

5 Diskussion

5.1 Methoden zur Diagnostik von Lymphomen im Vergleich

In den letzten Jahren haben sich die PCR-gestützten, molekularbiologischen Methoden in der Diagnostik kutaner T-Zell-Lymphome weitgehend gegen andere Methoden durchgesetzt.

Vornehmlich liegt dies daran, dass Klonalität als mutmaßlich sicheres Zeichen einer malignen Zelltransformation durch neue Auftrennungsmethoden mit hoher Trennschärfe zuverlässiger nachgewiesen werden kann. Nichtsdestoweniger bleibt die Frühdiagnose mit der höchsten Potenz einer Lebenszeitverlängerung auch mit dieser Methode trotzdem kein leicht zu gewährleistendes Ziel.

Für die Frühdiagnostik durch PCR ist hierbei die anfangs häufig geringe Dichte des klonalen T-Zellinfiltrates ein limitierender Faktor. Diese liegt dann unter der im Einleitungsteil mit 1-5% klonalen Zellen vor polyklonalem Hintergrund angegebenen Nachweisgrenze^{75,76}. Aber selbstverständlich weisen auch alle übrigen diagnostischen Modalitäten jeweils methoden- bzw. pathomechanismusabhängige Defizite auf. Die wichtigsten Methoden und deren typische Nachteile sind im Folgenden dargestellt.

Histologisch wie klinisch ähnelt eine frühe Mycosis fungoides in der Regel einem chronischen Ekzem. So finden sich entsprechend neben Hautatrophie und milder (oder auch fehlender) Parakeratose nur spärlich basalmembrannahe Lymphozyten, welche zudem nur selten Kernatypien aufweisen⁹⁸. Die pathognomonischen cerebriformen Zellkerne sowie sonstige Kernatypien sind gewöhnlich späteren Stadien der Erkrankung vorbehalten. Dazu zählen übergroße Nuklei, bandförmig unterhalb der Basalmembran gruppierte Lymphozyten oder epidermale, zirkulär um nekrotisch gewordene Keratinozyten angeordnete T-Zellen (so genannte Pautriersche Mikroabszesse) sowie zytoplasmatische Halo-Phänomene.⁹⁹

Die sehr späte Diagnose im Tumorstadium ist als solche unproblematisch. Hier herrscht das Bild des unter Umständen metastasierenden Lymphoms vor, welches durch den verloren gegangenen Epidermotropismus der Lymphomzellen zu erklären ist. Die Zellen können in diesem Fall alle Zeichen einer malignen Entartung bis zum Vorkommen von immunoblastischen Zellformen aufweisen.

Olerud et al. konnten zudem zeigen, dass bei einer histologischen Diagnosestellung häufig zahlreiche Probeentnahmen notwendig sind, die eine erhebliche Patientenbelastung darstellen¹⁰⁰. Diese Modalität allein ist zudem in der Regel nicht für eine Diagnose in frühen Krankheitsstadien ausreichend¹⁰¹. Es fehlt u.a. eine vereinheitlichte Bewertung von Biopaten

im Sinne eines Scores, welcher die histologischen Charakteristika von malignen Zellen gewichtet¹⁰².

Ein anderes diagnostisches Mittel ist die Elektronenmikroskopie, die vornehmlich auf dem ultrastrukturellen Nachweis malignitätsverdächtiger Veränderungen, insbesondere des Zellkerns beruht.

Hier handelt es sich vor allem um randständige Chromatinkondensationen, tiefe Kernmembraninvaginationen, „nukleäre Taschen“ sowie eine Erhöhung des DNA-Inhaltes der Kerne über das normale diploide Niveau. Dieser Methodik wurde eine Überlegenheit gegenüber der herkömmlichen Histologie bescheinigt¹⁰³.

Die Erfassung weiterer Aspekte der Mikroarchitektur kutaner Lymphome, die über die Deskription der eigentlichen Lymphozyten hinausgehen, ist hingegen eher von akademischem Interesse. In der Hauptsache wären die Expressionsdiversität von ICAM-1 und HLA-Molekülen auf der Oberfläche von Keratinozyten in der Epidermis von MF-Patienten im Gegensatz zu anderen chronischen Dermatosen¹⁰⁴ zu nennen. Zu erwähnen ist schließlich der hohe technische, zeitliche und nicht zuletzt infrastrukturelle und damit finanzielle Aufwand der Elektronenmikroskopie. Zudem ist sie stark untersucherabhängig, so dass sie sich in der Routinediagnostik von Lymphomen letztlich nicht durchsetzen konnte und besonderen Fragestellungen vorbehalten blieb.

Auf die Immunphänotypisierung als Methode zur Erfassung des Oberflächenmolekülmusters wurde bereits in der Einleitung eingegangen. Ihre Aussagekraft in Bezug auf die Frühdiagnose von Lymphomen ist dabei stets kontrovers diskutiert worden. Wie bereits zuvor erwähnt, ist der Verlust der CD-7-Expression bzw. anderer T-Zellantigene wie CD-2, CD-3, CD-4 oder die neuere Beschreibung des auf klonalen Zellen offenbar fehlenden CD-158k^{15,16} diagnoseerleichternd. Diese Befunde sind aber für sich allein nicht für eine Diagnose ausreichend, zumal insbesondere der CD-7-Expressionsverlust erst im Plaque- bzw. Tumorstadium der MF am ausgeprägtesten vorliegt¹⁰⁵.

Ein neuer Ansatz beruht auf der semiquantitativen Bestimmung der CD-8/CD-3-Ratio von Lymphozyten der Dermis bzw. Epidermis. Laut Ortonne et al. ist dieser zudem für die Frühdiagnostik geeignet¹⁰⁶. Da die Mycosis fungoides meistens ein Lymphom der CD-4-positiven Helferzellen ist, wird bei diesem Phänotyp eine Verringerung der CD-8/CD-3-Ratio (da CD-3 als Pan-T-Zellmarker auf Helfer- wie Effektor-T-Zellen exprimiert wird) als Hinweis einer kutanen Invasion mit Lymphomzellen gewertet. Florell et al. verfolgten jüngst noch einen anderen Ansatz durch die Bestimmung eines komplexeren Expressionsmusters. Sie quantifizierten dabei die Expression von CD-2, -3, -4, -5, -7, -8, -20, -30 und MIB-1¹⁰⁷.

Sowohl ein partieller CD-2-Verlust wie auch das Fehlen mehrerer Oberflächenantigene (außer CD-7) gleichzeitig korrelierten stark mit dem Vorliegen von Mycosis fungoides-Infiltraten.

Daneben wurde ein weiterer Nutzen von immunhistochemischen Methoden unter anderem für die Frage der Therapiebarkeit der Lymphome beschrieben. So identifizierten Talpur et al. eine Korrelation der CD-25-Expression der Lymphomzellen mit dem Ansprechen der Erkrankung auf eine Therapie mit Denileukin-Diftitox¹⁰⁸. Dieser Marker zeigt zudem eine Expressionsabnahme, wenn in späten Stadien eine lymphatische Metastasierung eintritt¹⁰⁹. Für die Problematik der Frühdiagnostik kutaner Lymphome (für andere Non-Hodgkin-Lymphome wird der Immunhistochemie eine höhere Aussagekraft zugeschrieben¹¹⁰) stellen jedoch all diese Ansätze nur indirekte Hinweise ohne Beweischarakter dar.

Außer der Untersuchung von entwicklungs- und stadien- bzw. transformationsabhängigen Oberflächenmarkern kommt auch der Erfassung des vorherrschenden Zytokinmusters eine diagnostische Bedeutung zu. Die bereits zitierten Arbeiten von Dummer bzw. Papadavid et al.^{28,29} sowie die Gruppe um Sigurdsson¹¹¹ dokumentieren die Prädominanz des Th2-Helferzelltyps neben dem assoziierten Zytokinmuster aus IL-4 und IL-12 bei der Mycosis fungoides. Die Kenntnis dieses Musters hat momentan jedoch eher eine Relevanz für neuere therapeutische Ansätze (wie Agenzien, welche die, für die Zell-Expansion integrale, IL-2-Produktion hemmen¹¹²).

Einen anderen Zugang zur diagnostischen Problematik stellt der Nachweis einer erhöhten IL-15-Produktion epidermaler Keratinozyten bei Mycosis fungoides dar, wobei die Datenlage bezüglich dieser Beobachtung widersprüchlich ist. Darüber hinaus scheint diese Interleukinerhöhung erneut allenfalls späteren Krankheitsstadien vorbehalten. Für die frühe Diagnostik ist diese Nachweismodalität keinesfalls ausgereift^{113,114}.

Einige Autoren nutzen für die Charakterisierung (wenn auch noch nicht für diagnostische Zwecke) von Lymphomen das distinkte Expressionsmuster von Chemokinrezeptoren: Jones et al. beschreiben hier für die Mycosis fungoides eine CCR4-Expression als konsistenten Befund bei einer großzelligen Transformation¹¹⁵. Des Weiteren beschreiben Poenitz et al. eine sich früh manifestierende konstitutive c-myc-Überexpression in verschiedenen kutanen Lymphomentitäten. Dies ist ein proliferations-, differenzierungs- und apoptoseregulierendes Gen, welches unter anderem die Interaktion der Lymphozyten mit c-myc oder bcl-2 vermittelt. Laut den oben genannten Autoren lässt diese Überexpression eine Differenzierung zwischen malignen und chronisch entzündlichen Dermatosen zu, allerdings ist auch diese Erkenntnis noch nicht für die Routinediagnostik verwendbar¹¹⁶.

Schließlich kommt der Chromosomenanalyse eine Rolle in der Lymphomdiagnostik zu. Wie zuvor erwähnt, findet man bei den kutanen T-Zell-Lymphomen – analog zu anderen hämatologischen Krankheitsbildern – numerische wie strukturelle Chromosomenaberrationen. Dies sind häufig Deletionen, Verlust der Heterogenität, Allelverluste oder Translokationen, die jedoch fast alle späten und entdifferenzierten Krankheitsstadien vorbehalten scheinen. Lediglich die ebenfalls oben genannten Allelverluste bei 1p und 9p treten bereits früher bei den Lymphomzellen auf. Der diagnostische Nutzen und die Spezifität und Sensitivität dieser Erkenntnisse (und dies sogar weniger im Hinblick auf die Frühdiagnose als eher auf prognostische Hinweise bei mittleren oder späten Stadien) ist aber weiterhin stark umstritten¹¹⁷.

Der Nachweis von Klonalität unter Verwendung von Antikörpern, die gegen die konstante Region der T-Zell-Rezeptoren gerichtet sind, ist ein älterer Ansatz. Er ist aufgrund zu geringer Spezifität und neuerer, effektiverer Methoden inzwischen weitgehend wieder verlassen worden¹¹⁸.

Zusammenfassend zeigt sich, dass ein Verfahren zur Diagnosestellung allein nicht ausreichend ist. Gerade im Hinblick auf die angestrebte Diagnose im frühen Stadium der Erkrankung wird die simultane Applikation mehrerer diagnostischer Modalitäten empfohlen^{119,120}.

5.2 Molekularbiologisch gestützte Lymphomdiagnostik

Im Verlauf dieser Arbeit ist mehrfach auf das Prinzip der Diagnose eines Malignoms durch Nachweis von Klonalität der beteiligten Zellen eingegangen worden. Bösartige lymphozytäre Neoplasien erlauben dieses Vorgehen im Besonderen, da die Unzahl an realisierbaren, genetisch determinierten Rezeptorstrukturen die Klonalitätsdiagnose erleichtern.

Im Gegensatz dazu gehen benigne entzündliche Erkrankungen in der Regel mit der fortlaufenden Selektion von Zellen einher, die mit geeigneten Rezeptoren für die Abwehr bestimmter Antigene ausgestattet sind. Deren anschließende Proliferation erfolgt auch durch klonales Wachstum, jedoch findet sich hier durch die Selektion mehrerer Klone ein oligoklonales Muster.

Klonalität ist jedoch nicht per se mit Malignität gleichzusetzen. So können klinisch benigne Dermatosen klonale Hautinfiltrate aufweisen. Hierzu gehören die

- Pityriasis lichenoides chronica bzw.
- varioliformis acuta (für die allerdings eine Spärentartung beschrieben wurde^{121,122})

- kutane lymphoide Hyperplasie (welche als benigner Pol eines bis zur Malignität reichenden Kontinuums gilt^{123,124})
- angiolymphoide Dysplasie als Beispiel für einen Misch tumor¹²⁵
- Parapsoriasis en Plaque (im Allgemeinen als potentieller Lymphomvorläufer angesehen¹²⁶).

Erschwerend kommt hinzu, dass die Zurechnung verschiedener Krankheitsentitäten des lymphatischen Gewebes zu benignen oder malignen Dermatosen einem zeitlichen wie klassifikatorischen Wandel unterlegen ist¹²⁷.

Insgesamt ist somit auch der Nachweis von Klonalität allein kein hinreichender, wohl aber ein sensitiver und den Verdacht erhärtender Beitrag zur Gesamtdiagnostik¹²⁸. Im Folgenden wird lediglich auf die auch in dieser Arbeit verwendete Methode der PCR eingegangen werden und der Southern Blot ausgeklammert. Dieser Methode wird – im Gegensatz zur vorher genannten – seitens der meisten Autoren eine deutliche Unterlegenheit vor allem im Hinblick auf die niedrigere diagnostische Sensitivität bescheinigt¹²⁹. Durch multizentrische Studien zur Erarbeitung von effektiven PCR-Protokollen für Klonalitätsanalysen bei verschiedenen T- und B-Zell-Neoplasien wie der BIOMED-2-Studie³⁹ konnte inzwischen eine Systematik von Protokollen erstellt werden. In diesem Kontext wird für die o.g. Krankheitsentitäten eine diagnostische Sensitivität bis zu 0,1% monoklonaler Zellen vor polyklonalem Hintergrund beschrieben (Tab. 2). Zudem ist aufgrund des multizentrisch angelegten Versuchsdesigns von einer hohen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auszugehen.

5.3 PCR-Grundlagen in der Lymphomdiagnostik

Auf die zahlreichen Vorteile sowie die Systematik des Ablaufs einer PCR-Reaktion wurde bereits ausführlich eingegangen. Hierzu gehören geringer zeitlicher, wie infrastruktureller Aufwand, weitgehender Verzicht auf gesundheits- oder umweltschädliche Reagenzien sowie ganz wesentlich eine hohe generelle Sensitivität und Spezifität.

Ergänzend sollen hier nur einige konkrete Problemfelder der, in dieser Arbeit angewendeten, Methodik der Ergebnisdiskussion vorangestellt werden.

Da das γ -Rezeptorgen aus Gründen der Anzahl der V- und J-Segmente für die Klonalitätsdiagnostik am geeignetesten scheint, ist seine Amplifikation als Routinemethode in den Augen der meisten Autoren legitimiert¹³⁰. Die eben zitierten Autoren ordnen der γ -Rezeptorgen-PCR in diesem Zusammenhang eine engere Korrelation zur histologischen Diagnose zu als der Immunphänotypisierung oder der TMN-Klassifikation.

Die Forderungen an eine Routine-PCR müssen unter anderem sein, dass nur wenige Ansätze zum Erfassen der häufigsten Rearrangements notwendig sind und dass störende Faktoren weitestgehend ausgeschlossen werden. Da die α - bzw. β - im Vergleich zur γ -Rezeptorgenfamilie erheblich mehr V-, D- und J-Segmente besitzen, die zudem (im Falle von α wenige, von β immerhin einige) Sequenzhomologien aufweisen, ist bei diesen der Einsatz von Konsensusprimern erschwert. Daher müsste eine Vielzahl von Ansätzen gleichzeitig verwendet werden, um zuverlässig alle Rearrangements abzudecken. Hinzu kommt, dass das rearrangierte α -Gen ein ca. eine Kilobase langes Intron beinhaltet. Daher wäre eine Amplifikation nur auf Ebene der mRNA möglich. Diese ist allerdings gegen RNAsenbedingte Degenerationseffekte anfällig. Dennoch finden Amplifikationen des β -Genlocus in der Klonalitätsdiagnostik ihre Anwendung. Unter anderem konnten Morgan et al. jüngst nachweisen, dass das J- β -1-Segment insbesondere bei fortgeschrittenen kutanen Lymphomen bevorzugt umgelagert wird¹³¹.

Der δ -Genlocus scheidet schon deswegen für die Diagnostik aus, weil er aufgrund seiner Position im Zuge der α -Rezeptorgenumlagerungen verloren geht (siehe oben), so dass rearrangierte Rezeptorgene nur bei dem Phänotyp der vergleichsweise seltenen γ - δ -T-Lymphozyten sowie bei den unreifen Lymphozyten der T-ALL vorliegen.

5.4 Kapillarelektrophorese und Fragmentanalyse

Wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Klärung der Frage, ob die PCR unter der Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer mit anschließender Kapillarelektrophorese und Fragmentanalyse insbesondere die frühe Diagnostik von Lymphomen optimieren könnte. Auf die Grundlagen der elektrophoretischen Substrattrennung ist bereits eingegangen worden, so dass hier nur einige Besonderheiten der Kapillarelektrophorese Erwähnung finden sollen.

Hohe Trennschärfe und Zeitökonomie wurden bereits als wesentliche Vorteile dieser Diagnostik genannt. Eine hohe Trennschärfe bezeichnet hierbei das Vermögen, Amplifikatfraktionen im Gel nach einer Längendifferenz von nur wenigen bp voneinander zu trennen. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung, um das klonale Amplifikat vor einem polyklonalen Hintergrund darzustellen.

Verdünnungsreihen, welche andere Autoren mit Stämmen klonaler T-Lymphozyten (Jurkat-Zellen) durchgeführt haben, bescheinigten dem Einsatz dieser Methode eine Nachweisgrenze von 0,001 % monoklonalen Zellen vor polyklonalem Hintergrund¹³².

Diese ausgesprochen hohe Sensitivität konnte in den Verdünnungsreihen, auf welche sich die Methodik dieser Arbeit stützt, nicht bestätigt werden⁸¹. Eine zu hohe Sensitivität birgt jedoch die Gefahr, dass kleine, reaktiv bedingte, klonal expandierte T-Zell-Populationen fälschlich als maligne interpretiert werden. Dieses Problem stellt eine Grenze der Aussagefähigkeit der PCR-gestützten Klonalitätsdiagnostik dar.

Die Kapillarelektrophorese weist jedoch noch weitere, teils systembedingte, teils artifizielle Störgrößen auf: So ist bei der Prozessierung von zuvor mit Eosin gefärbten Proben ein artifizieller Basenpeak beschrieben worden, der IgH-Klonalität vortäuscht¹³³. Für die γ -Rezeptorgen-PCR ist dies allerdings ohne Bedeutung.

Ein weiterer systematischer Fehler scheint ferner die Tendenz zu Leitfähigkeitsveränderungen der Trägersubstanz während der Elektrophorese zu sein. Die Folge sind Änderungen der Migrationsgeschwindigkeit und daraus resultierende Peak-Verschiebungen¹³⁴. Dieser Effekt dürfte durch die Fragmentanalyse mit ihrem Größenabgleich gegen einen internen Längensstandard in seiner Wirkung minimiert werden.

5.5 Ergebnisdiskussion

Anwendung zuvor etablierter Amplifikationsprotokolle:

Die Versuche zielten zunächst darauf ab, eine Optimierung der Methoden zu erreichen, die bereits an der dermatologischen Klinik der Charité voretabliert waren⁸¹. Vorrangiges Ziel war die Erhöhung der Ausbeute an PCR-Produkten. Anschließend wurde dieses modifizierte Versuchsprotokoll an bestimmten Stichproben angewendet. Untersucht wurde insbesondere das Potenzial der Methodik zur frühen Diagnose maligner Entartung.

Die Güte einer PCR hängt nicht zuletzt von der Reinheit der Substratlösung ab, das heißt von der weitgehenden Abwesenheit störender Faktoren. Da bei einer Zellyse, welche der Amplifikation genomischer DNA stets vorausgeht, neben den Nukleotiden eine Unzahl anderer chemischer Verbindungen anfallen, ist eine Aufreinigung notwendig. Diese sollte jedoch möglichst zu keiner Verminderung der Ausgangsmenge der DNA führen.

Der erste Versuch diente daher gemäss Kapitel 2 Punkt 1) der Frage, ob eine Substratreinigung mittels kommerzieller Kits eine Verbesserung der PCR gegenüber der oben beschriebenen Routineaufschlussmethode herbeiführen könnte. Neben einem Kit, das während des Zellaufschlusses arbeitet, wurde ein weiteres verwendet, welches erst nach der PCR deren Produkte nachreinigt.

Ein günstiger Einfluss auf die generierte Produktmenge wäre auf Grund des oben Gesagten am ehesten von dem letzteren Reinigungskit zu erwarten gewesen. Dies liegt daran, dass die Wirkung eines Substratverlusts schon vor der Amplifikation durch die anschließende PCR zwangsläufig noch verstärkt werden müsste. Dennoch erzielte die Routinediagnostik, wie im Ergebnisteil dargestellt, in der semiquantitativen Betrachtung die mit Abstand besten Ergebnisse. Dies legt den Schluss nahe, dass die Amplifikation genomischer T-Zell-Rezeptor-DNA weniger von Störgrößen beeinflussbar ist, als zum Beispiel die von mRNA. Deren Prozessierung unterliegt ohnehin einer strikteren, auch enzymatischen, Regulation unter anderem durch Nukleasen. Da diese schnell zu einer Degradation vorhandener Nukleotidstränge führen können, ist bei mRNA der Einsatz von Reinigungskits daher obligat. Bei der bekannten, im Vergleich zu unmarkierten Primern geringeren, Sensitivität farbstoffmarkierter Primer, war eine größere Substratmenge vorrangiges Ziel. Demzufolge fiel nach diesen Versuchen die Wahl des Aufschlussverfahrens auf die Routinemethode. Somit lässt sich im Sinne der Problemstellung konstatieren, dass bei dem in dieser Arbeit verwendeten PCR-Protokollen zusätzliche Aufreinigungsschritte keinen Vorteil darstellen.

5.5.1 Modifikation der Amplifikationsprotokolle

Der zweite Versuchsteil diente der eigentlichen Modifikation des Versuchsprotokolls. Es konnte hierbei bei der bloßen Wiederholung der Routinediagnostik keine wesentliche Änderung zu den Vorbefunden aufgezeigt werden. So blieben Proben, bei denen zuvor kein Amplifikat generiert werden konnte, weiterhin negativ.

Die primäre Zielsetzung dieser Versuche insgesamt war es, die PCR-Effektivität mit Einsatz von farbstoffmarkierten Primer zu erhöhen. Die Beeinflussung der etablierten Methodik erfolgte daher aufgrund der vermuteten geringeren Sensitivität dieser Primer in einer gezielten Erhöhung der zugegeben Primermenge. Bei Vorversuchen war der originäre PCR-Ansatz bereits vor Beginn der PCR mit einer höheren Primermenge angesetzt worden. Dabei trat regelmäßig das Phänomen der diffusen Verteilung ungebundener Primermoleküle in der Gelelektrophorese auf. Dies machte eine Auswertung der Elektrophorese unmöglich.

Daher fiel die Entscheidung, erst nach der Hälfte der Zyklen mit der Primerzugabe zu beginnen. Zu diesem Zeitpunkt ist bereits genug Amplifikat vorgeneriert, um unspezifische Bindungen auch der Primer untereinander zu minimieren.

Der erste Versuchsteil zeigte im Vergleich zum unmodifizierten Ansatz eine deutliche Verbesserung der Ausbeute, dies auch in der Wiederholung. Die Zugabezeitpunkte zum 20.,

30., 35. oder 40. Zyklus hingegen zeitigten diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede. Es kann daher angenommen werden, dass nicht während des Starts der Amplifikation, sondern in den Folgezyklen, welche primär der weiteren Erhöhung der Menge an Amplifikat (theoretisch eine Verdopplung der Substratmenge pro Zyklus) dient, die Problematik geringerer Sensitivität ausbeutemindernd wirkt.

Hierbei zeigte der zweite Versuchsteil, dass eine weitere Erhöhung der zugegebenen Konzentration an Primern (zwei- bzw. zehnfach) nach dem 20. bzw. 40. Zyklus ebenfalls keine Verbesserung des Verfahrens mehr herbeiführen konnte.

Als Konsequenz dieser Versuche wurde ein Protokoll erstellt, in welchem jeweils nach der Hälfte der PCR-Zyklen nochmals die doppelte Primermenge, wie im Standardprotokoll vorgesehen, zugegeben wurde. Dieses wurde konsekutiv in allen weiteren Versuchen angewendet.

Zu diskutieren ist der Grund für die Beobachtung, dass einerseits eine zu früh erfolgende Primerzugabe keinen Vorteil zu erbringen vermag und andererseits eine Zugabe zu einem späteren Zeitpunkt, dann offenbar mengenunabhängig, ausbeuteerhöhend wirkt. Offensichtlich stellt ein Überschuss von farbstoffmarkierten Primern eine größere Fehlerquelle dar, wenn nur eine relativ geringe Menge an komplementären Bindungsmöglichkeiten vorliegt. Dieses Ungleichgewicht nimmt folgerichtig mit der Menge bereits amplifizierter DNA im Verlauf der PCR immer weiter ab. Somit ist dieser Ansatz zur Überwindung des Sensitivitätsdefizits als geeignet anzusehen. Zu erwähnen sind allerdings zwei Defizite dieser Methode. Zum einen das zeitaufwendige Unterbrechen der laufenden Amplifikation für die Primerzugabe, zum anderen das Risiko einer Kontamination. Allerdings zeigten sich in den Folgeversuchen (insbesondere bei der Methodenanwendung an gesicherten Lymphomen Kap. 4.4) im Vergleich zur bisherigen Routinediagnostik stets gleich gute oder sogar bessere Ergebnisse.

5.5.2 Farbstoffvergleich

Wie bereits dargestellt, ist die lymphozytäre DNA des γ -T-Zell-Rezeptors aufgrund ihrer oben beschriebenen Struktur am zuverlässigsten auf Klonalität zu untersuchen. Allerdings existiert kein Primersystem, welches allein mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit alle realisierbaren Kombinationen an V- und J-Segmenten amplifizieren kann. Der Konsensusprimersatz V γ I / J γ 1/2 besitzt das Potenzial, etwa 70-80 % der möglichen Rearrangements zu

erfassen^{58, 59}. Durch die Hinzunahme der γ -2- bzw. γ -3-PCR sollte dieses Verhältnis annähernd auf 100 % anzuheben sein, wenngleich diese Ansätze für sich allein weniger geeignet wären.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit drei Farbstoffe für die Fluoreszenzmarkierung verwendet (6-FAM, HEX und TET). Da diese in ihrer Struktur differieren, war zu erwarten, dass sie die Bindungsfähigkeit der Primer unterschiedlich stark beeinflussen würden. Folglich war in diesem Versuch der geeignetste Primer für die zuverlässigste PCR zu bestimmen.

Da – was unten noch genauer zu erläutern sein wird – häufiges Auftauen und Einfrieren zur Degradation der genomischen DNA führen, wurden für diesen Versuch frisch angefertigte Präparate aus Paraffinschnitten für die Beurteilung herangezogen. Eindeutiges Ergebnis dieses Versuches war die deutliche Überlegenheit des TET-, gegenüber dem HEX- und dem, deutlich dagegen abfallenden, 6-FAM-Farbstoffes. Folgerichtig fiel die Wahl auf TET-markierte γ -1-Primer, HEX- wurden für die γ -2- und 6-FAM-Markierungen für die γ -3-Primer verwendet.

Es ist zu erwähnen, dass sicherlich nicht einfach aus der generellen Struktur der Moleküle auf ihre Beeinflussung der Bindungsfähigkeit der assoziierten Primer geschlossen werden kann. Hierfür ist das Primer-Farbstoffmolekül in seiner sterischen Gesamtformation zu komplex. Da auch spektrale Eigenschaften der Moleküle als Einflussgröße auf die Fluoreszenzintensität in Betracht kommen, ist die Sensitivitätsminderung daher am ehesten als empirisches Faktum zu betrachten.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass 6-FAM (wie aus Abb. 6 ersichtlich ist) zwei Wasserstoffatome an Bindungsstellen besitzt, an denen bei TET ein und bei HEX zwei Chloratome gebunden sind. Dies lässt diese Moleküle (geringfügig) polarer werden. Allerdings lässt diese Beobachtung keine unmittelbaren Schlüsse auf die Güte einer PCR zu. Im Gegensatz hierzu sind die Phänomene des Einflusses auf die Bindungsstabilität von Nukleotiden an sich bzw. die Veränderungen der Migrationsgeschwindigkeit im Kapillarelektrophoreseträgergel genauer spezifiziert:

So konnten Moreira et al. zeigen, dass die Bindung von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen an Nukleotidstränge diese eher noch stabilisiert. Von den drei in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffen weist 6-FAM sogar die stabilste Bindung auf¹³⁵.

Eine potenziell größere Fehlerquelle ist jedoch der Effekt auf die Wanderungsgeschwindigkeit: Hahn et al. demonstrierten eine fluorophorenvermittelte Migrationsverlangsamung von DNA-Einzelsträngen in der Kapillarelektrophorese. Für 5'-markierte Short-tandem-repeats (einem bestimmten DNA-Polymorphismustyp) von 100 Bp Länge ergab sich ein

Längenbestimmungsfehler von ca. 6,5 Bp. Dieser nimmt für kürzere Stränge noch zu, bei längeren ab¹³⁶. Begründet ist er in der Geschwindigkeitsdifferenz zu mitlaufenden internen Längenstandardfragmenten. Als systematischer Fehler sollte dieser Effekt auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit betreffen. Gleichwohl er bei Genotypisierungsfragestellungen stark verfälschend wirkt, ist er jedoch für Klonalitätsnachweise zu vernachlässigen. Hier wird ein Peak innerhalb eines genügend großen Toleranzbereiches von 230 bis 260 Bp dargestellt. Bei dieser Fragmentlänge dürfte – wie zuvor ausgeführt – der Fehler ohnehin noch kleiner als 6,5 Bp Abweichung sein. Für die Klonalitätsdiagnostik ist eine Abweichung in dieser Größenordnung jedoch zu vernachlässigen.

5.5.3 Gesamtbeurteilung der Vorversuche

Die bisherigen Versuche dienten der Erarbeitung eines PCR-Protokolls, welches unter sinnvollstem Einsatz der zur Verfügung stehenden farbstoffmarkierten Primer mit hoher Sicherheit ein Amplifikat zu generieren vermag. Da der Einsatz der drei eingesetzten Primersysteme annähernd alle Rearrangements erfassen kann und ein automatisiertes System für Kapillarelektrophorese und Fragmentanalyse zur Verfügung stand, war eine der in Kapitel 2 formulierten Forderungen erfüllt: Das Design eines Protokolls, welches zeitökonomisch und mit einer hohen analytischen Sensitivität arbeitet. Hierbei ist zu erwähnen, dass das verwendete Gerät als Einkapillarsystem lediglich eine Probe gleichzeitig auswerten kann. Der Einsatz neuerer Systeme (bis zu 96 Kapillaren) beschleunigt die Auswertung noch weiter. Die weiteren Versuche Trennschärfe dienten nun der Klärung folgender Fragen: der generellen Anwendbarkeit und insbesondere der Fähigkeit dieses diagnostischen Protokolls, in Frühstadien bereits Klonalität nachzuweisen..

5.5.4 Methodentest an Lymphomstichprobe

Nach Abschluss der Protokollmodifikationen erfolgte der erste Teil der Versuchsreihe an histologisch gesicherten Lymphomen. Ergebnis war einerseits die Bestätigung der hohen Trennschärfe der Kapillarelektrophorese und Fragmentanalyse, da einige vorher in der Routine nicht als klonal erkannte Proben nun als klonal identifiziert wurden. Bei sämtlichen Mycosis fungoides-Fällen dieser Stichprobe konnte zudem Klonalität diagnostiziert werden. Darüber hinaus wiesen die Fragmentanalyseergebnisse stets sehr hohe Peaks auf. Auffällig hingegen war die (in allen Versuchen und Vorversuchen beobachtete) niedrige Erfolgsquote der γ -3-PCR, wobei sich mutmaßlich Primer wie Farbstoff in ihren Defiziten

ergänzten und zur Sensitivitätssenkung beitrugen. Die Frequenz des wichtigsten in der γ -3-PCR erfassten Rearrangements (V- γ -9/JP) beträgt bei reifen T-Lymphozyten jedoch auch nur ca. 1%^{39,137}. Daher ist der weitgehende Ausfall dieses PCR-Protokolls für die Klonalitätsdiagnostik am ehesten verzichtbar.

Ferner bestand eine geringe Erfolgsquote der PCR bei den pleomorphen T-Zell-Lymphomen. Ob dies ein entitätstypisches Phänomen ist, lässt sich jedoch bei der geringen Stichprobengröße (n=4) nicht entscheiden. Die vorhandene Literatur beschreibt denn auch die Anwendbarkeit molekularbiologischer Methoden in der Klonalitätsdiagnostik vornehmlich für die weitaus häufigsten Formen von CTCL, der Mycosis fungoides sowie des Sézary Syndroms. Daher müsste die Frage nach tatsächlichen Sensitivitätsdifferenzen dieser Methode innerhalb der recht heterogenen Gruppe der kutanen T-Zell-Lymphome und deren Ursache durch zukünftige Studien erhellt werden.

Sollte die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Untergruppe der Erkrankungsfamilie einen relevanten Faktor für das Funktionieren der Diagnostik darstellen, wäre besonders die Untersuchung von Proben der (relativ seltenen) CD-8-positiven T-Zell- oder NK-Neoplasien von Interesse. Diese verfügen im Gegensatz zu den CD-4-exprimierenden Lymphomen über ein gänzlich differentes Korezeptoren- und Chemokinrepertoire. Sie ähneln zumeist jedoch histologisch der Mycosis fungoides¹³⁸, weswegen eine molekularbiologische Differenzierung hier hilfreich wäre. Gleichzeitig weisen sie zumeist einen deutlich aggressiveren Verlauf auf, was zumindest klinisch diagnoseerleichternd wirkt. Jedoch konnten Brüggemann et al.¹⁴² unter Einsatz einer Kombination aus γ - und β -PCR (gemäß BIOMED2³⁹) bei 99% eines Kollektivs von 188 Patienten und fünf verschiedenen T-Zell-Neoplasien Klonalität nachweisen. Pleomorphe TCL oder NK-Neoplasien waren allerdings nicht darunter.

5.5.5 Methodentest an der Stichprobe lymphomähnlicher Dermatosen

Wenn Klonalitätsdiagnostik mittels PCR und Elektrophorese als Hilfsmittel zur Diskrimination zwischen benignen und malignen Dermatosen dienen soll, sollten histologisch ähnliche aber gutartige Erkrankungen möglichst nicht mit klonaler T-Zellexpansion vergesellschaftet sein. Dies ist eine Prämisse, die nicht immer zutrifft. Dennoch ist Klonalität bei benignen Hauterkrankungen selten und ein eindringliches Warnzeichen. Das zeigten auch Chen et al., die vor der PCR durch eine Lasermikrodissektion aus paraffinisierten Hautproben Einzelregionen präparierten. Dadurch konnten sie den Einfluss reaktiver klonaler Expansionen als Fehlerquelle minimieren und so den positiven prädiktiven Wert der

Klonalitätsdiagnostik noch weiter erhöhen¹³⁹. Die eben genannten Autoren ordnen ihrer Methode eine Spezifität von 86 % in der Erkennung von Lymphomen oder präneoplastischen Zuständen zu. Jedoch konnte in der bereits mehrfach zitierten BIOMED-2-Studie auch gezeigt werden, dass bei 10 % der Fälle mit lediglich entzündlichen Hautinfiltraten Monoklonalität vorlag¹⁴⁰.

In der hier untersuchten Stichprobe konnte für ein Bioptat Monoklonalität als Abweichung von der vorherigen, TGGE-gestützten Routinediagnostik attestiert werden. Folgehistologien, welche unter Umständen eine spätere maligne Transformation hätten aufweisen können, lagen jedoch nicht vor. Demzufolge wäre jedoch eine Reevaluation, gegebenfalls sogar eine erneute Probenentnahme an einer alternativen Lokalisation sinnvoll gewesen.

Nach einer Lagerungszeit von mehreren Monaten bis bereits einigen Jahren treten bei aus paraffinisierten Proben gewonnener und bei Temperaturen von -20°C gelagerter DNA deutliche Degradationserscheinungen auf. Das bedingt zum Teil eine deutlich geringere Amplifikatmenge und Fluoreszenzintensität als bei den entsprechenden, zeitnah erhobenen Routinediagnostikbefunden. Auf dieses Phänomen wird noch eingegangen, diese Beobachtung lässt sich jedoch bereits hier für diese Stichprobe konstatieren.

Allerdings weist das erarbeitete PCR-Protokoll insgesamt offenbar keine Tendenz zur gehäuften Generierung falsch positiver Klonalitätsbefunde bei per definitionem gutartigen T-Zell-Erkrankungen auf.

5.5.6 Methodentest zur Beurteilung der Frühdiagnosepotenz

Auf folgende Störgrößen muss vorweg hingewiesen werden:

- a) Insbesondere bei den Probenkollektiven, welche zur Abschätzung der Frühdiagnosefähigkeit eingesetzt wurden, waren die Stichproben in ihrem Umfang begrenzt. Dies lag an der Tatsache, dass in der Lymphomdatenbank der Hautklinik der Charité keine größere Anzahl geeigneter Proben dokumentiert vorlag.
- b) Bei den Biopsien war retrospektiv nicht immer zu beurteilen, ob eine Probeexzision aus einer im Hinblick auf die Diagnose repräsentativen Lokalisation entnommen wurde. Auch anhand der Patientenakten war meistens nicht ersichtlich, von wo eine Probe entnommen wurde.

Wie bereits ausgeführt, ist eine hohe Sensitivität das herausragende Merkmal einer Methode für die frühzeitige Klonalitätsdiagnostik. Die Probleme und Defizite, welche die Zusammenstellung der vorliegenden Stichprobe zwangsläufig mit sich brachte, wurden bereits erläutert:

Es sind dies das Alter der ersten Probe sowie die Tatsache, dass bei der frühen Probe wegen des fehlenden Lymphomverdachtes keine molekularbiologische Diagnostik bemüht wurde. Daher konnte im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen der Methodenvergleich nicht durchgeführt werden. Im Hinblick auf die langsame Progression könnte folgerichtig nur mit einer jahrelangen Längsschnittstudie das tatsächliche Frühdiagnosepotenzial aufgeklärt werden.

Nichtsdestoweniger gelang trotz dieser kleinen Stichprobe für die beiden aussagefähigen PCR-Ansätze in vier Fällen ein Nachweis klonaler T-Zell-Expansion im Biopat. Das lässt zwei Schlüsse zu:

- 1) Die Indikationsstellung für die PCR-Diagnostik sollte großzügiger gestellt werden. In diesem Versuch war, wie erwähnt, kein Methodenvergleich zwischen Fragmentanalyse und TGGE möglich. Daher ist nicht einzuschätzen, ob Letztere, wäre sie zur Anwendung gekommen, nicht auch Klonalität nachgewiesen hätte. Jedoch haben die übrigen Versuche der Fragmentanalyse im Vergleich zur TGGE durchgehend ein größeres Vermögen zum Klonalitätsnachweis bescheinigt.
- 2) Erstrebenswert wäre andererseits eine Steigerung der Sensitivität auch der histologischen Diagnostik. Auf Literatur, in welcher ein reformiertes und score-basiertes Wertungssystem für die Erleichterung und Vereinheitlichung der (Verdachts)-Diagnoseerhebung gefordert wird, wurde bereits in Kapitel 5.1 eingegangen.

Die Fähigkeit PCR-basierter Methoden, den Verdacht auf ein Lymphom zu erheben bevor die Histologie für ein malignes Geschehen spricht, ist durch die Versuche unter Kap. 4.6 und 4.7 jedoch eindrücklich dokumentiert worden.

5.5.7 Beurteilung des Vermögens zur Spät- bzw. Rezidivdiagnostik

Trotz differierender Stichprobenkollektive verfolgte dieser Versuchsteil eine ähnliche Fragestellung wie der vorige. So ist das Vermögen, ein Rezidiv einer Lymphomerkrankung früh zu erkennen bzw. auszuschließen, erneut in erster Linie eine Funktion der Sensitivität eines diagnostischen Verfahrens. Zum Teil im Gegensatz zu den obigen Versuchen gelang in diesem Durchgang keine Änderung eines Klonalitätsbefunds, sei es zur histologischen oder zu TGGE-gestützten Vordiagnostik. Da aber im Design prinzipiell keine wesentlichen Unterschiede zu dem vorgehenden Versuch bestehen, sollte von einer ähnlichen Potenz zur Frühdiagnostik ausgegangen werden. Der Nachweis einer solchen ist aber einer multizentrischen Studie vorbehalten, wenn selbst in einer universitären Dermatologie mit dem

Schwerpunkt Hautlymphome nur eine ungenügende Menge an Einzelproben der geforderten Konstellation vorliegt.

Der Nutzen einer solchen Methode für Nachsorgeuntersuchungen ist hingegen offensichtlich. Es ist jedoch ebenso zu erwähnen, dass regelmäßige Hautbiopsien im Rahmen von Kontrolluntersuchungen nicht klinischer Standard sind. Darüber hinaus ist ein erneutes Auftreten chronischer Ekzematosen nach erfolgter Therapie per se rezidivverdächtig. Daher ist die Rezidivdiagnostik nicht als Haupteinsatzgebiet der Methode anzusehen.

Insgesamt lassen sich die Vorteile der in dieser Arbeit etablierten Methode, im Vergleich zu präexistenten Diagnoseprotokollen, wie folgt zusammenfassen:

- Im Vergleich zu vorherigen Protokollen bietet sie durch die zusätzliche Primerzugabe während der Amplifikation eine erhöhte Ausbeute an PCR-Produkt. Das bekannte Sensitivitätsdefizit farbstoffmarkierter Primer wird hierbei verringert. Es muss jedoch erwähnt werden, dass die Unterbrechung der PCR zur Primerzugabe sowohl einen aufwändigen Schritt darstellt als auch das Risiko einer Verunreinigung bedeutet.
- Die Methode weist durch die Anwendung der Fragmentanalyse im Vergleich zur TGGE eine höhere Auflösung auf, was eine präzisere Diagnosestellung erlaubt.
- Sie verfügt über eine hohe Frühsensitivität im Vergleich zur TGGE und zur Histologie, wobei der letztgenannte Umstand noch einer Bestätigung durch deutlich größere Probenkollektive bedarf.

Nicht unerwähnt darf jedoch bleiben, dass in einer großangelegten multizentrischen Studie (BIOMED2, 2003³⁹) ein umfassender Ansatz für die molekularbiologische Diagnostik von B- und T-Zell-Neoplasien definiert wurde. Anhand dieses Datenmaterials ist erstmalig auch ein Leitfaden für den Ablauf einer molekularbiologischen Diagnostik erstellt worden, der den Anspruch erhebt, in Routinelaboren reproduzierbar gute Ergebnisse zu liefern. Van Krieken et al. gehen hierbei von einer diagnostischen Sensitivität von 94 % bei T-Zell-Lymphomen aus¹⁴¹, andere Autoren leiten aus dem vorhandenen Datenmaterial sogar eine Sensitivität von 99%¹⁴² her. Das gewonnene Datenmaterial wird zur Zeit von verschiedenen Arbeitsgruppen (von denen einige bereits zitiert worden sind) auf weitere Aussagekraft hin untersucht. Aussagen zu Früh- und Rezidivdiagnosepotenz sind allerdings noch nicht publiziert. Es steht jedoch zu erwarten, dass analog zu den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen auch die Anwendung der BIOMED-Protokolle diese diagnostischen Fragestellungen zuverlässig beantworten können sollte.

5.6 Abbauprozesse bei der Generierung genomischer DNA

Der Nachweis von Nukleinsäuresequenzen aus Blut oder Gewebe, der unter Idealbedingungen über Jahrtausende möglich ist¹⁴³, wird durch verschiedene Faktoren erschwert bzw. die Ausbeute an DNA vermindert. In der Regel fixiert man durch Probeentnahmen gewonnenes Gewebe in Formalin, bettet sie in Paraffin ein und gefriert aus ihnen gewonnene DNA anschließend. Diese Methode erlaubt sowohl die Aufrechterhaltung der geweblichen Architektur wie auch das Verhindern der DNA-Degradation durch die formalinvermittelte Enzymdenaturierung. Für die weitere Prozessierung ist ein Auftauen sowie ein DNA-Aufschluss, wie oben beschrieben, notwendig. Bei allen diesen Schritten können Degradationseffekte auftreten. Gut untersucht ist hierbei der Einfluss wiederholten Gefrierens und Auftauens. Für Blut konnte hier ein Verlust der Nukleinsäureausbeute um 25 % bereits durch einmaliges Gefrieren gezeigt werden¹⁴⁴, andere Autoren schätzen diesen Effekt als geringer ein¹⁴⁵. Bisher war das Gefrieren zur Vermeidung größerer Verluste jedoch unverzichtbar, da sonst eine rasche Degradation der DNA eintritt¹⁴⁶. Zwei Überlegungen werden somit interessant:

- die Möglichkeiten einer nichtkryogenen Lagerung von Proben sowie
- ein sofortiger DNA-Aufschluss mit anschließender Lagerung.

Letzteres wird bereits länger durchgeführt, dabei wurden Lagerungszeiten ohne nennenswerte Degradation von bis zu drei Jahren bei 4°C nach Isolierung der DNA beschrieben¹⁴⁷. Selbstverständlich steht nach einer solchen Behandlung kein intaktes Gewebe mehr für die weitere Diagnostik zu Verfügung. In den letzten Jahren wird zudem vermehrt an nonkryogenen Konservierungsmethoden gearbeitet. Für die DMSO(Dimethyl-Sulfoxid)-Lösung als Lagerungsmedium für Gewebe wurde nach zwei Jahren Aufbewahrung das Vorliegen von weitgehend intaktem Material beschrieben¹⁴⁸.

Neben der Lagerung bedingen auch Extraktion und Fixation die sofortige Degradation eines Teils der DNA. Deswegen werden neben Konservierungsmedien auch Fixationsmedien mit einer geringeren Neigung zu DNA-Verlusten zunehmend Gegenstand der Forschung¹⁴⁹.

So soll dieser Exkurs verdeutlichen, dass multiple Faktoren das Ergebnis einer sensitiven diagnostischen Methode kumulativ ungünstig beeinflussen. Dies erklärt darüber hinaus die Schwierigkeiten, die bei der Reproduktion einer vormals problemlos funktionierenden PCR auftreten. Ferner wird hierdurch verdeutlicht, dass ein zeitnahe polypragmatischer Einsatz mehrerer Diagnostika sinnvoll ist. Wegen der Insuffizienz eines Verfahrens allein fußt die

Hautlymphomdiagnostik weiterhin auf einer Synthese aus Klinik und Paraklinik (Histologie, Immunohistochemie, Molekularbiologie).