1 Einleitung

1.1 Historischer Überblick, Nomenklatur und Definition kutaner T-Zell-Lymphome

Kutane T-Zell-Lymphome stellen eine im Hinblick auf Symptomatik, Histo(patho)logie und Prognose heterogene Untergruppe der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) dar, wobei die Mycosis fungoides (MF) unter diesen Entitäten die am häufigsten anzutreffende Dermatose ist. Die Inzidenz der CTCL insgesamt wird auf ca. 0,5-1/100000 geschätzt[1], damit sind sie die zweithäufigste Manifestationsform extranodaler Lymphome. Gemeinsame Eigenschaft aller in dieser Definition eingeschlossenen Entitäten ist eine unregulierte klonale Expansion hautspezifischer T-Lymphozyten. Insbesondere aufgrund der raschen Entwicklung neuer diagnostischer Methoden unterlag die Klassifikation der CTCL in den letzten Jahrzehnten einem stetigen Wandel. Für den europäisch/amerikanischen Raum kann zurzeit die überarbeitete, unten aufgeführte EORTC-Klassifikation primär kutaner Lymphome[2, 3] als repräsentativ angesehen werden.

***Tabelle 1*:** EORTC-Klassifikation primär kutaner Lymphome (Stand 2005)
Kutane T-Zell- und NK-Zell-Lymphome
Mycosis fungoides MF-Varianten und Subtypen Follikulotropische MF Pagetoide Retikulose Granulomatous slack skin
Sézary Syndrom
Adulte T-Zell-Leukämie/-Lymphome
Primär kutane CD30+ lymphoproliferative Störungen Primär kutanes anaplastisches großzelliges Lymphom Lymphomatoide Papulose
Subkutanes pannikulitis-ähnliches T-Zell-Lymphom
Extranodales NK/T-Zell-Lymphom, nasaler Typ
Primär kutanes peripheres T-Zell-Lymphom, unspezifiziert Primär kutanes aggressives epidermotropisches CD8+ T-Zell Lymphom (provisorisch) Kutanes / T-Zell-Lymphom (provisorisch) Primär kutanes CD4+ klein-mittelgroßes pleomorphes T-Zell-Lymphom (provisorisch)
Kutane B-Zell-Lymphome
Primär kutanes Marginalzonen B-Zell-Lymphom
Primär kutanes Follikelzentrums-Lymphom
Primär kutanes diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom der unteren Extremität
Primär kutanes diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, andere intravaskuläre Großzellige B-Zell-Lymphome
Präkursor/hämatologische Neoplasien CD4+/CD56+ hämatodermische Neoplasien (blastisches NK-Zell-Lymphom)

Der Begriff Mycosis fungoides stammt aus dem deskriptiven Zeitalter der Dermatologie, er wurde von Alibert 1806 geprägt[4]. Heute sollte er – streng genommen – nur noch bei dem von Bazin 1870[5] beschriebenen dreiphasigen Verlauf mit Ekzem-, Plaque- und Tumorstadium verwendet werden, dieser wird daher auch als „klassischer“ Typ oder „Alibert-Bazin-Typ“ bezeichnet. Die Krankheit verläuft langsam progredient (Fünfjahresüberlebensrate 87%[2]) und wird daher zu den niedrigmalignen NHL gerechnet.

1.2 Die Diagnostik primärer CTCLs

Bis heute beruht die definitive Diagnose einer Mycosis fungoides auf der Korrelation des klinischen Verlaufes mit makro- oder mikroskopisch erfassbaren dermatomorphologischen Charakteristika. Histologisches Korrelat der Dermatose im Ekzemstadium sind bandförmige Infiltrate kleiner bis mittelgroßer epidermotroper T-Zellen mit cerebriformen Nuklei im Stratum papillare, typischerweise vergesellschaftet mit einer variierenden Anzahl verschiedenster Entzündungszellen[6]. Gruppen neoplastischer Zellen in tieferen Hautschichten und Pautrier´sche Mikroabszesse sind diagnostisch wegweisend, letztere aber selten anzutreffen. In späteren Stadien der Erkrankung geht der Epidermotropismus zunehmend verloren, hier herrschen noduläre Infiltrate in tieferen Hautschichten vor, während Zellatypien an Häufigkeit zunehmen[7]. Eventuell kann eine Transformation der Tumorzellen in ein großzelliges anaplastisches TCL (s. Tabelle 1) mit rascher Progredienz und schlechter Prognose erfolgen. Gleichzeitig findet eine hämatogene Dissemination maligner T-Zellen statt – diese sogar in früheren Krankheitsstadien als lange Zeit angenommen[8]. Neben dem „klassischen“ Typ existieren weitere Varianten, die sich jedoch eher durch die Morphe der Hautveränderungen (bullös, mit Pigmentveränderungen) als durch den Verlauf unterscheiden und daher von der EORTC dem klassischen Verlaufstyp zugeordnet werden.

1.3 Immunphänotypische Aspekte der Tumorzellen

Während der Reifung, Prägung und Selektion von T-Lymphozyten findet eine entwicklungsabhängig variable Expression von Oberflächenmolekülen statt, anhand derer die Zuordnung zu unterschiedlichen Reifestadien durch Antikörpernachweis dieser Moleküle möglich ist.
Die Tumor-T-Zellen der Mycosis fungoides exprimieren überwiegend CD-3, CD-4, CD45RO neben den Pan-T-Zellmarkern CD-2, CD-3 und CD-5, während CD-8 und CD-30 in der Regel fehlen (in seltenen Fällen sind die Zellen CD-8$^+$ und CD-4$^-$).
Aufgrund der vorherrschenden Rezeptorenausstattung werden Mycosis fungoides Tumorzellen zu den T-Helferzellen gerechnet. Die fehlende CD-30 Expression (ein Antigen aus der TNF-Rezeptorfamilie) grenzt sie von den großzelligen TCL ab und ist daher bei Verdacht auf

die prognostisch ungünstige o.g. Transformation in ein großzelliges Lymphom ein wichtiger prognostischer Marker[9]. Entgegen früherer Ansicht scheinen neuere Arbeiten zu zeigen, dass trotz der qualitativ (bis auf CD-7) normalen Antigenexpression offensichtlich immunphänotypische Abweichungen im Expressionsmuster vorliegen[10]. CD-7 ist ein früher T-Zell-Linienmarker, dessen verminderte Expression insbesondere bei Sézary-Syndrom- und MF-Zellen seit längerem bekannt ist[11]. Diese Defizienz wird als typisch für maligne lymphatische Erkrankungen angesehen, wenn auch eine natürliche Abnahme der Expression mit dem Lebensalter nachgewiesen werden konnte[12].
Im Verlauf der Krankheit kommt es häufig zu einem Verlust eines oder mehrerer Oberflächenantigene (häufig CD-4, aber auch CD-2 und CD-3), wobei dies im Gegensatz zur Zunahme von Zellatypien kein sicherer prognostischer Marker zu sein scheint[13].
Jüngere Studien zeigen darüber hinaus die Beteiligung noch weiterer Chemokine und Rezeptoren an Pathogenese und Progression der Krankheit: so zeigen Kakinuma et al. einen stadienabhängigen Anstieg des Serumspiegels von TARC (thymus and activation-regulated chemokine)[14]. Ein neuer phänotypischer Marker maligner T-Zellen des Sézary-Syndroms ist das Oberflächenmolekül CD-158k, das auf nicht klonal expandierenden Zellen nicht exprimiert zu werden scheint[15, 16]. Schließlich ist die fehlende Expression von CD-26 ein konstanter Befund bei Sézary-Zellen, der bei dieser Neoplasie zuverlässiger als die CD-7-Expression zu sein scheint[17]. So findet man sehr wohl häufig CD-3^+,CD-7^+,CD-26^--Zellen bei Sézary-Patienten.

1.4 Immunphänotypische Aspekte in der Pathogenese

Im Folgenden sei auf weitere Aspekte der Pathogenese eingegangen, die diese als langsam voranschreitenden Prozess charakterisieren und so die Wichtigkeit und Möglichkeit einer frühen Diagnose unterstreichen. Wichtiges pathogenetisches Merkmal der kutanen Lymphome ist die Migration der Tumorzellen in die oberflächlichen Hautschichten, eine Eigenschaft, die z.B. im Fall der Mycosis fungoides erst in späten Krankheitsstadien und zunehmender Entdifferenzierung verloren geht. Der Mechanismus dieses Epidermotropismus ist in seiner Komplexität noch nicht geklärt, einige Einzelaspekte sind nunmehr jedoch untersucht. Die Existenz des lymphozytenständigen CLA (kutanes lymphozytenassoziiertes Antigen) ist seit längerem bekannt. Dieses wird als die Kohlenhydratmodifikation des PSGL-1 (P-Selektin-Glykoproteinligand 1)[18] angesehen und vermittelt über eine Interaktion mit dem E-Selektin ELAM-1 (= CD-62e, endotheliales Lymphocytenadhäsionsmolekül 1)[19,20] das für die Extravasation wichtige Rolling der Helferzellen an der Intima kutaner Venolen. Physiologischerweise unterliegt die Expression dieses Rezeptors einer Regulation durch IL-4 (Herabregulierung) und IL-12 (verstärkte Expression) über eine noch nicht gänzlich

verstandene Vermittlung durch intrazelluläre Glucosyl-, Fucosyl- und Galactosyltransferasen[21]. Der Expressionsgrad von CLA auf maligne transformierten T-Lymphozyten und die Krankheitsausdehnung scheinen hierbei direkt miteinander zu korrelieren[22]. Weiterhin scheinen auto- und parakrine Chemokinsekretionen für die T-Zell-Migration verantwortlich zu sein: epidermale Lymphominfiltrate sezernieren Interferon-γ (IFN-γ), ein für die T-Zell-vermittelte Abwehr integrales Cytokin.

Sarris et al.[23] zeigten, dass dieses Zytokin in den Keratinozyten der Epidermis die Expression von IP-10 (IFN-γ-induzierbares Protein 10) stimuliert. IP-10 selbst ist ein Chemotaxin für CD-4$^+$ Helferzellen, unterhält also seinerseits eine stetige weitere Migration von T-Zellen in die Epidermis. Ferner induziert IFN-γ die Expression von ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül) auf den Keratinozytenoberflächen. ICAM-1 ist der Ligand für das auf allen T-Zellen exprimierte LFA-1, einem Integrin, welches normalerweise den Kontakt zwischen T-Zellen und Endothel- sowie antigenpräsentierenden Zellen vermittelt[24]. Auch IL-8 als allgemeines Lymphozytenchemokin ist in Hautinfiltraten von CTCL in größerer Konzentration enthalten, als dies in normalem oder auch entzündlich verändertem Gewebe der Fall ist.

Entscheidend für die Pathogenese der CTCL ist darüber hinaus ein besonderes Chemokinmilieu in der Epidermis, das von allen physiologischerweise dort vorhandenen Zellen erzeugt wird. Hierzu gehören neben den bereits erwähnten Keratinozyten vor allem antigenpräsentierende Zellen (APC), die einerseits über den Kontakt zu T-Zellen mittels einer MHC-II-T-Zell-Rezeptor-Interaktion in diesen eine autokrine IL-2 Sekretion verursachen, andererseits selbst IL-1 produzieren. Beide Zytokine spielen eine entscheidende Rolle für die T-Zell-Expansion und Differenzierung[25]. Diese Mechanismen sind im Hinblick auf einen Einfluss auf den Epidermotropismus der CTCL auch bereits länger bekannt und untersucht[26].

Schlussfolgerung hieraus ist daher, dass erst wenn aufgrund von Entdifferenzierungsvorgängen im Verlauf der Erkrankung die autokrine Wachstumsstimulation durch IL-2 auch ohne Beteiligung von Drittzellen (vornehmlich APC) erfolgt, Tumorzellen in extrakutane Organe metastasieren können. Diese autokrine Sekretionsmodaliät bietet jedoch auch die Möglichkeit eines therapeutischen Eingreifens in die Krankheitsprogression durch rezeptormediierte Zellintoxikation mittels rekombinanter Fusionsproteine aus z.B. IL-2 und Diphterietoxin[27].

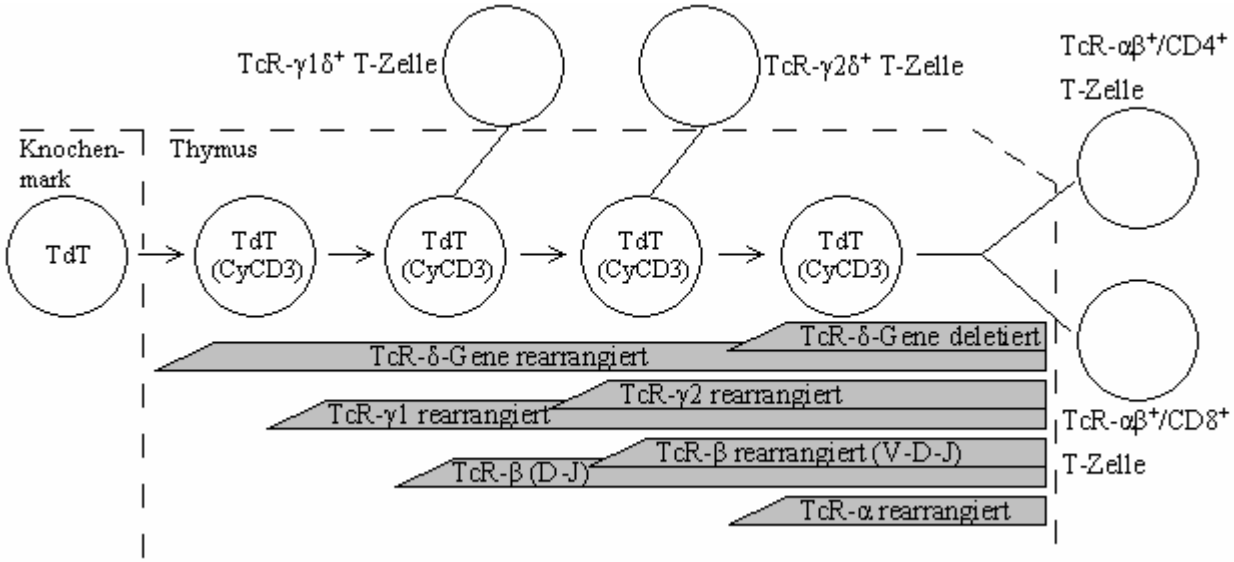
Die Hypothese, dass eine unregulierte Zytokinproduktion Charakteristikum fortgeschrittenerer Erkrankungsstadien ist, wird ferner durch die Beobachtung gestützt, dass in MF-Plaques erhöhte Spiegel sekretorischer Immunglobuline wie IgA und IgE gefunden werden[28]. Dies führt man u.a. auf einen hohen IL-4-Spiegel zurück, wie man ihn besonders im Tumorstadium der MF findet. IL-4 ist neben der Bindung von CD-40 der B-Zelle an T_H2-ständiges CD-40L ausschlaggebendes Stimulanz für die B-Zell-Differenzierung und Immunglobulinsekretion und wie Dummer[29] et al. zeigen konnten, dominiert bei den Tumorzellen kutaner Lymphome ein T_H2-Zellen entsprechender Immunphänotyp.

1.5 Der T-Zell-Rezeptor in Struktur und Ontogenese

Der T-Zell-Rezeptor stellt im nichtkovalenten Verbund mit dem signaltransduzierenden CD-3-Protein das für die Funktion und Rolle der T-Zellen in der adaptiven Immunantwort ausschlaggebende Zelloberflächenmolekül dar. Es handelt sich um ein transmembranales, durch Disulfidbrücken verbundenes Heterodimer aus zwei von vier möglichen Einzelketten, wobei jeweils α:β- (zu 85-98% auf reifen T-Zellen im peripheren Blut)[30] bzw. γ:δ-Kettendimere gebildet werden. Hierbei ähnelt die extrazelluläre Komponente des Rezeptors, in der die antigenbindende Region lokalisiert ist, dem membrangebundenen Fab-Fragment eines Immunglobulins. Die beiden (α:β bzw. γ:δ) Zellspezies unterscheiden sich außer in der Struktur des Rezeptorgens auch in der Expression der Korezeptoren, ihren Aufgaben und der anatomischen Verteilung. Nicht zuletzt liegt ein Unterschied aber auch im Zeitpunkt der für die Entstehung des endgültigen Rezeptorgens unten noch zu nennenden Umlagerungen (schematische Darstellung siehe Abb. 1, nach [31]). Auffällig ist hierbei unter anderem, dass diese Prozesse bereits vorgeburtlich einsetzen und ferner nicht organgebunden sind, sondern sowohl im Knochenmark als auch konsekutiv im Thymus stattfinden.

Abb. 1

T-Zelldifferenzierung und konkomitante Umlagerungsprozesse

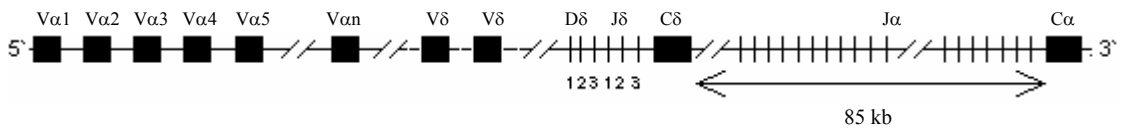


Hypothetisches Schema der humanen T-Zelldifferenzierung mit Darstellung der linear-sequentiell erfolgenden T-Zell-Rezeptorgenumlagerungen. Die horizontalen Balken stellen die hierarchische Reihenfolge der Rearrangements, abgeleitet nach T-ALL und humanen $\gamma\delta^+$-T-Zell-Klonen, dar. Die Unterteilung des γ-Rezeptorgens in 1 und 2 trägt dem Umstand Rechnung, dass dessen C1-Region und C2-Regionen nacheinander rearrangieren. Dazwischen liegt im zeitlichen Ablauf das D-J-Joining des β-Gens. Erklärung: TdT = lymphatische Stammzelle, TdT (CyCD3) = (Pro-)Thymozyt. Nach [30].

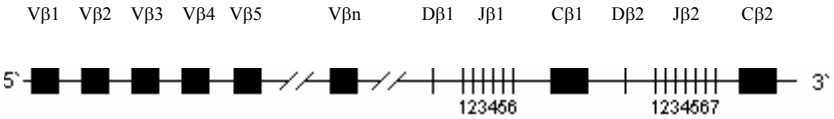
Die Einzelketten weisen jeweils konstante (C), variable (V), verbindende (J) sowie im Fall der β- bzw. δ-Ketten D (Diversity)-Segmente auf, deren genetische Information in der Keimbahn auf verschiedenen Chromosomen kodiert wird. Hierbei liegen verschiedene V-, D- und J-Segmente in von Gen zu Gen unterschiedlich großer Zahl vor (s. Abb. 2). Neben diesen funktionellen Genen existieren zusätzlich noch funktionslose Pseudogene (mit Ψ gekennzeichnet). Im menschlichen Genom finden sich auffällig mehr α- bzw. β-Segmente (>50 Vα, 65 Vβ / 55 Jα, 13 Jβ) als rekombinatorische γ- oder δ-Genabschnitte (8Vδ, 14Vγ / 4Jδ, 5Jγ)[32, 33, 34, 35], wobei dem γ (wie auch dem α)-Rezeptorgenom D-Segmente gänzlich fehlen. Hieraus resultiert eine deutlich höhere Anzahl unterschiedlicher Rekombinationsmöglichkeiten für den α:β-Komplex. Die theoretisch erreichbare Anzahl genetisch diverser Rezeptordimere wird jedoch aus zwei Gründen nicht realisiert: erstens sind in den oben genannten Angaben Pseudogene, welche nicht an den Rearrangements partizipieren, mitberücksichtigt; ferner werden bestimmte Kombinationen der Segmente gegenüber anderen bevorzugt. So fällt am Beispiel des Gamma-Rezeptorgens auf, dass von den 14 vorhandenen V-Segmenten in reifen T-Zellen lediglich sechs rearrangiert vorliegen (Vγ 2-5 sowie 8 und 9)[36]. Dennoch erlaubt dieser Reorganisationsprozess, zusammen mit zufälligen Nukleotiddeletions- (trimming) bzw. Insertionsvorgängen (vermittelt durch die Terminale-Desoxynukleotid-Transferase TdT) in den junktionalen Regionen ein geschätztes Diversitätspotential von mehr als 10^{12} Kombinationen[37, 38]. Der letztere Prozess stellt für den γ:δ-Rezeptorkomplex die wesentliche Grundlage für die Rezeptorvielfalt dar, da durch den oben erwähnten Mangel an vielen verschiedenen V- oder J-Segmenten (D-Segmente fehlen im γ-Rezeptorgen) sonst eine breite Antigenspezifität kaum gewährleistet werden könnte.

Abb. 2

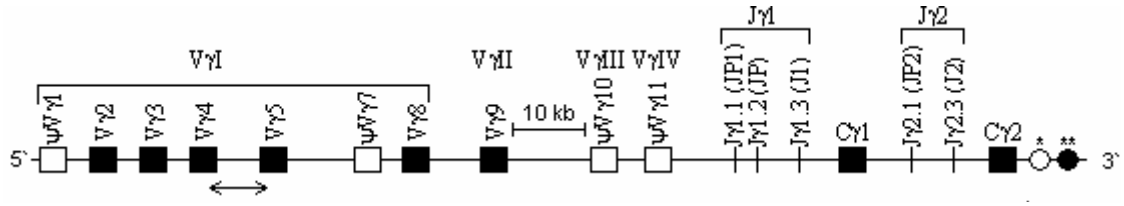
TCR-α- und TCR-δ-Gene[32]



TCR-β-Gene[32]



TCRG Genkomplex (#7p14)[32]**:**

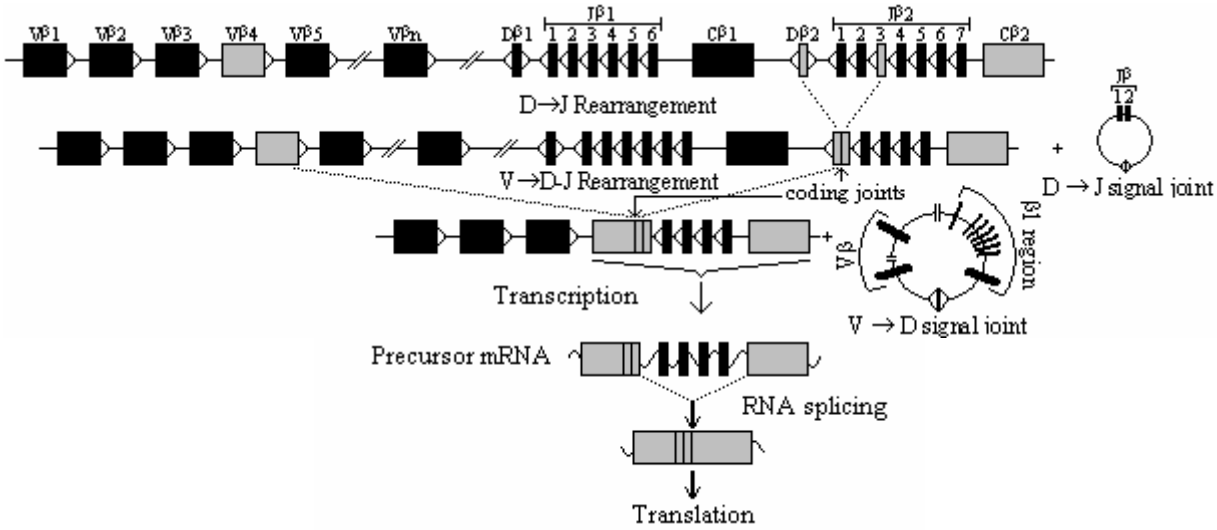


*: silencers **: enhancers

Als weitere Besonderheit ist, wie oben zu sehen, das Genmaterial der δ-Kette auf Chromosom 14q11.2 zwischen Teilen (Vα und Jα) des α-Kettengens eingefügt und geht daher bei den für die T-Zellreifung notwendigen Umlagerungsprozessen verloren. Diese während der T-Zell-Ontogenese auftretenden Umlagerungen (Rearrangements) sind für die große Vielfalt an Kombinationen des variablen Teils der T-Zell-Rezeptorketten verantwortlich und in Abb. 2 exemplarisch dargestellt. Sie beginnen bereits pränatal in mehreren Wellen, wobei – wie oben erwähnt – die γ:δ-T-Zellen zuerst ausreifen. Im Verlauf des Rearrangements lagern sich grundsätzlich zuerst D- an J-Segmente, anschließend lagert sich dieser Komplex an ein V-Segment an (s. Abb. 3). Im einzelnen erfolgt dieser Vorgang als eine nichthomologe Annäherung zweier, die Einzelsegmente flankierender, Nukleotidheptamere unter Bildung einer Schleife in einer bestimmten Konstellation. Damit die zur Exzision der intersegmentalen DNA nötigen Enzyme wirksam werden können, muss diese Schleife eine Signalsequenz beinhalten. Diese wird durch zwei nichtkodierende Nukleotidnonamere, die ihrerseits von zwei Spacern getrennt sind, formiert (s. Abb. 4). Für die Erkennung durch die spezifischen Endonukleasen ist ferner erforderlich, dass diese Spacer eine unterschiedliche Länge von 12 bzw. 23 bp aufweisen.

Abb. 3

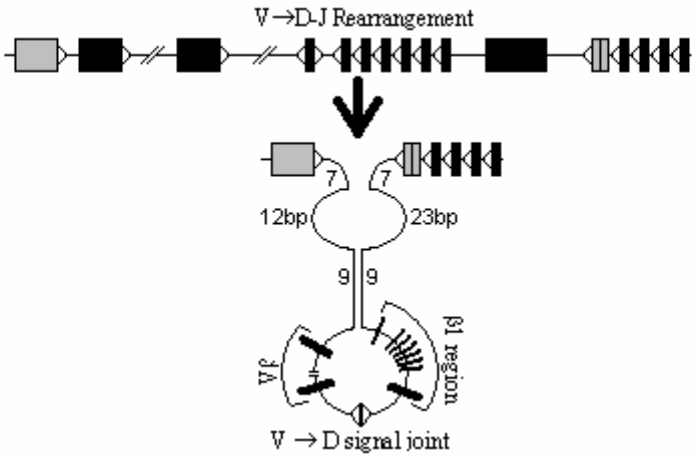
Rearrangement, Transkription und Translation am Beispiel des TCRB-Gens[39]



Schematische Darstellung der Rearrangementsequenz am Beispiel des TCRB-Gens, mit initialer Dβ2-Jβ2.3- und anschließender Vβ4-Anlagerung. Ferner sind die hierbei entstehenden D-J- bzw. V-D-Signalkomplexe dargestellt (Erläuterungen siehe Text)

Abb. 4

Rearrangement, am Beispiel des TCRB-Gens, Bildung des Signal joints[33]



Ergänzung zu Abb. 3 mit Darstellung der im Rahmen des Rearrangements stattfindenden essentiellen Schleifenbildung (Erläuterungen siehe Text) und Abspaltung des sog. „signal joint“

Nach Abschluss der Umlagerungsprozesse erfolgt in der Regel die Membranexpression der kodierten Rezeptoren. Aufgrund des oben gesagten ist daher ein bestimmter Lymphozyt zur Expression nur eines Rezeptors in der Lage. Zusammen mit der erwähnten großen Diversität der antigenbindenden Region des Rezeptors ergibt sich eine geringe Wahrscheinlichkeit des gleichzeitigen Vorliegens genetisch identischer Lymphozyten in einer Testpopulation. Daher ist der (durch Einsatz unten noch zu nennender Techniken) Nachweis monotypischer Rearrangements eines größeren Anteils gewonnener Lymphozyten ein indirekter Nachweis für Klonalität und maßgeblich für die Diagnosestellung vieler lymphoproliferativer Erkrankungen. Bei den kutanen T-Zell-Lymphomen hat sich zudem gezeigt, dass der Klonalitätsnachweis von Hautläsionen gegenüber z.B. Lymphknoteninfiltraten den höchsten prognostischen Wert besitzt[40].

1.6 Weitere onkogenetische Charakteristika / genetische Abberationen der T-Zellen kutaner Lymphome

Analog zu Leukämien, bei welchen regelmäßig zum Teil erhebliche chromosomale Abberationen im Verlauf der Erkrankung kumulieren, finden sich solche Defekte auch bei kutanen T-Zell-Lymphomen. Insbesondere beim Sézary-Syndrom imponieren häufig Deletionen des Chromosoms 10 sowie des kurzen Arms von Chromosom 1 (vor allem 1p22 und 1p36)[41] und 17[42]. Des Weiteren bestehen häufig Additionen an Chromosom 17p und 19p neben Translokationen (vornehmlich an Chromosom 1p, 10q und 14q)[43]. Auch Verluste der Heterozytogenität als typischer Befund bei bösartiger Transformation finden sich bei Mycosis fungoides und Sézary-Syndrom gleichermaßen, u.a. auf den Chromosomen 1p, 9p sowie 10q

(bei Segment 10q22.3-10q26.13) und 17p. Während die Allelverluste auf 1p und 9p in allen Phasen der Erkrankung vorzuliegen scheinen, treten die übrigen genannten offenbar erst in späteren Krankheitsstadien auf[44].
Wie bei anderen malignen Erkrankungen auch, findet man darüber hinaus Verluste oder Inaktivität von Tumorsuppressorgenen (besonders TGF-β-Rezeptor, bcl-2, Fas und p15), Hypermethylierung von Promotorgenen[45] und defiziente DNA-Reperaturenzyme. Auf zellulärer Ebene herrscht weiterhin eine konstitutive Überaktivität von zu Wachstum und Mitose disponierenden zytoplasmatischen Faktoren. Hierzu gehören STAT (signal transducer and activator of transcription)[46] und der hiervon induzierte Suppressor zytokiner Signalgebung (SOCS)-3. Diese wirken zudem über eine Blockierung der interferonabhängigen Wachstumsinhibtion proonkogenetisch[47]. In späten Stadien der Erkrankung schließlich neigen die Tumor-T-Lymphozyten wie auch leukämische Zellen zu Aneuploidie, besonders nach großzelliger Transformation.

1.7 Molekulargenetische Nachweismethoden der T-Zell-Klonalität

Die genetisch determinierte Vielfalt an unterschiedlichen Rezeptorgenen innerhalb einer Lymphozytenpopulation bietet die Chance, unkontrollierte Proliferationen dadurch indirekt nachzuweisen, dass ein überproportional repräsentierter Zellklon vor dem Hintergrund der genetisch verschiedenen übrigen Zellen identifiziert wird. Einerseits ist dies auf Proteinebene durch die Verwendung von Antikörpern zur Markierung variabler Regionen der Ig-Ketten (bei B-Zellen) bzw. des T-Zell-Rezeptors im Falle der T-Lymphozyten möglich. Durch eine anschließende Quantifizierung der Marker-Antikörper (z.B. durch ELISA) wird der Anteil der merkmalstragenden Zellen zur Gesamtpopulation ermittelt. Im Falle einer Überexpression eines distinkten Rezeptors oder Immunglobulins deutete dies auf eine klonale Expansion hin. Jedoch findet diese Methode ihre Grenzen darin, dass durch sie lediglich semiquantitativ die Prädominanz eines Immunglobulins bzw. T-Zell-Rezeptorkomplexes konstatiert werden kann. Eine weitere Limitierung besteht in der unteren Nachweisgrenze. So wurde diese Methode vornehmlich an Lymphknotenbioptaten, welche eine hohe Dichte von Immunozyten aufweisen, angewendet[48]. Ein generelles Problem aller Methoden besteht zudem in der Häufung klinisch irrelevanter monoklonaler T-Zellfraktionen im peripheren Blut, besonders im höheren Lebensalter[49].
Im Gegensatz hierzu erlauben molekularbiologische Methoden die direkte Detektion klonaler T-Zellen auf der Ebene der DNA. Es stehen die Southern blot Analyse sowie die heute überwiegend und auch in dieser Arbeit verwendete PCR-Technik zur Verfügung. Die erstgenannte Technik beruht auf dem Verfahren der definierten Spaltung genomischer DNA mittels sequenzspezifischer Restriktionsendonukleasen. Je nach Art der im Verlauf der T-

Zellreifung stattgefundenen Rearrangementsequenz entstehen dabei DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Anschließend erfolgt eine längenabhängige Auftrennung des Fragmentgemisches durch Elektrophorese sowie die Ausfällung und Fixation der getrennten Fragmente auf einer Nitrozellulose- oder Nylonmembran. Die fixierten Fragmente werden nun mit einer komplementären Gensonde inkubiert, die z.B. durch Autoradiographie detektiert werden kann. Während nicht rearrangierte Gensequenzen (Keimbahngene) aufgrund ihrer Häufigkeit als distinkte Banden imponieren, sind polyklonale und damit unterschiedlich lange DNA-Fragmente statistisch über die Länge der Membran verteilt. Im Falle klonalen Wachstums bilden sich hingegen Banden außerhalb von denen der Keimbahn aus. Nachteile dieser Methode sind der lediglich indirekte Klonalitätsnachweis ohne Möglichkeit einer Sequenzbestimmung der aufgetrennten Gene und damit im Falle der Lymphozyten Bestimmung des Rearrangementmusters. Die Diskrimination zwischen poly- und monoklonal stellt daher insbesondere bei den γ:δ-T-Zell-Genen wegen ihres o.g. limitierten kombinatorischen Potentials ein Problem dar. Darüber hinaus liegt die Sensitivität dieser Methode bei ca. 5% klonalem Zellanteil an der Gesamtpopulation für lymphozytäre Neoplasien[50, 51]. Auch in Bezug auf die prognostische Aussagekraft zeigen jüngere Studien, welche die Langzeitimplikationen des Southern blot kritisch evaluieren, Defizite gegenüber der noch zu besprechenden PCR[52]. Diese gewährleistet vor allem eine höhere Sensitivität sowie die Möglichkeit des Nachweises von Klonalität direkt auf der Ebene der DNA. So besteht durch Sequenzierung die Möglichkeit, den tatsächlichen Klon anhand seiner Sequenz zu bestimmen. Insbesondere die hohe Sensitivität von bis zu 0,03% klonalem Zellanteil vor polyklonalem Hintergrund im Falle von T-Lymphozyten führte bereits früh zur Erforschung der Eignung dieser Methode zur Frühdiagnostik[53] bzw. zum Nachweis vollständiger Remissionen (siehe Tabelle 2)[54]. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die generierten DNA-Fragmente nach der Amplifikation gewonnen und diversen weiteren diagnostischen Methoden, wie zum Beispiel der oben bereits erwähnten Sequenzierung, zugeführt werden können.

1.7.1 PCR als Methode zur Amplifikation genomischer DNA

Im Jahr 1985 entwickelt, ist die Polymerase Kettenreaktion (PCR) heutzutage eines der wichtigsten Instrumente molekularbiologischer Diagnostik geworden, welche die enzymatische Vervielfältigung von DNA aus geringen Ausgangsmengen (im Fall der Lymphomdiagnostik von genomischer DNA aus Zelllysaten von Haut- oder Blutproben) in vitro ermöglicht. Die Methode ist unter optimalen Bedingungen ebenso hochsensitiv wie spezifisch. Sie basiert auf einer in Zyklen ablaufenden Substratvermehrung mit folgendem Ablauf:

Temperaturbedingte Denaturierung des Doppelstranges der zu vervielfältigenden DNA in zwei Einzelstränge, Abkühlung des Reaktionsgemisches, Anlagerung (Annealing) von zwei, den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt einschließenden, komplementären Primern als Ausgangspunkt für die Synthese des Neustranges. Durch DNA-Polymerasen (ca. 72°C) erfolgt die von den Primern ausgehende Neusynthese eines komplementären DNA-Fragmentes als Beendigung des Zyklus.

Die hierdurch theoretisch denkbare Ausbeute würde bei n Zyklen 2^n betragen. Man nimmt die tatsächliche Effektivität einer PCR im Hinblick auf die Amplifikatmenge jedoch mit 70-80% dieses theoretischen Wertes an. Einerseits liegt dies an der mit der steigenden Produktmenge einhergehenden Schmelztemperaturzunahme des Gemisches, darüber hinaus an der abnehmenden Wahrscheinlichkeit, dass ein neu synthetisierter Strang beim Annealing wieder auf einen Primer trifft. Andererseits nimmt die Aktivität der DNA-Polymerase mit steigender Zykluszahl, bedingt durch die lang einwirkende hohe Temperatur, allmählich ab[55]. Zusätzlich spielt die Auswahl der Primer eine entscheidende Rolle (Länge > 18 bp, GC-Gehalt von 50-60%, keine Tendenz Haarnadeln bzw. Dimere auszubilden). Für die Primerentwicklung stehen verschiedene Softwareprogramme zur Verfügung, welche die o.g. Parameter berücksichtigen. Auf die ebenfalls entscheidende Zusammensetzung der Reaktionslösung, zu nennen sind Enzym-, Puffer- sowie Kofaktor- und Substratmengen, wird im Kapitel „Materialien und Methoden“ noch genauer eingegangen werden.
Die hohe, primerbedingte, Spezifität, die hohe Sensitivität, ein geringer Bedarf an Ausgangsmaterial (Mindestmenge bei genomischer DNA 50 ng[56]) und die Möglichkeit einer automatisierten und damit zeitökonomischen Herstellung von Proben-DNA, haben den Southern Blot bei den meisten Fragestellungen abgelöst[57,58].
Im Falle der T-Zell-Lymphome kommen zur Diagnostik überwiegend Konsensusprimer, welche multisegmentspezifisch sind, zur Amplifikation der V- und J-Segmente des γ-Genlokus zum Einsatz, da hier Klonalität aufgrund der weniger komplexen Struktur des Gens leichter nachzuweisen ist[59]. Dennoch existieren keine Primer, die in einem Ansatz alle V- resp. J-Genfamilien erfassen. Gebräuchlich zum Screening sind daher zwei Primeransätze, die in etwa 70% der Fälle Klonalität nachzuweisen vermögen[60]. Für eine Erhöhung der diagnostischen Sensitivität sind jedoch noch weitere Primerkombinationen erforderlich, auf die im Material- und Methodenteil näher eingegangen werden wird.
Daneben finden auch die β-Gene in der Diagnostik der CTCL Verwendung[61]. Lediglich das α-T-Zell-Rezeptorgen wird wegen seiner zu zahlreichen V- und J-Segmente hierfür in der Regel nicht herangezogen, das δ-T-Zell-Rezeptorgen scheidet wegen seiner regelmässigen Deletion

während der T-Zellreifung aus. Auf das in dieser Arbeit verwendete Primer– und PCR-Design wird im Folgenden noch einzugehen sein.
Im Anschluss an die PCR kann das Amplifikat mittels verschiedener Techniken in Bezug auf Fragmentlänge, Sequenz und Quantität des Produktes weiter untersucht werden. Insbesondere bei der Lymphomdiagnostik nimmt die PCR daher in Kombination mit weiteren Aufarbeitungsmethoden (z.B. Klonalitätsnachweis, Sequenzierung[62]) inzwischen eine herausragende Stellung ein. Dies liegt einerseits an der Möglichkeit, bereits in Initialstadien durch Amplifikation oft geringer Ausgangsmengen an DNA zur Diagnose zu gelangen. Darüber hinaus ist früh eine hämatogene Dissemination maligner Lymphozyten nachweisbar. Dies wird im Allgemeinen als ungünstiger prognostischer Faktor diskutiert[63, 64,65].

1.8 Elektrophoresetechniken zur Auftrennung amplifizierter DNA

Die grundlegende Methode zur Analyse von PCR-erzeugten DNA-Produkten ist deren größenabhängige Auftrennung. Sie beruht auf der Ausnutzung von Geschwindigkeitsdifferenzen bei der Wanderung verschieden großer Moleküle in einer Trägersubstanz bei angelegter Gleichspannung. Ziel ist hierbei zunächst der qualitative Nachweis eines Amplifikats. Eine möglichst hohe Trennschärfe (also die Fähigkeit, Fragmente schon bei geringen Längendifferenzen voneinander getrennt darstellen zu können) dient dazu, zwischen Mono-, Oligo- und Polyklonalität (Erläuterungen siehe unten) unterscheiden zu können[66]. Die heute eingesetzten Techniken arbeiten unter Verwendung einer Trägersubstanz, welche aus einem hochmolekularen Gel (z.B. Agar, Polyacrylamid oder polymergefüllte Kapillaren) als Trennmedium besteht. Die Beschaffenheit dieser Gele einerseits, zusammen mit den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Analyt- wie der verwendeten Elektrolytlösung andererseits, sind Voraussetzung für das Funktionieren der Elektrophorese. Folgende Forderungen an die Eigenschaften dieser Trennmedien sind zu stellen:

1) Störungsfreie Wanderung des Analyten,
2) Ausbleiben von Reaktionen mit dem Trennmedium,
3) im Falle von DNA dessen kontinuierliche Denaturierung[67] (Ausnahmen s.u.).

Grundsätzlich bietet der Einsatz von Gelen gegenüber den früher verwendeten trägerfreien Verfahren einen Vorteil, da freie Diffusionen der Analytlösung als Fehlerquelle ausscheiden. Weil die Wanderungsgeschwindigkeit neben der Größe wesentlich von der Ladung der Analytmoleküle abhängt, ist der Einsatz einer Pufferlösung nötig. Diese hält den pH-Wert trotz der konstitutiv durch die Elektrolyse stattfindende Entstehung von Hydroxid- bzw. Hydroniumionen konstant . So werden Änderungen in der Ionisation der zu analysierenden Substanz vermieden. An der Anode reagieren hiernach Pufferanionen mit Hydroniumionen, an der Kathode bedingt die Entstehung von Hydroxylionen einen lokalen pH-Wertanstieg.

Dieser wiederum bedingt eine zusätzliche Dissoziation der schwachen Säure des Puffersystems in weitere Pufferanionen, die an der Anode anfallende Hydroniumionen weiter binden[68]:

Anode: $H_2O \rightarrow 2H^+ + ½ O_2 + 2e^-$

$H^+ + P^- \rightarrow HP$ (P^-=Pufferanion)

Kathode: $2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2 + 2OH^-$

Wie oben erwähnt, wird der Ladungsfluss neben der Wanderung der Analytmoleküle zusätzlich durch die Migration der an der Kathode gebildeten Pufferanionen getragen. Daher hat eine Erhöhung der Pufferkonzentration eine Herabsetzung der Wanderungsgeschwindigkeit der Proben zur Folge, da ihr Anteil am Stromfluss abnimmt. Daneben existieren weitere Parameter mit Einfluss auf den Ablauf einer elektrophoretischen Substrattrennung, die hier nur dem Namen nach genannt werden sollen: der Kanaleffekt, die Elektroendoosmose und die Schrankenwirkung.

1.9 Verschiedene Arten von Elektrophorese-Trägersystemen für PCR-Produkte

Während die obigen Gesetzmäßigkeiten bei sämtlichen Arten von Trägersubstanzen Gültigkeit besitzen, unterscheiden sich die Systeme dennoch grundlegend in ihrer Eignung für verschiedene Fragestellungen. Neben der bereits genannten geforderten hohen Trennschärfe ist auch die Leseweite, d.h. die Fähigkeit, DNA-Fragmente eines bestimmten Fragmentlängenbereichs aufzutrennen, entscheidend. Angemerkt sei an dieser Stelle, dass die am häufigsten verwendeten Materialien eine Leseweite von ca. 800 bp Differenz gewährleisten. Als Prämisse gilt: Bei der Auftrennung von Nukleinsäuren ist generell nur deren Größe entscheidend (Ausnahmen bei verschiedenen Variationen der DNA-Inkubation siehe unten), da sie in freier Lösung gewichtsunabhängig die gleiche elektrische Mobilität besitzen. Daher sind Medien zu favorisieren, bei denen die Trennleistung in erster Linie durch die sterische Konformation der Moleküle des Mediums (siehe oben: Schrankenwirkung, Kanaleffekt) erzeugt wird.

Weiterer Einfluss auf die Wanderungscharakteristika wird hierbei durch die Konformation der applizierten DNA ausgeübt. Insbesondere für den Nachweis von Mutationen existieren einerseits Ansätze, bei denen entweder zuvor thermisch denaturierte und anschließend in Eis inkubierte Einzelstränge (SSCP = single-strand-conformational-polymorphism-PCR) auf das Trennmedium aufgebracht werden. Alternativ kann die DNA in Form von Heterodimeren

(heteroduplex = HD-Elektrophorese) vorliegen. Dies sind Komplexe, bei denen die Nukleotidstränge initial de- und nachfolgend wieder renaturiert werden, sich jedoch nicht komplementär anordnen. Bei der ersteren Methode erreicht man die Trennschärfeerhöhung durch die unterschiedlichen räumlichen Konformationen (und Wanderungsgeschwindigkeiten) von Wildtyp- und Mutanteneinzelstrang-DNA[69]. Bei der zweiten Methode wird diese durch die verschiedenen Laufgeschwindigkeiten von Heteroduplexes erzielt, die jeweils aus einem Wildtyp- und Mutanten-DNA-Einzelstrang zusammengesetzt sind. Deren Wanderungsgeschwindigkeit weicht im Vergleich zu Homoduplexes[70], welche aus mutierten und nativen DNA-Strängen bestehen, ab.

Im Folgenden werden Struktur und Eigenschaften der relevantesten Trennmedien für T-Zell-Rezeptor-PCR-Produkte beschrieben. Die Tabelle am Ende des Kapitels vergleicht die Angaben verschiedener Autoren bezüglich der jeweils ermittelten Sensitivität.

1.9.1 Agarosegele

Diese Form von Trennmedium findet trotz ihrer fehlenden Eignung für die Differenzierung zwischen poly-, oligo- bzw. monoklonalen PCR-Produkten nach wie vor (so auch in dieser Arbeit) ihren Einsatz, u.a. zur Erfolgskontrolle der PCR. Agarose ist ein aus glykosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalactose zusammengesetztes Polysaccharid. Nach Aufkochen in einer Pufferlösung, hier: TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA), geliert die Lösung während der Abkühlung. Für die Auftrennung von Nukleinsäuresequenzen von 100 bis 500 Basenpaaren Länge ist eine Agarosekonzentration von 1-2 % bewährt, kürzere Sequenzen bedürfen einer höheren Konzentration von bis zu 25 %.

1.9.2 Polyacrylamidgele (PAGE)

Hierbei handelt es sich um ein die DNA denaturierendes, meistens harnstoffhaltiges Polyacrylamidgel, zusammengesetzt aus Acrylamid ([CH_2=CHCONH$_2$]), Tetramethylendiamin (TEMED), Ammoniumperoxidsulfat (APS) und N,N´-Methylenbisacrylamid ($(CH_2NHCOCH=CH_2)_2$)[71]. Das Gel kann in u.g. Form (s. Abb. 5) oder in noch weiteren Modifikationsformen eingesetzt werden.

Abb. 5

Grundstruktur eines Polyacrylamidgels

```
-CH2-CH-|- CH2-CH-|x-CH2-CH-
        |          |         |
        CO         CO        CO
        |          |         |
        NH         NH2       NH
        |                    |
        CH2                  CH2
        |                    |
        CO         CO        CO
        |          |         |
-CH2-CH-|- CH2-CH-|x-CH2-CH-
```

Acrylamid: [CH2=CHCONH2]; Bisacrylamid CH2(NHCOCH=CH2)2; Erläuterungen s. Text

Gerade bei dieser Gelform findet die unter 1.9 beschriebene Heteroduplexanalyse ihre Anwendung. Trotz des relativ einfachen Ablaufs (mit unmarkierten Primern erzeugte PCR-Produkte werden rasch de- und wieder renaturiert) liegt die Nachweisgrenze für klonale Zellen bei ca. 5%[39]. Diese Trägersubstanz existiert noch in weiteren, im Folgenden genannten, Modifikationsformen:

1.9.3 Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese (TGGE) und denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

Durch die Generierung linearer Temperatur- bzw. Konzentrationsgradienten (von Harnstoff oder Formamid) entlang der Wanderungsrichtung gelingt bei diesen Gelen eine weitere Trennschärfeerhöhung.[72,73].

1.9.4 Mutation-Detection-Enhancement-Gelektrophorese (MDE®)

Die Besonderheit dieses Trennverfahrens, welchem ebenfalls eine Polyacrylamidmatrix zugrunde liegt, ist die Verwendung eines quervernetzenden Moleküls, dessen Struktur der Hersteller bisher nicht preisgegeben hat. Es handelt sich bei der MDE® um eine nicht denaturierende Elektrophorese, sowohl DNA-Duplexes als auch Einzelstränge können daher mittels dieser Methode separiert werden.

1.9.5 Klonalitätsnachweis durch Gelelektrophoresen

In Fällen von Klonalität mündet eine PCR in der Erzeugung eines überrepräsentiert großen Anteils von Nukleotidmolekülen an der Gesamtausbeute der gewonnenen Nukleinsäuren, die

in ihrer Sequenz identisch sind. Aus diesem Grund kommt es dann bei Gelelektrophoresen jeglicher Art zur Ausbildung typischer distinkter, schmaler Banden als Ausdruck der Akkumulation dieser gleichartigen (und damit auch gleich schnell wandernden) Moleküle an einem Ort im Gel.
In der Regel gilt im Falle der T-Zell-Rezeptor-DNA eine Bande im Bereich einer Größe von 240-270 Basenpaaren bei den hochauflösenden Elektrophoresen (z.B. TGGE) und den in dieser Arbeit verwendeten Primersystemen als Hinweis auf Klonalität.

1.9.6 Kapillar-Elektrophorese (CE)

Diese Methode ermöglicht neben der qualitativen auch eine direkte quantitative Beurteilung der applizierten Nukleotidfragmente in Form so genannter Elektropherogramme. Sie zeichnet sich insbesondere durch eine sehr hohe Trennschärfe aus. Wie bei den oben genannten Verfahren, erfolgt auch hier eine Auftrennung nach Größe und Nettoladung. Zusätzlich unterstützt wird das Trennverfahren durch den elektroosmotischen Fluss, der von den Wandladung tragenden Kapillarwänden erzeugt wird. Im Gegensatz zu den übrigen Trägermedien weist die Siebmatrix bei der CE jedoch ein multidirektionales (entangled) Polymernetz auf. Dieses wird aus viskösen Einzelpolymeren aufgebaut, durch welche (dies wird durch die Arbeit von de Carmejane et al. nahegelegt) die Nukleotidstränge in U-förmiger Konformation wandern[74]. Der größte Vorteil besteht jedoch in der Möglichkeit einer automatisierten Analyse, bei der die aufgetrennten Fragmente unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen nach der PCR unmittelbar weiter verarbeitet (z.B. sequenziert) werden können.
Die unten stehende Tabelle fasst die wichtigsten Ergebnisse zur Bestimmung der analytischen Sensiti-vität verschiedener Verfahren zusammen. Dabei ist folgende Anmerkung zur Definition der unteren Nachweisgrenze der Verfahren zu machen: als Maß für die Sensitivität wird die Fähigkeit einer Methode, Klonalität vor einem polyklonalem Hintergrund nachzuweisen, herangezogen.
Neben den unten noch zu nennenden Vorteilen bei der Verarbeitung größerer Probenzahlen, ist die CE demzufolge die Methode mit der höchsten analytischen Sensitivität.

***Tabelle 2*:** Literaturvergleich der analytischen Sensitivität verschiedener Verfahren						
	Amplifikationslokus					Anzahl der Arbeiten
	γ-TCR			β-TCR	δ-TCR	
Messgröße Verfahren	%	Zellzahl	DNA-Masse	%	%	
PAGE	1%	-	-	0,2%	-	3
lc-PAGE	3%	-	-	-	-	1
TGGE	0,1-5%	10^3-10^4	1-17,5ng	-	-	4
DGGE	0,1-1%	-	2ng	-	-	2
MDE	1%	10^4	-	-	-	1
SSCP	1-4%	-	-	-	-	2
CE	0,05-2,5%	10^4	0,125-6,5ng	0,03-5%	-	5
HD-Page / Genescan[39]	0,1-10%	-	-	0,1-5%	0,5-10%	1

Nach: [8, 39, 56, 57, 58, 64, 69, ,75, 76, 77, 78, 79, 80, 81,828384]

Abkürzungen und weiterführende Erklärungen s. Text. **Anmerkungen:** lc = light-cycler.

1.10 DNA-Fragmentanalyse als Instrument zum Nachweis genomischer Klonalität

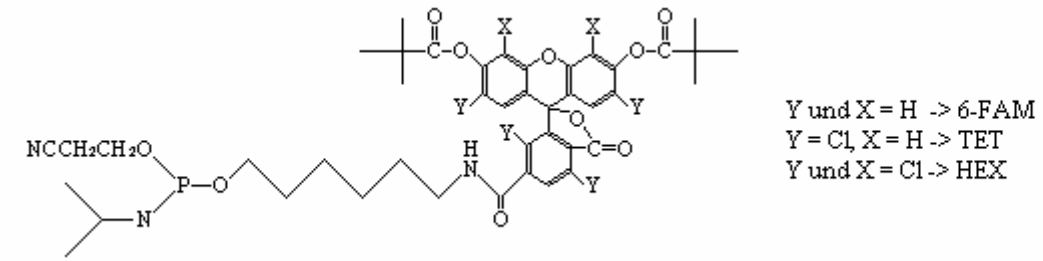
Fragmentanalyse ist das Verfahren zur Nukleotidfragmentlängenbestimmung, Quantifizierung dieser Fragmente und ggf. deren Sequenzierung. Bei der Verwendung von Gelelektrophoresen zur Detektion der in Form distinkter Banden organisierten, aufgetrennten DNA-Fragmente ist die Applikation von z.T. gesundheitsschädlichen Agenzien notwendig. Dazu zählen Silber (silver staining z.B. bei PAGE oder TGGE), Ethidiumbromid (interkalierender Farbstoff, der unter UV-Licht Fluoreszenz zeigt) bzw. radioaktive Sonden wie ^{32}P oder ^{35}S dCTP. Diese mussten zudem in teilweise aufwendigen Arbeitsschritten zugesetzt werden. Bei der Fragmentanalyse entfallen diese Zusatzschritte. Voraussetzung für die Fragmentanalyse ist die Herstellung fluoreszenzmarkierter Amplifikate. Hierfür stehen drei denkbare Verfahren zur Verfügung: Verwendung markierter Primer bzw. markierter dNTPs während der Amplifikation oder die Applikation fluoreszierender DNA-Interkalatoren, die nach der PCR zugesetzt werden. Der größte Vorteil bei der Verwendung markierter Primer liegt in der einfachen Quantifizierung, da die Fluoreszenzintensität von Fragmentlänge und Sequenz unabhängig ist. Sie ist bei dieser Methode eine direkte Funktion der Menge an PCR-Produkt. Daneben ist die Multiplex-PCR (d.h. Amplifikation eines Gens mit mehreren Primerpaaren gleichzeitig bei Deletionsdetektion) nur mit markierten Primern möglich.[85]

Da in dieser Arbeit die heute gängigen markierten Primer für die Fragmentanalyse benutzt wurden, soll hier näher auf das zugrunde liegende Prinzip eingegangen werden. Zur Anwendung kommt dabei ein entweder am 5´- oder 3´- Ende markierter forward- neben einem unmarkierten reverse-Primer (oder vice versa). Der markierte Primer lagert sich während des Annealings an die Ziel-DNA an, wodurch nach der Synthesephase ein am 5´-Ende einfach markiertes Doppelstrang-DNA-Fragment vorliegt.
Die Verwendung moderner automatisierter Analysegeräte und zugehöriger Software erlaubt in diesem Fall den Einsatz mehrerer verschiedener Farbstoffe, die jeweils unterschiedliche Spektren emittieren. Bei diesen Farbstoffen handelt es sich um so genannte Farbstoffamidite aus der Sequenzierchemie (Sanger), die während der Primersynthese an deren 5´-Enden addiert werden und die unter den Reaktionsbedingungen einer PCR stabil sind[86].

Gebräuchliche Farbstoffe sind hierbei die [F]-Amidite 6-FAM, HEX und TET, deren chromophores Grundelement 6-Carboxyfluorescin ist.

Abb. 6

Chemische Struktur von 6-FAM, HEX und TET



Modifiziert nach[87]

Die genaue Fragmentlängenbestimmung erfolgt nach der PCR. Sie geschieht durch den Vergleich der gewonnenen Fragmente gegen einen internen Längenstandard. Dieser wird anhand einer Kalibrierungskurve, welche durch Interpolation bei Einsatz von Größenstandardfragmenten gewonnen wird, definiert. Schließlich wird die gemessene Farbstoffintensität, die bei Verwendung farbstoffmarkierter Primer eine direkte Funktion der vorliegenden Menge eines amplifizierten DNA-Fragmentes distinkter Länge ist, in Form eines Elektropherogramms aufgezeichnet.
Klonalität ist bei der Fragmentanalyse durch das Vorliegen eines sogenannten Peaks vor dem gaußkurvenartig konfigurierten polyklonalen Hintergrund charakterisiert. Dieser Peak ist Ausdruck der Akkumulation eines identischen DNA-Fragments einer bestimmten Länge.

Daneben finden sich noch weitere Zwischenzustände: zum einen die so genannte Oligoklonalität, zum anderen biallel klonale Rearrangements. Bei ersterer koexistieren mehrere dominante Zellklone zur gleichen Zeit. Dieser Zustand findet sich außer bei malignen Erkrankungen auch bei Infektions- oder Autoimmunerkrankungen (Posnett et al. [49]). Bei diesen findet eine Selektion der Lymphozytenklone statt, die eine geeignete Immunantwort vermitteln können. Bei biallel klonalem Rearrangement kommt es zum Auftreten zweier unabhängiger Peaks.

Die erwähnten Klonalitätszustände sind im Folgenden in den Abbildungen 7 bis 10 dargestellt:

Abb.7 bis 10:

Elektropherogramme der Amplifikate von γ-T-Zell-Rezeptor-DNA bei verschiedenen Klonalitätszuständen

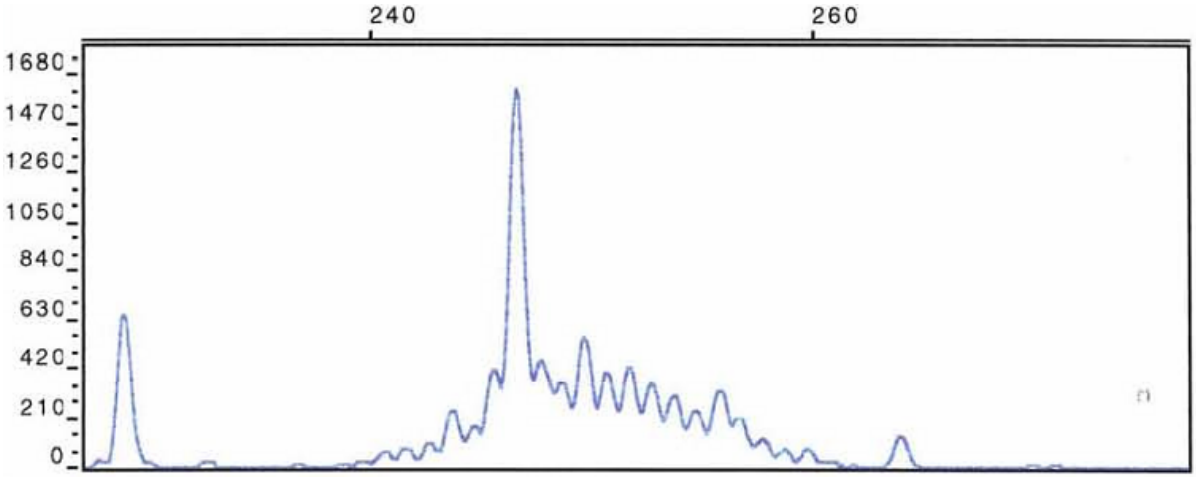


Abb. 7: Monoklonalität

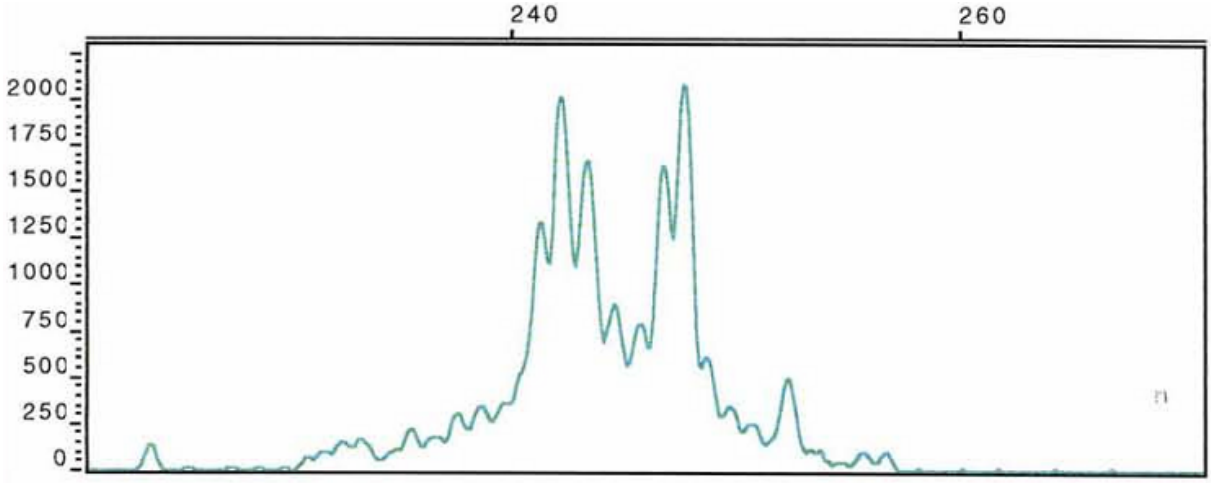


Abb. 8: Oligoklonalität

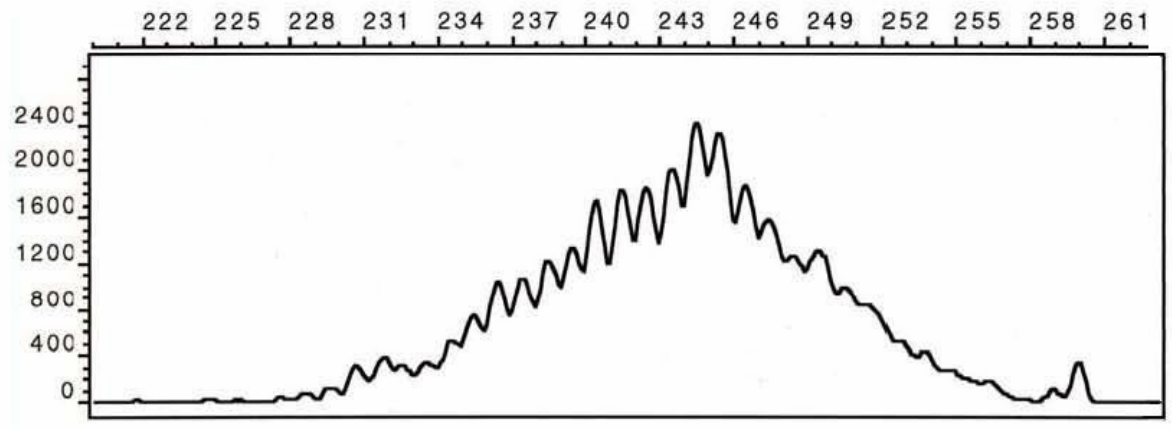


Abb. 9: Polyklonalität

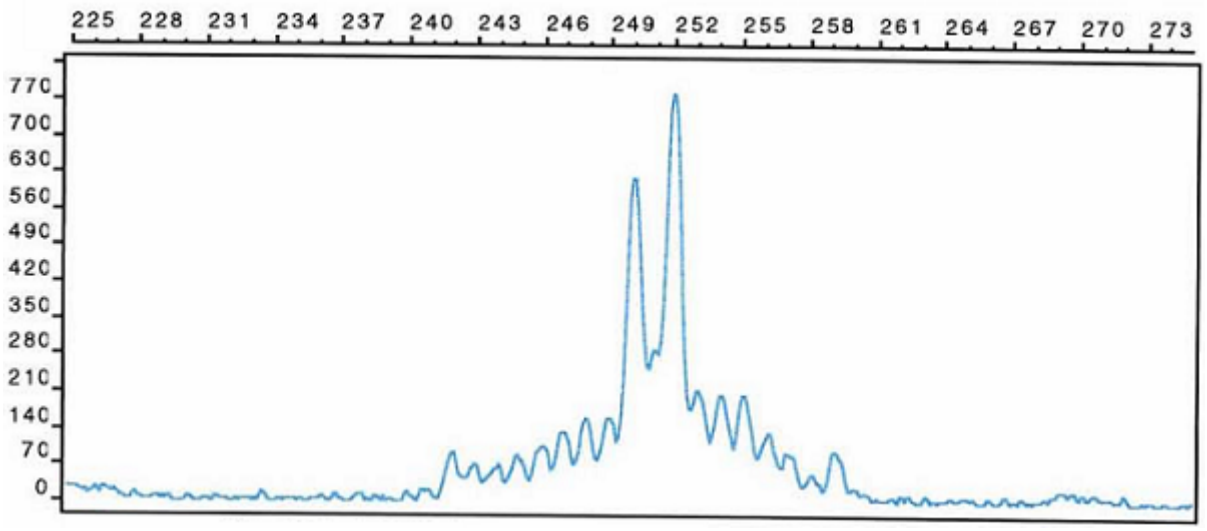


Abb. 10: biallel-klonal