

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Hilden
Tischzentrifuge, Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1,0	Heraeus, Berlin
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Blockheizinkubator	Stuart Scientific, GB
Gelkammern für Agarosegel	Micro Bio Tec Brand, Giessen
UV-Fotodokumentationseinrichtung	Cybertech, Berlin

3.2 Reagenzien

Roche® „High Pure PCR Template Preparation Kit“, Cat. No. 1 796 828:

Tissue Lysis Buffer (Roche):	4 M Urea, 200 mM Tris, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA, pH 7,4
Binding Buffer (Roche):	6 M Guanidin-HCl, 10 mM Urea, 10 mM Tris-HCl, 20% Triton ⁸⁸ X-100 (v/v), pH 4,4
Proteinase K (Roche):	90 mg Lyophilisat
Wash Buffer (Roche):	20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 nach Addition von Ethanol im Verhältnis 4:1
Elution Buffer (Roche):	10 mM Tris, pH 8,5
Inhibitor Removal Buffer (Roche):	5 M Guanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6 nach Addition von Ethanol im Verhältnis 1:1,65
High Pure filter tubes (Roche):	Polypropylen-Röhrchen mit zwei Lagen Glasfibervlies
Collection tubes (Roche):	Polypropylen-Auffangröhrchen
Proteinase K (Routine):	1 mg Proteinase auf 0,5 ml H ₂ O
Extraktionspuffer (Routine):	1M KCl, 1M Tris-HCl, NP40 10%, Tween 20 10%, pH 8,3
Ladepuffer (Routine):	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylenxyanol, 15% Ficoll
PBS:	1,7 mM NaCl, 0,064 mM KCl, 0,375% Tris-Base, 0,002% Phenolrot, pH 7,4
Taq-Polymerase:	AmpliAq DNA-Poymerase, N808-0153, Roche, Branchburg, NJ

Größenstandard: 100 bp DNA Ladder, Cat. No. 15628—019, Invitrogen
Ethidiumbromid

3.3 Methoden

3.3.1 DNA-Isolierung/Aufreinigung

3.3.1.1 Isolierung von DNA aus Paraffinschnitten, Routinemethode

Zunächst Deparaffinisierung durch Lösen der Schnitte (ca. 25 bis 50 mg je Probe, dies entspricht in etwa 10 Schnitten à 10 µm) in 1 ml Xylol, Zentrifugation, Dekantierung, anschließender Extraktion der Probe mittels zweimaliger Lösung in 1 ml Ethanol und Trocknung im Vakuum. Danach Zugabe von 200 µl Extraktionspuffer und 20 µl Proteinase K, Inkubation über Nacht bei 55°C, Enzymaktivierung durch Erhitzen auf 95°C für 15 Minuten. Danach wird das Lysat für 5 Minuten bei 15000 U/Min zentrifugiert und der Überstand mit der enthaltenen DNA kann weiterverwendet werden.

3.3.1.2 Aufschluss von DNA aus Paraffinschnitten unter Einsatz des Roche® „High Pure PCR Template Preparation Kit“, Cat. No. 1 796 828:

Lösen der Schnitte in Xylol, anschließend wie unter a) Extraktion mittels Ethanol. Das gewonnene Material wird gemäß Herstelleranleitung weiter bearbeitet, die extrahierte DNA liegt in gelöster Form in 200 µl Elution Buffer vor.

3.3.1.3 Dichtegradienten-Isolierung und DNA-Aufschluss aus mononukleären Zellen des Blutes von Gesunden:

Diese Zellen (PBMC) wurden als polyklonale PCR-Kontrolle bei jeder PCR verwendet. Gewonnen wurden sie durch Zentrifugation von heparinisiertem Vollblut über einem Ficoll-Gradienten. Nach vorheriger Dilution des Blutes im Verhältnis 1:2 mit PBS, wurde mit diesem Gemisch eine Ficoll-Säule überschichtet und für 20 Minuten bei 2400 U/Minute zentrifugiert. Hierbei entsteht ein weißlicher Lymphozytenring, der aus dem Probenröhrchen abpipettiert und nach erneuter Lösung in PBS und Zentrifugation (10 Minuten bei 1100 U/Minute) aus dem Bodensatz des Röhrchens gewonnen werden kann. Anschließend wird mit diesen Zellen wie unter a) verfahren, d.h. Zugabe von 200 µl Extraktionspuffer und 20 µl Proteinase K mit der erwähnten Übernachtinkubation.

3.3.1.4 Agarosegelelektrophorese

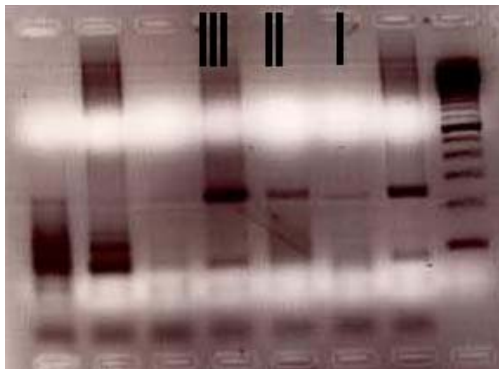
Diese Methode kam als Produktnachweis und zur semiquantitativen Intensitätsbestimmung (s. unten) zum Einsatz. 0,01% Ethidiumbromid wurden in einem 2%igen Agarosegel gelöst. Die Trennung erfolgte bei 60V über eine Stunde. Zusammen mit einer Positiv- sowie einer Negativprobe (Aqua dest.) und einer 100 bp DNA-Leiter wurden jeweils 10 µl Probenlösung aufgetragen. Die Elektropherogramme wurden anschließend durch UV-Illumination und Fotodokumentation ausgewertet.

Für die semiquantitative Bewertung der Ausbeute von PCR-Produkt kam in allen Versuchen folgendes Bewertungsschema zum Einsatz: eine schwache, d.h. mit bloßem Auge gerade erkennbare Bande erhält einen, eine deutlich erkennbare zwei, eine sehr intensive Bande drei Punkte.

Beispiele für den Befund einer schwachen, mittel- und sehr intensiven Bande sowie ein Beispiel für eine typische Aufnahme einer Elektrophorese liefert Abbildung 11.

Abb. 11

Beispiel Agarosegelelektrophorese



Anmerkungen: I steht für eine schwache, II für eine mittelstarke, III für eine intensive Bande

3.3.1.5 Fragmentanalyse

Die Fragmentanalyse wurde mit dem automatischen CE-DNA-Sequenziergerät ABI Prism 310® durchgeführt, wobei die Probenauftrennung gemäß Herstelleranleitung erfolgte. Es gewährleistet neben der elektrophoretischen Trennung der PCR-Produkte auch eine Fragmentlängenbestimmung.

Hierbei werden die farbstoffmarkierten Nukleotidstränge durch einen Laser angeregt. Das Signal wird danach der jeweiligen Fragmentgröße zugeordnet. Je mehr Fragmente einer Länge vorliegen (z.B. bei Klonalität), desto intensiver wird das Signal. Diese Signalintensität wird auf der y-Achse der Elektropherogramme aufgetragen (s. Abb. 7-10, y-Achse).

Dieser Umstand wurde für quantitative Aussagen in den einzelnen Versuchen genutzt, wobei die folgende Skalierung verwendet wurde:

- Bis zu einem Intensitätswert von bis zu 100 relativen Einheiten kann von Hintergrundrauschen ausgegangen werden.
- Eine Fluoreszenz bis zu einer Höhe von 500 galt für Auswertungszwecke in diesem Zusammenhang als einfach positiv, bis 1000 als doppelt positiv, ab hier als dreifach positiv. Dies allerdings unter der Voraussetzung, dass ein gemäß der unten noch zu nennenden Definition eindeutig als Amplifikat zu identifizierendes Fluoreszenzmuster vorliegt.

3.4 PCR

Es kamen folgende PCR-Protokolle zum Einsatz:

3.4.1 Konsensusprimer (γ -1)-PCR

Eine etablierte Konsensusprimer-PCR, welche die bei kutanen T-Zell-Lymphomen erfahrungsgemäß (^{50, 79}) am häufigsten rearrangierten γ -T-Zell-Rezeptorgensegmente amplifiziert. Dies sind die V γ I- (V γ 1 bis V γ 8) und J γ 1/2-Segmente, die zuverlässig unter Einsatz der folgenden zwei Konsensusprimer amplifiziert werden können^{89, 90, 91, 92}:

V- γ -I: 5`CTCCATCCACTGGTACCT

J- γ -1,2: 5`CAACAAGTGTTGTTCCAC

Das Reaktionsgemisch hatte bei allen drei PCR-Ansätzen folgende Zusammensetzung:

- 10 μ l gelöste DNA (ca. 0,1- 0,5- μ g)
- 0,6 μ l von 5,0 U/l enthaltender Taq Polymerase
- 8,0 μ l 25 mM MgCl₂
- jeweils 4,0 μ l 10 mM jeden Nukleotids
- 5,0 μ l 10xPCR-Puffer
- 0,7 μ l 50 μ M der jeweiligen Primer.

Das Endvolumen jeder Probe belief sich hierbei auf jeweils 50 μ l, die nach der Mischung im Thermocycler wie folgt prozessiert wurden:

- 1) Einmalige initiale, vierminütige Denaturationsphase bei 95°C.

- 2) 40 Amplifikationszyklen, bestehend aus einer je eine Minute dauernden Denaturierung (bei 94°C), einer Annealingphase von einer Minute bei 58°C und einer Extension über eine Minute bei 72°C.
- 3) Nach Abschluss dieser Zyklen erfolgte eine weitere Extension bei 72°C für 12 Minuten.

Auch bei den folgenden PCR-Protokollen wurden diese oben genannten Amplifikationsbedingungen eingehalten. Wenn das Versuchsdesign Abweichungen hiervon erforderlich machte, wird gesondert darauf hingewiesen.

3.4.2 γ -2-PCR

Bei dieser PCR wird die am zweithäufigsten bei klonaler Expansion rearrangiert vorgefundene Rezeptorgensegmentfamilie V γ 9 (⁹³) und weitere, d.h. V γ 10,11 amplifiziert. Die hierzu verwendeten Primer sind (alle gemäß⁹):

V- γ -9: 5'ATTGGTATCGAGAGAGAC

V- γ -2: 5'CACTGGTACKKGCAGAAAC

J- γ -1,2: 5'CAACAAGTGTTGTTCCAC

Die Reaktionsbedingungen und das Reaktionsgemisch stimmen mit den unter 3.4.1 beschriebenen überein.

3.4.3 γ -3-PCR

Der dritte PCR-Ansatz amplifiziert die Segmente V γ 1-8, V γ 9, V γ 10 und V γ 11 sowie J- γ -P1,2. Das JP-Segment wurde, aufgrund der Tatsache, dass es sehr selten rearrangiert vorliegt, nicht berücksichtigt (^{9,87}).

V- γ -I: 5'CTCCATCCACTGGTACCT

V- γ -9: 5'ATTGGTATCGAGAGAGAC

V- γ -2: 5'CACTGGTACKKGCAGAAAC

J- γ -P1,2*: 5'CTATGAGCYTAGTCCCTT*: Dieser Primer wird in einer anderen Nomenklatur auch als J γ 1.1/2.1 bezeichnet³⁹.

Die Reaktionsbedingungen und das Reaktionsgemisch stimmen mit den unter 3.4.1 beschriebenen überein.

3.5 Ablauf der Untersuchungen und Materialien

Alle Untersuchungen erfolgten anhand von Hautbiopsaten oder Blutproben, die entweder in der dermatologischen Klinik der Charité gewonnen bzw. durch Fremdeinsender eingeschickt wurden. Die Diagnosestellung erfolgte gemäß den EORTC-Kriterien von 1997 (2). Je nach Diagnose wurden diese einzelnen Gruppen zugeordnet und zur Klärung der in den folgenden Kapiteln genannten Fragestellungen eingesetzt:

3.5.1 Methodenmodifikationen

3.5.1.1 Vergleich von Extraktionsmethoden

Es erfolgte der Vergleich verschiedener Methoden zur Isolierung genomischer DNA aus in Paraffin eingebetteten Hautproben. Zwei Forderungen sollten erfüllt sein: Einerseits die Generierung ausreichender Ausgangsmengen an DNA für die weitere Diagnostik. Gleichzeitig sollte eine weitgehende Eliminierung von Stoffen erreicht werden, die auf eine PCR hemmend wirken. Um lagerungsbedingte DNA-Degradation zu minimieren, war zum Zeitpunkt der Bearbeitung keine der Proben älter als 12 Monate.

Dieser Test diente dem Vergleich der PCR-Ausbeuten und nicht zur Klärung der Frage nach Klonalität, daher erfolgte keine Kapillarelektrophorese im Anschluss an die PCR. Ferner wurde lediglich der – zumeist effektivste – Konsensusprimer(= γ -1)-PCR-Ansatz verwendet, jeweils mit un- sowie mit FAM-markierten Primern. Alle Teile der Stichprobe waren zuvor mit der routinemäßigen Klonalitätsdiagnostik durch PCR/TGGE untersucht worden. Es wurde mit zwei getrennten Versuchsanordnungen gearbeitet.

Schritt 1:

Diese Versuchsgruppe enthält insgesamt 14 Hautproben (s. Tabelle 3) histologisch gesicherter Lymphome:

Tabelle 3: Probenkonstellation Versuch 3.5.1.1)i.			
Diagnose	Anzahl gesamt	Monoklonal	Polyklonal
MF-Ekzem	10	8	2
MF-Plaue	3	2	1
Pleo. CTCL ^{a)}	1	0	1

^{a)}Mittel- bis großzelliges pleomorphes T-Zell-Lymphom

Folgende Probenkonstellationen wurden verglichen:

- Routineextraktionsverfahren und PCR mit den unmarkierten γ -1-Konsensusprimern
- Isolierung mit dem Roche® „High Pure PCR Template Preparation Kit“, nachfolgende PCR mit unmarkierten Konsensusprimern
- Routineextraktionsverfahren und PCR mit markierten Konsensusprimern
- Roche®-Kit und PCR mit markierten Konsensusprimern

Schritt 2:

Bei dieser Versuchsreihe kamen Paraffinschnitte von fünf Hautbiopsaten zur Auswertung (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Probenkonstellation Versuch 3.5.1.1)ii.			
Diagnose	Anzahl gesamt	Oligoklonal	Polyklonal
MF-Ekzem	5	1	4

Die zuvor verwendeten Aufreinigerungsverfahren wurden hier zusätzlich mit dem Qiagen®-Aufschlusskit verglichen, der Versuch lief in zwei Phasen ab:.

- Vergleich von Routineverfahren sowie dem Roche® „High Pure PCR Template Preparation Kit“ und dem Qiagen® „QIAmp DNA Blood Midi Kit“ anhand der bereits aus der Routinediagnostik vorliegenden gefrorenen DNA-Lösung
- Zur Minimierung der Fehlerquelle der Degradation von bereits aufgeschlossener DNA Wiederholung des Versuchsdurchgangs mit neu zugeschnittenen (und mit den im ersten Versuchsteil identischen) Proben

Somit dient dieser Versuch der Klärung der eingangs gestellten Frage, ob die Vorschaltung einer Aufreinigung die analytische Sensitivität der PCR erhöht.

Anmerkung: Das zweite Probenkollektiv wurde anschließend für den Farbstoffvergleich (Versuch 3) weiter genutzt.

3.5.1.2 PCR-Protokollmodifikation

Der Schwerpunkt liegt hier auf dem optimalen Einsatz fluoreszenzmarkierter Primer i.S. des dritten Punkts der Problemstellung – Optimierung der PCR. Beim Einsatz in der klinischen Routine in der dermatologischen Klinik der Charité zeigte sich die Tendenz, dass diese im Vergleich zu nichtmarkierten Primern eine geringere analytische Sensitivität aufweisen. Der Versuch fußt auf folgender Hypothese:

Die Ursache für das Sensitivitätsdefizit könnte durch eine sterische Beeinträchtigung des Primers durch das kovalent gebundene Farbstoffmolekül bedingt sein. Dies legt den Schluss nahe, dass eine Konzentrationserhöhung des zugegebenen Primers dieses Bindungsdefizit überwinden müsste. Da hieraus jedoch ein Spezifitätsverlust durch unspezifische Bindung des Primers auftreten kann, diente dieser Versuch der Definition des optimalen Zugabezeitpunktes sowie der Konzentration der Primer. Alle Proben, bei denen ein Amplifikat generiert werden konnte, wurden im Anschluss an die PCR der Fragmentanalyse zugeführt. Hierdurch sollte der Optimierungseffekt quantitativ beurteilt werden.

Die PCR wurde mit dem γ -1-Konsensusprimersatz durchgeführt. Ein Ansatz war hierbei markiert, der andere unmarkiert.

Schritt 1:

Vorversuch mit 37 Proben (s. Tabelle 5), sämtlich nicht älter als 12 Monate, aus der Routinediagnostik. Dieser Vorversuch dient der Festlegung einer Stichprobe für die eigentliche Protokollmodifikation. Drei Stichprobengruppen wurden nach folgenden Kriterien selektiert:

- a. 13 Proben, bei denen nur in der PCR unter Einsatz von nichtmarkierten Primern ein Amplifikat generiert wurde.
- b. 8 Proben, die nur in der PCR mit Fluoreszenz-farbstoffmarkierten Primern ein Amplifikat lieferten.
- c. 16 Proben, die bei keinem der beiden Verfahren ein Amplifikat generierten .

Tabelle 5: Probenkonstellation Versuch 3.5.1.2)i.				
Gruppe	Anzahl Proben	Monoklonal	Biallel-monoklonal	Polyklonal
a.	13	3	1	9
b.	8	2	1	5
c.	16	-	-	-

Folgende Gesichtspunkte waren ausschlaggebend für diese Auswahl:

Gruppe a.:

Hier soll nach der Optimierung des PCR-Protokolls nach Möglichkeit auch die (in der Routinediagnostik bisher erfolglose) markierte PCR ein Amplifikat erzeugen.

Gruppe b.:

Bei dieser Gruppe stand die Frage nach der Ursache im Vordergrund, warum ausschließlich die mit markierten, also mutmaßlich weniger sensitiven, Primern angefertigten PCR-Durchgänge ein Amplifikat erzeugten.

Gruppe c.:

Dient der Klärung der Frage, ob durch eine PCR-Protokollmodifizierung auch hier ein Amplifikat generiert werden kann.

Alle Hautproben entsprachen histologisch Lymphomen, jedoch wiesen die in der PCR positiven Proben in der anschließenden Klonalitätsdiagnostik (TGGE bei unmarkierten, Fragmentanalyse bei markierten) nicht notwendigerweise Klonalität auf.

Zuverlässig ein Amplifikat generierende bzw. signifikant vom Vorbefund abweichende Proben wurden im Anschluss an diesen Vorversuch für die nachfolgenden verwendet.

Schritt 2:

Die Protokollmodifikation basiert in Bezug auf Ablauf und eingesetzte Reagenzien wieder auf der Konsensusprimer-(γ -1)-PCR. Dieses PCR-Protokoll wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterbrochen, um zusätzlich Primer zu applizieren, und zwar jeweils in der auch im Normalprotokoll (s. oben) definierten Menge. Die Unterbrechungen erfolgten jeweils in der Elongationsphase des 20., 30., 35. und 40. Zyklus der PCR, bei letzterer vor der längeren Abschlusselfelongation. Ein Ansatz blieb zum Vergleich unmodifiziert.

Das Probenkollektiv entsprach bis auf die Probe mit biallel-klonalem Amplifikat der Gruppe a. aus Versuch 3.5.1.2)i (s. Tabelle 5). Der Versuch wurde in zwei Durchgängen durchgeführt.

Schritt 3:

Nach der Wahl des optimalen Zeitpunkts für die Primerzugabe, ist in diesem Versuch nun die zugegebene Primermenge erhöht worden: es wurde jeweils die doppelte sowie die zehnfache Primermenge (ausgehend von jeweils 0,7 µl, also 7,0 µl der im Kapitel 3.4 genannten Primer) in den Ansatz pipettiert.

Im Vergleich zum vorhergehenden Versuch blieb es hierbei bei einem Durchgang, da nicht mehr genug DNA vorhanden war. Zwei der zwölf Proben waren verbraucht. Die Stichprobe ist die gemäß Tabelle 5), es fehlen jedoch: eine Probe mit polyklonalem, eine mit monoklonalem Amplifikat.

3.5.1.3 Farbstoffauswahl

Hierauf aufbauend erfolgte die Bewertung der drei (HEX, TET und 6-FAM) Fluoreszenzfarbstoffe anhand folgender Gesichtspunkte (Punkt 2 der Problemstellung): der Farbstoff, welcher die Amplifikation am wenigsten negativ beeinflusst, wird für die γ -1-PCR (dem effektivsten Ansatz) verwendet, da mit ihm 70-80% der möglichen Rearrangements erfasst werden (^{50, 79}) können. Die beiden anderen werden jeweils für die γ -2- bzw. γ -3-PCR-Ansätze verwendet.

Die Erstellung der Farbstoffhierarchie erfolgte mit der bereits im zweiten Teil des ersten Versuchs verwendeten Probengruppe. Die DNA dieser Proben wurde jeweils mit den drei Primergruppen (1, 2 und 3) in wechselnden Farbstoffmarkierungen durch 6-FAM, HEX bzw. TET amplifiziert. Das Ergebnis wurde mittels Fragmentanalyse objektiviert und die so ermittelte Reihenfolge anschließend in allen folgenden Versuchen beibehalten.

3.5.2 Methodenanwendung

In diesem Teil erfolgte die Anwendung des in Kapitel 3.5.1 erarbeiteten PCR-Protokolls an mehreren Stichprobengruppen. Bei allen Proben handelte es sich um in Paraffin eingebettete Hautbioptate, die kryokonserviert worden waren. Die Diagnosestellung, welche für die Zuordnung zu den einzelnen Gruppen herangezogen wurde, erfolgte jeweils durch die dermatohistopathologische Abteilung der Hautklinik der Charité.

3.5.2.1 Anwendung des in Kapitel 3.5.1 erarbeiteten PCR-Protokolls:

a. gesicherte Lymphome

15 Proben von Patienten mit histologisch und klinisch gesicherten Lymphomen (s. Tabelle 6). Die Tabelle berücksichtigt die Ergebnisse der vorherigen Routinediagnostik und gibt die Befunde (Mono-, Bi-, Polyklonalität) mit an. Keine der Proben war zum Zeitpunkt der Bearbeitung älter als 12 Monate.

Diagnose	Anzahl	Vorergebnis γ -1			Vorergebnis γ -2		
		Mono	Bi	poly	Mono	Bi	poly
Mycosis fungoides	8	5	-	3	6	-	2
Sézary-Syndrom	1	-	-	1	1	-	-
Pleo. TCL	4	2	-	-	1	1	-
CD-30 ⁺ -TCL	2	1	1	-	1	-	1

Anmerkungen: Pleo. TCL = klein- bis mittelzelliges pleomorphes T-Zell-Lymphom, CD-30⁺-TCL: großzelliges anaplastisches, CD-30-positives T-Zell-Lymphom.

3.5.2.2 b. lymphomähnliche Dermatosen

Ein Kollektiv von 14 Patientenproben mit einer histologisch den CTCL ähnelnden Krankheit (s. Tabelle 7). Wie zum Teil seit langem bekannt, können diese und andere Dermatosen im Verlauf der Erkrankung ein klonales T-Zell-Hautinfiltrat entwickeln^{94,95,96,97}. Mit den Proben wurde wie unter 3.5.2.1 beschrieben verfahren.

Diagnose	Anzahl	Vorergebnis γ -1		Vorergebnis γ -2	
		Mono	poly	mono	Poly
Ekzem	1	-	-	-	1
Parapso. En Plaques	13	-	9	-	6

3.5.2.3 c. frühe Stadien von Lymphomen

14 Probenpaare von Patienten, welche im Verlauf ihrer Lymphomerkrankung im Frühstadium histologisch noch keinen Hinweis auf eine T-Zell-Neoplasie boten, diese sich jedoch in späteren Hautproben bestätigte. Insgesamt wurden nach histologischen Kriterien 14 jeweils korrespondierende Paare von Patientenproben ausgewählt.

Tabelle 8) stellt die einzelnen Proben, die jeweiligen Entnahmezeitpunkte sowie die histologische Erst- und Folgediagnose dar:

Patient Nr.	Alter ^{a)}	Frühe Diagnose	Späte Diagnose	t ^{a)}
1	4,5	Parapsoriasis en Plaques	Plaque MF	1,4
2	4,3	Chronisches Ekzem	Plaque MF	0,6
3	3,8	Parapsoriasis en Plaques	Ekzem MF	0,6
4	3,0	Parapsoriasis en Plaques	Frühe MF	1,1
5	2,7	Psoriasis	Frühe MF	1,3
6	2,5	Parapsoriasis en Plaques	Plaque MF	0,5
7	2,3	Chronisches Ekzem	Frühe MF	1,4
8	2,1	Chronisches Ekzem	Ekzem MF	1,8
9	2,0	Parapsoriasis en Plaques	Ekzem MF	1,4
10	2,0	Parapsoriasis en Plaques	Ekzem MF	1,8
11	1,0	Chronisches Ekzem	Ekzem MF	0,8
12	0,8	Granulom	Pleo. CTCL ^{b)}	1,1
13	0,6	MF in Remission	Rezidiv einer MF	0,5
14	0,5	Parapsoriasis en Plaques	Ekzem MF	0,6

^{a)} t: Lagerungszeit der Probe zum Zeitpunkt der Bearbeitung in Jahren

^{b)} Klein- bis mittelzelliges pleomorphes T-Zell-Lymphom

3.5.2.4 d. Rezidivdiagnostik

15 Paare von Patientenproben, welche nach initialer histologischer Diagnose eines CTCL und erfolgter Therapie histologisch kein Restinfiltrat oder eine andere Diagnose aufwiesen. Analog zu Versuch 3.5.2.3 wurden hierbei Probenpaare von jeweils einem Patienten zusammengestellt. Die ältere Probe war histologisch lymphomverdächtig gewesen, die jüngere wies keine Charakteristika einer T-Zell-Neoplasie mehr auf (s. Tabelle 9).

Insbesondere die letzten beiden Versuche (s. 3.5.2.3 und 3.5.2.4) tragen somit zur Bestimmung der Frühsensitivität bei, da bei diesen Versuchsgruppen histologisch noch kein Lymphom bzw. kein Rezidiv gesehen wurde und dieser Vorbefund nun mit der modifizierten PCR überprüft werden konnte.

Tabelle 9: Probengruppen von Versuch 3.5.2.4

Patient Nr.	Alter ^{a)}	Frühe Diagnose	Späte Diagnose	t ^{a)}
1	4,3	M pleo. CTCL	Lymphomatoide Papulose	0,7
2	4,0	Tumor MF	Chronisches Ekzem	3,0
3	3,9	Ekzem MF	Ø Restinfiltrat	1,3
4	3,5	MF, lichenoid	Urtikaria pigmentosa	0,7
5	3,3	Plaque MF	Parapsoriasis en Plaque	1,6
6	3,1	MF, foll. Muzinose	Chronisches Ekzem	0,4
7	2,8	Ekzem MF	Ø Restinfiltrat	2,1
8	2,6	Ekzem MF	Chronisches Ekzem	1,4
9	2,2	Ekzem MF	Ø Restinfiltrat	0,7
10	2,2	Ekzem MF	Ø Restinfiltrat	0,8
11	2,0	Ekzem MF	Parapsoriasis en Plaque	1,4
12	1,6	MF, foll. Muzinose	Parapsoriasis en Plaque	0,4
13	1,6	Ekzem MF	Parapsoriasis en Plaque	0,5
14	1,0	Ekzem MF	Parapsoriasis en Plaque	0,3
15	0,5	K-m pleo. CTCL	Pseudolymphom	0,3

Anmerkungen: ^{a)} t: Lagerungszeit der Probe zum Zeitpunkt der Bearbeitung in Jahren

K-m pleo. CTCL: klein- bis mittelzelliges pleomorphes T-Zell-Lymphom. M pleo. CTCL: mittelzelliges pleomorphes T-Zell-Lymphom. Foll. Muzinose: Follikuläre Muzinose.