

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

**DISSERTATION**

Methoden der Klonalitätsanalyse von kutanen T-Zell-Lymphomen –  
Optimierung vorhandener PCR-Techniken

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Staffan Lars Mikael Vandersee

aus Malmö (Schweden)

Gutachter: 1. Priv.Doz. Dr. rer. nat. A. Lukowsky  
2. Prof. Dr. med. R. Stadler  
3. Prof. Dr. med. H. Kerl

**Datum der Promotion: 19.09.2008**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	7
1.1	Historischer Überblick, Nomenklatur und Definition kutaner T-Zell-Lymphome	7
1.2	Die Diagnostik primärer CTCLs	8
1.3	Immunphänotypische Aspekte der Tumorzellen	8
1.4	Immunphänotypische Aspekte in der Pathogenese	9
1.5	Der T-Zell-Rezeptor in Struktur und Ontogenese	11
1.6	Weitere onkogenetische Charakteristika / genetische Abberationen der T-Zellen kutaner Lymphome	14
1.7	Molekulargenetische Nachweismethoden der T-Zell-Klonalität	15
1.7.1	PCR als Methode zur Amplifikation genomischer DNA	16
1.8	Elektrophoresetechniken zur Auftrennung amplifizierter DNA	18
1.9	Verschiedene Arten von Elektrophoreseträgersystemen für PCR-Produkte	19
1.9.1	Agarosegele	20
1.9.2	Polyacrylamidgele (PAGE)	20
1.9.3	Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese (TGGE) und denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)	21
1.9.4	Mutation-Detection-Enhancement-Gelelektrophorese (MDE®)	21
1.9.5	Klonalitätsnachweis durch Gelelektrophoresen	21
1.9.6	Kapillar-Elektrophorese (CE)	22
1.10	DNA-Fragmentanalyse als Instrument zum Nachweis genomischer Klonalität	23
<b>2</b>	<b>Problem- und Zielstellungen</b>	27
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	28
3.1	Geräte	28
3.2	Reagenzien	28
3.3	Methoden	29
3.3.1	DNA-Isolierung/Aufreinigung	29
3.3.1.1	Isolierung der DNA aus Paraffinschnitten, Routinemethode	29
3.3.1.2	Aufschluss von DNA aus Paraffinschnitten unter Einsatz des Roche® „High Pure PCR Template Preparation Kit“, Cat. No. 1 796 828	29
3.3.1.3	Dichtegradienten-Isolierung und DNA-Aufschluss aus mononukleären Zellen des Blutes von Gesunden	29
3.3.1.4	Agarosegelelektrophorese	30
3.3.1.5	Fragmentanalyse	30

3.4	PCR	31
3.4.1	Konsensusprimer ( $\gamma$ -1)-PCR	31
3.4.2	$\gamma$ -2-PCR	32
3.4.3	$\gamma$ -3-PCR	32
3.5	Ablauf der Untersuchungen und Materialien	33
3.5.1	Methodenmodifikationen	33
3.5.1.1	Vergleich von Extraktionsmethoden	33
3.5.1.2	PCR-Protokollmodifikation	35
3.5.1.3	Farbstoffauswahl	37
3.5.2	Methodenanwendung	37
3.5.2.1	Anwendung des in Kap. 3.5.1 erarbeiteten PCR-Protokolls	
	a. gesicherte Lymphome	38
	b. lymphomähnliche Dermatosen	38
	c. frühe Stadien von Lymphomen	39
	d. Rezidivdiagnostik	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	41
4.1	Versuch I: Vergleich verschiedener DNA-Aufschlussverfahren	41
4.1.1	PCR nach DNA-Isolierung mit der Routinemethode und einem kommerziellen Kit (Roche® „High Pure PCR Template Preparation Kit“)	41
4.1.2	Zusätzlicher Vergleich der Ausbeute mittels Verwendung des Qiagen®-„QIAmp DNA Blood Midi Kit“	42
4.2	Versuch II: Optimierung des als Routinediagnostik verwendeten PCR-Protokolls	42
4.2.1	Vorversuch zur Stichprobenauswahl	42
4.2.2	PCR-Protokollmodifikation	43
4.3	Versuch III: Farbstoffauswahl	44
4.4	Versuch IV: Anwendung des modifizierten PCR-Protokolls bei gesicherten Lymphomen	46
4.5	Versuch V: Anwendung des modifizierten PCR-Protokolls bei lymphomähnlichen Dermatosen	50
4.6	Versuch VI: Anwendung des modifizierten PCR-Protokolls bei frühen Stadien von Lymphomen	51

4.7	Versuch VII: Anwendung des modifizierten PCR-Protokolls bei Patienten, mit zunächst lymphompositiver und in späteren Proben abweichender histologischer Diagnose	54
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
5.1	Methoden zur Diagnostik von Lymphomen im Vergleich	56
5.2	Molekularbiologisch gestützte Lymphomdiagnostik	59
5.3	PCR-Grundlagen in der Lymphomdiagnostik	60
5.4	Kapillarelektrophorese und Fragmentanalyse	61
5.5	Ergebnisdiskussion	62
5.5.1	Modifikation der Amplifikationsprotokolle	63
5.5.2	Farbstoffvergleich	64
5.5.3	Gesamtbeurteilung der Vorversuche	66
5.5.4	Methodentest an Lymphomstichprobe	66
5.5.5	Methodentest an der Stichprobe lymphomähnlicher Dermatosen	67
5.5.6	Methodentest zur Beurteilung der Frühdiagnosepotenz	68
5.5.7	Beurteilung des Vermögens zur Spät- bzw. Rezidivdiagnostik	69
5.6	Abbauprozesse bei der Generierung genomischer DNA	71
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>75</b>

## **Verzeichnis der Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
Bp	Basenpaar
C	constant
CLA	kutanes lymphozytenassoziiertes Antigen
CTCL	kutanes T-Zell-Lymphom
CD	cluster of differentiation
cons	konsensus
D	diversity
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
HLA	humanes Leukozytenantigen
ICAM	intercellular adhesion molecule
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
LFA	lymphocyte function-associated molecule
MF	Mycosis fungoides
NHL	non-Hodgkin-Lymphom
NK	natürliche Killerzellen
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
Tab.	Tabelle
TARC	thymus and activation-regulated chemokine
TCL	T-Zell-Lymphom
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGGE	Temperaturgradientengelelektrophorese
TH1, TH2	T-Helferzelle, Typ 1, Typ 2
TNF	Tumornekrosefaktor
V	variable

## **Tabellarischer Lebenslauf**

**Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit  
nicht mit veröffentlicht

## **Erklärung**

„Ich, Staffan Vandersee, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Methoden der Klonalitätsanalyse von kutanen T-Zell-Lymphomen – Optimierung vorhandener PCR-Techniken“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

15.01.08  
Datum

Staffan Vandersee  
Unterschrift

## **Danksagung**

Mit dem Abschluss meiner Arbeit möchte ich insbesondere meinem Betreuer Herrn Privatdozent Dr. Ansgar Lukowsky danken, für seine Geduld, für seinen Rat, für seinen Einsatz, der für die Entstehung dieser Arbeit maßgeblich war. Ferner möchte ich Herrn Dr. med. Markus Muche für die Überlassung des bearbeiteten Themas danken.

Nicht zuletzt möchte ich den Wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen Frau Katja Schreiber, Frau Sarina Richter und Frau Katharina Dijkstra für die Hilfe bei der Laborarbeit danken.

Und zu guter Letzt danke ich meiner Frau für Ihr Antreiben, Ihr Lektorat und den Glauben an einen guten Ausgang.