

6 Zusammenfassung

Die Diagnose kutaner T-Zell-Lymphome, obschon in den letzten Jahren deutlich effizienter geworden, beruht weiterhin auf dem gleichzeitigen Einsatz verschiedener diagnostischer Verfahren. Dazu gehören unter anderem die klassische Histologie, die Immunphänotypisierung sowie molekularbiologische Methoden, wobei dem PCR-gestützten Klonalitätsnachweis der γ -T-Zell-Rezeptor-DNA die größte Bedeutung zukommt. Da wie bei anderen malignen hämatologischen Erkrankungen eine Diagnose in einem frühen Krankheitsstadium für die Verbesserung der Prognose als wesentlich gilt, konzentrierte sich die jüngere Forschung insbesondere auf die Methoden, welche eine hohe diagnostische Sensitivität aufweisen.

Diese Charakteristika treffen im Wesentlichen auf die oben genannte PCR-Diagnostik zu. Der Einsatz von farbstoffmarkierten Primersystemen mit anschließender Kapillarelektrophorese und Fragmentanalyse erlaubt zudem eine weitgehend automatisierte Prozessierung. Dieses Verfahren stellte den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit dar.

Vorrangiges Ziel war es, etablierte Versuchsanordnungen dergestalt zu modifizieren, dass:

- die Gewinnung der DNA aus paraffinisierten Hautproben möglichst verlustfrei gelingt,
- die Sensitivität der PCR durch Veränderungen des Protokolls im Hinblick auf Primerapplikation und Auswahl der geeignetsten Farbstoffe erhöht,
- das Potenzial dieses modifizierten Protokolls im Hinblick auf eine Frühdiagnostik bestimmt und
- im Vergleich zu präexistenten Methoden wie der TGGE möglichst gesteigert wird.

Grundlage der Modifikation war die PCR zur Amplifikation der γ -T-Zell-Rezeptor-DNA. Als Primer kamen zum Einsatz: ein Konsensusprimerpaar mit der Fähigkeit zur Amplifikation von 70-80 % der realisierbaren Rearrangements neben zwei anderen Primersystemen zur Abdeckung der Restrearrangements. Die Vergleiche der drei verwendeten Farbstoffe zeigten eine Überlegenheit von TET gegenüber HEX und 6-FAM. Daher wurde das Konsensusprimersystem mit ersterem, das zweite mit HEX, das letzte mit 6-FAM markiert. Eine PCR, bei der nach dem 20. von 40 Amplifikationszyklen eine erneute Primerzugabe mit dem doppelten der Startkonzentration erfolgte, zeigte im Vergleich zum Grundprotokoll eine Sensitivitätsverbesserung.

Die Anwendung dieses Protokolls an Stichproben von jeweils 15 histologisch gesicherten sowie lymphomähnlichen Dermatosen wies das Funktionieren der Methode nach. Sie belegte zugleich ein höheres Vermögen zum Klonalitätsnachweis als vorbestehende Methoden wie

die TGGE. So konnten bei dem ersten Versuch eine, beim zweiten sechs Diagnoseänderungen zum Vorbefund aufgrund des höheren Auflösungsvermögens der Fragmentanalyse nachgewiesen werden.

Danach erfolgte die Applikation des Verfahrens an zwei konstruierten Stichprobengruppen. Bei der ersten existierten jeweils Vorhistologien, die den Verdacht auf ein Hautlymphom nicht bestätigen konnten. Eine spätere Biopsie im Verlauf bewies jedoch diesen Verdacht. Die zweite Gruppe bestand aus anfänglich lymphompositiven und später in Remission befindlichen Patienten. Die Untersuchung der Frühsensitivität war Hauptziel dieser Versuche. Die Stichprobengruppen waren in ihrer Größe durch die zur Verfügung stehenden Probenpaare limitiert. Zudem litt die Auswertung unter der relativ raschen lagerungsbedingten DNA-Degradation, welche die Ausbeute bei den frühen Proben verminderte. Dennoch gelang bei insgesamt drei der 15 Probenpaare im ersten Versuch ein Nachweis von Klonalität bevor die Histologie lymphomverdächtig erschien. Der zweite Versuch zeigte im späteren Stadium (das heißt: in Remission) keine Diagnosedifferenzen zur vorher durchgeführten TGGE.

Insgesamt konnten die Versuche so eine sinnvolle Anwendbarkeit der Methode aufzeigen, deren Vorteile besonders in der Zeitersparnis zu anderen Verfahren liegen. Ferner konnte die Fähigkeit zur frühen Diagnose bzw. im Vergleich zu anderen molekularbiologischen Methoden präzisere Auflösung nachgewiesen werden. Auch wurde das Phänomen einer raschen, durch die heutigen Aufschluss- und Lagerungsverfahren weitgehend noch nicht zu beeinflussenden, Degradation der Nukleinsäuren beobachtet.

Dennoch bleibt der alleinige Einsatz molekularbiologischer Methoden in der Diagnose von kutanen Lymphomen weiterhin insuffizient, so dass die Diagnose eines Hautlymphoms stets durch die Zusammenschau der Ergebnisse verschiedener Diagnostika sowie des klinischen Bildes zu stellen ist.