98: 1298-1301.
- Fantin VR, Loboda A, Paweletz CP, et al. Constitutive Activation of Signal Transducers and Activators of Transcription Predicts Vorinostat Resistance in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Cancer Res* 2008;68: 3785–94.
- Feng B, Jorgensen JL, Jones D, et al. Flow cytometric detection of peripheral blood involvement by mycosis fungoides and Sézary syndrome using T-cell receptor V $\beta$  chain antibodies and its application in blood staging. *Mod Pathol* 2010; 23: 284–295.
- Ferenczi K, Fuhlbrigge RC, Pinkus JL, et al. Increased CCR4 Expression in Cutaneous T Cell Lymphoma. *J Invest Dermatol* 2002;119:1405-1410.
- Fierro MT, Ponti R, Titli S, **et al.** TCR $\gamma$ -chain gene rearrangement by GeneScan: incidence and significance of clonal heterogeneity in Sézary syndrome. *J Invest Dermatol.* 2010;130(9):2312-9.
- Folch G, Lefranc MP. The human T cell receptor beta variable (TRBV) genes. *Exp Clin Immunogenet* 2000;17:42-54.
- Foulc P, N'Guyen JM, Dreno B. Prognostic factors in Sézary syndrome: a study of 28 patients. *Br J Dermatol* 2003;149:1152–1158.
- French LE, Huard B, Wysocka M, et al. Impaired CD40L signaling is a cause of defective IL-12 and TNF- production in Sézary syndrome: circumvention by hexameric soluble CD40L. *Blood* 2005;105:219-225.
- Gniadecki R, Luckowsky A. Monoclonal T-cell dyscrasia of undetermined significance associated with recalcitrant erythroderma. *Arch Dermatol* 2005;141:361-7.
- Heid JB, Schmidt A, Oberle N, Goerdts S, Krammer PH, Suri-Payer E, Klemke CD. FOXP3+CD25- tumor cells with regulatory function in Sézary syndrome. *Journal of Investigative Dermatology* 129(12). 2875-85. 2009.
- Hodak E, Klein T, Gabay B, et al. Familial mycosis fungoides: report of 6 kindreds and a study of the HLA system. *J Am Acad Dermatol* 2005; 2:393-402.
- Humme D, Lukowsky A, Steinhoff M, et al. 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* 2009;129:89–98.

Hwang ST, Janik JE, Jaffe ES, et al. Mycosis fungoides and Sézary Syndrome. *Lancet* 2008;371:945-957.

Jackow CM, McHam JB, Friss A, Alvear J, Reveille JR, Duvic M. HLA-DR5 and DQB1\*03 class II alleles are associated with cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 1996;107:373-376.

Jackow CM, Cather JC, Hearne V, et al. Association of Erythrodermic Cutaneous T-Cell Lymphoma, Superantigen-Positive Staphylococcus aureus, and Oligoclonal T-Cell Receptor-V $\beta$  Gene Expansion. *Blood* 1997;89:32-40.

Jarrouse V, Quereux G, Marques-Briand S, et al. Toll-like receptors 2, 4 and 9 expression in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome). *Europ J Dermatol* 2006;16:636-641.

Jones CL, Wain EM, Chu CC, et al. Downregulation of Fas Gene Expression in Sézary Syndrome Is Associated with Promoter Hypermethylation. *J Invest Dermatol* 2010;130:1116–1125.

Kakinuma T. et al. Thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) in mycosis fungoides: Serum TARC levels reflect the disease activity of mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 2003;48:23-30.

Kamstrup MR, Gjerdrum LM, Biskup E, et al., Notch1 as a potential therapeutic target in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 2010;116(14):2504-12.

Karenko L, Hahtola S, Paivinen S, et al. Primary Cutaneous T-cell-Lymphomas show a deletion or translocation affecting NAV3, the human UNC-53 homologue. *Cancer Res* 2005;65:8101-10.

Kari L, Loboda A, Nebozhyn M, et al. Classification and prediction of survival in patients with the leukemic phase of cutaneous t cell lymphoma. *J Exp Med* 2003;97:1477-1488.

Kelemen K, Guitart J, Kuzel TM, et al. The Usefulness of CD26 in Flow Cytometric Analysis of Peripheral Blood in Sézary Syndrome. *Am J Clin Pathol* 2008;129:146-156.

Kempf W, Christian A. Sander. Classification of cutaneous Lymphomas- an update. *Histo-pathology* 2010;56:57-70.

Kim EJ, Hess S, Richardson SK, et al. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest* 2005;115:798-812.

Kim YH, Liu HL, Mraz-Gernhard S, et al. Long-term Outcome of 525 Patients With Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome. Clinical Prognostic Factors and Risk for Disease Progressio. *Arch Dermatol* 2003;139:857-866.

Klemke CD, Brade J, Weckesser S, et al. The diagnosis of Sézary syndrome on peripheral blood by flow cytometry requires the use of multiple markers. *Br J Dermatol* 2008;159:871-880.

Lamprecht B, Kreher S, Möbs M, et al. The tumor suppressor p53 is frequently non-functional in Sézary syndrome. *Br J Dermatol* 2012;10:1365-2133.



Langerak AW, T Szczepanski, M van der Burg, et al. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia* 1997;11:2192-2199.

Leib ML, Lester H, Braunstein RE, et al. Ocular findings in cutaneous T-cell-lymphoma. *Ann Ophthalmol* 1991;23:182-186.

Lenihan DJ, Alencar AJ, Yang D, et al. Cardiac toxicity of alemtuzumab in patients with mycosis fungoides/ Sézary syndrome. *Blood* 2004;104:655-658.

Li B, Tournier C, Davis RJ, et al. Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *EMBO J* 1999;18:420-32.

Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Gen Res* 1995;4:357-362.

Lundin J, Hagberg H, Repp R, et al. A. Phase 2 study of alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) in patients with advanced mycosis fungoides/Sézary syndrome. *Blood* 2003;101:4267-4272.

Lukowsky A, Muche JM, Möbs M, et al. Evaluation of T-cell Clonality in Archival Skin Biopsy Samples of Cutaneous T-cell Lymphomas Using the Biomed-2 PCR Protocol. *Diagn Mol Pathol* 2010;19:70-77.

Lukowsky A, Muche JM, Sterry W, et al. Detection of expanded T cell clones in skin biopsy samples of patients with Lichen sclerosus et atrophicus by t-cell receptor- $\gamma$  polymerase chain rection assays. *J Invest Dermatol* 2000;115:254-259.

Lukowsky A, Audring H, et al.. Nachweis von monoklonalen T-Zellen mittels TCR- $\gamma$ -PCR bei Mycosis fungoides (MF). *Hautarzt* 1998;49:641-645.

Lutzner M, Edelson R, Schein P, et al. Cutaneous T-Cell Lymphomas: the Sézary Syndrome, mycosis fungoides and related disorders. *Ann Intern Med* 1975;83:534-552.

Manfè V, Biskup E, Johansen P, et al. MDM2 Inhibitor Nutlin-3a Induces Apoptosis and Senescence in Cutaneous T-Cell Lymphoma: Role of p53. *J Invest Dermatol* 2012;132:1487–1496.

Mann H, Whitney D. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annals of mathematical Statistics* 1947;18: 50-60.

Mao X, Lillington M, Czepulkowski B et al.. Molecular cytogenetic characterization of Sezary Syndrome. *Cancer* 2003;36:250-260.

Mao X, Orchard G, Lillington DM, et al. Amplification and overexpression of JUNB is associated with primary cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 2003;101: 1513-1519.

- Marks DI, Vonderheid EC, Kurz BW, et al. Analysis of p53 and mdm-2 expression in 18 patients with Sézary syndrome. *Br J Haematol* 1996;92:890-899.
- Marty M, Prochazkova M, Laharanne E, et al. Primary Cutaneous T-Cell Lymphomas Do not Show Specific NAV3 Gene Deletion or Translocation. *J Invest Dermatol* 2008;128:2458–2466.
- McGinnis K, Shapiro M, Vittorio CC, et al. Psoralen Plus Long-Wave UV-A (PUVA) and Bexarotene Therapy. *Arch Dermatol* 2003;139:71-775.
- Mitchell TJ, Whittaker SJ, John S. Dysregulated Expression of COOH-Terminally Truncated Stat5 and Loss of IL2-Inducible Stat5-Dependent Gene Expression in Sezary Syndrome. *Cancer Res* 2003;63:9048–9054.
- Miyagaki T, Sugaya M, Suga H, et al. IL-22, but Not IL-17, Dominant Environment in Cutaneous T-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res* 2011;17:7529-7538.
- Moretta A, Biassoni R, Bottino C, et al. Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes. *Immunol Rev* 1997;155:105-17.
- Muche JM, Sterry W, Gellrich S, et al. Peripheral blood T-cell clonality in mycosis fungoides and nonlymphoma controls. *Diagn Mol Pathol* 2003;12(3):142-50.
- Narducci MG, Scala E, Bresin A, et al. Skin homing of Sezary cells involves SDF-1–CXCR4 signaling and down-regulation of CD26/dipeptidylpeptidase IV. *Blood* 2006;107:1108-1115.
- Ni X, Hazarika P, Zhang C, et al. Fas Ligand Expression by Neoplastic T Lymphocytes Mediates Elimination of CD8 Cytotoxic T Lymphocytes in Mycosis Fungoides: A Potential Mechanism of Tumor Immune Escape? *Clin Cancer Res* 2001;7:2682–2692.
- Ni X, Zhang C, Talpur R, et al. Resistance to Activation-Induced Cell Death and Bystander Cytotoxicity Via the Fas/Fas Ligand Pathway Are Implicated in the Pathogenesis of Cutaneous T Cell Lymphomas. *J Invest Dermatol* 2005;124:741 –750.
- Novelli M, Merlino C, Ponti R, et al. Epstein-Barr Virus in Cutaneous T-Cell Lymphomas: Evaluation of the Viral Presence and Significance in Skin and Peripheral Blood. *J Invest Dermatol* 2009;129:1556–1561.
- Pancake BA, Zucker-Franklin D, Coutavas EE. The Cutaneous T-cell Lymphoma, Mycosis fungoides, is a human t cell lymphotropic virus associated disease. *J Clin Invest* 1995;95:547-554.
- Picchio MC, Scala E, Pomponi D, et al. CXCL13 Is Highly Produced by Sézary Cells and Enhances Their Migratory Ability via a Synergistic Mechanism Involving CCL19 and CCL21 Chemokines. *Cancer Res* 2008;68:7137–7146.
- Poszepczynska-Guigné E. CD 158k/KIR3DL2 is a new phenotypic Marker of Sézary Cells: Relevance for diagnosis and Follow-Up of Sézary Syndrome. *J Invest Dermatol* 2004;122:820–823.
- Prince HM, Duvic M, Martin A, et al. Phase III Placebo-Controlled Trial of Denileukin Diftitox for Patients With Cutaneous T-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 2010;28:870-1877.

Robins HS, Campregher PV, Srivastava SK, et al. Comprehensive assessment of T-Cell receptor diversity in  $\alpha\beta$  T cells. *Blood* 2009;114:4099-4107.

Rowen L, Koop B, et al.. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta cell receptor locus. *Science* 1996;72:1755-1762.

Russell-Jones R, Whittaker S. Sézary syndrome: diagnostic criteria and therapeutic options. *Semin Cutan Med Surg*2000;19(2):100-8.

Scarisbrick JJ, Woolford AJ, Russell-Jones R, et al. Allelotyping in Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: Common Regions of Allelic Loss Identified on 9p, 10q, and 17p. *J Invest Dermatol* 2001;117:663-670. <sub>A</sub>

Scarisbrick JJ, Whittaker S, Evans AV, et al. Prognostic significance of tumor burden in the blood of patients with erythrodermic primary cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 2001;97:624-630. <sub>B</sub>

Scarisbrick JJ, Woolford AJ, Calonje E, et al. Frequent Abnormalities of the P15 and P16 Genes in Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome. *J Invest Dermatol* 2002;118:493-499.

Sézary A, Bouvrain Y. Erythrodermie avec présence de cellules monstreuses dans le derme et le sang circulant. *Bull Soc Fr Dermatol Syphiligr* 1938;45:254-260.

Shermann SI. Etiology, diagnosis and treatment recommendations for central hypothyroidism associated with bexarotene therapy for cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Lymph* 2003;4:249-252.

Sommer VH, Clemmensen OJ, Nielsen O, et al. In vivo activation of STAT3 in cutaneous T-cell lymphoma: Evidence for an antiapoptotic function of STAT3. *Leukemia* 2004;18:1288–1295.

Steiger, JH. Tests for comparing elements of a correlation matrix. *Psychological Bulletin* 1980;87:245-251

Steinhoff M. Prevalence of genetically defined tumor cells in CD7 as well as CD26 positive and negative circulating T-cell subsets in Sézary syndrome. *Leukemia* 2009;33:88–99.

Steininger A, Möbs M, Ullmann R, et al. Genomic loss of putative tumor suppressor gene E2A in human lymphoma. *J Exp Med* 2011;208:1585-1593.

Su M, Dorocicz I, Dragowska WH, et al. Aberrant Expression of T-Plastin in Sezary Cells. *Cancer Res* 2003;63:7122-7127.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4th edn. Lyon: IARC Press. 2008.

Tancrede-Bohin E, Ionescu MA, de La Salmonière P, et al. Prognostic Value of Blood Eosinophilia in Primary Cutaneous T-Cell Lymphomas. *Arch Dermatol* 2004;140:1057-1061.

- Trautinger F, Knobler R, Willemze R et al.. EORTC consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides/ Sézary Syndrome. *Eur J Cancer* 2006;42: 1014-1030.
- Trotter MJ, Whittaker SJ, Orchard GE et al.. Cutaneous histopathology of Sézary Syndrome: a study of 41 cases with a proven circulating cell clone. *J Cutan Pathol* 1997;24:286-291.
- Vallejo AN, Nestel AR, Schirmer M, et al. Aging-related deficiency of CD28 expression in CD4+ T cells is associated with the loss of gene-specific nuclear factor binding activity. *J Biol Chem*. 1998;3;273(14):8119-29.
- Van der Velden, VHJ, Cazzaniga, G, Schrauder, A, et al. Analysis of minimal residual disease by IG/TCR gene rearrangements: guidelines for the interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007;21:604-611.
- Van Dongen, JJM, Langerak, AW, Brüggemann, M, et al. 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* 2003;7:2257-2317.
- Van Dongen J, Comans-Bitter M, et al.. Development of human T lymphocytes and their thymus dependency. *Thymus* 1990;16:207-234.
- Van Doorn R, Dijkman R, Vermeer MH, et al. A Novel Splice Variant of the Fas Gene in Patients with Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Cancer Res* 2002;62:5389–5392.
- Vermeer MH, van Doorn R, Dijkman R, et al. Novel and Highly Recurrent Chromosomal Alterations in Sézary Syndrome. *Cancer Res* 2008;68:2689-2698.
- Vidulich KA, Talpur R, Bassett RL, et al. Overall survival in erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: an analysis of prognostic factors in a cohort of patients with erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma. *Intern J Dermatol* 2008;48:243–252.
- Vonderheid EC, Bernengo MG, Burg G et al. Update on erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: report of the International Society for Cutaneous Lymphomas. *J Am Acad Dermatol* 2003;46:95-106.
- Vonderheid E, Pena J, Nowell P. Sézary cell counts in erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: Implications for prognosis and staging. *Leuk Lymph* 2006; 47:1841 – 1856.
- Vonderheid EC. On the Diagnosis of erythrodermic T-cell Lymphoma. *J Cutan Pathol* 2006;33:27-42.
- Vowels BR, Cassin M, Vonderheid EC, et al. Aberrant cytokine production by Sezary syndrome patients: cytokine secretion pattern resembles murine Th2 cells. *J Invest Dermatol* 1992;99:90–94.
- Vowels BR, Lessin SR, Cassin M, et al. Th2 cytokine mRNA expression in skin in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 1994;103:669–673.

- Wagner UG, Koetz K, Weyand CM, et al. Perturbation of the T cell repertoire in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;24;95(24):14447-52.
- Wasik MA, Vonderheid EC, Bigler RD, et al. Increased serum concentration of the soluble interleukin-2 receptor in cutaneous T-cell lymphoma. Clinical and prognostic implications. *Arch Dermatol* 1996;132:42-47.
- Wechsler J, Bagot M, Nikolova M, et al. Killer Cell immunoglobulin-like receptor expression delineates in situ Sezary Syndrome lymphocytes. *J Pathol* 2003;199:77-83.
- Weinstock MA, Gardenstein B. Twenty-year trends in the reported incidence of mycosis fungoides and associated mortality. *Am J Pub Health* 1999;89:1240-1244.
- Whittacker SJ, Foss FM. Efficacy and tolerability of currently available therapies for the mycosis fungoides and Sezary syndrome variants of cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Treat Rev* 2007;33:146-160.
- Wieselthier JS, Koh HK. Sézary syndrome: diagnosis, prognosis and critical review of treatment options. *J Am Acad Dermatol* 1990;22:381-401.
- Willemze R, Jaffe ES, Burg G et al.. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005;105:3768-3785.
- Wood GS, Schaffer JM, Boni R, et al. No Evidence of HTLV-I Proviral Integration in Lymphoproliferative Disorders Associated with Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Am J Pathol* 1997;115:667-673.
- Wu D, Sherwood A, Fromm JR et al. High-throughput sequencing detects minimal residual disease in acute T lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*. 2012;16;4:134ra63.
- Wu J, Nihal M, Siddiqui J, et al. Low FAS/CD95 Expression by CTCL Correlates with Reduced Sensitivity to Apoptosis that Can Be Restored by FAS Upregulation. *J Invest Dermatol* 2009;129:1165–1173.
- Wysocka M, Zaki MH, French LE, et al. Sézary syndrome patients demonstrate a defect in dendritic cell populations: effects of CD40 ligand and treatment with GM-CSF on dendritic cell numbers and the production of cytokines. *Blood* 2002;100:3287-3294.
- Yamanaka KI, Clark R, Rich B, et al. Skin-derived interleukin-7 contributes to the proliferation of lymphocytes in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 2006;107:2440-2445.
- Yawalkar N, Ferenczi K, Jones DA, et al. Profound loss of T-cell receptor repertoire complexity in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 2003;102:4059-4066.
- Zinzani PL, Alinari L, Tani M, et al. M. Preliminary observations of a phase II study of reduced-dose alemtuzumab treatment in patients with pretreated T-cell lymphoma. *Haematologica* 2005;90:702-703.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Kerstin Wehrheim, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Möglichkeiten und Grenzen der klonspezifischen, quantitativen Real- Time- PCR bei Patienten mit Sézary Syndrom selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **Curriculum Vitae**

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

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt meiner Familie und meinen außergewöhnlichen Freunden, welche mir durch Ihre liebevolle und kraftschenkende Unterstützung, die Verwirklichung dieser Arbeit möglich machten.

Ebenso danke ich Herrn PD Dr. med. Chalid Assaf, Herrn Dr. rer. nat. Markus Moebs und Linda El-Ahmad für die vielen Anregungen, konstruktive, ausdauernde Skepsis und professionelle Hilfe, welche diese Arbeit zu einem lehrreichen persönlichen Schritt machten.