

**Charité Centrum: Innere Medizin und Dermatologie (CC12)**

**Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie**

**Direktor: Prof. Dr. W. Sterry**

**Diagnostischer Stellenwert und klinische Bedeutung der Analyse von  
T-Zellrezeptor Genumlagerungen bei  
kutanen T-Zell-Lymphomen**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach  
Dermatologie und Venerologie

vorgelegt der Medizinische Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dr. med. Chalid Assaf

Geboren am 18.01.1969 in Darmstadt

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

eingereicht am: Juli/2007

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J.C. Becker  
2. Prof. Dr. med. H. Höfler

*gewidmet meinen Kindern*

*Thalia und Lilian*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
<b>1.1</b>	<b>EPIDEMIOLOGIE</b>	<b>5</b>
<b>1.2</b>	<b>ÄTIOLOGIE</b>	<b>6</b>
<b>1.3</b>	<b>PATHOGENESE</b>	<b>7</b>
1.3.1	Epidermotropismus	7
1.3.2	T-Zellaktivierung	8
1.3.3	Klonale Dominanz der T-Zellen	8
<b>1.4</b>	<b>KLASSIFIKATION</b>	<b>10</b>
<b>1.5</b>	<b>KLINISCHE PRÄSENTATION</b>	<b>11</b>
1.5.1	Mycosis fungoides und Sonderformen	11
1.5.2	Sézary-Syndrom	12
1.5.3	CD30-positive grosszellige anaplastische T-Zell-Lymphome	12
1.5.4	Lymphomatoide Papulose	12
<b>1.6</b>	<b>DIAGNOSTIK</b>	<b>13</b>
1.6.1	Histologie/Immunhistologie	13
1.6.1.1	Mycosis fungoides/Sézary-Syndrom	14
1.6.1.2	CD30-positive grosszellige T-Zell-Lymphome	14
1.6.1.3	Lymphomatoide Papulose	14
1.6.2	Molekulare Diagnostik	15
1.6.3	Ausbreitungsdiagnostik	19
<b>1.7</b>	<b>THERAPIE</b>	<b>20</b>
1.8.1	Mycosis fungoides/Sézary Syndrom	20
1.8.2	CD30-positive Lymphoproliferationen	21

<b>2</b>	<b>EIGENE BEFUNDE</b>	
<b>2.1</b>	<b>Untersuchung der Spezifität und Sensitivität von T-Zellrezeptor Genumlagerungsanalysen bei CTCL (Projekt 1)</b>	<b>22</b>
2.1.1	Erläuterung des Projekts	22
2.1.2	<i>Ergebnisse in Form von Veröffentlichungen</i>	
	• High detection rate of T-cell receptor beta chain rearrangements in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction in combination with the GeneScan technique and DNA sequencing (2000)	23
	• Clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangement by PCR-based Genescan analysis in advanced cutaneous T-cell lymphoma: A critical evaluation. (1999)	30
	• Clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangement by PCR-based Genescan analysis in the skin and blood of patients with parapsoriasis and early stage mycosis fungoides (2002)	39
<b>2.2</b>	<b>Nachweis der Klonalität zur Charakterisierung der T- bzw. B-Zell Linienzugehörigkeit (Projekt 2)</b>	<b>46</b>
2.2.1	Erläuterung des Projekts	46
2.2.2	<i>Ergebnisse in Form von Veröffentlichungen</i>	
	• Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease (2000)	47
	• Single cell analysis of CD30 (+) cells in lymphomatoid papulosis demonstrates a common clonal (2002)	52
	• Anaplastic large cell lymphoma of T-cell and Null-cell Phenotype express cytotoxic molecules (1996)	59
<b>2.3</b>	<b>Nachweis der T-Zell-Klonalität in der Ausbreitungsdiagnostik bei CTCL (Projekt 3)</b>	<b>66</b>
2.3.1	Erläuterung des Projekts	66
2.3.2	<i>Ergebnisse in Form von Veröffentlichungen</i>	
	• Transition of Sézary syndrome into mycosis fungoides after complete clinical and molecular remission under extracorporeal photophoresis (2004)	67
	• Early TCR-β and TCR-γ PCR detection of T-cell clonality indicates minimal tumor disease in lymph nodes of cutaneous T-cell lymphoma: Diagnostic and prognostic implications (2005)	71

<b>3</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>79</b>
3.1	Sicherung der Klonalität in der Diagnostik des kutanen T-Zell-Lymphoms	79
3.2	Klonalität als Methode zur Charakterisierung von Lymphomen	83
3.3	Bedeutung der Klonalität in der Ausbreitungsdiagnostik	84
3.4	Bedeutung der Klonalität im Hinblick auf die Prognose der Lymphomkrankheit	86
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSENDER BETRACHTUNG UND PERSPEKTIVEN</b>	<b>88</b>
<b>5</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>103</b>

## **Einleitung**

Kutane Lymphome repräsentieren eine heterogene Gruppe von lymphatischen Neoplasien, die überwiegend von T- und B-Lymphozyten abstammen. Sie manifestieren sich in der Haut und bilden nach den gastrointestinalen Lymphomen die zweithäufigste Gruppe extranodaler Lymphome. Seltenheit und Heterogenität der kutanen Lymphome erschweren die Diagnosestellung im klinischen Alltag. Die genaue Zuordnung erfordert die Integration klinischer, histologischer und molekularbiologischer Daten.

### **1.1 Epidemiologie**

Kutane Lymphome sind die zweithäufigsten extranodalen Non-Hodgkin Lymphome. Die Inzidenz wird auf eine Neuerkrankung pro Jahr und 100 000 Einwohner geschätzt mit einer Verteilung von ca. 65 % T-Zell-Lymphome und ca. 25 % B-Zell-Lymphome; der Rest verteilt sich auf seltene Lymphome<sup>1</sup>. Die Mycosis fungoides (MF) und das Sézary-Syndrom (SS) als häufigste Vertreter kutaner T-Zell-Lymphome zeigen anhand von Daten aus neun Krebsregistern in den USA<sup>2</sup> eine Inzidenz von 0,29 Fälle pro Jahr und 100 000 Einwohner, was 2,2 % aller Lymphome entspricht. Ferner zeigte sich in der Zeit von 1973 bis 1984 eine 3,2 fache Zunahme der Inzidenz.<sup>2</sup> Der Anteil der MF/SS stieg ebenfalls während dieses Zeitraumes von 1,6 % auf 2,8 %. Für Deutschland liegen hierzu nur vorläufige Daten vor.<sup>3</sup> Insgesamt besteht eine Häufung der Erkrankung mit zunehmendem Alter sowie eine Geschlechterverteilung zwischen Mann und Frau von 2:1.

### **1.2 Ätiologie**

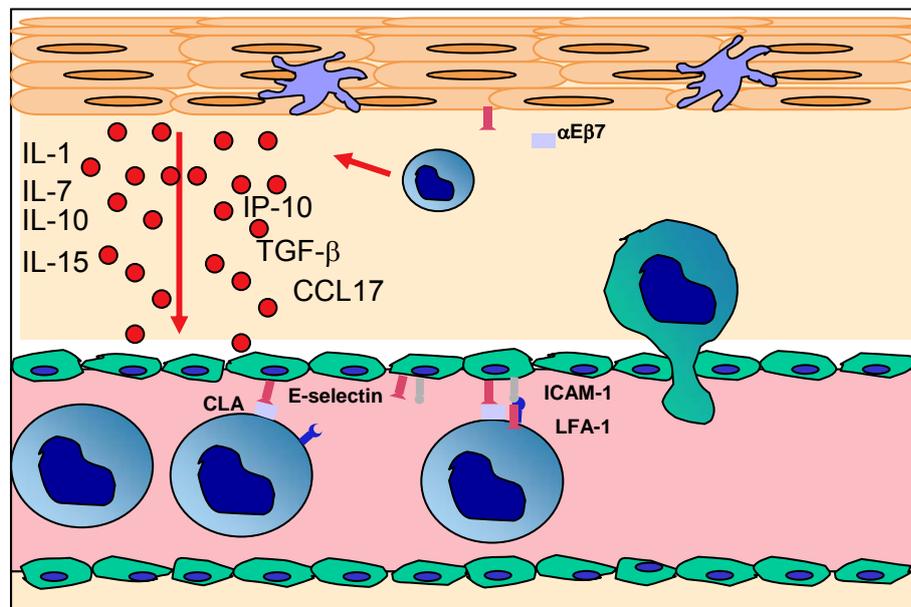
Die Ätiologie kutaner T-Zell-Lymphome ist bisher nicht geklärt. Verschiedene Faktoren, die eine chronische Antigenstimulation als Folge haben, wurden diskutiert. Hierzu wurden insbesondere virale Infektionen<sup>4,5</sup> bakterielle Hautinfektionen<sup>6,7</sup>, familiäre Häufung<sup>8</sup> und atopische Diathese<sup>9</sup> diskutiert. Allerdings konnte bisher bei keinen der genannten Faktoren ein ätiologischer Zusammenhang bewiesen werden.<sup>10,11,12,13</sup>

## 1.3 Pathogenese

Der molekulare Mechanismus für die Pathogenese der Mycosis fungoides ist komplex und multifaktoriell und ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Die bisherigen Daten weisen auf eine Mehrschrittgenese hin, wobei die T-Zellen wahrscheinlich sich initial wie reaktive (nicht-maligne) T-Zellen verhalten und im Verlauf zunehmend *epidermotrope* Eigenschaften erwerben. Im weiteren Verlauf befinden sich diese T-Zellen in einem *Aktivierungsstatus* und erreichen schließlich durch Akkumulation weiterer Mutationen eine *klonale Dominanz*, was zur klinischen Progression der Erkrankung führt.<sup>14</sup>

### 1.3.1 Epidermotropismus

Charakteristisch für die Mycosis fungoides ist im Initialstadium die Migration von neoplastischen T-Zellen in die Epidermis. Die Expression des kutanen Lymphozytenantigens (cutaneous lymphocyte antigen, CLA) sowie des CC Chemokinrezeptors 4 (CCR4) ermöglicht T-Zellen in die Haut zu migrieren.<sup>15,16</sup> Durch die Interaktion von CLA mit E-Selektin, ein Adhäsionsmolekül, das sich auf Endothelzellen von kleinen Venolen in der Haut findet, kommt es zur Extravasation der T-Zellen in die Dermis.<sup>17</sup> Dieser Prozess wird durch sog. Haut-assoziierte Chemokine („cutaneous chemokine ligand“ CCL) wie die beiden Liganden von CCR4, nämlich CCL 17 und CCL 22 getriggert.<sup>18</sup>



**Abb.1:** Zytokine und Chemokine, die am Epidermotropismus von T-Zellen beteiligt sind.

Im Rahmen der Entstehung einer Mycosis fungoides Läsion kommt es zur Sekretion von Zytokinen und Chemokinen auch durch basale Keratinozyten, die für die Initiierung oder auch Unterhaltung der Primärläsion wichtig ist. Hier spielen eine Reihe von Chemokinen wie das INF- $\gamma$  induzierende Protein-10 (IP-10) und Zytokine wie IL-1, IL-7, IL-10 und IL-15 eine entscheidende Rolle.<sup>19,20,21,22,23,24</sup> Des Weiteren können in diesem Prozess beteiligte T-Lymphozyten Integrin-Adhäsionsmoleküle (z.B. alpha E beta 7 Integrin) und Chemokinrezeptoren (z.B. CCR4 und CXCR3) exprimieren, womit sie in der Lage sind Liganden auf Endothelzellen, Keratinozyten und Langerhanszellen zu binden.<sup>25</sup> Dies ermöglicht ihnen die Migration in die Epidermis.

### **1.3.2 T-Zell Aktivierung**

Zusätzlich zu den epidermotropen Eigenschaften zeigen diese bereits neoplastischen T-Zellen in frühen Stadien eine erhöhte IL-4- und IL-5-Produktion, was klinisch in der Erhöhung des Gesamt-IgE-Spiegels sowie der Bluteosinophilie fassbar sein kann. Dies ist bedingt durch eine verstärkte Expression von GATA-3, einem Transkriptionsfaktor, der zu einer TH<sub>2</sub>-Differenzierung führt sowie von JunB, einem Regulator der IL-4 Expression.<sup>26,27</sup> Die aktivierten Zellen der Mycosis fungoides haben auch durch die Fähigkeit IL-10 und TGF- $\beta$  zu produzieren einen regulatorischen (inhibitorischen) Effekt auf die eigene Tumorabwehr.<sup>28,29</sup> Mycosis fungoides-Zellen können große Mengen an löslichem IL-2-Rezeptor bilden, der kompetitiv das Zytokin IL-2 bindet und dadurch die Aktivierung von normalen T-Zellen verhindert.<sup>30</sup> All diese Faktoren dienen dem Selbstschutz der Tumorzellen, die schließlich in einer Inhibition der Zell-medierten Immunität resultieren.

### **1.3.3 Klonale Dominanz der T-Zellen**

Zum Teil erst im Verlauf der Erkrankung kommt es zu chromosomalen Abberationen, die direkte Effekte auf die Expression von Onkogenen haben oder zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und damit zu einer klonalen Expansion führen.<sup>31</sup> Hier ist z.B. die Mutation des Zellzyklus-Regulatorgen p53 oder Deletionen des NAV3-Gens bei der Mycosis fungoides beschrieben.<sup>32</sup> Mikrosatelliten-Instabilitäten scheinen jedoch weder bei der Entstehung noch bei der Progression der Mycosis fungoides eine größere Rolle zu spielen.<sup>33</sup>

Aber auch Mutation die zum weiteren Selbstschutz der Tumorzellen vor der eigenen Immunantwort schützen können entstehen. So gehen normalerweise T-Zellen nach Antigenstimulation und Expansion unter physiologischen Bedingungen wieder in die Apoptose über. Dies geschieht physiologischerweise über den Fas-Rezeptor in Interaktion mit dem Fas-Liganden. So exprimieren z.B. zytotoxische T-Lymphozyten den Fas-Liganden und leiten in der Regel über den Fas-Rezeptor der Tumorzellen eine Antitumor-Antwort also Apoptose ein.<sup>34</sup>

Die Mycosis fungoides-Zellen zeigen bei Fortschreiten der Erkrankung eine relative Reduktion der Fas-Rezeptorexpression. Ursächlich dafür sind verschiedene Mutationen als auch Splice-Varianten im Fas-Rezeptorgen identifiziert worden. Die meisten davon führen zu einem nicht funktionierenden Fas-Protein.<sup>35,36</sup> Diese führt zu einer Verhinderung der Fas-medierten Stimulation der Apoptose, und scheint ein wichtiger und zunehmender Mechanismus der Tumorzellen zu sein, um dem Immunsystem zu entkommen („tumor escape“).<sup>37</sup> Zusätzlich sind die Tumorzellen paradoxerweise sogar in der Lage den Fas-Liganden selbst zu exprimieren und somit die CD8-positiven T-Zellen „Abwehrzellen“ zu eliminieren.<sup>38</sup>

## 1.4 Klassifikation

Die aktuelle WHO-EORTC-Klassifikation<sup>39</sup> beschreibt nosologische Entitäten, die durch klinische und histo- und zytomorphologische sowie phäno- und genotypische Merkmale definiert sind. Sie integriert größtenteils Entitäten, die zuvor von der Projektgruppe „kutane Lymphome“ der EORTC<sup>40</sup> vorgeschlagen wurden als auch Entitäten, die in der WHO-Klassifikation<sup>41</sup> beschrieben wurden. Sie ist die erste gemeinsame Klassifikation von Hämatopathologen und Dermatologen für kutane Lymphome (siehe Tab 1).

**Tab 1. WHO-EORTC Klassifikation kutaner Lymphome**

<b>Kutane T-Zell und NK-Zell Lymphome</b>	<b>Kutane B-Zell Lymphome</b>
<p>Mycosis fungoides (MF)</p> <p>Mycosis fungoides Varianten und Subtypen</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Follikulotrope MF</li> <li>• Pagetoide Reticulose</li> <li>• Granulomatous slack skin</li> </ul> <p>Sézary Syndrom</p> <p>Adulte T-Zell Leukemie/Lymphom</p> <p>Primär kutane CD30-positive Lymphoproliferationen</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primär kutanes anaplastisch großzelliges Lymphom</li> <li>• Lymphomatoide papulose</li> </ul> <p>Subkutanes panniculitis-like T-Zell Lymphom</p> <p>Extranodales NK/T-Zell Lymphom, nasal type</p> <p>Primär kutanes peripheres T-Zell Lymphom, unspezifiziert</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primär kutanes aggressives epidermotropes CD8-positives T-Zell Lymphom (provisorisch)</li> <li>• Kutanes <math>\gamma/\delta</math> T-Zell Lymphom (provisorisch)</li> <li>• Primär kutanes CD4+ klein/mittelgroßzelliges pleomorphes T-Zell Lymphom (provisorisch)</li> </ul>	<p>Primär kutanes Marginalzonen B-Zell Lymphom</p> <p>Primär kutanes Follikelzentrumslymphom</p> <p>Primär kutanes diffuses großzelliges B-Zell Lymphom, leg type</p> <p>Primär kutanes diffuses großzelliges B-Zell Lymphom, andere</p> <p>Intravaskuläres großzelliges B-Zell Lymphom</p> <p><b>Vorläufer hämatologische Neoplasie</b></p> <p>CD4+/CD56+ Hematodermische Neoplasie (früher: Blastisches NK Zell Lymphom)</p>

## 1.5 Klinische Präsentation

Im Folgenden werden die Klinik der häufigsten kutanen T-Zell Lymphome wie die Mycosis fungoides, Sézary Syndrom, das grosszellig anaplastische CD30+ Lymphom und die Lymphomatoide Papulose beschrieben. Diese Entitäten nehmen mehr als 70 % aller primär kutanen Lymphome ein.<sup>39,42</sup>

### 1.5.1 Mycosis fungoides und Varianten

Die *Mycosis fungoides* repräsentiert die häufigste Form kutaner T-Zell-Lymphome. Alibert<sup>43</sup> beschrieb 1806 den ersten Patienten mit einer MF. Dieser präsentierte sich mit Hautveränderungen, die sich zu pilzartigen Tumoren entwickelten. Sein Schüler Bazin<sup>44</sup> beschrieb erstmals die drei klassischen Phasen der kutanen Progression der Mycosis fungoides, in der die Erkrankung mit einem prämykosiden Stadium beginnt, sich dann in ein Plaquestadium entwickelt und schließlich in Hauttumore übergeht. Im prämykosiden (patch) Stadium findet man verschieden große, scharf begrenzte, runde, ovale, serpingiöse oder polyzyklisch begrenzte Herde. Sie sind meist nur gering entzündet und gerötet und können pityriasiform schuppen. Die Anzahl der Herde wechselt von Patient zu Patient. Prädilektionsstellen existieren nicht. Rumpf, Extremitäten und Kopf einschließlich Gesicht können betroffen sein. Vielfach besteht Juckreiz. Die Hauterscheinungen im prämykosidem Stadium können klinisch als auch histologisch leicht mit entzündlichen Dermatosen wie atopischem Ekzem oder Psoriasis vulgaris sowie den Formen der Parapsoriasisgruppe verwechselt werden.

Bei Progression der Erkrankung werden die makulösen Patches zunehmend infiltrierter und bilden dann die für das infiltrative Stadium typischen Plaques. Man findet jetzt scharf abgegrenzte, oft bizarr konfigurierte, infiltrierte, erhabene, plattenartige Herde von entzündlich rötlicher oder mehr bräunlich-rötlicher Farbe. Die Herde vergrößern sich langsam und können scharf begrenzte Inseln normaler Haut (sog. „nappes claires“) umschließen.

Das mykoside (tumoröse) Stadium tritt nach unterschiedlich langer Krankheitsdauer auf. Innerhalb der plattenförmig infiltrierte Herde oder auch *de novo* wachsen halbkugelige oder auch unregelmäßig konfigurierte, rötlich-bräunliche Tumoren. Diese fungoiden (schwammartigen) Knoten können ulzerieren und nekrotisch zerfallen.

Die beschriebenen Hautveränderungen müssen nicht nacheinander auftreten, sie können in den fortgeschrittenen Stadien auch gleichzeitig bestehen. Eine Progression über das prämykoside Stadium hinaus muss nicht regelmäßig erfolgen; die Erkrankung kann in diesem Stadium lebenslang persistieren.

### 1.5.2 Sézary-Syndrom

Das *Sézary-Syndrom*, das ca. 5 % aller kutaner Lymphome ausmacht<sup>39</sup>, ist klinisch durch die Trias Rötung und Schuppung meist des gesamten Integuments (Erythrodermie), Lymphknotenschwellung und leukemische Ausschwemmung von Tumorzellen charakterisiert. Häufig sind die Hautsymptome von starkem Juckreiz begleitet. Typisch für diese Erkrankung ist der Nachweis von atypischen Lymphozyten, sog. Sézary-Zellen im peripheren Blutbild. Die „*International Society for Cutaneous Lymphoma (ISCL)*“ hat insbesondere zur Differenzierung des Sézary Syndroms von einer erythrodermischen Form einer MF folgende Kriterien vorgeschlagen.<sup>45</sup> (1) Sezary Zellen  $\geq 1000$  /mm<sup>3</sup>; (2) eine CD4/CD8 Ratio  $\geq 10$ , sowie der Anteil CD4/CD7-negativer Zellen  $< 40$  %; (3) erhöhte Lymphozytenzahl im peripheren Blut sowie der Nachweis eines T-Zell Klons mittels der Southern blot- oder Polymerase-Kettenreaktion (PCR)- Technik; oder (4) Nachweis chromosomaler Aberrationen des T-Zell-Klons.

### 1.5.3 Grosszelliges anaplastisches CD30 positives T-Zell-Lymphom

Das *grosszellige anaplastische CD30 positive T-Zell-Lymphom* erstmals von Stein et al.<sup>46</sup> 1985 als malignes Lymphom des Lymphknotens beschrieben. Als primäre kutane Manifestation präsentiert es sich durch knotige Hautläsionen mit einem Durchmesser von 1 bis 15 cm. Typischerweise treten sie beim Erwachsenen auf. Histologisch finden sich typischerweise große blastäre CD30 positiven T-Zellen ( $>75$  % des Infiltrates). Meist findet sich ein einziger Knoten oder gruppierte Knoten in einem anatomischen Areal. Spontane Regressionen werden bei bis zu 25 % der Patienten beobachtet.

### 1.5.4 Lymphomatoide Papulose

Die *Lymphomatoide Papulose (LyP)* wurde erstmals von Dupont<sup>47</sup> 1965 als Erkrankung beschrieben und 1968 mit diesem Namen von Macaulay<sup>48</sup> bezeichnet. Sie ist eine chronische, zum Teil selbstheilende, papulonoduläre Hauterkrankung mit dem histologischen Bild eines kutanen T-Zell-Lymphoms. Die Patienten präsentieren sich mit papulösen, papulonekrotischen oder nodulären Hautläsionen, die sich in unterschiedlichen Entwicklungsstadien befinden können, und zeigen in der Regel einen gutartigen, aber chronischen Verlauf mit einer Krankheitsdauer von 3 Monaten bis zu 40 Jahren. Die einzelnen Läsionen verschwinden spontan innerhalb einiger Wochen und hinterlassen in der Regel eine kleine Narbe. Dennoch können etwa 10 –20 % der Patienten mit einer LyP im Verlauf ein anderes Lymphom entwickeln. Dabei handelt es sich meist um eine MF, ein CD30 positives grosszelliges Lymphom oder um einen Morbus Hodgkin.<sup>39</sup>

## 1.6 Diagnostik

Die Diagnosestellung bei kutanen Lymphomen erfordert umfangreiche klinische Erfahrung und beruht auf anamnestischen Angaben, klinischen Befunden, histologischen Analysen- einschließlich Immunhistologie, molekularbiologische Untersuchungen (Klonalitätsnachweis) in der Haut und bei Verdacht auf ein Sézary-Syndrom auch im Blut, sowie bildgebenden Verfahren zum Ausschluss von extrakutanen Manifestationen.

### 1.6.1 Histologie/Immunhistologie

Die Histologie einschließlich der Immunhistologie stellt nach wie vor den Goldstandard in der Diagnostik lymphoproliferativer Erkrankungen dar. Häufig vermag sie, bis auf die Frühstadien kutaner Lymphome, eine klare Diagnose zu stellen.

#### 1.6.1.1 Mycosis fungoides/Sézary-Syndrom

Histologisch ist eine klare Diagnose bei der MF sowie der SS gerade in den Frühstadien schwierig. In der Hämatoxylin- und Eosinfärbung zeigt sich typischerweise eine Exozytose von Lymphozyten in die Epidermis. Des Weiteren zeigt sich im Bereich der dermo-epidermalen Junctionszone häufig ein bandförmiges Entzündungsinfiltrat bestehend aus mononuklären Zellen, z.T. untermischt mit eosinophilen Granulozyten. Die Zellkerne der Lymphozyten zeigen oft gyrierte Formen. Allerdings sind diese atypischen Lymphozyten untermischt mit vielen reaktiven Lymphozyten, und somit sind die atypischen Zellen nicht sicher abgrenzbar. In dieser Phase der Erkrankung, in der sich histologisch häufig nur unspezifische Veränderungen zeigen, sind Verlaufsbiopsien meist unerlässlich.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten hat Glusac<sup>49</sup> verschiedene Studien internationaler Lymphomgruppen<sup>50,51,52</sup> (wie die EORTC und ISCL) zusammengefaßt und 5 reproduzierbare Kriterien zur Diagnose eines Frühstadiums einer MF erarbeitet: 1) Pautriersche Mikroabzesse, 2) Intraepidermale Lymphozyten sind größer als dermale Lymphozyten, 3) „Lining“ von atypischen Lymphozyten entlang der Basalmembran, 4) 7-µm bis 9-µm große gyrierte Lymphozyten, 5) pagetoide Ausbreitung intraepidermal von atypischen Lymphozyten. Diese Kriterien konnten größtenteils durch die Grazer Arbeitsgruppe an 745 Mycosis fungoides Fällen bestätigt werden.<sup>53</sup>

Bei Progression der Erkrankung in das Plaque-Stadium nimmt die Anzahl der epidermotropen T-Lymphozyten zu und sie neigen zu einer nest-artigen Ansammlung innerhalb der Epidermis, sog. „Pautrierschen Mikroabzessen“.

Im Tumorstadium zeigt sich dann ein dichtes Infiltrat mit überwiegend pleomorphen Lymphozyten, das bis in das Fettgewebe reichen kann. Der Epidermotropismus ist in diesem Stadium häufig wenig ausgeprägt.

**Immunhistologisch** handelt es sich um T-Lymphozyten mit einem CD3+, CD4+ und CD45RO+ Phänotyp. Des Weiteren exprimieren die Tumorzellen betaF1 (Betakette des T-Zellrezeptors). Diese Antigene werden aber auch von physiologischen Nicht-Tumor- Lymphozyten exprimiert, so daß diese keine CTCL-spezifischen Antigene repräsentieren<sup>54</sup>. Eine immunhistologische Unterscheidung einer MF von einem SS ist bisher mit den verfügbaren Antikörpern nicht möglich<sup>55</sup>. Nur in seltenen Fällen findet sich eine MF mit einem zytotoxischen Phänotyp mit Expression von CD8+ und TIA-1.<sup>56,57</sup>

### **1.6.1.2 Grosszelliges anaplastisches CD30 positives T-Zell-Lymphom**

Histologisch zeigt sich ein knotiges dermales Infiltrat, das bis in das Fettgewebe reichen kann. Ein Epidermotropismus ist vorhanden meist jedoch nur gering ausgeprägt. Charakteristisch sind große blastäre Zellen mit unregelmäßig geformten Zellkernen und hellem weitem Zytoplasma. Zum Teil haben die Tumorzellen mehrere Kerne. Die Tumorzellen wachsen kohesiv im Verband. Grosszellige CD30+ T-Zell Lymphome sind durch Infiltrate von mehr als 75 % CD30+ neoplastische T-Zellen charakterisiert. Im Gegensatz zu den primär nodalen anaplastisch grosszelligen Lymphomen zeigt sich meist keine Translokation 2;5 mit Expression des NPM/ALK-Gens<sup>58</sup>. In Abgrenzung zur Lymphomatoiden Papulose zeigen die CD30+ Tumorzellen hier meist keine TRAF1-Expression.<sup>59</sup>

### **1.6.1.3 Lymphomatoide Papulose**

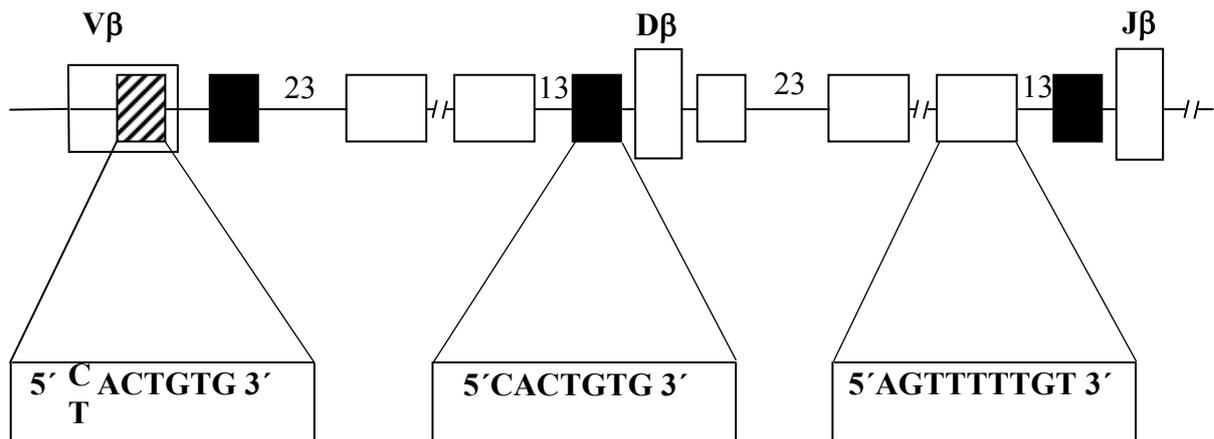
Hier zeigt sich histologisch in einer voll entwickelten Läsion ein dermales knotiges gemischzelliges Infiltrat aus Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und manchmal auch neutrophilen Granulozyten. Abhängig von der Größe der Lymphozyten lässt sich die LyP nach Willemze<sup>60</sup> in drei zytologisch unterschiedliche Formen unterteilen: LyP Typ A besteht aus großen blastären Lymphozyten (< 50 %) beigemischt mit Neutrophilen und Eosinophilen Granulozyten sowie Histiozyten; LyP Typ B überwiegend kleinen Lymphozyten mit cerebriformen Zellkernen ähnlich wie einer bei einer Mycosis fungoides und LyP Typ C aus > 50 blästeren CD30-positiven Blasten ähnlich einem CD30-positiven grosszelligem Lymphom.

Immunhistologisch entsprechen diese Lymphozyten aktivierten T-Helfer-Zellen mit Expression des CD30-Moleküls: CD30+, CD3+, CD4+, CD5+, TRAF1+, CD8-, CD15-.<sup>59,61,62,63</sup>

## 1.6.2 Molekulare Diagnostik

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der differenzialdiagnostischen Abgrenzung besonders der frühen Formen der CTCL von chronisch entzündlichen Dermatosen, z.B. chronische Ekzeme, wurden molekularbiologische Nachweismethoden entwickelt, die die umgelagerten T-Zellrezeptor-(TCR)-Gene als Ziel haben.

Während der Entwicklung der T-Zelle im Thymus entstehen T-Zellen mit einem riesigen Repertoire unterschiedlicher T-Zellrezeptoren. Die Generierung der Vielfalt von Antigenrezeptoren beruht vorwiegend auf zwei genetischen Prozessen, zum einen auf der *rekombinatorischen Diversität* und zum anderen auf der *junktionalen Diversität*.<sup>64</sup> 1. Die *rekombinatorische Diversität* umfaßt die möglichen Rekombinationen der variablen- (V), Diversifikations- (D) und Junktionssegmente (J) zu einem funktionellen VDJ-Genabschnitt. Dazu muß eines der V-Genelemente mit einem J-Genelement rekombiniert werden. Existieren D-Elemente, wie im Genlokus für die  $\beta$ - und  $\delta$ -Kette des T-Zellrezeptors, vollzieht sich die Genumlagerung in zwei Schritten. Zuerst wird ein D-Gensegment mit einem J-Segment rekombiniert, darauf folgt im zweiten Schritt die Anlagerung eines V-Genes an den bereits neukombinierten D-J-Komplex. Diese Rekombination wird durch spezifische Rekombinasen (RAG1 und RAG2) vermittelt, die bestimmte Signalsequenzen erkennen, welche die einzelnen Gensegmente an ihrem 5'- und 3'-Ende flankieren.<sup>65,66</sup> Die Signalstrukturen für diese Rekombinasen gliedern sich in eine heptamere und eine nonamere Basenfolge, die jeweils - unabhängig von ihrer Lokalisation - eine nahezu identische Sequenz aufweisen. In Abhängigkeit von ihrer 5'- oder 3'-Position zum variablen Genelement sind Heptamere und Nonamere entweder durch 12 oder 23 Basenpaare lange Einschübe voneinander getrennt, deren Sequenzen jedoch beliebig sind. Die zueinander homologen Heptamer/Nonamer-Sequenzen benachbarter Genelemente gehen unter Herausschneiden aller dazwischenliegenden Bereiche, Basenpaarungen ein. Es impliziert auch die Deletion aller  $\delta$ -Kettengene bei der Umlagerung der Genregion für die  $\alpha$ -Kette des TCRs. Ist diese sogenannte "stem- & loop-Konfiguration" erreicht, katalysieren die Rekombinasen die Verknüpfungen der variablen Gensegmente, wobei die zuvor entstandene "Loop-Region" ausgeschnitten wird.



**Abb.2** Schematische Darstellung der Lokalisation der Heptamer/Nonamer Signalsequenzen relativ zu den Gensegmenten.

2. Durch die *junktionale Diversität* wird die Vielfalt der TCRs noch erheblich durch ein sogenanntes “imprecise joining” der an der Rekombination beteiligten Gensegmente gesteigert. Von entscheidender Bedeutung sind dabei die Möglichkeiten der Deletion von terminalen V-3`- und J-5`-Nucleotiden durch Nucleasen sowie die Insertion von nach dem Zufallsprinzip eingebauten Nucleotiden (N-Nucleotide) an den Verknüpfungsstellen der einzelnen Keimbahnsegmente durch das Enzym terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT). N-Nucleotide können sowohl an der V-D als auch an der D-J Junction eingefügt sein. Darüber hinaus können die D-Elemente gänzlich fehlen, nur teilweise oder mit verschiedenen D-Elementen fusioniert vorliegen. Die beschriebenen Prozesse stellen die Grundlage für die Generation von mehr als  $10^6$  verschiedenen funktionellen TCR dar. Die resultierende hypervariable Genkonfiguration (V-N-D-N'-J) stellt somit einen molekularbiologischen Fingerabdruck für jede individuelle T-Zelle und alle aus ihr entstehenden Tochterzellen dar.

Bei einer malignen Entartung, d.h. einer klonalen Proliferation, die von einer einzelnen malignen transformierten T-Zelle ausgeht, finden sich daher viele Zellen mit einer identischen hypervariablen Region des T-Zellrezeptorgens (V-N-D-N'-J-Region); man bezeichnet diese T-Zellen dann als monoklonal. Im Gegensatz dazu findet man bei einem reaktiven – entzündlichen- Geschehen unterschiedliche T-Zellen mit unterschiedlichen TCR-Genmlagerungen (polyklonal). Aufgrund dieser Charakteristik eignet sich diese hypervariable Region in Kombination mit molekularbiologischen Analysemethoden als DNS-Tumormarker klonaler T-Zellen.

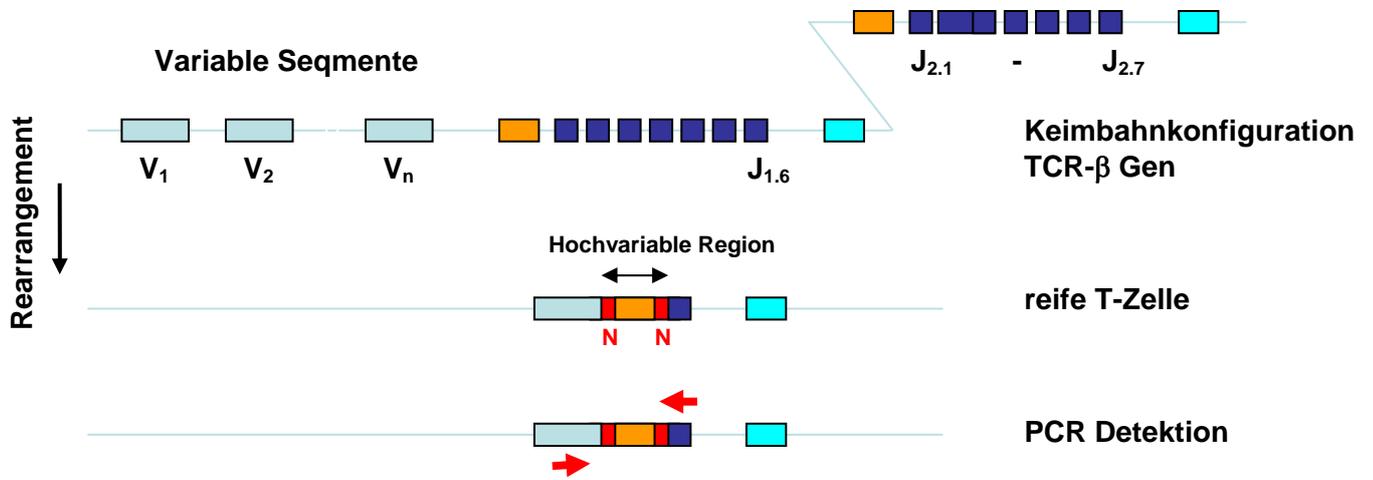
Zum Nachweis klonaler Antigenrezeptor-Genumlagerungen wurden in den letzten 15 Jahren enorme Anstrengungen unternommen. Anfangs stand die Southern-Blot-Hybridisierungstechnik<sup>67</sup> im

Vordergrund, mit deren Hilfe sich klonale B- und T-Zellpopulationen aus DNS-Extrakten aus schockgefrorenem Gewebe nachweisen ließen. Untersuchungen der T-Zellrezeptor- $\beta$ -Genumlagerung mit der Southern-Blot-Hybridisierungstechnik konnten zeigen, dass die Mycosis fungoides als auch das Sézary-Syndrom eine monoklonale Erkrankung darstellen.<sup>68,69</sup> Diese Technik hat sich jedoch in der Routinediagnostik wegen der radioaktiven Belastung, der geringen Sensitivität (mindestens 5-10 % monoklonale T-Zellen in einem Gemisch polyklonaler, reaktiver T-Zellen) sowie aufgrund des hohen Zeitaufwandes von mindestens 5 Tagen nicht durchsetzen können. Besonders einschränkend ist die Erfordernis großer Mengen hochmolekularer DNS (ca. 10  $\mu$ g pro Ansatz) aus Frischmaterial und nicht aus dem in der alltäglichen Routine verwendeten Formalin-fixiertem Paraffingewebe.

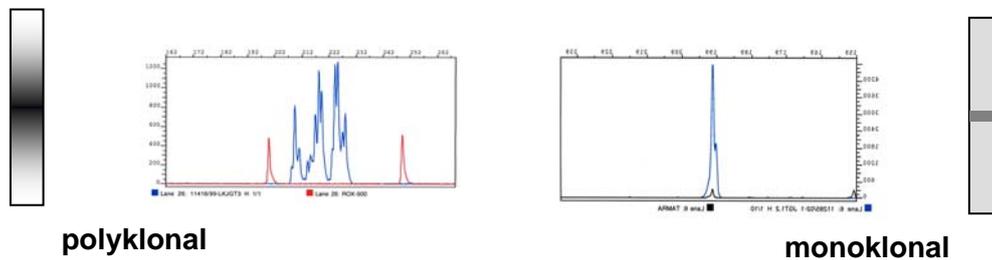
Mit der Entwicklung der Polymerase Kettenreaktion<sup>70,71</sup> (PCR) folgten verschiedene PCR-basierte Methoden, die in der Lage waren, einen frühen Nachweis klonal expandierter T-Zellen mit einer niedrigen Nachweisgrenze zu führen. Die meisten Klonalitätsanalysen konzentrierten sich auf die Untersuchungen der TCR- $\beta$ - und TCR- $\gamma$ -Gene, da die Gene der TCR- $\alpha$ -Kette für routinemäßige Untersuchungen zu komplex aufgebaut und die dazwischenliegenden TCR- $\delta$ -Gene meist deletiert sind.<sup>72</sup> Aufgrund der einfacheren Konfiguration der TCR- $\gamma$ -Gene<sup>73</sup> (12 V- und 5 J-Segmente mit hoher Sequenzhomologie im Vergleich zum TCR- $\beta$ -Gen<sup>74</sup> mit 65 V- und 13 J-Segmenten mit niedriger Sequenzhomologie) wurden zunächst TCR- $\gamma$ -PCR Varianten etabliert, beruhend auf z.B. Konsensus-Primern, segment-spezifischen Primer oder GC-Klammer-Primer.<sup>75,76,77,78,79, 80,81</sup>

Insgesamt kann mit der Analyse des TCR- $\gamma$  Rearrangements eine Detektionsrate von 50-90 % erreicht werden. Sie ist somit eine wichtige Hilfestellung in der Diagnose von kutanen T-Zell-Lymphomen auch in frühen Stadien.

## A T-Zell-Rezeptor Rearrangement



## B Elektrophorese- und Genescan-Analyse



**Abb.3** A) Schematische Darstellung der TCR-Genumlagerung während der Entwicklung der T-Zelle sowie die resultierenden Bindungsstellen der Primer für die PCR-Analyse.  
 B) Darstellung der PCR-Produkt-Analyse im Gelbild als auch in der Genescan-Analyse.

### 1.6.3 Ausbreitungsdiagnostik

Zur Stadieneinteilung der kutanen T-Zell-Lymphome wird die TNM-Klassifikation verwendet.<sup>82</sup> Diese Klassifikation wurde vor allem für die Mycosis fungoides entwickelt und wird anderen Hautlymphomen wie z.B. den CD30 positiven CTCL nur bedingt gerecht. Sie enthält auch Kategorien wie z.B. N2 (klinisch keine vergrößerten Lymphknoten aber histologisch Infiltrate eines CTCL), die im klinischen Alltag keine Bedeutung haben.

**Tab 2. Staging-System für MF/SS\***

Klinisches Stadium	T (Tumor)	N (Lymphknoten)	M (Metastasen)
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T1 or T2	N1	M0
IIB	T3	N0 or N1	M0
III	T4	N0 or N1	M0
IVA	T1-4	N2 or N3	M0
IVB	T1-4	N0-N3	M1

T1: Patch/Plaque  $\leq$  10% der Körperoberfläche; T2: Patch/Plaque  $\geq$  10% der Körperoberfläche; T3: Hauttumore; T4: Erythrodermie; N0: normale Lymphknoten; N1: Palpable Lymphknoten ohne histologischem Nachweis eines Lymphoms; N2: Lymphknoten nicht palpabel aber histologischer Nachweis eines Lymphoms; N3: Palpable Lymphknoten mit histologischem Nachweis eines Lymphoms; M0: Keine viszerale Manifestation; M1: Histologischer Nachweis einer viszeralen Manifestation

\*nach Bunn and Lamberg (1979).

Bei Erstdiagnose wird zur Ausbreitungsdiagnostik neben komplettem Routinelabor (Differenzialblutbild, LDH, BSG sowie Leber – und Nierenparameter, Elektrolyte) sowie bildgebende Verfahren wie Ultraschall der peripheren Lymphknoten und Abdomen sowie Röntgen-Thorax durchgeführt. Bei in dieser Diagnostik suspekten Befunden werden zusätzlich gezielte CT-Untersuchungen, ggf. Knochenmarksbiopsie durchgeführt. In Anlehnung an die ISCL sollte zusätzlich bei Verdacht auf Sézary-Syndrom neben der Quantifizierung von Sézary-Zellen im peripheren Blut eine Untersuchung der Lymphozytensubpopulation (CD4/CD8 Ratio, Anteil der CD4+CD7- Zellen) sowie eine Klonalitätsanalyse durchgeführt werden. Diese Diagnostik wird im weiteren Verlauf der Erkrankung jährlich oder bei Anzeichen einer Progression wiederholt.

## 1.8 Therapie

### Therapie von kutanen T-Zell Lymphomen

Das Prinzip bei der Therapie von kutanen Lymphomen, das rein palliativ ausgerichtet ist, beruht auf drei konzeptionelle Überlegungen:

- 1) Induktion einer Remission durch eine stadienorientierte Therapie;
- 2) Verlängerung der Remissionsdauer und der Überlebenszeit;
- 3) Lebensqualität.

Für die MF und ihre Sonderformen wird im Gegensatz zu den nodalen Non-Hodgkin- Lymphomen eine stadiengerechte eher zurückhaltende Therapie empfohlen. Frühzeitige aggressivere Therapiemaßnahmen (z.B. Polychemotherapie) erzielen keine verlängerten Überlebenszeiten, sind aber mit einer erhöhten Morbidität verbunden und minimieren zudem Therapiemöglichkeiten bei Progression der Erkrankung.<sup>83</sup>

Im Folgenden werden für die unterschiedliche Entitäten in Anlehnung an die deutsche Leitlinie für kutane Lymphome ([www.ado-homepage.de/Leitlinie\\_Lymphome\\_ADO\\_2005.pdf](http://www.ado-homepage.de/Leitlinie_Lymphome_ADO_2005.pdf)) Therapieempfehlungen erläutert.

#### 1.8.1 Therapie der Mycosis fungoides/Sézary Syndrom

In frühen Stadien (Stadium I und II) stehen lokale Therapieverfahren im Vordergrund wie topische Steroide und Phototherapie (UVB1, PUVA: Psoralen plus UVA). Bei größeren Tumoren kann zusätzlich eine Radiotherapie mit schnellen Elektronen (30-40 cGy) bzw. eine Röntgenweichteiltherapie (10x2 Gy, 30-50 kV, 2x/Woche) durchgeführt werden.<sup>84</sup> In den USA und den skandinavischen Ländern werden auch lokal applizierte Zytostatika wie Mechlorethamin und Carmustin (BCNU) eingesetzt, in Mitteleuropa jedoch selten.<sup>85,86</sup>

In fortgeschrittenen Stadien (II, III) bieten sich eine Kombination von lokalen und systemischen Therapie an, z.B. eine Kombination aus PUVA mit Retinoiden<sup>87</sup> (RePUVA) und/oder rekombinantem Interferon-Alpha (PUVA, alpha-RePUVA). Hier zeigt sich auch insbesondere das neue Retinoid Bexarotene (Targretin®) als besonders wirksam bei CTCL<sup>88,89</sup>, das ebenso zur Wirkungspotenzierung mit alpha-INF kombiniert werden kann.<sup>90</sup> Eine weitere erfolgversprechende Phototherapie stellt die extracorporale Photophorese (ECP) dar, die insbesondere in Kombination mit alpha-INF-ECP eine etablierte Therapie für das Sézary Syndrom ist.<sup>91,92</sup>

Erst bei weiterer Progression der Erkrankung (Stadium IV) kommen Chemotherapien zum Zuge. Man beginnt zunächst mit milden Regimes wie Chlorambucil in Kombination mit Prednison („Knospe-Schema“) oder mit Methotrexat (MTX). Das neuentwickelte pegylierte Doxorubicin

(Caelyx®) mit einer Ansprechrate von 83% scheint ebenso als Monotherapie in Betracht zu kommen.<sup>93</sup>

Bei Nichtansprechen auf diese Therapien kommen als *ultima ratio* Polychemotherapien z.B. nach dem CHOP-Schema (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon) oder neuere Nucleosidanaloga wie das Gemcitabine in Betracht.<sup>94</sup> Hier ist zu Bedenken, dass sich in der Regel ein schnelles Ansprechen zeigt aber meist im weiteren Verlauf ein nicht mehr zu beherrschendes Rezidiv auftreten kann. Die Patienten sterben häufig unter der Polychemotherapie an Infektionen und Kachexie.<sup>83</sup> Neuere immunologische Therapien wie Denileukin-Diftitox (DAB389IL-2, Ontak®), ein Fusionsprotein aus Diphtherietoxin und IL-2, welches bei IL-2 Rezeptor positiven (CD25) MF sind als Alternativen in diesem Stadium zu überlegen. Dieses Präparat zeigt in der Multicenter Studie Ansprechraten von 30% auch in fortgeschrittenen Stadien bei multiplen Vorbehandlungen.<sup>95</sup> Aufgrund eigener Erfahrungen ist hiermit, allerdings nur in Einzelfällen, Langzeitremission im Tumorstadium bis zu 3 Jahren zu erreichen.<sup>96</sup>

### **1.8.3 Therapie von kutanen CD30+ Lymphoproliferationen**

Im Gegensatz zu nodalen CD30+ Lymphomen weisen primär kutane CD30+ lymphoproliferative Erkrankungen, die Lymphomatoide Papulose und das anaplastisch grosszellige Lymphom, eine ausgezeichnete Prognose auf. Daher ist von einer aggressiven den sonst für nodale CD30+ Lymphomen üblichen Chemotherapien in der Regel abzusehen. Die Hautveränderungen der lymphomatoiden Papulose und gelegentlich auch die der CD30+ grosszelligen Lymphomen können spontan in eine Regression eintreten, die typischerweise mit einer Narbenbildung verbunden ist. Bei Beschränkung auf die Haut werden zunächst Lokalmaßnahmen erwogen, in der Regel eine komplette Exzision und/oder ggf. eine Nachbestrahlung. Erst bei ausgedehnten Herden oder bei Lymphknoten- oder Organbefall kommt eine MTX-Therapie (15-25 mg/Woche) in Betracht.

## **2 Eigene Befunde**

### **2.1 Untersuchung der Spezifität und Sensitivität von T-Zellrezeptor Genumlagerungsanalysen bei CTCL (Projekt 1)**

#### 2.1.1 Erläuterung des Projekts

Die Mycosis fungoides, als häufigste Form von kutanen malignen T-Zell-Lymphomen, zeigt ein breites Spektrum klinischer und histologischer Erscheinungsformen, so dass häufig eine zuverlässige Unterscheidung zwischen benignen und malignen kutanen T-Zell-Proliferationen schwierig ist. Dies gilt insbesondere für die frühen Mycosis fungoides Stadien, die nur schwer von entzündlichen Hauterkrankungen abzugrenzen sind. In diesen Fällen erwies sich für die Diagnosestellung der Nachweis identischer TCR-Umlagerungen von klonal proliferierenden T-Zellen hilfreich.

In den bisherigen Klonalitätsstudien von kutanen T-Zell-Lymphomen wurde hauptsächlich die TCR- $\gamma$  PCR verwendet. Mit dieser Technik gelang der Nachweis einer monoklonalen T-Zell Population in 53-90 % der Fälle. Dabei ist unklar, ob diese große Spannbreite der Detektionsrate eher methodisch oder aufgrund des unterschiedlichen Patientenkollektivs (unterschiedliche Stadien) bedingt ist.

Um diese diagnostischen Unsicherheiten bei den Frühformen der CTCL auszuschließen, untersuchten wir zunächst Patienten in fortgeschrittenen Stadien (II-IV) mit einer optimierten TCR- $\gamma$  PCR und nachfolgender GENESCAN-Analyse. Mit dem Ziel möglicherweise höhere Detektionsraten zu erreichen erweiterten wir das Patientenkollektiv und untersuchten diese mittels einer von uns erstmals entwickelten TCR- $\beta$  PCR in Kombination mit der Genescan-Technik und DNA-Sequenzierung.

Nach Erhalt dieser Daten analysierten wir die Sensitivität und Spezifität der TCR-PCR in Kombination mit der Genescan-Methode von Patienten mit Mycosis fungoides in Frühstadien. Hierbei ergab sich auch die Frage, ob sich möglicherweise bereits bei initialen Stadien klonale T-Zellpopulationen im Blut nachweisen lassen. Des Weiteren beabsichtigten wir die Frage zu beantworten, ob sich eine Parapsoriasis en grand plaque, die einer Mycosis fungoides klinisch und histologisch ähneln kann, mittels Klonalitätsanalysen abgrenzen lässt.

*Assaf C, Hummel M, Dippel E, Goerdts S, Muller HH, Anagnostopoulos I, Orfanos CE, Stein H. High detection rate of T-cell receptor beta chain rearrangements in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction in combination with the GeneScan technique and DNA sequencing. Blood. 2000; 96: 640-6.*

*Dippel E, Assaf C, Hummel M, Schrag HJ, Stein H, Goerdts S, Orfanos CE. Clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan analysis in advanced cutaneous T-cell lymphoma: a critical evaluation. J Pathol. 1999; 188:146-54.*

*Klemke CD, Dippel E, Dembinski A, Ponitz N, Assaf C, Hummel M, Stein H, Goerdts S. Clonal T cell receptor gamma-chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan analysis in the skin and blood of patients with parapsoriasis and early-stage mycosis fungoides. J Pathol. 2002; 197:348-54.*

## **2.2 Nachweis der Klonalität zur Charakterisierung der T- bzw. B-Zell-Linienzugehörigkeit (Projekt 2)**

### 2.2.1 Erläuterung des Projekts

Ein Teil der malignen Lymphome, wie z.B. beim CD30-positiven grosszelligen Lymphom oder der Morbus Hodgkin, exprimieren auf der Oberfläche weder T- noch NK- oder B-zellspezifische Antigene. Damit können diese Lymphome weder der T-Zell- noch der NK-Zell- oder der B-Zellreihe zugeordnet werden. Aber auch die Beziehung zueinander bleibt unklar, entwickelt sich doch manchmal beide Lymphome in einem Patienten.

Ähnliches Problem ergibt sich häufig bei einer weiteren CD30-positiven lymphoproliferativen Erkrankung, nämlich der lymphomatoiden Papulose. Bei dieser Entität stellen sich zwei Fragen, zum einem ist es nicht klar, ob die großen CD30-positiven Zellen der T-Zellreihe angehören und zum zweiten, ob diese Zellen klonal sind.

Um diese Fragen zu klären haben wir Klonalitätsanalysen an DNA aus dem Gesamtextrakt von Tumorgewebe beim CD30-positiven grosszelligen Lymphom durchgeführt. Da bei der lymphomatoiden Papulose und beim Morbus Hodgkin die großen CD30-positiven Zellen nur eine geringe Minderheit im Gewebe repräsentieren, haben wir zusätzliche Untersuchungen auf Einzel-Zell Niveau durchgeführt. Hierzu wurden einzelne CD30-positve Zellen aus dem Gewebe isoliert und deren DNA extrahiert und amplifiziert. Die PCR-Produkte jeder einzelnen Zelle wurden sequenziert und miteinander verglichen.

*Seitz V, Hummel M, Marafioti T, Anagnostopoulos I, Assaf C, Stein H. Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. Blood. 2000;95:3020-4.*

*Steinhoff M, Hummel M, Anagnostopoulos I, Kaudewitz P, Seitz V, Assaf C, Sander C, Stein H. Single-cell analysis of CD30+ cells in lymphomatoid papulosis demonstrates a common clonal T-cell origin. Blood. 2002;100:578-84.*

*Foss HD, Anagnostopoulos I, Araujo I, Assaf C, Demel G, Kummer JA, Hummel M, Stein H. Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and null-cell phenotype express cytotoxic molecules. Blood. 1996;88:4005-11.*

## 2.3 **Nachweis der T-Zell- Klonalität in der Ausbreitungsdiagnostik bei kutanen T-Zell-Lymphomen (Projekt 3)**

### 2.3.1 Erläuterung des Projekts

Der Nachweis klonal expandierender T-Zellen in der Ausbreitungsdiagnostik erfordert eine hochsensitive Methode. Dies gilt insbesondere für den Nachweis klonaler T-Zellen im Blut oder Lymphknoten, wo die malignen T-Zellen physiologischerweise von einem ausgeprägten „lymphozytären Hintergrund“ umgeben sind. Hierfür eignen sich die von uns entwickelten und etablierten TCR- $\beta$  und TCR- $\gamma$ -PCR Techniken, die in der Lage sind etwa 1 % klonal umgelagerter T-Zellen in einem polyklonalen Hintergrund (ca. 1 ng T-Zell Linien-DNA in 100 ng Tonsillen DNA) aufzuzeigen.

Im vorliegenden Projekt führten wir Klonalitätsuntersuchungen exemplarisch bei einem Patienten mit Sézary Syndrom vor und während einer Therapie mit extracorporaler Photophorese im Primärtumor als auch im Blut und Lymphknoten sowie im weiteren Verlauf bei Progression der Erkrankung auch in den verschiedenen Organmanifestationen durch. Hier stellte sich insbesondere die Frage, ob während der initial erreichten klinischen Remission auch eine molekularbiologische Remission vorliegt, und ob sich der Tumorzellklon bei Progression hinsichtlich seiner klonalspezifischen Sequenz (V-N-D-N-J-Region) verändert.

Des Weiteren haben wir in einer größeren Pilotstudie die diagnostische und prognostische Bedeutung des Nachweises einer klonalen T-Zellpopulation im Lymphknoten überprüft. Anhand eines klinisch und histologisch gut charakterisiertem Kollektiv von Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom untersuchten wir klinisch palpable Lymphknoten sowie die Lymphommanifestation an der Haut mittels TCR- $\beta$  und zum Vergleich TCR- $\gamma$  PCR. Dabei verglichen wir die PCR-Produkte der Haut und der Lymphknoten hinsichtlich ihrer Amplifikatgröße (Genescan-Technik) wie auch der DNA-Sequenz. Die Klonalitätsergebnisse der Lymphknoten setzten wir in Relation zur histologischen Klassifizierung. Um die klinische bzw. prognostische Bedeutung diese Befunde zu evaluieren verglichen wir die Klonalitätsergebnisse mit den klinischen Verläufen hinsichtlich Stadienwechsel und Gesamtüberleben.

*Assaf C, Hummel M, Zemlin M, Steinhoff M, Geilen CC, Stein H, Orfanos CE. Transition of Sezary syndrome into mycosis fungoides after complete clinical and molecular remission under extracorporeal photophoresis. J Clin Pathol. 2004;57:1325-8.*

*Assaf C, Hummel M, Steinhoff M, Geilen CC, Orawa H, Stein H, Orfanos CE. Early TCR-beta and TCR-gamma PCR detection of T-cell clonality indicates minimal tumor disease in lymph nodes of cutaneous T-cell lymphoma: diagnostic and prognostic implications. Blood. 2005;105:503-10.*

### 3 DISKUSSION

Kutane T Zell-Lymphome stellen eine heterogene Gruppe von klonal expandierenden T-Lymphozyten mit unterschiedlich klinischer Manifestation, Histologie, Immunphänotyp und Prognose dar.

Schwierigkeiten bereitet die Diagnosestellung insbesondere in Frühstadium der Erkrankung, da sowohl klinisch als auch histologisch Ähnlichkeiten zu anderen entzündlichen Dermatosen, wie z.B. chronisches Ekzem, vorliegen. Die Immunhistologie als moderne Methode zur Objektivierung der histologischen Diagnose vermag Frühformen der Mycosis fungoides nicht sicher von reaktiven Läsionen zu unterscheiden, da die malignen T-Zellen in der Regel kein auffälliges Markerprofil aufweisen, sondern klassische T-Zell-Oberflächenmarker exprimieren (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7) wie sie auch bei anderen entzündlichen Hauterkrankungen gefunden werden.

Obwohl die Mycosis fungoides nicht durch einen rasch-progressiven Verlauf gekennzeichnet ist, ist das adäquate Management der Patienten doch entscheidend abhängig von 1) einer frühen Diagnosestellung und 2) einem akkuraten Staging der Erkrankung, die eine stadiengerechte Therapie dem Patienten ermöglicht. Mittlerweile sind molekularbiologische Methoden entwickelt worden, um bei histologisch suspekten T-Zell-reichen Hautinfiltraten als Hinweis auf eine mögliche Malignität des Infiltrates monoklonale T-Zellpopulationen nachzuweisen. Die vorliegende Arbeit hat hierzu mittels Untersuchungen der T-Zellklonalität diverse Aspekte des kutanen T-Zell-Lymphoms untersucht, die unter anderem zum Verständnis der Biologie der Mycosis fungoides und der aus ihr transformierten Lymphome beigetragen haben. Des Weiteren konnten hiermit auch grundlegende Daten bezüglich der diagnostischen (sowohl in der primären Hautläsion als auch in der Ausbreitungsdiagnostik z.B. Lymphknoten) als auch prognostischen Bedeutung von Klonalitätsuntersuchungen beim kutanen T-Zell-Lymphom gewonnen werden.

#### 3.1 Sicherung der Klonalität in der Diagnostik des kutanen T-Zell-Lymphoms

Die Mycosis fungoides als häufigste Variante primär kutaner T-Zell-Lymphome (CTCL) ist initial nur auf die Haut beschränkt. Im weiteren Verlauf tritt jedoch bei einem Teil der Patienten eine Progression auf, zunächst mit Befall der hautnahen Lymphknoten, später auch der inneren Organe. Für Patienten in den frühen Stadien mit alleinigem Hautbefall (I-II) wurde eine 10-Jahres-Überlebensrate zwischen 100 und 67,4 % errechnet.<sup>97,98,99</sup> Bei Auftreten extrakutaner Lymphommanifestationen sinkt die mittlere Überlebensrate drastisch auf nur 13 Monate.<sup>100,101</sup> Eine

frühe Diagnosestellung ist daher besonders wichtig, wird doch die Prognose wesentlich durch den Zeitpunkt der Diagnosestellung bestimmt.

Die Diagnose der Mycosis fungoides ist allerdings sowohl klinisch als auch histologisch in den Frühstadien häufig schwierig zu stellen. Eine große Anzahl entzündlicher Dermatosen zeigt doch einer Mycosis fungoides ähnliche klinische und histologische Merkmale.<sup>102,103</sup> Insbesondere die histologischen Veränderungen beim Sézary-Syndrom sind häufig dezenter ausgeprägt als bei einer Mycosis fungoides im Plaque-Stadium, aber auch unspezifische Veränderungen werden häufig gesehen.<sup>104</sup> Histologische Veränderungen wie Pautrier'sche Mikroabszesse, epidermale Lymphozyten mit größerem Zellkern im Vergleich zu denen von dermalen Lymphozyten, finden sich meist nur bei Mycosis fungoides und sind daher recht zuverlässige Kriterien für die Diagnose. Sie finden sich allerdings nur bei einer kleineren Zahl von initialen Mycosis fungoides Fällen und sind daher nicht sensitiv.<sup>49</sup> Als weiterer erschwerender Faktoren bei der histopathologischen Begutachtung früher Mycosis fungoides-Läsionen kommt die intra- und interindividuelle-Variabilität der begutachtenden Dermatopathologen.<sup>105</sup>

Diese Schwierigkeiten bei der differenzialdiagnostischen Abgrenzung von Frühstadien der Mycosis fungoides von chronischen Dermatosen, führten zur Entwicklung molekularbiologischer Nachweismethoden. Diese beruhen auf der Tatsache, dass bei malignen T-Zell-Neoplasien eine klonale Proliferation von transformierten T-Zellen angenommen wird. Die proliferierenden T-Zellen müssten daher eine identische hypervariable Region des T-Zellrezeptorgens (V-N-(D)-N'-J-Region) aufweisen, die an die Tochterzellen weitergegeben werden. Im Gegensatz dazu findet man bei reaktiven Geschehen unterschiedliche T-Zellen mit unterschiedlichen TCR-Genumlagerungen. Aufgrund dieses Charakteristikums eignet sich die hypervariable V-N-(D)-N'-J Region in Kombination mit molekularbiologischen Analysemethoden als DNA-Tumormarker klonaler T-Zellen.

Anfangs stand die Southern-Blot-Hybridisierungstechnik im Vordergrund, mit deren Hilfe sich klonale T-Zellpopulationen aus DNA-Extrakten aus schockgefrorenem Gewebe nachweisen ließen. Die Southern-blot-Technik wurde jedoch in den letzten Jahren immer mehr von der PCR-Technik abgelöst, mit der man Untersuchungen auch an, in der Routine üblichen, Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Material durchführen kann. Zudem ist die PCR-Technik sensitiver, mit geringerem Zeit- und Kostenaufwand verbunden und das Arbeiten mit radioaktivem Material ist nicht notwendig.

Aufgrund der einfacheren Konfiguration der TCR- $\gamma$ -Gene werden überwiegend TCR- $\gamma$ -PCR-Varianten verwendet. Zahlreiche TCR- $\gamma$ -PCR-Varianten, z. B. mit Verwendung von segmentspezifischen Primern, Konsensus-Primern, radioaktiv-markierten Primern, GC-Klammer-Primer oder geschachtelte („nested“) PCR kommen zum Einsatz. Mit diesen Methoden konnte bei der Mycosis fungoides unterschiedlichen Detektionsrate von 53-90 % gefunden werden.<sup>75-81</sup> In den vorliegenden Arbeiten war es bisher unklar, ob die voneinander weit divergierenden Nachweisraten durch die Anwendung verschiedener Techniken oder durch Untersuchung unterschiedlicher Stadien der Mycosis fungoides bedingt waren. In der vorliegenden Arbeit beschränkten wir uns daher anfangs auf Klonalitätsuntersuchungen von klinisch und histologisch klar charakterisierten Mycosis fungoides Fällen. Hierbei konnten wir mittels einer etablierten TCR- $\gamma$  PCR eine Nachweisrate von 76 % (16/21 Patienten) bei fortgeschrittenen Mycosis fungoides Fällen zeigen.<sup>106</sup> Diese Arbeit belegt erstmalig, dass auch in einem Teil der klinisch und histologisch klar definierten Lymphome der Nachweis einer T-Zell-Klonalität nicht gelingt.

Dass diese Einschränkung primär methodisch bedingt ist und diese Mycosis fungoides Fälle doch in der überwiegenden Zahl der Fälle eine klonale T-Zellpopulation enthalten konnten wir in weiteren Experimenten zeigen.<sup>107</sup> Nach Entwicklung einer neuen TCR- $\beta$  PCR untersuchten wir insgesamt 24 Patienten mit Mycosis fungoides, einschließlich der 21 zuvor mit der TCR- $\gamma$  PCR untersuchten Fälle. Hier konnten wir in allen (24/24) der fortgeschrittenen Mycosis Fällen eine T-Zellklonalität nachweisen.<sup>107</sup> Diese Daten belegen eine signifikante Korrelation zwischen Klonalität und dem Vorliegen einer Mycosis fungoides. Der fehlende Nachweis klonaler TCR- $\gamma$ -Genumlagerungen bei Vorhandensein klonaler TCR- $\beta$  Genumlagerungen ist wahrscheinlich durch die häufigen Mutationen im TCR- $\gamma$ - Genloкус bedingt. Diese Mutationen des TCR- $\gamma$ -Gens können möglicherweise nicht durch die verwendete PCR-Primer erkannt werden und somit keine TCR- $\gamma$  spezifische PCR-Produkte generiert werden. Dieses Phänomen ist auch bei den B-Zell-Lymphomen vom Keimzentrumstyp bekannt; sog. somatische Mutationen in den Immunglobulin-Genen, sind die Ursache, dass in bis zu 30 % der Keimzentrums-Lymphome ein Klonalitätsnachweis nicht gelingt.<sup>108</sup>

Die unterschiedlichen Nachweisraten sowohl bei Lymphomen als auch bei Kontrollen dürften häufig wie bereits erwähnt durch unterschiedliche PCR-Varianten aber auch durch unterschiedliche Analysemethoden der PCR-Produkte bedingt sein. Die Kenntnis dieser technischen Unterschiede ist daher eine unerlässliche Voraussetzung bei der Bewertung einer Klonalität.

Zur Identifizierung von PCR-Produkten stehen diverse Methoden zur Verfügung, die von der einfachen Agarose-Gel-Elektrophorese bis hin zur hochauflösenden Fraktionierung von Sequenzgelen reichen. Scheller et al. konnten zeigen, dass die Detektionsrate identischer klonaler

PCR-Produkte mit Hilfe der PCR-Produktanalyse mit der Polacrylamid-Gelelektrophorese 42 % (; 22/53 CTCL Fälle) und mit der Genescan-Analyse 62 % (33/53 CTCL Fälle) beträgt.<sup>109</sup> Ferner zeigte sich, dass die Interpretation der PCR-Produkte unter Verwendung der Denaturierenden-Gradienten- (DGGE) und der Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) mit möglicherweise starkem Hintergrundsignal häufig schwierig ist. Hier lässt die Bewertung von so genannten „schwachen Banden“ einen großen interpretatorischen Spielraum.

Eine wesentliche Verbesserung der Analysetechniken zum Nachweis von TCR- $\beta/\gamma$ -Genumlagerungen wurde im Rahmen unserer Arbeiten durch den Einsatz von Primern erreicht, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierter waren und eine computergestützte Analyse der PCR-Produkten in einem automatischen DNA-Sequenzierer erfolgte (Genescan-Analyse). Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte fand analog zur Analyse von DNA-Sequenzierreaktionen in einem hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamid-Gel statt.<sup>106,107,110</sup> Das entwickelte Genescan-Verfahren ermöglicht durch präzise Größenbestimmung und Messung der Fluoreszenzintensität eine Trennschärfe von einem einzigen Basenpaar und gestattet damit eine objektive Unterscheidung monoklonaler von polyklonalen PCR-Produkten. Zusätzlich ist es möglich, durch die genaue Bestimmung der PCR-Produktgröße verschiedene Gewebeproben von gleichen Patienten, z. B. im Rahmen der Ausbreitungsdiagnostik, zu vergleichen.

Erst nach Erkenntnis der Sensitivität der verschiedenen PCR-Methoden (TCR- $\gamma/\beta$ -PCR) an klar definierten kutanen T-Zell-Lymphomen haben wir frühe Stadien der Mycosis fungoides untersucht. Hier konnten wir in 67 % der untersuchten Fälle (8/12 Patienten im Stadium Ia/Ib) eine klonale T-Zellpopulation nachweisen.<sup>110</sup> Diese Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Detektionsraten weitgehend überein.<sup>75,76,77,78,80</sup> Trotz der eingeschränkten Nachweisrate (keine Klonalität in 33 %) scheint diese Methode sensitiver als jedes einzelne histologische Kriterium in den Frühstadien der Mycosis fungoides zu sein und damit eine zusätzliche diagnostische Hilfe.<sup>111</sup>

Eine klare Abgrenzung eines Frühstadiums der Mycosis fungoides von einer Parapsoriasis en plaque ist mittels Klonalitätsuntersuchungen nicht möglich. So ließen sich in unserer Arbeit<sup>110</sup> in 19 % (5/26) und bei Theodorou et al.<sup>80</sup> sogar in 100 % (5/5) eine klonale T-Zellpopulation nachweisen. Hierbei muss kritisch bemerkt werden, dass eine sichere Differenzierung einer frühen Mycosis fungoides von einer großfleckigen Parapsoriasis klinisch und auch histologisch bisher nicht möglich ist. Nach Burg et al. entsprechen diese klonalen Parapsoriasisfälle möglicherweise doch einer Mycosis fungoides.<sup>112</sup>

### 3.2 Klonalität als Methode zur Charakterisierung von Lymphomen

Als Beispiel sei hier die lymphomatoide Papulose genannt. Klinisch ist für diese Erkrankung das wiederholte Vorkommen von spontanen Regressionen der papulonodulären Hautläsionen charakteristisch. Nur in 10-20 % der Fälle ist die Erkrankung mittel- bzw. langfristig mit einem malignen T-Zell-Lymphom, z.B. mit einem grosszelligen CD30-positivem Lymphom oder einem Morbus Hodgkin assoziiert,<sup>113,114,115</sup> die meisten Fälle der lymphomatoiden Papulose zeigen einen benignen Verlauf und gehen nicht in ein T-Zell-Lymphom über. Die 10-Jahres Überlebensrate der betroffenen Kranken wird in der WHO-Klassifikation mit 100 % angegeben.

Interessanterweise wird jedoch in den meisten Fällen eine monoklonale T-Zell-Population nachgewiesen, unabhängig davon, ob die Patienten im Verlauf ein malignes T-Zell-Lymphom entwickelten.<sup>116,117,118,119</sup> Des Weiteren zeigten mehrere Studien, dass sowohl zeitliche als auch von der Lokalisation unterschiedliche Läsionen der lymphomatoiden Papulose bei einem Patienten den identischen T-Zell-Klon repräsentierten.<sup>120,121</sup> Wir konnten erstmals auf Einzell-Ebene zeigen, dass die großen CD30-positiven Blasten ähnlich wie beim Morbus Hodgkin Ursprung der Klonalität sind. Diese Daten belegen, dass die lymphomatoide Papulose eine klonale Erkrankung ist.

Möglicherweise ist die Klonalität ein Ausgangspunkt für Malignität und die klonalen CD30-positiven T-Zellen der Ursprung für ein malignes CD30-positives Lymphom. Mehrere Arbeitsgruppen sowie auch unsere Ergebnisse belegen, dass sich sowohl bei lymphomatoider Papulose als bei anderen Lymphomen, z.B. beim CD30-positiven grosszelligen Lymphom oder beim Morbus Hodgkin, identische T-Zellpopulationen bzw. identische TCR- $\beta$  bzw. TCR- $\gamma$  Genumlagerungen nachweisen lassen.<sup>122,123</sup> Dies beweist die klonale Verwandtschaft dieser CD30-positiven Lymphoproliferationen. Möglicherweise entstehen diese CD30-positive Lymphome aus dem Ursprungsklon der lymphomatoiden Papulose nach Akquirierung zusätzlicher Mutationen. So könnte das Auftreten von Mutationen, die z.B. im TGF- $\beta$ -Rezeptorgen<sup>124</sup> nachgewiesen wurde, die fehlende FasL-Expression<sup>125</sup> sowie ein Defekt in der CD30/CD30 Ligand-Interaktion<sup>126</sup> zu einer malignen Transformation führen, die in ein CD30-positives grosszelliges Lymphom mündet. Aktuelle Daten zeigen, dass die initiale Transformation möglicherweise bereits im Knochenmark erfolgt.<sup>127</sup>

Dieses Konzept einer klinisch benignen klonalen Vorläufererkrankung (Prälymphom), die in eine echte Neoplasie übergeht ist nicht nur für kutane Lymphome beschrieben, sondern z.B. auch bei der benignen monoklonalen Gammopathie undeterminierter Signifikanz bekannt, die im Rahmen einer Mehrschritt-Tumorgenese in ein Plasmozytom übergehen kann.<sup>128</sup>

Unterschiedliche Ergebnisse bezüglich einer T-Zell-Klonalität zeigen verschiedene Studien bei benignen entzündlichen Hauterkrankungen, die nicht mit einer Neoplasie assoziiert sind. So konnte die Arbeitsgruppe um Sander<sup>129</sup> beim Lichen ruber planus in 25 % der Fälle (9/36) eine klonale T-Zell Population nachweisen. Andererseits fanden Staib und Sterry<sup>130</sup> sowie andere Gruppen<sup>131,132,133</sup> bei dieser Erkrankung keine Klonalität. In einer größeren Studie konnte Lukowsky et al. beim Lichen sclerosus et atrophicus in nahezu der Hälfte der Fälle (49 %; 19/39) mittels TCR- $\gamma$  PCR und Genescan-Analyse eine klonale T-Zellpopulation nachweisen. Als Kriterium wurde in dieser Studie der Nachweis eines T-Zell Klonen *in einer von zwei* durchgeführten PCR-Analysen mit nachfolgender Genescan-Auftrennung der PCR-Produkte gewählt.

Diese Daten stimmen z.T. mit unseren Ergebnissen überein. Bei der Analyse von chronischen Dermatosen wie bei Psoriasis vulgaris oder chronischem Ekzem, konnten wir in den Hautproben ein betont oligoklonale T-Zellproliferation, teilweise mit einer Dominanz einzelner Produktgrößen darstellen. Diese dominanten Banden können jedoch im Gegensatz zu den T-Zell-Lymphomen bei wiederholter Untersuchung nicht reproduziert werden, so daß wir diese als *pseudoklonal* gewertet haben. Die Tatsache, daß diese PCR-Resultate in wiederholten Untersuchungen eine unterschiedliche Bandengröße und Sequenz zeigen, läßt weniger an einen biologischen Prozess im Sinne einer Neoplasie denken. Vielmehr können die dominanten PCR-Amplifikate in Hautproben von Patienten mit Psoriasis und Ekzem durch die hohe Sensitivität der PCR-Technik erklärt werden, die auch wenige proliferierende reaktive T-Zellklone darstellen kann, möglicherweise im Rahmen einer T-Zellantwort auf ein bestimmtes Antigen. Als ein Ergebnis unserer Arbeiten ist daher die Reproduzierbarkeit der klonalen Amplifikate in verschiedenen, unabhängig durchgeführten Amplifikationen als Charakteristikum einer "echten" malignen T-Zellproliferation zu fordern.

### **3.3 Bedeutung der Klonalität in der Ausbreitungsdiagnostik**

Ist die Diagnose eines kutanen T-Zell-Lymphoms bei einem Patienten gestellt, so ist die nächste wichtige Frage das Stadium der Erkrankung, das für die Wahl sowie das Ansprechen der Therapie und damit letztendlich für das Überleben entscheidend ist. Voraussetzung dafür ist eine akkurate sowie individuell-angepasste Ausbreitungsdiagnostik. Ein Stadienwechsel wird in der Regel mit klinischen Mitteln erst spät entdeckt. Insbesondere der Nachweis des Befalls von Lymphknoten oder peripheren Blutes ist eine schwierige diagnostische Herausforderung. Mittels der TCR- $\gamma/\beta$ - PCR wurden hierzu in den letzten Jahren enorme Anstrengungen durchgeführt klonale T-Zell Populationen in den Rezirkulationsorganen zu detektieren.

Der *Lymphknotenbefall*, der erfahrungsgemäß als erste extrakutane Manifestation des kutanen T-Zell-Lymphoms gilt, stellt sowohl den Kliniker als auch den Histologen vor diagnostische Probleme. Vergrößerte Lymphknoten treten sowohl bei malignen Hauterkrankungen als auch bei ausgedehnten benignen entzündlichen Dermatosen auf. Sofern ein Antigen vorwiegend eine T-Zell-Reaktion hervorruft, bewirkt dies in den hautnahen Lymphknoten eine Verbreiterung des Parakortex und ggf. auch der interfollikulären Zonen<sup>134</sup>. Vermehrt sind nicht nur kleine T-Lymphozyten und T-Immunoblasten, sondern auch Antigen-präsentierende Zellen, wie die interdigitierenden Retikulumzellen, Makrophagen und Langerhans-Zellen, ebenso die sog. hochendothelialen Venolen. Histologisch entsprechen diese Veränderungen einer sog. „dermatopathischen Lymphadenopathie“, die eine Reaktion des Lymphknotens bei juckenden chronischen Hauterkrankungen verschiedenster Ursache (Ekzeme, Hautlymphome, atopischer Dermatitis u.a.) darstellt.<sup>135,136</sup> Typischerweise wird neben kutanen Antigenen auch Melanin in die Lymphknoten transportiert und in Makrophagen (Melanophagen) gespeichert. Bei der dermatopathischen Lymphadenopathie finden sich zusätzlich aktivierte T-Lymphozyten, die zytologisch ähnlich den atypischen malignen T-Zellen sein können. Diese können weder morphologisch noch immunhistologisch in ihrer Dignität sicher charakterisiert werden, insbesondere bei Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom kann bei einer dermatopathischen Lymphadenopathie eine frühe Lymphknoteninfiltration weder sicher diagnostiziert noch ausgeschlossen werden.<sup>137</sup>

Weiss et al.<sup>138</sup> konnten erstmals basierend auf der Southern-Blot-Hybridisierungstechnik zeigen, dass in dermatopathischen Lymphknoten von Patienten mit einem CTCL in der Mehrzahl der Fälle (7/9) eine monoklonale TCR- $\beta$ -Umlagerung nachweisbar ist. Diese Daten konnten durch nachfolgende Untersuchungen zum Teil unterstützt werden.<sup>139,140,141</sup> Allerdings konnten diese Studien in einigen Lymphknoten, die histologisch sicher einen Lymphombefall zeigten, keine klonale T-Zellpopulation mittels der Southern-Blot-Technik nachweisen. Möglicherweise ist hierfür die niedrige Sensitivität der Methode verantwortlich, die mindestens 5-10 % monoklonale T-Zellen in einem Gemisch polyklonaler T-Zellen benötigt. Wir konnten anhand einer größeren Fallzahl mittels TCR- $\beta$ - und TCR- $\gamma$ -PCR in Kombination mit der Genescan-Technik zeigen, dass sich eine klonale T-Zell Population in 50 % der klinisch vergrößerten und histologisch als dermatopathisch klassifizierten Lymphknoten eine klonale T-Zellpopulation nachweisen lässt. Darüber hinaus konnten wir erstmals anhand Größen- und Sequenzvergleich der PCR-Produkte zeigen, dass dieser T-Zell Klon identisch mit dem malignen T-Zell Klon in der korrespondierenden befallenen Hautläsion ist. Dies beweist, dass die klonale T-Zellpopulation des Lymphknotens eine Infiltration den Primärtumor, d.h. kutane Lymphom repräsentiert. Im Gegensatz dazu konnten in

dermatopathischen Lymphknoten bei Patienten mit chronischen entzündlichen Dermatosen keine klonale T-Zellpopulationen nachgewiesen werden.<sup>142</sup>

Zusammenfassend belegen die bisherigen Southern-Blot-Daten sowie insbesondere unsere Ergebnisse, dass die TCR- Klonalitätsanalysen eine wichtige Hilfe in der schwierigen Diagnostik bei suspektem Lymphknotenbefall durch ein kutanes T-Zell-Lymphom sind und dadurch ein akkurates Staging von Lymphompatienten ermöglichen.

### **3.4 Bedeutung der Klonalität im Hinblick auf die Prognose der Lymphomkrankheit**

Mit den heutigen molekularen Techniken, die eine hohe Sensitivität haben, lassen sich geringste Mengen von Tumorzellen in den verschiedenen Geweben wie Lymphknoten oder Blut nachweisen. So lassen sich auch bei Patienten mit initialen Stadien einer Mycosis fungoides wie z. B. im Patch-Stadium, (Stadium IA) mittels PCR-basierten Klonalitätsanalysen Tumorzellklone im Blut nachweisen. Darüber hinaus wissen wir aber aus mehreren klinischen Studien, dass Patienten im Stadium IA eine Überlebensrate ähnlich der Normalbevölkerung haben. Hieraus ergibt sich die Frage, ob das sensitive molekulare Staging eine klinische Bedeutung hat oder, ob der Nachweis von Tumorzellen in Blut oder Lymphknoten lediglich eine physiologische Rezirkulation zwischen Haut und Lymphknoten über den Lymph- oder Blutweg entspricht.

Wie zuvor erwähnt konnten mehrere Southern-Blot-basierte Studien als auch unsere TCR- $\beta$ - und TCR- $\gamma$ -PCR basierte Arbeiten zeigen, dass im *Lymphknoten* klonale T-Zellpopulationen sowohl in histologisch befallenen (80-100 %) als auch in dermatopathischen Lymphknoten (40-50%) nachgewiesen werden können. Die bisher publizierten Arbeiten, die die Klonalitätsergebnisse in Relation zum klinischen Verlauf setzten, zeigten, dass Patienten mit dermatopathischen Lymphknoten in denen sich eine Monoklonalität nachweisen ließ eine geringere Überlebensrate zeigten als die ohne Nachweis einer Klonalität.<sup>139,140,141</sup> Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Überlebensrate von Patienten mit Nachweis einer klonalen T-Zellpopulation in dermatopathischen Lymphknoten oder in histologisch nachweisbar befallenen Lymphknoten gibt.<sup>142</sup> Dieses deutet darauf hin, dass es in einigen dermatopathischen Lymphknoten eine geringe Zahl von Lymphomzellen gibt im Sinne einer weiteren Ausbreitung der Erkrankung und nicht als physiologische Rezirkulation.

Zusammengefaßt belegen die Daten der Lymphknotenuntersuchungen, dass die TCR-Klonalitätsanalysen ein wichtiges Hilfsmittel in der Differenzialdiagnostik einer benignen

dermatopathischen Lymphadenitis von einer frühen Lymphominfiltration sind und eine prognostische Bedeutung haben. Basierend auf diesen Daten werden daher Klonalitätsuntersuchungen im Lymphknoten in der neuen Klassifikation zur Stadienteilung der Mycosis fungoides und des Sézary Syndroms der International Society of Cutaneous Lymphoma berücksichtigt.<sup>143</sup>

#### 4 ZUSAMMENFASSENDE BETRACHTUNG UND PERSPEKTIVEN

Kutane T-Zell-Lymphome treten in verschiedenen klinischen und histologischen Erscheinungsformen auf, die ihre Abgrenzung von nicht-malignen T-Zell-Lymphoproliferationen häufig schwierig macht. Der Nachweis klonaler T-Zellrezeptor-Umlagerungen bietet für diese Unterscheidung eine wichtige Hilfestellung, da T-Zell-Lymphome sich durch eine klonale T-Zellpopulation mit identischen T-Zellrezeptor-Umlagerungen auszeichnen.

Zum besseren Verständnis der bisherigen Daten haben wurden initial Klonalitätsuntersuchungen bei klinisch und histologisch eindeutig definierte Mycosis fungoides-Fällen fortgeschrittener Stadien durchgeführt. Dabei wurden Hautmanifestationen sowohl mit einer TCR- $\beta$  als auch TCR- $\gamma$  –PCR und analysierten die Amplifikate mit der Genescan-Technik bzw. DNA-Sequenzierung untersucht. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse, zeigen, dass die Mycosis fungoides in diesen Stadien in der Regel eine klonale Erkrankung ist. In manchen Fällen wird jedoch keine T-Zellklonalität gefunden. Hier konnten wir zeigen, dass dies eher ein methodisches Problem ist. Wir definierten erstmals die Pseudomonoklonalität, die gerade häufiger in Hautproben mit geringem Anteil reaktiver T-Zellen gefunden wird, aber im Gegensatz zu den „echten kutanen T-Zell-Lymphomen“ nicht reproduzierbar ist. Basierend auf diesen Erkenntnissen untersuchten wir Frühformen der Mycosis fungoides. Hier konnten wir eine klonale T-Zellpopulation in 66,7 % der Fälle in der Haut und nur in 26 % im peripheren Blut nachweisen. Diese Daten unterstützen das pathogenetische Konzept, dass sich wahrscheinlich in der Frühphase der Mycosis fungoides häufig noch keine klonale Dominanz ausgeprägt, bzw. ein Tumorzellklon selektioniert wurde.

Des Weiteren wurde der Nachweis der T-Zell-Klonalität auf Einzell-Ebene zur Charakterisierung von Lymphomen, die aus wenigen Tumorzellen bestehen und daher in der konventionellen PCR häufig nicht detektiert werden, eingesetzt. Die Untersuchungen der Lymphomatoiden Papulose und des Morbus Hodgkin mittels Einzell-PCR zeigen erstmals, dass beide Lymphoproliferationen eine monoklonale Erkrankung sind, wobei die Klonalität in beiden Erkrankungen den CD30-positiven Zellen entstammen und damit Tumorzellen repräsentieren. Darüber hinaus konnten wir erstmals die Existenz eines Morbus Hodgkin mit T-Zellabstammung beweisen.

Schließlich wurde die Bedeutung von T-Zell-Klonalitätsuntersuchungen in der Ausbreitungsdiagnostik von Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom analysiert. Hier konnten wir erstmals an einem größeren Kollektiv zeigen, dass basierend auf der TCR- $\beta$  und TCR- $\gamma$  PCR in Kombination mit der Genescan-Analyse, Klonalitätsuntersuchungen im Lymphknoten sowohl einen diagnostischen als auch prognostischen Wert haben. Insbesondere helfen hier die

Genumlagerungsanalysen bei der Unterscheidung einer reaktiven Lymphadenitis von einer frühen Lymphominfiltration.

In der Gesamtheit tragen die durchgeführten Experimente zum Verständnis der Klonalität bei kutanen T-Zell-Lymphomen bei, das eine Voraussetzung für die Interpretation der Klonalitätsergebnisse in der schwierigen Diagnostik von kutanen Lymphomen ist.

Perspektivisch gilt es zunächst die Techniken der Klonalitätsanalysen in den Laboren zu standardisieren um für die Diagnostik und die Ausbreitungsuntersuchungen vergleichbare Ausgangsbedingungen und schließlich Daten zu haben. Hierzu hat sich bereits eine europäische Projektgruppe ausgebildet (BIOMED-2 concerted action)<sup>144</sup> das sich mit der Entwicklung neuer Primer für alle T-Zellrezeptor- und Immunglobulingene befasst. Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe sind bisher vielversprechend.<sup>145</sup>

Basierend auf diesen standardisierten Primern wird es u.a. Ziel sein eine Quantifizierung von Tumorzellen durchzuführen (z.B. mittels Real-time PCR), die als Biomarker zur Induktion und Fortführung einer Therapie dienen könnte.

## 5 Literatur

---

- <sup>1</sup> Weinstock MA: Epidemiology of mycosis fungoides. *Semin Dermatol* 1994; 13: 154-159.
- <sup>2</sup> Weinstock MA, Horm JW: Mycosis fungoides in the United States. Increasing incidence and descriptive epidemiology. *JAMA* 1988; 260: 42-6.
- <sup>3</sup> Assaf C, Gellrich S, Steinhoff M, Nashan D, Weiße F, Dippel E, Coors E, Stein A, Golling P, Henke U, Adam-Murati S, Koch A, Klemke CD, Stadler R, Sterry W. Kutane Lymphome in Deutschland. Eine Analyse des Zentralregisters „Kutane Lymphome der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG)“. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2007, in press
- <sup>4</sup> Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 7415-9.
- <sup>5</sup> Hall WW, Liu CR, Schneewind O, Takahashi H, Kaplan MH, Roupe G, Vahlne A. Deleted HTLV-I provirus in blood and cutaneous lesions of patients with mycosis fungoides. *Science* 1991; 253: 317-20.
- <sup>6</sup> Jackow CM, Cather JC, Hearne V, Asano AT, Musser JM, Duvic M. Association of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma, superantigen-positive *Staphylococcus aureus*, and oligoclonal T-cell receptor V beta gene expansion. *Blood* 1997; 89: 32-40.
- <sup>7</sup> Linnemann T, Gellrich S, Lukowsky A, Mielke A, Audring H, Sterry W, Walden P. Polyclonal expansion of T cells with the TCR V beta type of the tumour cell in lesions of cutaneous T-cell lymphoma: evidence for possible superantigen involvement. *Br J Dermatol* 2004;150: 1013-7.
- <sup>8</sup> Baykal C, Bueyuekbabani N, Kaymaz R: Familial Mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 2002; 146: 1108-1110.
- <sup>9</sup> Rajka G, Winkelmann RK. Atopic dermatitis and Sezary syndrome. *Arch Dermatol* 1984; 120: 83-4.
- <sup>10</sup> Kikuchi A, Nishikawa T, Ikeda Y, Yamaguchi K. Absence of human T-lymphotropic virus type I in Japanese patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 1997; 89: 1529-32.
- <sup>11</sup> Wood GS, Schaffer JM, Boni R, Dummer R, Burg G, Takeshita M, Kikuchi M. No evidence of HTLV-I proviral integration in lymphoproliferative disorders associated with cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Pathol* 1997; 150: 667-73.
- <sup>12</sup> Burg G, Dummer R, Haeffner A, Kempf W, Kadin M. From inflammation to neoplasia: mycosis fungoides evolves from reactive inflammatory conditions (lymphoid infiltrates) transforming into neoplastic plaques and tumors. *Arch Dermatol* 2001; 137: 949-52.
- <sup>13</sup> Mehrany K, El-Azhary RA, Bouwhuis SA, Pittelkow MR. Cutaneous T-cell lymphoma and atopy: is there an association? *Br J Dermatol* 2003; 149: 1013-7.
- <sup>14</sup> Kim EJ, Hess S, Richardson SK, Newton S, Showe LC, Benoit BM, Ubriani R, Vittorio CC, Junkins-Hopkins JM, Wysocka M, Rook AH. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest* 2005; 115:798-12.

- 
- <sup>15</sup> Jalkanen S, Saari S, Kalimo H, Lammintausta K, Vainio E, Leino R, Duijvestijn AM, Kalimo K. Lymphocyte migration into the skin: the role of lymphocyte homing receptor (CD44) and endothelial cell antigen (HECA-452). *J Invest Dermatol* 1990; 94: 786-92.
- <sup>16</sup> Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Rottman J, Qin S, Ponath P, Andrew DP, Warnke R, Ruffing N, Kassam N, Wu L, Butcher EC. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* 1999; 400: 776-80.
- <sup>17</sup> Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D, Kupper TS. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature* 1997; 389: 978-81.
- <sup>18</sup> Kakinuma T, Sugaya M, Nakamura K, Kaneko F, Wakugawa M, Matsushima K, Tamaki K. Thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) in mycosis fungoides: serum TARC levels reflect the disease activity of mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48: 23-30.
- <sup>19</sup> Tensen CP, Vermeer MH, van der Stoop PM, van Beek P, Scheper RJ, Boorsma DM, Willemze R. Epidermal interferon-gamma inducible protein-10 (IP-10) and monokine induced by gamma-interferon (Mig) but not IL-8 mRNA expression is associated with epidermotropism in cutaneous T cell lymphomas. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 222-6.
- <sup>20</sup> Qin JZ, Dummer R, Burg G, Dobbeling U. Constitutive and interleukin-7/interleukin-15 stimulated DNA binding of Myc, Jun, and novel Myc-like proteins in cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood* 1999; 93: 260-7.
- <sup>21</sup> Qin JZ, Zhang CL, Kamarashev J, Dummer R, Burg G, Dobbeling U. Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myc genes in cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood* 2001; 98: 2778-83.
- <sup>22</sup> Foss FM, Koc Y, Stetler-Stevenson MA, Nguyen DT, O'Brien MC, Turner R, Sausville EA. Costimulation of cutaneous T-cell lymphoma cells by interleukin-7 and interleukin-2: potential autocrine or paracrine effectors in the Sezary syndrome. *J Clin Oncol* 1994; 12: 326-35.
- <sup>23</sup> Asadullah K, Docke WD, Haeussler A, Sterry W, Volk HD. Progression of mycosis fungoides is associated with increasing cutaneous expression of interleukin-10 mRNA. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 833-7.
- <sup>24</sup> Kallinich T, Mucic JM, Qin S, Sterry W, Audring H, Kroczeck RA. Chemokine receptor expression on neoplastic and reactive T cells in the skin at different stages of mycosis fungoides. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 1045-52.
- <sup>25</sup> Schechner JS, Edelson RL, McNiff JM, Heald PW, Pober JS. Integrins alpha4beta7 and alphaEbeta7 are expressed on epidermotropic T cells in cutaneous T cell lymphoma and spongiotic dermatitis. *Lab Invest* 1999; 79: 601-7.

- 
- <sup>26</sup> Kari L, Loboda A, Nebozhyn M, Rook AH, Vonderheid EC, Nichols C, Virok D, Chang C, Horng WH, Johnston J, Wysocka M, Showe MK, Showe LC. Classification and prediction of survival in patients with the leukemic phase of cutaneous T cell lymphoma. *J Exp Med* 2003; 197: 1477-88.
- <sup>27</sup> Dummer R, Heald PW, Nestle FO, Ludwig E, Laine E, Hemmi S, Burg G. Sezary syndrome T-cell clones display T-helper 2 cytokines and express the accessory factor-1 (interferon-gamma receptor beta-chain). *Blood* 1996; 88: 1383-9.
- <sup>28</sup> Saed G, Fivenson DP, Naidu Y, Nickoloff BJ. Mycosis fungoides exhibits a Th1-type cell-mediated cytokine profile whereas Sezary syndrome expresses a Th2-type profile. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 29-33.
- <sup>29</sup> Bagot M, Nikolova M, Schirm-Chabanette F, Wechsler J, Boumsell L, Bensussan A. Crosstalk between tumor T lymphocytes and reactive T lymphocytes in cutaneous T cell lymphomas. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 941: 31-8.
- <sup>30</sup> Vonderheid EC, Zhang Q, Lessin SR, Polansky M, Abrams JT, Bigler RD, Wasik MA. Use of serum soluble interleukin-2 receptor levels to monitor the progression of cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38: 207-20.
- <sup>31</sup> Fischer TC, Gellrich S, Muche JM, Sherev T, Audring H, Neitzel H, Walden P, Sterry W, Tonnie H. Genomic aberrations and survival in cutaneous T cell lymphomas. *J Invest Dermatol*. 2004;122:579-86.
- <sup>32</sup> Karenko L, Hahtola S, Paivinen S, Karhu R, Syrja S, Kahkonen M, Nedoszytko B, Kytola S, Zhou Y, Blazevic V, Pesonen M, Nevala H, Nupponen N, Sihto H, Krebs I, Poustka A, Roszkiewicz J, Saksela K, Peterson P, Visakorpi T, Ranki A. Primary cutaneous T-cell lymphomas show a deletion or translocation affecting NAV3, the human UNC-53 homologue. *Cancer Res*. 2005;65:8101-10.
- <sup>33</sup> Assaf C, Sanchez JAA, Lukowsky A, Kölbl K, Fischer T, Amerio P, Sterry W, Walden P. Lack of microsatellite instability and subclone diversification in the pathogenesis and progression of mycosis fungoides. *J Invest Dermatol*, 2007 , 127: 1752-1761.
- <sup>34</sup> Nevala H, Karenko L, Vakeva L, Ranki A. Proapoptotic and antiapoptotic markers in cutaneous T-cell lymphoma skin infiltrates and lymphomatoid papulosis. *Br J Dermatol*. 2001;145:928-37.
- <sup>35</sup> Dereure O, Levi E, Vonderheid EC, Kadin ME. Infrequent Fas mutations but no Bax or p53 mutations in early mycosis fungoides: a possible mechanism for the accumulation of malignant T lymphocytes in the skin. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 949-56.
- <sup>36</sup> van Doorn R, Dijkman R, Vermeer MH, Starink TM, Willemze R, Tensen CP. A novel splice variant of the Fas gene in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Res* 2002; 62: 5389-92.
- <sup>37</sup> Braun F, Fecker L, Schwarz C, Walden P, Assaf C, Dürkop H, Sterry W, Eberle E. Inhibition of death receptor-mediated pathways early in the signaling cascade coincide with pronounced apoptosis resistance in cutaneous T-cell lymphoma cells. *J Invest Dermatol*, 2007, May 10; [Epub ahead of print]

- 
- <sup>38</sup> Ni X, Hazarika P, Zhang C, Talpur R, Duvic M. Fas ligand expression by neoplastic T lymphocytes mediates elimination of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in mycosis fungoides: a potential mechanism of tumor immune escape? *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2682-92.
- <sup>39</sup> Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, Ralfkiaer E, Chimenti S, Diaz-Perez JL, Duncan LM, Grange F, Harris NL, Kempf W, Kerl H, Kurrer M, Knobler R, Pimpinelli N, Sander C, Santucci M, Sterry W, Vermeer MH, Wechsler J, Whittaker S, Meijer CJ. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 2005 ;105:3768-85.
- <sup>40</sup> Willemze R, Kerl H, Sterry W, Berti E, Cerroni L, Chimenti S, Diaz-Perez JL, Geerts ML, Goos M, Knobler R, Ralfkiaer E, Santucci M, Smith N, Wechsler J, van Vloten WA, Meijer CJ. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood* 1997; 90: 354-71.
- <sup>41</sup> Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. (eds) (2001). World Health Organization Classification of Tumors, Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon.
- <sup>42</sup> Assaf C, Steinhoff M, Gellrich S, Sterry W. Classification of cutaneous lymphomas. *Front Radiat Ther Oncol*. 2006; 39: 25-37.
- <sup>43</sup> Alibert JLM: Description des maladies de la peau observees a l'HospitalSt Louis, paris, France, Barrois Láine et Fils : 1806; 413-446.
- <sup>44</sup> Bazin PAE: Maldiies de la peau Observees a l'HospitalSt Louis, Paris, France; 1876
- <sup>45</sup> Vonderheid EC, Bernengo MG, Burg G, Duvic M, Heald P, Laroche L, Olsen E, Pittelkow M, Russell-Jones R, Takigawa M, Willemze R; ISCL Update on erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: report of the International Society for Cutaneous Lymphomas. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46: 95-106.
- <sup>46</sup> Stein H, Mason DY, Gerdes J, O'Connor N, Wainscoat J, Pallesen G, Gatter K, Falini B, Delsol G, Lemke H, et al. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 1985; 66: 848-58.
- <sup>47</sup> Dupont A. Langsam verlaufende und klinisch gutartige Retikulopathie mit höchst maligner histologischer Struktur. *Hautarzt* 1965; 16: 284-286.
- <sup>48</sup> Macaulay W L. Lymphomatoid papulosis. A continuing self-healing eruption, clinically benign--histologically malignant. *Arch Dermatol* 1968; 97: 23-30.
- <sup>49</sup> Glusac EJ. Criterion by criterion, mycosis fungoides. *Am J Dermatopathol* 2003; 25: 264-9.
- <sup>50</sup> Smoller BR, Bishop K, Glusac E, Kim YH, Hendrickson M. Reassessment of histologic parameters in the diagnosis of mycosis fungoides. *Am J Surg Pathol* 1995; 19: 1423-30.

- 
- <sup>51</sup> Santucci M, Biggeri A, Feller AC, Burg G. Accuracy, concordance, and reproducibility of histologic diagnosis in cutaneous T-cell lymphoma: an EORTC Cutaneous Lymphoma Project Group Study. European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Arch Dermatol* 2000; 136: 497-502.
- <sup>52</sup> Pimpinelli N, Olsen EA, Santucci M, Vonderheid E, Haeffner AC, Stevens S, Burg G, Cerroni L, Dreno B, Glusac E, Guitart J, Heald PW, Kempf W, Knobler R, Lessin S, Sander C, Smoller BS, Telang G, Whittaker S, Iwatsuki K, Obitz E, Takigawa M, Turner ML, Wood GS; International Society for Cutaneous Lymphoma. Defining early mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53:1053-63.
- <sup>53</sup> Massone C, Kodama K, Kerl H, Cerroni L. Histopathologic features of early (patch) lesions of mycosis fungoides: a morphologic study on 745 biopsy specimens from 427 patients. *Am J Surg Pathol*. 2005;29:550-60.
- <sup>54</sup> Balfour EM, Glusac EJ, Heald P, Talley LL, Smoller BR. Sezary syndrome: cutaneous immunoperoxidase double-labeling technique demonstrates CD4/CD8 ratio non-specificity. *J Cutan Pathol* 2003; 30: 437-42.
- <sup>55</sup> Kamarashev J, Burg G, Kempf W, Hess Schmid M, Dummer R. Comparative analysis of histological and immunohistological features in mycosis fungoides and Sezary syndrome. *J Cutan Pathol* 1998; 25: 407-12.
- <sup>56</sup> Berti E, Tomasini D, Vermeer MH, Meijer CJ, Alessi E, Willemze R. Primary cutaneous CD8-positive epidermotropic cytotoxic T cell lymphomas. A distinct clinicopathological entity with an aggressive clinical behavior. *Am J Pathol* 1999; 155: 483-92.
- <sup>57</sup> Agnarsson BA, Vonderheid EC, Kadin ME. Cutaneous T cell lymphoma with suppressor/cytotoxic (CD8) phenotype: identification of rapidly progressive and chronic subtypes. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22: 569-77.
- <sup>58</sup> Wood GS, Hardman DL, Boni R, Dummer R, Kim YH, Smoller BR, Takeshita M, Kikuchi M, Burg G. Lack of the t(2;5) or other mutations resulting in expression of anaplastic lymphoma kinase catalytic domain in CD30+ primary cutaneous lymphoproliferative disorders and Hodgkin's disease. *Blood* 1996; 88: 1765-70.
- <sup>59</sup> Assaf C, Hirsch B, Wagner F, Lucka L, Grünbaum M, Gellrich S, Lukowsky A, Sterry W, Stein H, Dürkop H. Differential expression of TRAF1 aids in the distinction of cutaneous CD30-positive lymphoproliferations. *J Invest Dermatol*, 2007 . Mar 29; [Epub ahead of print]
- <sup>60</sup> Willemze R, Meyer CJ, Van Vloten WA, Scheffer E. The clinical and histological spectrum of lymphomatoid papulosis. *Br J Dermatol* 1982; 107: 131-44.
- <sup>61</sup> Kadin M, Nasu K, Sako D, Said J, Vonderheid E. Lymphomatoid papulosis. A cutaneous proliferation of activated helper T cells expressing Hodgkin's disease-associated antigens. *Am J Pathol* 1985; 119: 315-25.
- <sup>62</sup> Kaudewitz P, Stein H, Burg G, Mason DY, Braun-Falco O. Atypical cells in lymphomatoid papulosis express the Hodgkin cell-associated antigen Ki-1. *J Invest Dermatol* 1986; 86: 350-4.

- 
- <sup>63</sup> El Shabrawi-Caelen L, Kerl H, Cerroni L. Lymphomatoid papulosis: reappraisal of clinicopathologic presentation and classification into subtypes A, B, and C. *Arch Dermatol*. 2004; 140: 441-7.
- <sup>64</sup> Alt FW, Oltz EM, Young F, Gorman J, Taccioli G, Chen J. VDJ recombination. *Immunol Today* 1992; 13: 306-14.
- <sup>65</sup> Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 1990; 248: 1517-23.
- <sup>66</sup> Notarangelo LD, Santagata S, Villa A. Recombinase activating gene enzymes of lymphocytes. *Curr Opin Hematol* 2001; 8: 41-6.
- <sup>67</sup> Southern, EM. Detection of specific sequences among fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-517.
- <sup>68</sup> Weiss LM, Hu E, Wood GS, Moulds C, Cleary ML, Warnke R, Sklar J. Clonal rearrangements of T-cell receptor genes in mycosis fungoides and dermatopathic lymphadenopathy. *N Engl J Med* 1985; 313: 539-44.
- <sup>69</sup> Weiss LM, Wood GS, Hu E, Abel EA, Hoppe RT, Sklar J. Detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in the peripheral blood of patients with mycosis fungoides/Sezary syndrome. *J Invest Dermatol* 1989; 92: 601-4.
- <sup>70</sup> Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNS in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-50.
- <sup>71</sup> Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNS with a thermostable DNS polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
- <sup>72</sup> Chien YH, Iwashima M, Kaplan KB, Elliot JF, Davis MM: A new T-cell receptor gene located within the a locus and expressed early in T-cell differentiation. *Nature* 1987; 327: 677-682.
- <sup>73</sup> Hayday AC, Saito H, Gillies SD, Kranz DM, Tanigawa G, Eisen HN, Tonegawa S. Structure, organization, and somatic rearrangement of T cell gamma genes. *Cell* 1985; 40: 259-69.
- <sup>74</sup> Rowen L, Koop BF, Hood L: The complete 685-kilobase DNS sequence of the human beta T-cell receptor locus. *Science* 1996; 272: 1755-1762.
- <sup>75</sup> Bourguin A, Tung R, Galili N, Sklar J: Rapid, nonradioactive detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in lymphoid neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8536-8540.
- <sup>76</sup> Trainor K, Brisco M, Wan J, Neoh S, Grist S, Morley A: Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by polymerase chain reaction. *Blood* 1991; 78: 192-196.
- <sup>77</sup> Bottaro M, Berti E, Biondi A, Migone N, Crosti L: Heteroduplex analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 1994; 83: 3271-3278.

- 
- <sup>78</sup> Wood GS, Tung RM, Haeffner AC, Crooks CF, Liao S, Orozco R, Veelken H, Kadin ME, Koh H, Heald P, Barnhill RL, Sklar J: Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements in early Mycosis fungoides/sézary syndrome by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE). *J Invest Dermatol* 1994; 103: 34-41.
- <sup>79</sup> Kneba M, Bolz I, Linke B, Bertram J, Rothaupt D, Hiddemann W: Characterization of clone-specific rearrangement T-cell receptor gamma-chain genes in lymphomas and leukemias by the polymerase chain reaction and DNS sequencing. *Blood* 1994; 84: 574-581.
- <sup>80</sup> Theodorou I, Delfau Larue MH, Bigorgne C, Lahet C, Cochet G, Bagot M, Wechsler J, Farcet JP: Cutaneous T-cell infiltrates: Analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangement by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Blood* 1995; 86: 305-310.
- <sup>81</sup> Greiner TC, Raffeld M, Lutz C, Dick F, Jaffe ES: Analysis of T-cell receptor-gamma gene rearrangements by denaturing gradient gel electrophoresis of GC-clamped polymerase chain reaction products. Correlation with tumor-specific sequences. *Am J Pathol* 1995; 146: 46-55.
- <sup>82</sup> Bunn PA Jr, Lamberg SI. Report of the Committee on Staging and Classification of Cutaneous T-Cell Lymphomas. *Cancer Treat Rep* 1979; 63: 725-8.
- <sup>83</sup> Kaye FJ, Bunn PA Jr, Steinberg SM, Stocker JL, Ihde DC, Fischmann AB, Glatstein EJ, Schechter GP, Phelps RM, Foss FM, et al. A randomized trial comparing combination electron-beam radiation and chemotherapy with topical therapy in the initial treatment of mycosis fungoides. *N Engl J Med* 1989; 321: 1784-90.
- <sup>84</sup> Jones GW, Kacinski BM, Wilson LD, Willemze R, Spittle M, Hohenberg G, Handl-Zeller L, Trautinger F, Knobler R. Total skin electron radiation in the management of mycosis fungoides: Consensus of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Cutaneous Lymphoma Project Group. *J Am Acad Dermatol* 2002; 47: 364-70.
- <sup>85</sup> Vonderheid EC, Tan ET, Kantor AF, Shrager L, Micaily B, Van Scott EJ. Long-term efficacy, curative potential, and carcinogenicity of topical mechlorethamine chemotherapy in cutaneous T cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* 1989; 20: 416-28.
- <sup>86</sup> Zackeim HS, Epstein EH Jr, Crain WR. Topical carmustine (BCNU) for cutaneous T cell lymphoma: a 15-year experience in 143 patients. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22: 802-10.
- <sup>87</sup> Stadler R, Otte HG, Luger T, Henz BM, Kuhl P, Zwingers T, Sterry W. Prospective randomized multicenter clinical trial on the use of interferon -2a plus acitretin versus interferon -2a plus PUVA in patients with cutaneous T-cell lymphoma stages I and II. *Blood* 1998; 92: 3578-81.
- <sup>88</sup> Duvic M, Hymes K, Heald P, Breneman D, Martin AG, Myskowski P, Crowley C, Yocum RC; Bexarotene Worldwide Study Group. Bexarotene is effective and safe for treatment of refractory advanced-stage cutaneous T-cell lymphoma: multinational phase II-III trial results. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2456-71.
- <sup>89</sup> Assaf C, Bagot M, Dummer R, Duvic M, Gniadecki R, Knobler R, Ranki A, Schwandt P, Whittaker S. Minimising Adverse Side Effects of Oral Bexarotene in Cutaneous T-Cell Lymphoma: an Expert Opinion. *Brit J Dermatol*. 2006, 155:261-266.

- 
- <sup>90</sup> McGinnis KS, Junkins-Hopkins JM, Crawford G, Shapiro M, Rook AH, Vittorio CC. Low-dose oral bexarotene in combination with low-dose interferon alfa in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma: Clinical synergism and possible immunologic mechanisms. *J Am Acad Dermatol* 2004; 50: 375-9.
- <sup>91</sup> Edelson R, Berger C, Gasparro F, et al. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. Preliminary results. *N Engl J Med* 1987; 316: 297-303.
- <sup>92</sup> Gollnick HP, Owsianowski M, Ramaker J, Chun SC, Orfanos CE. Extracorporeal photopheresis--a new approach for the treatment of cutaneous T cell lymphomas. *Recent Results Cancer Res* 1995; 139: 409-15.
- <sup>93</sup> Wollina U, Dummer R, Brockmeyer NH, Konrad H, Busch JO, Kaatz M, Knopf B, Koch HJ, Hauschild A. Multicenter study of pegylated liposomal doxorubicin in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer* 2003; 98: 993-1001.
- <sup>94</sup> Zinzani PL, Baliva G, Magagnoli M, Bendandi M, Modugno G, Gherlinzoni F, Orcioni GF, Ascani S, Simoni R, Pileri SA, Tura S. Gemcitabine treatment in pretreated cutaneous T-cell lymphoma: experience in 44 patients. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2603-6.
- <sup>95</sup> Olsen E, Duvic M, Frankel A, Kim Y, Martin A, Vonderheid E, Jegasothy B, Wood G, Gordon M, Heald P, Oseroff A, Pinter-Brown L, Bowen G, Kuzel T, Fivenson D, Foss F, Glode M, Molina A, Knobler E, Stewart S, Cooper K, Stevens S, Craig F, Reuben J, Bacha P, Nichols J. Pivotal phase III trial of two dose levels of denileukin diftitox for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2001; 19:376-88.
- <sup>96</sup> Assaf C. Denileukin diftitox therapy for refractory Mycosis fungoides. *Clin Dermatol*. 2007, in press.
- <sup>97</sup> Hoppe RT, Wood GS, Abel EA. Mycosis fungoides and the Sézary syndrome: pathology, staging, and treatment. *Curr Probl Cancer* 1990; 14: 293-371.
- <sup>98</sup> Diamandidou, E., Cohen, PR., Kurzrock, R. (1996) Mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Blood* 88: 2385-409.
- <sup>99</sup> Zackheim, HS., Amin, S., Kashani-Sabet, M., McMillan, A. Prognosis in cutaneous T-cell lymphoma by skin stage: long-term survival in 489 patients. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: 418-25.
- <sup>100</sup> Diamandidou, E., Colome, M., Fayad, L., Duvic, M., Kurzrock, R. Prognostic factor analysis in mycosis fungoides/Sézary syndrome. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: 914-24.
- <sup>101</sup> De Coninck, EC., Kim, YH., Varghese, A., Hoppe, TR. Clinical characteristics and outcome of patients with extracutaneous mycosis fungoides. *J Clin Oncol* 2001; 19: 779-784.
- <sup>102</sup> Kohler S, Kim YH, Smoller BR. Histologic criteria for the diagnosis of erythrodermic mycosis fungoides and Sezary syndrome: a critical reappraisal. *J Cutan Pathol* 1997; 24: 292-7.
- <sup>103</sup> Smoller BR. *Pathol Case Rev* 1996; 1: 158-62.

- 
- <sup>104</sup> Trotter MJ, Whittaker SJ, Orchard GE, Smith NP. Cutaneous histopathology of Sézary syndrome: a study of 41 cases with a proven circulating T-cell clone. *J Cutan Pathol* 1997; 24: 286-91.
- <sup>105</sup> Olerud JE, Kulin PA, Chew DE, Carlsen RA, Hammar SP, Weir TW, Patterson SD, Bolen JW, Kadin ME, Barker E, et al. Cutaneous T-cell lymphoma. Evaluation of pretreatment skin biopsy specimens by a panel of pathologists. *Arch Dermatol* 1992; 128: 501-7.
- <sup>106</sup> Dippel E, Assaf C, Hummel M, Schrag HJ, Stein H, Goerdts S, Orfanos CE. Clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan analysis in advanced cutaneous T-cell lymphoma: a critical evaluation. *J Pathol.* 1999; 188:146-54.
- <sup>107</sup> Assaf C, Hummel M, Dippel E, Goerdts S, Muller HH, Anagnostopoulos I, Orfanos CE, Stein H. High detection rate of T-cell receptor beta chain rearrangements in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction in combination with the GeneScan technique and DNA sequencing. *Blood.* 2000; 96: 640-6.
- <sup>108</sup> Harris NL, Stein H, Coupland SE, Hummel M, Favera RD, Pasqualucci L, Chan WC. New approaches to lymphoma diagnosis. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2001;:194-220.
- <sup>109</sup> Scheller U, Mucche JM, Sterry W, Lukowsky A. Detection of clonal T cells in cutaneous T cell lymphoma by polymerase chain reaction: comparison of mutation detection enhancement-polyacrylamide gel electrophoresis, temperature gradient gel electrophoresis and fragment analysis of sequencing gels. *Electrophoresis* 1998; 19: 653-8.
- <sup>110</sup> Klemke CD, Dippel E, Dembinski A, Ponitz N, Assaf C, Hummel M, Stein H, Goerdts S. Clonal T cell receptor gamma-chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan analysis in the skin and blood of patients with parapsoriasis and early-stage mycosis fungoides. *J Pathol.* 2002; 197:348-54.
- <sup>111</sup> Bergman R. How useful are T-cell receptor gene rearrangement studies as an adjunct to the histopathologic diagnosis of mycosis fungoides? *Am J Dermatopathol.* 1999;21:498-502.
- <sup>112</sup> Burg G, Dummer R, Haeffner A, Kempf W, Kadin M. From inflammation to neoplasia: mycosis fungoides evolves from reactive inflammatory conditions (lymphoid infiltrates) transforming into neoplastic plaques and tumors. *Arch Dermatol.* 2001 Jul;137(7):949-52.
- <sup>113</sup> Willemze R, Meyer CJ, Van Vloten WA, Scheffer E. The clinical and histological spectrum of lymphomatoid papulosis. *Br J Dermatol* 1982; 107: 131-44.
- <sup>114</sup> Kaudewitz P, Stein H, Plewig G, Schwarting R, Gerdes J, Burg G, Kind P, Eckert F, Braun-Falco O. Hodgkin's disease followed by lymphomatoid papulosis. Immunophenotypic evidence for a close relationship between lymphomatoid papulosis and Hodgkin's disease. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22: 999-1006.
- <sup>115</sup> Bekkenk MW, Geelen FA, van Voorst Vader PC, Heule F, Geerts ML, van Vloten WA, Meijer CJ, Willemze R. Primary and secondary cutaneous CD30(+) lymphoproliferative disorders: a report from the Dutch Cutaneous Lymphoma Group on the long-term follow-up data of 219 patients and guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 2000; 95: 3653-61.

- 
- <sup>116</sup> Weiss LM, Wood GS, Trela M, Warnke RA, Sklar J. Clonal T-cell populations in lymphomatoid papulosis. Evidence of a lymphoproliferative origin for a clinically benign disease. *N Engl J Med* 1986; 315: 475-9.
- <sup>117</sup> Kadin ME, Vonderheid EC, Sako D, Clayton LK, Olbricht S. Clonal composition of T cells in lymphomatoid papulosis. *Am J Pathol* 1987; 126: 13-7.
- <sup>118</sup> Whittaker S, Smith N, Jones RR, Luzzatto L. Analysis of beta, gamma, and delta T-cell receptor genes in lymphomatoid papulosis: cellular basis of two distinct histologic subsets. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 786-91.
- <sup>119</sup> El-Azhary RA, Gibson LE, Kurtin PJ, Pittelkow MR, Muller SA. Lymphomatoid papulosis: a clinical and histopathologic review of 53 cases with leukocyte immunophenotyping, DNA flow cytometry, and T-cell receptor gene rearrangement studies. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30: 210-8.
- <sup>120</sup> Wood GS, Crooks CF, Uluer AZ. Lymphomatoid papulosis and associated cutaneous lymphoproliferative disorders exhibit a common clonal origin. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 51-5.
- <sup>121</sup> Chott A, Vonderheid EC, Olbricht S, Miao NN, Balk SP, Kadin ME. The dominant T cell clone is present in multiple regressing skin lesions and associated T cell lymphomas of patients with lymphomatoid papulosis. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 696-700.
- <sup>122</sup> Davis TH, Morton CC, Miller-Cassman R, Balk SP, Kadin ME. Hodgkin's disease, lymphomatoid papulosis, and cutaneous T-cell lymphoma derived from a common T-cell clone. *N Engl J Med* 1992; 326: 1115-22.
- <sup>123</sup> Basarab T, Fraser-Andrews EA, Orchard G, Whittaker S, Russel-Jones R. Lymphomatoid papulosis in association with mycosis fungoides: a study of 15 cases. *Br J Dermatol* 1998; 139: 630-8.
- <sup>124</sup> Schiemann WP, Pfeifer WM, Levi E, Kadin ME, Lodish HF. A deletion in the gene for transforming growth factor beta type I receptor abolishes growth regulation by transforming growth factor beta in a cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 1999; 94: 2854-61.
- <sup>125</sup> Levi E, Wang Z, Petrogiannis-Halioitis T, Pfeifer WM, Kempf W, Drews R, Kadin ME. Distinct effects of CD30 and Fas signaling in cutaneous anaplastic lymphomas: a possible mechanism for disease progression. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 1034-40.
- <sup>126</sup> Mori M, Manuelli C, Pimpinelli N, Mavilia C, Maggi E, Santucci M, Bianchi B, Cappugi P, Giannotti B, Kadin ME. CD30-CD30 ligand interaction in primary cutaneous CD30(+) T-cell lymphomas: A clue to the pathophysiology of clinical regression. *Blood* 1999; 94: 3077-83.
- <sup>127</sup> Gniadecki R, Lukowsky A, Rossen K, Madsen HO, Thomsen K, Wulf HC. Bone marrow precursor of extranodal T-cell lymphoma. *Blood* 2003; 102: 3797-9.
- <sup>128</sup> Avet-Loiseau H, Facon T, Daviet A, Godon C, Rapp MJ, Harousseau JL, Grosbois B, Bataille R. 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. *Intergroupe Francophone du Myelome. Cancer Res* 1999; 59: 4546-50.

- 
- <sup>129</sup> Schiller PI, Flaig MJ, Puchta U, Kind P, Sander CA. Detection of clonal T cells in lichen planus. *Arch Dermatol Res* 2000; 292: 568-9.
- <sup>130</sup> Staib G, Sterry W. Use of polymerase chain reaction in the detection of clones in lymphoproliferative diseases of the skin. *Recent Results Cancer Res* 1995; 139: 239-47.
- <sup>131</sup> Theodorou I, Delfau-Larue MH, Bigorgne C, Lahet C, Cochet G, Bagot M, Wechsler J, Farcet JP. Cutaneous T-cell infiltrates: analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangement by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Blood* 1995; 86: 305-10.
- <sup>132</sup> Tok J, Szabolcs MJ, Silvers DN, Zhong J, Matsushima AY. Detection of clonal T-cell receptor gamma chain gene rearrangements by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE) in archival specimens from patients with early cutaneous T-cell lymphoma: correlation of histologic findings with PCR/DGGE. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38: 453-60.
- <sup>133</sup> Bergman R, Faclieru D, Sahar D, Sander CA, Kerner H, Ben-Aryeh Y, Manov L, Hertz E, Sabo E, Friedman-Birnbaum R. Immunophenotyping and T-cell receptor gamma gene rearrangement analysis as an adjunct to the histopathologic diagnosis of mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 1998; 39: 554-9.
- <sup>134</sup> Geissmann F, Dieu-Nosjean MC, Dezutter C, Valladeau J, Kayal S, Leborgne M, Brousse N, Saeland S, Davoust J. Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *J Exp Med* 2002; 196: 417-30.
- <sup>135</sup> Rausch, E., Kaiserling, E., Goos, M. Langerhans cells and interdigitating reticulum cells in the thymus-dependent region in human dermatopathic lymphadenitis. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1977; 25: 327-43.
- <sup>136</sup> van der Valk P, Meijer CJ. The histology of reactive lymph nodes. *Am J Surg Pathol* 1987; 11: 866-82
- <sup>137</sup> Weiss, LM., Wood, GS., Warnke, RA. Immunophenotypic differences between dermatopathic lymphadenopathy and lymph node involvement in mycosis fungoides. *Am J Pathol* 1985; 120: 179-85.
- <sup>138</sup> Weiss, LM., Hu, E., Wood, GS., Moulds, C., Cleary, ML., Warnke, R., Sklar, J. Clonal rearrangements of T-cell receptor genes in mycosis fungoides and dermatopathic lymphadenopathy. *N Engl J Med* 1985; 313: 539-44.
- <sup>139</sup> Lynch, JW Jr., Linoilla, I., Sausville, EA., Steinberg, SM., Ghosh, BC., Nguyen, DT., Schechter, GP., Fischmann, AB., Ihde, DC., Stocker, JL., Bastian, A., Turner, R., Cotelingam, JD., Gazdar, AF., Foss, FM. Prognostic implications of evaluation for lymph node involvement by T-cell antigen receptor gene rearrangement in mycosis fungoides. *Blood* 1992; 79: 3293-9.
- <sup>140</sup> Bakels, V., Van Oostveen, JW., Geerts, ML., Gordijn, RL., Walboomers, JM., Scheffer, E., Meijer, CJ., Willemze, R. Diagnostic and prognostic significance of clonal T-cell receptor beta gene rearrangements in lymph nodes of patients with mycosis fungoides. *J Pathol* 1993; 170: 249-55.

- 
- <sup>141</sup> Kern, DE., Kidd, PG., Moe, R., Hanke, D., Olerud, JE. Analysis of T-cell receptor gene rearrangement in lymph nodes of patients with mycosis fungoides. Prognostic implications. *Arch Dermatol* 1998; 134: 158-64.
- <sup>142</sup> Assaf C, Hummel M, Steinhoff M, Geilen CC, Orawa H, Stein H, Orfanos CE. Early TCR- $\beta$  and TCR- $\gamma$  PCR detection of clonality indicates minimal tumor disease in lymph nodes of cutaneous T-cell lymphoma: diagnostic and prognostic implications. *Blood* 2005, 10:053-10
- <sup>143</sup> Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R, Zackheim H, Duvic M, Estrach T, Lamberg SI, Wood G, Dummer R, Ranki A, Burg G, Heald P, Pittelkow M, Bernengo MG, Sterry W, Laroche L, Trautinger F, Whittaker S. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood*. 2007 May 31; [Epub ahead of print]
- <sup>144</sup> van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurink E, Garcia-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, Gonzalez D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, Gonzalez M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17: 2257-317.
- <sup>145</sup> Bruggemann M, van der Velden VH, Raff T, Droese J, Ritgen M, Pott C, Wijkhuijs AJ, Gokbuget N, Hoelzer D, van Wering ER, van Dongen JJ, Kneba M. Rearranged T-cell receptor beta genes represent powerful targets for quantification of minimal residual disease in childhood and adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004; 18: 709-19.

---

## 6 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Sterry für die von Beginn an intensive Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit, sowie für die ständige Diskussionsbereitschaft und kritischer Aufarbeitung wissenschaftlicher Projekte.

Herzlicher Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Prof. h. c. Orfanos für die umfassende Ausbildung zum Facharzt für Dermatologie und Venerologie sowie für die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Des Weiteren danke ich herzlich Herrn Professor Dr. Stein und Herrn Priv-Doz. Dr. Hummel aus dem Institut für Pathologie. Durch ihre große Erfahrungen in der wissenschaftlichen Praxis und die freundschaftliche kontinuierliche Zusammenarbeit sind mehrere gemeinsame erfolgreiche Projekte entstanden.

Herrn Professor Dr. Dr. Geilen gilt mein Dank für die konstruktive Zusammenarbeit und zahllosen Ratschläge, die nicht nur wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danken möchte ich Herrn Dr. Matthias Steinhoff für die langjährige freundschaftliche Zusammenarbeit und unermüdlichen Diskussionen zum Thema der malignen Lymphome.

Dank auch allen Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie für das sehr angenehme und stets freundschaftliche Arbeitsklima.

Mein letzter ganz persönlicher Dank soll meiner Familie gelten, meiner Frau Selma und unseren Kindern Thalia und Lilian für die Kraft und Motivation, die sie mir täglich geben um auch diese Arbeit zu erstellen.

---

## 7. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Dr. med. Chalid Assaf

Berlin, den 07.06.2007