

4 Ergebnisse

4.1 Versuch I: Vergleich verschiedener DNA-Aufschlussverfahren

4.1.1 PCR nach DNA-Isolierung mit der Routinemethode und einem kommerziellen Kit (Roche® „High Pure PCR Template Preparation Kit“)

Ein positives Ergebnis in unten genannter Tabelle entspricht einer, in der Agarose-Gelelektrophorese unter UV-Licht sichtbaren Bande im korrekten Größenbereich (240-270 bp). Als negativ gilt das Fehlen einer solchen Bande.

Tabelle 10: Ergebnis des Aufschlussvergleichstest a) Routine vs. Roche®

Diagnose	Anzahl gesamt	Hiervon positiv			
		Routine	Rou. FAM ^{c)}	Roche	Roche FAM ^{c)}
MF Ekzem p ^{a)}	8	7	5	1	0
MF Ekzem m ^{b)}	2	2	1	0	0
MF Plaque p ^{a)}	2	2	1	0	0
MF Plaque m ^{b)}	1	1	0	1	0
Pleo. CTCL ^{d)}	1	1	1	0	0
Σ pos.	-	13	8	2	0
Anteil pos.	-	93,0%	57,1%	14,3%	0

^{a)}polyklonal

^{b)}monoklonal

^{c)} Primer ist durch 6-FAM markiert

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

Dieser Vorversuch verdeutlicht zwei Dinge:

- 1) Die offensichtliche Überlegenheit der Routineaufschlussmethode gegenüber dem Aufschlusskit, wie die Gegenüberstellung der Anzahl positiver Ergebnisse bei der Routine und der Verwendung des Roche®-Kits zeigt.
- 2) Die geringere Effektivität fluoreszenzmarkierter Primer gegenüber unmarkierten. Insbesondere bei der Benutzung des Routineverfahrens liegt die Anzahl der positiven Ergebnisse bei den unmarkierten Primern annähernd doppelt so hoch wie bei fluoreszenzmarkierten.

4.1.2 Zusätzlicher Vergleich bei Verwendung des Qiagen® „QIAmp DNA Blood Midi Kit“

Die Ergebnisse sind jeweils in Tabelle 11 zusammengefasst, wobei für eine schwache, d.h. ohne Hilfsmittel gerade erkennbare Bande in der Agarosegelelektrophorese ein Punkt, für eine stärkere zwei, für eine intensive Bande drei Punkte vergeben wurden (s. auch Kap. 3.3.1.4). Für alle Farbstoffe wurde dieser Punktwert addiert, um auf diese Weise zu ermitteln, welche Methode im Mittel die Ausbeute am meisten begünstigte.

Anmerkungen: hierbei kommen nur noch fünf Proben (s. Tabelle 4) zum Einsatz, die nicht mit denen aus Versuch 4.1.1 übereinstimmen. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt (Durchgang 1 und 2, siehe auch Kapitel 3.5.1.1). In Klammern in Tabelle 11 ist die jeweils erreichbare (bei fünf Proben und maximal drei Punkten also 15) Punktzahl angegeben.

	Routine	Roche®	Qiagen®
1. Durchgang	14 (15)	4 (15)	8 (15)
2. Durchgang	14 (15)	5 (15)	7 (15)
Summe	28 (30)	9 (30)	15 (30)

Dieser – semiquantitative – Versuch verdeutlicht, dass auch der Einsatz eines Aufreinigungskits für PCR-Produkte zu keiner Ergebnisverbesserung, sondern eher zu einer verminderten Fluoreszenzintensität führt.

Basierend auf diesen Erkenntnissen, wurden alle im folgenden beschriebenen Experimente unter Verwendung des Routineaufschlussverfahrens durchgeführt.

4.2 Versuch II: Optimierung des in der Routinediagnostik verwendeten PCR-Protokolls

4.2.1 Vorversuch zur Stichprobenauswahl

In der folgenden Auswertung werden lediglich die Ergebnisse der Proben angegeben, welche im Wiederholungstest von den früheren Ergebnissen abwichen. Sofern relevant, wird hierbei zwischen schwachen bzw. intensiven Banden differenziert.

Verwendet wurden die unter 3.5.1.2 definierten Probengruppen aus der Routinediagnostik:

- A: 13 Proben, die im Vorversuch nur in der PCR ohne Einsatz von fluoreszenzmarkierten Primern ein Amplifikat lieferten.
- B: 8 Proben, die im Vorversuch nur in der PCR mit farbstoffmarkierten Primern ein Amplifikat generierten.
- C: 16 Proben, bei denen im Vorversuch mit keinem der beiden Verfahren ein Amplifikat generiert werden konnte.

Ergebnis:

In Probengruppe A konnten mit unmarkierten Primern 12 der zuvor 13 positiven Ergebnisse reproduziert werden, nicht eine einzige PCR gelang auch mit markierten Primern. In Gruppe B hingegen konnten mit unmarkierten Primern keine Banden generiert werden. Mit markierten Primern waren von den acht positiven Vorproben lediglich vier positiv. In Gruppe C gelang es, mit unmarkierten Primern bei zwei Proben ein Amplifikat zu generieren, alle übrigen Amplifikationen blieben erfolglos.

Somit ergab sich keine systematische Abweichung zur vorrangestellten Routine, welche drei Monate vor dem obigen Versuch erfolgt war. Daher wurden für den Folgeversuch die 13 Proben aus Probengruppe A ausgewählt.

4.2.2 PCR-Protokollmodifikation

1. Schritt:

Stichprobe s. Tabelle 5, Gruppe A. Die Auswertung der einzelnen Banden erfolgte nach dem Punkteschema aus Kapitel 3.3.1.4. Es wurde die Punktzahl für alle Primerzugabezeitpunkte erfasst, anschließend addiert sowie in Tabelle 13 dargestellt (in Klammern der erreichbare Gesamtwert von 39 bei 13 Proben und maximal 3 Punkten). Der Versuch wurde einmalig wiederholt (1. und 2. Durchgang).

Tabelle 12: Ergebnisse des ersten Protokollmodifizierungsversuchs

	Unmodifiziert	20. Zyklus	30. Zyklus	35. Zyklus	40. Zyklus
1. Durchgang	10 (39)	22 (39)	17 (39)	18 (39)	18 (39)
2. Durchgang	11 (39)	20 (39)	19 (39)	21 (39)	16 (39)
Gesamt	21 (78)	42 (78)	36 (78)	39 (78)	34 (78)

Offensichtlich gewährleistete diese Methode, im Vergleich zum unmodifizierten Protokoll, zwar eine generelle Verbesserung der Ausbeute. Dennoch war augenscheinlich der Zugabezeitpunkt an sich hierfür nicht ausschlaggebend, da die Punktzahl für den 20., 30. und 35. Zyklus nicht wesentlich voneinander differiert. Daher erfolgte eine weitere Modifikation :

Bei diesem Durchgang wurden als Zugabezeitpunkte jeweils der 20. sowie der 40. Zyklus gewählt. Stichprobe und Bewertungsschema s. Tabelle 5) und Schritt 1.

Ergebnis:

Für die unmodifizierte PCR ergab sich eine Punktschnee von 8.

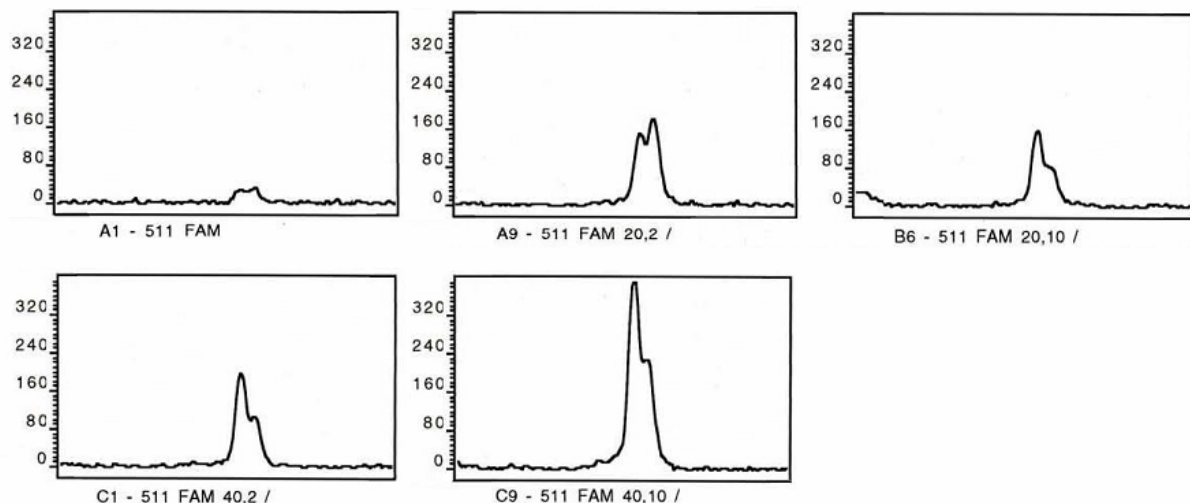
Bei Zugabe der doppelten Primermenge nach 20 Zyklen betrug die Punktschnee 10, bei Zugabe der zehnfachen Menge 7.

Bei Zugabe der doppelten Primermenge nach 40 Zyklen betrug die Punktschnee 11, ebenso bei Zugabe der zehnfachen Menge.

Somit ergab sich auch hier keine signifikante Verbesserung der Ausbeute. Ein Befund, der auch durch die deutlich präzisere Gegenüberstellung der Fragmentanalyseergebnisse der in diesem Versuch verwendeten Proben gestützt wird (s. Abb. 12-16).

Abb. 12-16

Elektropherogramme bei unterschiedlichen Zugabezeitpunkten bzw. Konzentrationen



Die Elektropherogramme zeigen die Peakhöhendifferenz bei verschiedenen Zugabezeitpunkten resp. Primermengen: 20/40: Zugabe nach dem 20. bzw. 40. Zyklus. 2/10: zwei- bzw. zehnfache Primermenge wurde zugesetzt.

Alle folgenden Versuche wurden, den obigen Erkenntnissen folgend, mit der Modifikation einer Primerzugabe nach dem 20. Zyklus mit der doppelten Konzentration durchgeführt.

4.3 Versuch III: Farbstoffauswahl

Das Probenkollektiv umfasste die bereits im Versuch 4.1.2 eingesetzten fünf Lymphomproben (s. Tabelle 4). Die Ergebnisinterpretation erfolgte einerseits semiquantitativ aus der

Agarosegelelektrophorese (s. Tabelle 15) sowie anschließend mittels Fragmentanalyse (in Tabelle 16). Die Punktschme wurde erneut, wie unter 3.3.1.4 beschrieben, ermittelt. Bei fünf Proben betrug der Maximalwert folglich 15.

Tabelle 13: Semiquantitatives Ergebnis des Farbstofftests nach Gelelektrophorese

	F, γ -1	H, γ -1	T, γ -1	F, γ -2	H, γ -2	T, γ -2	F, γ -3	H, γ -3	T, γ -3
Punktsumme	1	2	11	0	11	12	0	3	6

Anmerkungen: F = 6-FAM, H = Hex, T = TET

Dieser Versuch zeigt eine deutliche Überlegenheit des Farbstoffes TET gegenüber den beiden anderen, wobei 6-FAM am wenigsten sensitiv ist. Dieses Ergebnis wird durch die Fragmentanalyse noch erhärtet und in den Abbildungen 17-19 dargestellt. Die folgende Tabelle wurde hierbei nach dem in Kapitel 3.3.1.5 angegebenen Schema ausgewertet, erneut waren 15 Punkte der maximal erreichbare Wert:

Tabelle 14: Auswertung der Fragmentanalyse des Farbstoffvergleichs

	F, γ -1	H, γ -1	T, γ -1	F, γ -2	H, γ -2	T, γ -2	F, γ -3	H, γ -3	T, γ -3
Punktsumme	*	3	7	*	1	6	*	*	2

Anmerkungen: - F = 6-FAM, H = Hex, T = TET

- mit „*“ gekennzeichnete Felder entsprechen einer negativen FFA bei gleichzeitig negativer Gelelektrophorese

Abb. 17-19

Nachlassen der Fluoreszenzintensität als Funktion der PCR-Ausbeute bei verschiedenen Farbstoffen

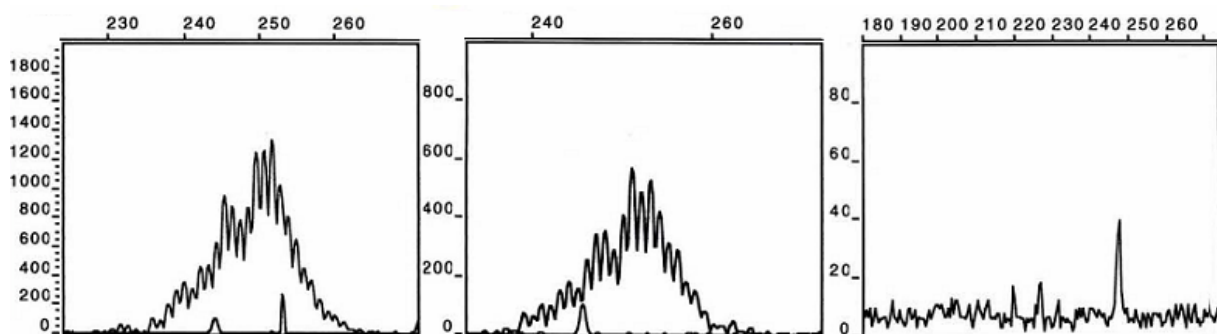


Abb. 17: TET

Abb. 18: HEX

Abb. 19: FAM

Gezeigt wird die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei drei Elektropherogrammen der gleichen Probe in Abhängigkeit vom verwendeten Farbstoff.

Aufgrund dieses Versuches und der oben erläuterten Ergebnisse, fiel die Wahl auf folgendes Anwendungsschema für die fluoreszenzmarkierten Primer:

- 1) Die γ -1-PCR wurde ab jetzt mit TET-markierten Primern durchgeführt.
- 2) Die γ -2-PCR mit HEX-markierten Primern.
- 3) Die γ -3-PCR mit 6-FAM markierten Primern.

4.4 Versuch IV: Anwendung des modifizierten PCR-Protokolls bei gesicherten Lymphomen

Wie in Kapitel 3.5 dargelegt, erfolgt nach Abschluss der Etablierungsphase nun die Anwendung des modifizierten PCR-Protokolls. In diesem Versuch geschieht dies zunächst an Proben von 15 histologisch gesicherten Lymphomen (s. Tabelle 6).

Die unten stehenden tabellarischen Darstellungen berücksichtigen jeweils den Lymphomtyp und die durchgeführte PCR (γ -1, γ -2 und γ -3). Die Gelelektrophorese wurde erneut, wie unter 3.3.1.4 aufgeführt, durch ein Punktwertesystem beurteilt. Bei der Fragmentanalyse wird zusätzlich der jeweilige Klonalitätsbefund (mono-, bi-, oligo- bzw. polyklonal) zugeordnet. Zum Methodenvergleich wird das Ergebnis der vorherigen Routinediagnostik mittels TGGE angeführt.

Tabelle 15: γ -1-PCR an gesicherten Lymphomen

a. Diagnose	Gesamt	MF	SS	Pleo. TCL	CD-30 ⁺ -TCL
b. Anzahl	15	8	1	4	2
c. PCR pos.	12 (80%)	8(100%)	1	1	2
d. Gel-Score	33/45	20/24	1/3	3/12	6/6
e. FFA auswertb.	11	8	1	1	1
f. FFA m	9	6	1	1	1
g. FFA bi	0	0	0	0	0
h. FFA ol	1	1	0	0	0
i. FFA poly	1	1	0	0	0
j. FFA-Score	27/45	21/24	1/3	3/12	3/6
k. TGGE-Abw.	5	2	1	1	1
l. Befundabw.	3	2	1	0	0

Anmerkungen: MF = Mycosis fungoides, SS = Sézary-Syndrom, Pleo. TCL = klein- bis mittelzelliges pleomorphes T-Zell-Lymphom, CD-30⁺-TCL: großzelliges anaplastisches, CD-30-positives T-Zell-Lymphom. Abw.: Abweichung zu Vorbefunden

- zu d./j.: tatsächlich erreichter zum theoretisch erreichbaren Score. In d. ist die Punktsumme für die Gelelektrophorese, in j. diejenige für die FFA angegeben.
- zu f.-i.: FFA: m = monoklonal, bi = biallel-klonal, ol = oligoklonal, poly = polyklonal.
- zu k.: Alle Unterschiede zur FFA (auch wenn z.B. kein Amplifikat generiert werden konnte).
- zu l.: Tatsächliche Änderungen des Befunds (z.B. mono-, statt vorher polyklonal)

Somit ist das modifizierte PCR-Protokoll in Verbindung mit der FFA für die Klonalitätsdiagnostik am γ -1-Genlocus geeignet. Insbesondere die DNA der Mycosis fungoides-Proben ließ sich zuverlässig amplifizieren. Interessant hierbei sind die tatsächlich relevanten Diagnoseänderungen im Vergleich zur Routinediagnostik: So erwies sich eine, in der TGGE zuvor als polyklonal bezeichnete, MF-Probe in der jetzigen Fragmentanalyse als oligo-, eine zuvor polyklonale Probe einer Mycosis fungoides als monoklonal. Ferner zeigte sich auch in der Probe des Sézary-Syndroms eine (schwache) Monoklonalität bei vorbeschriebener Polyklonalität. Ein weiterer Befund war das Vorherrschen außergewöhnlich hoher Peaks in der FFA, vornehmlich bei den MF-Proben (s. Abb. 20):

Abb. 20

Hoher Peak im Elektropherogramm einer γ -1-PCR einer Hautprobe bei MF

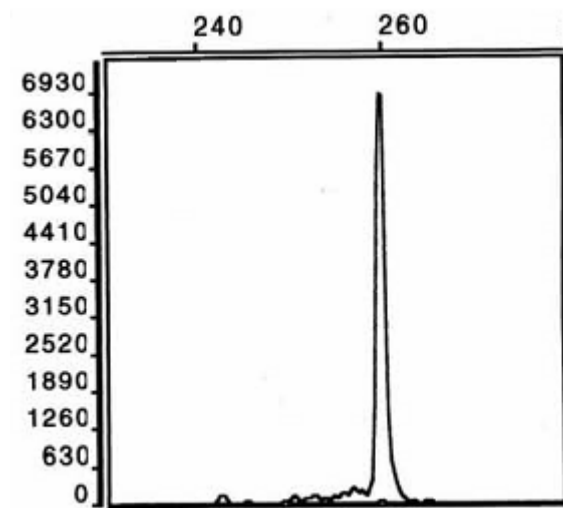


Tabelle 16 stellt in gleicher Weise die Ergebnisse der γ -2-PCR dar:

Tabelle 16: γ -2-PCR an gesicherten Lymphomen					
a. Diagnose	Gesamt	MF	SS	Pleo. TCL	CD-30 ⁺ -TCL
b. Anzahl	15	8	1	4	2
c. PCR pos.	11 (73%)	7 (87,5%)	1	1	2
d. Gel-Score	25/45	15/24	2/3	2/12	6/6
e. FFA auswertb.	9	7	1	0	1
f. FFA m	5	4	1	0	0
g. FFA bi	2	1	0	0	1
h. FFA ol	1	1	0	0	0
i. FFA poly	1	1	0	0	0
j. FFA-Score	18/45	13/24	3/3	0/12	2/6
k. TGGE-Abw.	8	3	0	3	2
l. Befundabw.	3	2	0	0	1

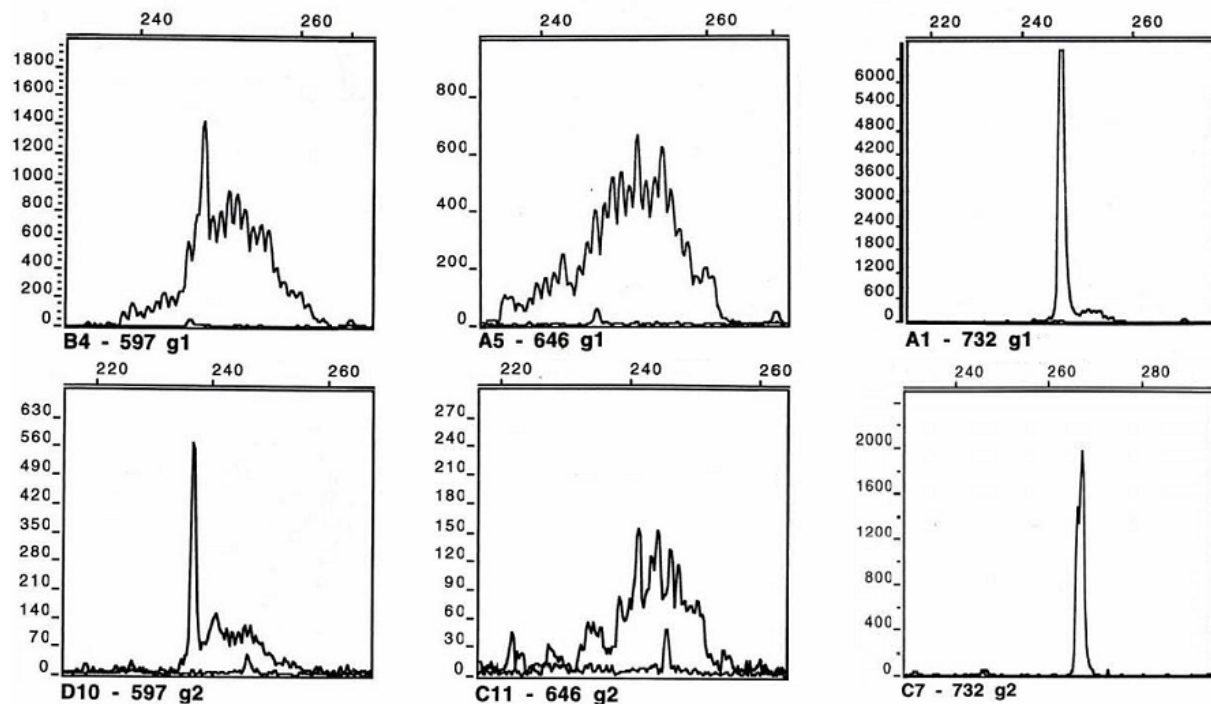
Anmerkungen: s. Anmerkungen zu Tabelle 15)

Erstes Ergebnis dieses Versuchs war die Tatsache, dass bei fünf der obigen Proben sowohl in der γ -1 als auch γ -2-PCR ein monoklonales Amplifikat generiert werden konnte. Dies traf auf vier MF- und den Sézary-Syndrom-Fall zu. Wie erwartet fiel bei der γ -2-PCR die Frequenz an klonalen FFA-Befunden im Vergleich zu oben geringer aus. Der Grund liegt in den weniger häufig rearrangiert vorliegenden Rezeptorgenen. Interessant auch hier wieder die Abweichungen von der TGGE: So wurde eine, vorher als monoklonal klassifizierte DNA-Probe als oligoklonal, eine weitere als biallel-klonal anstelle von monoklonal erkannt. Schließlich ergab sich eine Änderung bei den CD-30⁺ Lymphomen von poly- zu biallel-klonal. Diese drei Befunde, wie auch die der Befunddifferenzen, welche für die γ -1-PCR oben beschrieben worden waren, sind Ausdruck der höheren Trennschärfe der Fragmentanalyse im Vergleich zur TGGE. Dies zeigt sich unter anderem daran, dass eng zusammenliegende Banden von der TGGE als monoklonal erkannt worden waren, diese Einzelbande jedoch durch die FFA zu zwei Peaks aufgelöst werden konnte. Daneben verdeutlichen die vergleichenden Abbildungen 21 bis 26 die höhere Effektivität von TET zu HEX. Die gemessenen Peaks der γ -1-PCR fallen dabei deutlich höher als die der γ -2-PCR aus.

Die 6-FAM-markierte γ -III-PCR hingegen lieferte in keiner der Proben ein auswertbares Ergebnis – mutmaßlich Ausdruck der Kombination der geringen Sensitivität sowohl der PCR sowie des Farbstoffes.

Abb. 21-26

Differenz der relativen Fluoreszenzintensität zwischen γ -1- und γ -2-PCR



Die Abbildungen zeigen die paarweise übereinander angeordneten γ -1- und γ -2-PCR-Ergebnisse. Die γ -2-Fluoreszenzen sind dabei grundsätzlich deutlich weniger intensiv. Alle Elektropherogramme wurden im selben Durchgang generiert.

Eine Übersicht über alle erfolgreich amplifizierte und einer Diagnosestellung zugeführten Proben zeigt zusammenfassend Tabelle 17:

Tabelle 17: Zusammenfassendes Ergebnis der γ -1/2-PCR an gesicherten Lymphomen

a. Diagnose	Gesamt	MF	SS	Pleo. TCL	CD-30 ⁺ -TCL
b. Anzahl	15	8	1	4	2
c. PCR pos.	12(80%)	8	1	1	2
d. Klonalität FFA	11 (91,6%)	7 (87,5%)	1	1	2
e. Klonalität TGGE	10 (83%)	7 (87,5%)	0	1	2

Anmerkungen: Grundsätzlich gelten die Anmerkungen wie oben. Zu c.: Dies entspricht der Summe der entweder in der γ -1- oder γ -2-PCR positiven Proben. Zu d.: Klonalität FFA: Anzahl und Anteil (an den pos. PCR insgesamt) der FFA-Befunde, die mono-, bi- oder oligoklonal ausfielen. Zu e.: Anzahl und Anteil (an den pos. PCR insgesamt) der TGGE-Befunde, die mono- oder oligoklonal ausfielen. Zur Vergleichbarkeit mit der FFA werden hierbei nur die Proben berücksichtigt, welche bereits in Zeile d. mit inbegriffen sind.

In dieser, selektiven, Stichprobe konnten somit bei 80% der Proben erstens DNA amplifiziert und zweitens ein Befund durch die Fragmentanalyse erhoben werden. Diese Quote betrug bei den Mycosis-fungoides-Fällen, welche die häufigste Manifestationsform der CTCL darstellen,

100 Prozent. Auffallend war ferner, dass bei diesen Proben die Sensitivität von TGGE und FFA in der Addition beider erfolgreicher PCR (1 und 2) übereinstimmt. Allerdings war bei diesen Proben die Amplifikatausbeute sehr hoch, was sich an der intensiven Fluoreszenz mit hohen Peaks zeigt. Dazu hat die FFA in mehreren Proben, die von der TGGE nicht als klonal identifiziert wurden, Klonalität angezeigt.

4.5 Versuch V: Anwendung des modifizierten PCR-Protokolls bei lymphomähnlichen Dermatosen

Analog zu obigem Versuch wurden 14 Proben von Patienten mit einer Erkrankung mit T-Zell-lymphomähnlicher Histologie untersucht. Tabelle 20 fasst diesen Versuch für die γ -1- und γ -2-PCR zusammen. Die γ -3-PCR erwies sich erneut als nicht effektiv. Die PCR-Ergebnisse fielen insgesamt schwach aus, da die verwendeten Proben aus Gründen der Einheitlichkeit in ihren Gewinnungszeitpunkten zeitlich eng beieinander liegen, in der Folge aber etwas älter waren (ca. 12 Monate im Mittel). In der folgenden Tabelle sind daher lediglich die, überwiegend aussagekräftigen, Ergebnisse der Fragmentanalyse aufgeführt, auf eine Auswertung der Gelelektrophorese wurde verzichtet:

Tabelle 18: Ergebnis der γ -1/2-PCR an histologisch lymphomähnlichen Dermatosen

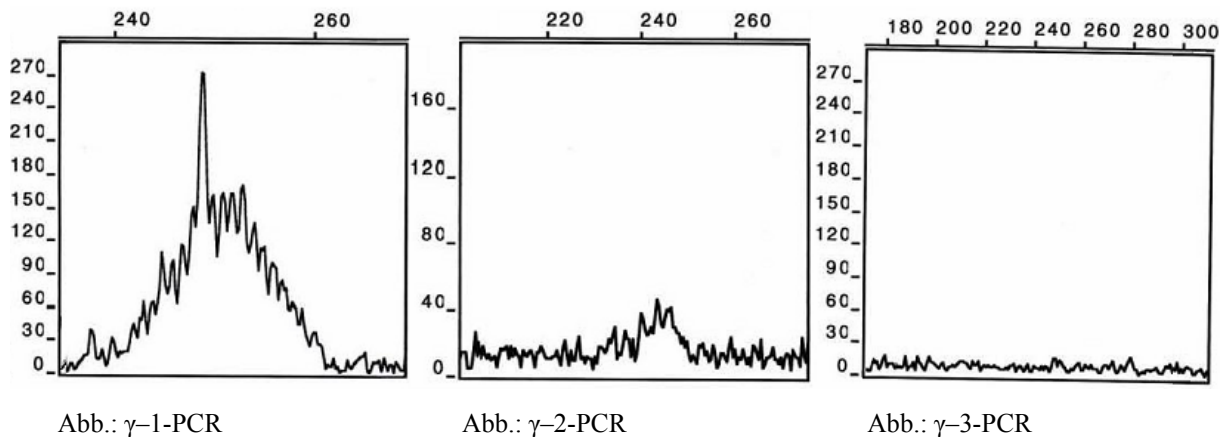
Diagnose	Ekzem γ -1	Ekzem γ -2	PP γ -1	PP γ -2
Anzahl	1	1	13	13
FFA auswertbar	1	0	6	3
FFA Score	1/3	0/3	8/39	3/39
FFA monoklonal	0	0	1	0
FFA polyklonal	1	0	5	3
Befundabweichung	0	0	1	0

Anmerkungen: Befundabweichung bedeutet hier wieder eine Diskrepanz zwischen vorheriger Routinediagnostik durch TGGE und jetziger Fragmentanalyse. PP: Parapsoriasis

Ergebnis dieser Versuchsanordnung ist zunächst die Erkenntnis einer insgesamt schwachen PCR-Ausbeute. In insgesamt neun Fällen war dennoch eine Diagnosestellung mittels FFA möglich. In einem Fall von großfleckiger Parapsoriasis en Plaque konnte in der γ -1-PCR durch diese Methode der vorherige Befund von Polyklonalität in Monoklonalität revidiert werden. Der schon in den Vorversuchen beschriebene Umstand einer abnehmenden PCR-Effizienz von der γ -1- bis hin zur γ -3-PCR wird anhand der Abbildungen verdeutlicht.

Abb. 27-29

Abnahme der PCR-Effizienz von der γ -1- bis hin zur γ -3-PCR anhand einer Probe



4.6 Versuch VI: Anwendung des modifizierten PCR-Protokolls bei frühen Stadien von Lymphomen

In diesem Versuch wurden jeweils Probenpaare eines Patienten zusammengestellt, bei denen eine erste Histologie keinen Lymphomverdacht ergab, dieser sich in einer späteren Biopsie jedoch bestätigte.

In Tabelle 19 sind die aus Tabelle 8 hergeleiteten Probenpaargruppen dargestellt:

Tabelle 19: Übersicht über die assoziierten Probenpaargruppen

Patient/Proben	Frühe Diagnose	Späte Diagnose	Anzahl
A	Parapsoriasis	MF, Ekzem	5
B	Ekzem	MF, Ekzem	3
C	Parapsoriasis	MF, Plaque	2
D	Ekzem	MF, Plaque	1
E	Psoriasis	MF, Ekzem	1
F	Granulom	Pleo. CTCL	1
G	MF, remittiert	MF Rezidiv	1

Anmerkungen: Die Kennbuchstaben A-G werden in künftigen Tabellen zur Charakterisierung der Diagnosepaarung verwendet werden.

Tabelle 20 dokumentiert jeweils für die γ -1- bzw. γ -2-Genloci die Ergebnisse. Die γ -3-PCR wurde für diesen und die folgenden Versuche aufgrund ihrer Ineffektivität nicht mehr angewendet. Eine Korrelation mit älterer Klonalitätsanalysen war in diesem Rahmen nicht möglich, da diese bei mangelndem histologischem Lymphomverdacht unterblieben war. Die Ermittlung des Punktwertes für die Gelelektrophorese erfolgte erneut wie unter 3.3.1.4, die

für die Fragmentanalyse wie unter 3.3.1.5 angegeben. Die Ergebnisse der Klonalitätsanalysen sind jeweils nach frühen und späten Proben sowie nach den angewendeten Methoden (Elektrophorese oder FFA) getrennt angegeben.

Tabelle 20: γ -1/2-PCR- bzw. FFA-Ergebnisse bei den Probengruppenpaaren

Patient/Proben gem. Tab. 19	A		B		C		D		E		F		G	
	γ -1	γ -2	γ -1	γ -2	γ -1	γ -2	γ -1	γ -2	γ -1	γ -2	γ -1	γ -2	γ -1	γ -2
a. PCR früh pos.	2/5	1/5	1/3	1/3	1/2	0	1	1	1	1	1	1	1	0
b. PCR spät pos.	3/5	2/5	1/3	1/3	1/2	0	1	1	1	1	1	0	1	1
c. PCR früh Score	5/15	3/15	2/9	3/9	2/6	0	2/3	3/3	2/3	2/3	1/3	3/3	1/3	0
d. PCR spät Score	6/15	4/15	1/9	3/9	1/6	0	2/3	2/3	2/3	3/3	2/3	0	1/3	2/3
e. FFA früh pos.	2/5	1/5	1/3	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
f. FFA spät pos.	2/5	1/5	1/3	1/3	1/3	0	1	1	1	1	0	0	1	1
g. FFA früh klonal	1/5	1/5	1/3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
h. FFA spät klonal	1/5	1/5	0	1/3	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1

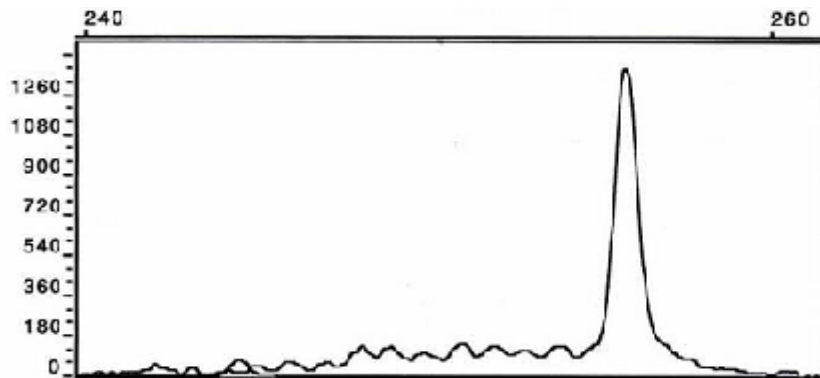
Anmerkungen: Klonal (in Zeile g. und h.) bedeutet in diesem Zusammenhang Bi- oder Monoklonalität

Insgesamt gesehen zeigt dieser Versuch folgende interessante Befunde:

- In den unter A subsummierten Probenpaaren gelang bereits in einer der frühen, histologisch unverdächtigen Proben der Nachweis eines hohen monoklonalen Peaks (s. Abb. 30).
- Dies gelang ebenso in einer der Proben aus Gruppe B. Bei diesen Patienten wäre eine Fragmentanalyse für eine frühere Diagnosestellung hilfreich gewesen.
- Erwähnenswert sind ferner die Bestätigungen der Histologien in den Gruppen D und G: die nicht lymphomverdächtige frühe Biopsie weist jeweils keine, die spätere, histologisch als Lymphom klassifizierte, Probe weist eine klonale Zellexpansion in der FFA auf.

Abb. 30

Monoklonales Fluoreszenzmuster in einer PCR aus einem histologisch nicht lymphomverdächtigen Biopstat



Für die γ -2-PCR lassen sich folgende Aussagen machen: zunächst bestätigt sich die bereits häufiger angetroffene und durch die schwächere Fluoreszenz gezeigte, insgesamt geringere PCR-Effizienz dieses Ansatzes im Vergleich zur γ -1-PCR. Ansonsten ergibt sich ein ähnlicher Befund insofern, dass erneut bei einer der Proben der Gruppe A (erneut handelt es sich – wie bei 4.4 – um die gleiche Probe wie unter γ -1) sowie bei der Probe aus Gruppe D Klonalität bereits vor Auftreten offensichtlicher histologischer Lymphomcharakteristika aufzuzeigen war.

Tabelle 21 fasst die relevanten Ergebnisse beider PCR noch einmal in einer Übersicht zusammen:

Tabelle 21: Übersicht über die Ergebnisse beider PCR			
	γ -1-PCR	γ -2-PCR	Gesamt
Anteil erfolgreicher PCR / alle PCR – frühe Proben	8/14	5/14	13/28
Anteil erfolgreicher PCR / alle PCR – späte Proben	9/14	6/14	15/28
Abweichender Befund zur histol. Diagnose der frühen Probe	3	1	4

Anmerkungen: Es sind nur die Diagnoseänderungen der frühen (d.h. histologisch nicht lymphomverdächtigen) Proben aufgeführt, da in der späteren Probe das Lymphom ohnehin auch histologisch gesichert worden war. Ferner ist die Probe, bei der in der γ -2-PCR eine Diagnoseänderung in der Gruppe A auffiel, identisch mit der der γ -1-PCR.

4.7 Versuch VII: Anwendung des modifizierten PCR-Protokolls bei Patienten, mit zunächst lymphompositiver und in späteren Proben abweichender histologischer Diagnose

Analog zum Vorversuch wurde das Verfahren nun an Probenpaarungen angewendet, bei denen – bei lymphompositiver Vorhistologie – im Verlauf entweder eine Remission oder eine Diagnoseänderung eingetreten war. Wie im Vorversuch werden in Tabelle 22 die aus Tabelle 9 abgeleiteten Charakteristika der einzelnen Probenpaargruppen zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 22: Übersicht über die assoziierten Probenpaargruppen

Patient/Proben	Frühe Diagnose	Späte Diagnose	Anzahl
A	MF, Ekzem	Ø Restinfiltrat	5
B	MF, Ekzem	Parapsoriasis	3
C	K-m pleo. CTCL	Pseudolymphom	1
D	M pleo. CTCL	Lymph. Pap.	1
E	MF, Tumor	Chron. Ekzem	1
F	MF, lichenoid	Urtikaria pigm.	1
G	MF, Plaque	Parapsoriasis	1
H	MF, foll. Muc.	Ekzem	1
I	MF, foll. Muc.	Parapsoriasis	1

Anmerkungen: Kennbuchstaben siehe Tabelle 19. K-m pleo. CTCL: klein- bis mittelzelliges pleomorphes T-Zell-Lymphom. M pleo. CTCL: mittelzelliges pleomorphes T-Zell-Lymphom. Lymph. Pap.: Lymphomatoide Papulose. Urtikaria pigm.: Urtikaria pigmentosa. Foll. Muc.: Follikuläre Muzinose.

Die Tabellen 23 und 24 zeigen die Ergebnisse dieses Versuchs. Wieder wurden die Punktwerte für die Gelelektrophorese wie unter 3.3.1.4, die für die Fragmentanalyse wie unter 3.3.1.5 ermittelt. Die Ergebnisse der Klonalitätsanalysen sind erneut jeweils nach frühen und späten Proben sowie nach den angewendeten Methoden (Elektrophorese oder FFA) getrennt angegeben.

Tabelle 23: γ -1 bzw. γ -2-PCR- bzw. FFA-Ergebnisse bei den Probenpaarungen A-D

Kennung	A		B		C		D	
	γ -1	γ -2	γ -1	γ -2	γ -1	γ -2	γ -1	γ -2
a. PCR früh pos.	3/5	2/5	1/3	1/3	1	1	1	0
b. PCR spät pos.	2/5	3/5	1/3	1/3	1	1	1	0
c. PCR früh Score	8/15	4/15	1/9	1/9	1/3	1/3	3/3	0
d. PCR spät Score	4/15	7/15	3/9	2/9	2/3	2/3	2/3	0
e. FFA früh pos.	1/5	0	1/3	1/3	1	1	0	0
f. FFA spät pos.	2/5	2/5	1/3	1/3	0	1	0	0
g. FFA früh klonal	1/5	0	1/3	1/3	0	0	0	0
h. FFA spät klonal	0	0	0	0	0	0	0	0

Anmerkungen: Klonal (in Zeile g. und h.) bedeutet in diesem Zusammenhang Bi- oder Monoklonalität

Tabelle 24: γ -1 bzw. γ -2-PCR - bzw. FFA-Ergebnisse bei den Probenpaarungen E-I

Kennung	E		F		G		H		I	
	γ -1	γ -2	γ -1	γ -2	γ -1	γ -2	γ -1	γ -2	γ -1	γ -2
a. PCR früh pos.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
b. PCR spät pos.	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
c. PCR früh Score	1/3	2/3	1/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3	1/3	1/3
d. PCR spät Score	1/3	3/3	1/3	1/3	0	1/3	0	1/3	1/3	0
e. FFA früh pos.	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
f. FFA spät pos.	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
g. FFA früh klonal	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
h. FFA spät klonal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anmerkungen: Klonal (in Zeile g. und h.) bedeutet in diesem Zusammenhang Bi- oder Monoklonalität

Dieser Versuch zeigt neben der insgesamt schwachen Fluoreszenz im Gegensatz zu Versuch 6 keine durch die Fragmentanalyse bedingten Diagnoseänderungen in dem Sinne, dass in den späten Proben noch Klonalität nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zu Versuch 4.6 lagen für die späten Proben hier allerdings TGGE-Diagnosen vor. Diese stimmten sämtlich mit dem FFA-Befund überein. Ferner zeigte sich erneut die insgesamt geringere Effizienz der γ -2-PCR. Jedoch ergab auch dieser Durchgang keine diagnostischen Vorteile gegenüber der Histologie sowie der vorliegenden TGGE, die auch hier in den späten Proben die Ergebnisse der Fragmentanalyse verifiziert.