

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der  
Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler)

**Diskordanter Befall des Knochenmarks bei  
diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen:  
Eine vergleichende molekularpathologische Studie**

**Martin Stephan Spitzer**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. F. Fend  
2. Priv.-Doz. Dr. H. Bernhard

Die Dissertation wurde am 01.09.2003 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 10.12.2003 angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Problemstellung und Zielsetzung</b>	<b>6</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Epidemiologie der Non-Hodgkin-Lymphome</b>	<b>8</b>
<i>Globale Bedeutung</i>	8
<i>Zunahme der Inzidenz</i>	8
<i>Wandel der Mortalität</i>	9
<i>Häufigkeitsunterschiede</i>	9
<i>Risikofaktoren</i>	9
<b>2.2 Klinische Aspekte</b>	<b>11</b>
<i>Klinisch heterogene Gruppe von Erkrankungen</i>	11
<i>Klinische Stadieneinteilung</i>	11
<i>Follikuläre Lymphome</i>	12
<i>Diffus-großzellige B-Zell-Lymphome</i>	12
<i>Die klinische Bedeutung des diskordanten Knochenmarksbefalls</i>	13
<b>2.3 Pathologie</b>	<b>14</b>
2.3.1 Die aktuelle pathologische Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome	14
<i>Allgemeines</i>	14
<i>Kiel- und R.E.A.L.-Klassifikation</i>	14
2.3.2 Morphologische Merkmale der Infiltration des Knochenmarks durch ausgewählte Non-Hodgkin-Lymphome	16
<i>Morphologische Kriterien für konkordante Infiltration</i>	16
<i>Morphologische Kriterien für diskordanten Knochenmarksbefall</i>	16
<i>Reaktive lymphoide Infiltrate: Eine wichtige Differentialdiagnose</i>	17
<b>2.4 Die Rolle des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen-Rearrangements (IgH-Rearrangements) bei Non-Hodgkin-Lymphomen</b>	<b>19</b>
<i>Physiologische genomische Instabilität bei Lymphozyten</i>	19
<i>Einsatz des IgH-Rearrangements für die molekulare Diagnostik</i>	21

<b>2.5 Wichtige genetische Alterationen bei B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen</b>	<b>22</b>
2.5.1 Bcl-2	23
<i>Bcl-2: Allgemeines</i>	23
<i>Verwendung der Bcl-2-Translokation für die molekulare Diagnostik</i>	24
<i>Bcl-2: Immunhistochemie</i>	25
2.5.2 p53	26
<i>p53: Allgemeines</i>	26
<i>Die Bedeutung von p53 bei ausgewählten B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen</i>	26
<i>p53: Immunhistochemie</i>	27
2.5.3 Bcl-6	27
<i>Bcl-6: Allgemeines</i>	27
<i>Bcl-6: Immunhistochemie</i>	28
<b>2.6 Einige immunhistochemische Marker bei Non-Hodgkin-Lymphomen</b>	<b>29</b>
<i>CD20</i>	29
<i>CD3</i>	29
<i>CD10</i>	30
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Herkunft und Sammlung des Materials</b>	<b>31</b>
<i>Studienfälle</i>	31
<i>Kontrollfälle</i>	31
<i>Sammlung klinischer Daten</i>	32
<b>3.2 Herstellung von Präparaten für Histologie, Immunhistochemie und Mikrodissektion</b>	<b>32</b>
<b>3.3 Immunhistochemie</b>	<b>33</b>
<i>Antikörper</i>	33
<i>Durchführung der Immunhistochemie</i>	33
<b>3.4 Mikrodissektion</b>	<b>35</b>
3.4.1 Laser Capture Mikrodissektion (LCM)	35
<i>Prinzip der Laser Capture Mikrodissektion (LCM)</i>	35
<i>Durchführung der Laser Capture Mikrodissektion</i>	37
3.4.2 Manuelle Mikrodissektion	39

<b>3.5 PCR</b>	<b>39</b>
<i>Extraktion von DNA aus Paraffingewebe</i>	39
<i>β-Globin-Kontrolle aller Fälle</i>	39
<i>PCR für das Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen-Rearrangement (FR3A)</i>	41
<i>PCR für FR2A des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gens</i>	42
<i>PCR für die Bcl-2-Translokation t(14;18)</i>	43
<b>3.6 Fragment-Längen-Analyse</b>	<b>43</b>
<i>Herstellung des Polyacrylamid-Gels</i>	44
<i>Probenvorbereitung und Gellauf</i>	44
<b>3.7 Sequenzierung ausgewählter PCR-Produkte</b>	<b>45</b>
<i>Extraktion der klonalen Amplifikationsprodukte</i>	45
<i>Big Dye Terminator Cycle Sequencing</i>	46
<i>Dye Ex (Qiagen) - Beseitigung der nicht eingebauten Terminatoren</i>	47
<i>Sequenzlauf auf ABI 377</i>	47
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>48</b>
<b>4.1 Retrospektive Archivsuche (Januar 1992 bis Dezember 2001)</b>	<b>48</b>
<b>4.2 Klinische Daten</b>	<b>50</b>
<b>4.3 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen</b>	<b>52</b>
<b>4.4 Ergebnisse der Immunhistochemie</b>	<b>53</b>
<b>4.5 Durchflusszytometrische Daten</b>	<b>55</b>
<b>4.6 Ergebnisse der molekularen Untersuchungen</b>	<b>55</b>
<i>1. Gruppe: Klonal verwandte Fälle</i>	55
<i>2. Gruppe: Klonal unverwandte Fälle</i>	58
<i>3. Gruppe: Technisch nicht verwertbare Fälle</i>	59
<i>Kontrollfälle</i>	60
<b>5. Diskussion</b>	<b>61</b>
<b>5.1 Bislang ungenaue Definition des Begriffs diskordantes Lymphominfiltrat</b>	<b>62</b>
<i>Zeitliche und terminologische Aspekte</i>	62
<i>Morphologische Kriterien</i>	63
<i>Bedeutung der Immunhistochemie</i>	63

<b>5.3 Molekularpathologie diskordanter Lymphominfiltrate des Knochenmarks bei diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen</b>	<b>64</b>
<i>Zur Vorgehensweise bei den molekularen Untersuchungen</i>	64
<i>Klonal verwandte Fälle</i>	65
<i>Klonal unverwandte Fälle</i>	67
<i>Technisch nicht verwertbare Fälle</i>	68
<b>5.4 Korrelation der Ergebnisse mit durchflusszytometrischen Untersuchungen</b>	<b>69</b>
<i>Wertigkeit von Durchflusszytometrie und Histologie</i>	69
<i>Vergleichende Untersuchungen diskordanter Lymphominfiltrate des Knochenmarks mittels Durchflusszytometrie</i>	69
<b>5.4 Klinische Relevanz der Ergebnisse</b>	<b>70</b>
<b>5.5 Noch ungeklärte Fragen</b>	<b>71</b>
<b>5.6 Fazit für die Praxis</b>	<b>72</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>88</b>
<b>8.1 Die Ann-Arbor-Klassifikation</b>	<b>88</b>
<b>8.2 Immunhistochemie – Puffer</b>	<b>88</b>
<b>8.3 PCR – Lösungen und Reagenzien</b>	<b>89</b>
<b>8.4 Fragment-Längen-Analyse – Lösungen und Reagenzien</b>	<b>90</b>
<b>8.5 Sequenzierung – Lösungen und Reagenzien</b>	<b>90</b>
<b>8.6 Abkürzungen</b>	<b>90</b>
<b>8.7 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen</b>	<b>92</b>
<b>8.8 Veröffentlichung</b>	<b>93</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>94</b>

## 1. Problemstellung und Zielsetzung

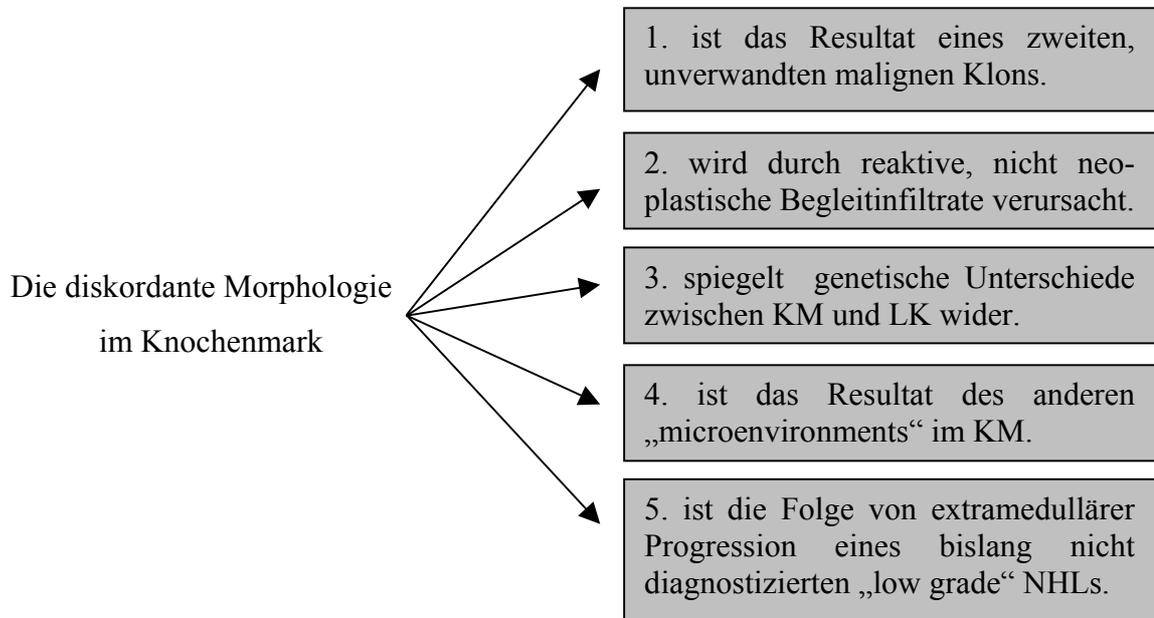
Der Befall des Knochenmarks (KM) durch maligne Non-Hodgkin-Lymphome hat weitreichende prognostische und therapeutische Konsequenzen. Deshalb ist eine möglichst genaue Zuordnung von lymphatischen Infiltraten im Knochenmark von großer Bedeutung.

Vor allem hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome – besonders diffus-großzellige B-Zell-Lymphome – zeigen im Knochenmark allerdings oftmals eine vom Primärbefund (z. B. im Lymphknoten [LK]) divergente Zytologie der Infiltratzellen, wobei das Infiltrat im Knochenmark meist kleinzelliger ist und morphologisch eher einem niedrig malignen NHL entspricht. Dieses Phänomen wurde bei Patienten mit hochmalignen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen und Knochenmarksbefall in bis zu 40% der Fälle beschrieben (Jagannath S et al., 1985; Bartl R et al., 1988; Purdy et al., 1989; Kluin PM et al., 1990). Dies wird als diskordante Lymphominfiltration bezeichnet. Bisher liegen zu diesem Thema in erster Linie morphologische und klinische Arbeiten vor (Fisher RI et al., 1981 (a) und (b); Mead GM et al., 1983; Fisher DE et al., 1989; Kluin PM et al., 1990; Conlan MG et al., 1990).

In einigen klinischen Studien fanden sich Hinweise dafür, dass diskordante Non-Hodgkin-Lymphome (v. a. großzellige B-Zell-Lymphome mit kleinzelligem Infiltrat im Knochenmark) zumindest teilweise ein längeres Überleben und rezidivfreies Intervall aufweisen als konkordant infiltrierende (Jagannath S et al., 1985; Conlan MG et al., 1990; Hodges GF et al., 1994). Andererseits haben Patienten mit diskordantem Knochenmarksbefall möglicherweise ein erhöhtes Rezidivrisiko nach initial erfolgreicher Therapie (Robertson LE et al., 1991).

Molekularpathologische Daten liegen zu diesem Thema nur in begrenztem Umfang im Knochenmark vor (Crisan D et al., 1995). Vergleichende molekularpathologische Analysen zwischen extramedullären und medullären Lokalisationen wurden bislang nicht vorgenommen.

Neben der Erarbeitung genauer morphologischer Kriterien zur Definition eines diskordanten Lymphominfiltrats, die bis dato fehlen, müssen zum besseren Verständnis diskordanter Lymphominfiltrate noch weitere offene Fragen geklärt werden, da es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten für dieses Phänomen gibt:



Die vorliegende Arbeit versuchte vor allem die erste Frage bzgl. klonaler Unterschiede zwischen Knochenmark und Lymphknoten zu klären.

## 2. Einleitung

### 2.1 Epidemiologie der Non-Hodgkin-Lymphome

#### *Globale Bedeutung*

Bösartige Erkrankungen stellen in der Bundesrepublik Deutschland und fast allen weiteren Industrienationen nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar (Statistisches Bundesamt 2002).

Zu den häufigen bösartigen Neubildungen gehören die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), maligne klonale Neoplasien, die von den B- oder T-Lymphozyten des lymphatischen Gewebes ihren Ausgang nehmen. In den Vereinigten Staaten von Amerika stehen die Non-Hodgkin-Lymphome mit ca. 26.100 jährlichen Todesfällen in der Mortalitätsstatistik durch Krebs auf dem fünften Rang (American Cancer Society 2002).

Die meisten Mortalitätsstatistiken erfassen allerdings die Leukämien als eine eigenständige Gruppe, somit sind diese Zahlen in Bezug auf Non-Hodgkin-Lymphome mit gewisser Vorsicht zu interpretieren, da die Grenze zwischen Non-Hodgkin-Lymphomen und Leukämien nicht immer klar zu ziehen ist (dies ist beispielsweise bei der B-CLL nicht eindeutig möglich) (Armitage JO et al., 2001). Darüber hinaus handelt es sich bei den Non-Hodgkin-Lymphomen um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit teilweise sehr unterschiedlichen Manifestationen, Verläufen, therapeutischen Möglichkeiten und Prognosen (Hauke RJ et al., 2000).

#### *Zunahme der Inzidenz*

Seit Beginn der siebziger Jahre hat sich die Inzidenzrate der Non-Hodgkin-Lymphome in den USA nahezu verdoppelt. Während der neunziger Jahre scheinen sich die Zuwachsraten der Inzidenz abgeschwächt zu haben. Möglicherweise hat die Inzidenz ein Plateau erreicht (American Cancer Society 2002). Ein ähnlicher Trend lässt sich auch in Europa feststellen, mit Zuwachsraten der Inzidenz von teilweise mehr als 4% pro Jahr Anfang der neunziger Jahre (Carli PM et al., 1994; McNally RJ et al. 1997; Cartwright R et al., 1999). Die AIDS-bedingten Non-Hodgkin-Lymphome, verbesserte diagnostische Möglichkeiten und die zunehmende Lebenserwartung erklären diesen starken Anstieg nur zum Teil (Carli PM et al., 1994; Reis LAG et al. 1997; Cartwright R et al., 1999). Ansonsten liegen die Gründe für den starken Zuwachs weitgehend im Dunkeln. Derzeit erkranken in der Bundesrepublik

Deutschland jährlich ca. 11.000 Menschen neu an einem Non-Hodgkin-Lymphom (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 1999).

#### *Wandel der Mortalität*

Die Gesamtmortalität aufgrund von Non-Hodgkin-Lymphomen weist leider eine eher negative Entwicklung auf. Obwohl die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate von 28% (1950 bis 1964) auf 52% (1983 bis 1989) gestiegen ist, steigt die Gesamtsterblichkeit an Non-Hodgkin-Lymphomen immer noch an, auch wenn die Mortalität geringer zunimmt als die Inzidenz (National Cancer Institute Division of Cancer Control, 1987; Reis LAG et al., 1997). Allerdings wurden vor allem bei diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen und Lymphomen des Kindes- und Jugendalters beeindruckende therapeutische Fortschritte erzielt (Aisenberg AC, 2000).

#### *Geographische, alterspezifische und geschlechtliche Häufigkeitsunterschiede*

Die Inzidenz und die Verteilung der verschiedenen Subtypen zeigen geographische Unterschiede. So sind die B-Zell-Lymphome (v. a. folliculäre Lymphome, B-CLL und diffus-großzellige B-Zell-Lymphome) mit ca. 90% aller NHL häufiger in westlichen Ländern als in Asien, wo die T-Zell-Lymphome einen größeren Anteil haben. Manche Lymphome zeigen eine besonders herausragende geographische Häufung wie z. B. das angiozentrische/nasale Natural Killer (NK)-Zell-Lymphom in Südasien und Teilen Südamerikas oder das mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) assoziierte endemische Burkitt Lymphom in Afrika (Armitage JO et al., 2001).

Insgesamt kommen Non-Hodgkin-Lymphome häufiger bei Männern (m:w = 1,5:1) und im höheren Lebensalter vor. Allerdings gibt es bei einigen Unterarten wie dem lymphoblastischen und dem Burkitt-Lymphom Häufigkeitsgipfel im Kindes- und Jugendalter. Bei AIDS-Patienten ist die Lymphominzidenz um bis das 1.000-fache erhöht (Armitage JO et al., 2001).

#### *Risikofaktoren*

Zahlreiche Umweltfaktoren werden mit dem Auftreten von Non-Hodgkin-Lymphomen in Verbindung gebracht. Allerdings konnten solche Risikofaktoren nur mit einem Teil der Lymphomerkrankungen in Zusammenhang gebracht werden (Aisenberg AC, 2000). Zu den die Lymphomentstehung begünstigenden Faktoren werden Infektionserreger, verschiedene Chemikalien und bestimmte Medikamente gezählt.

Seit der regelmäßigen Isolierung des Epstein-Barr Virus (EBV) aus afrikanischen Burkitt-Lymphomen (Epstein MA et al., 1964) wurden für einige Lymphome Viren (und Bakterien – *Helicobacter pylori*) als wichtige ätiologische Faktoren ausfindig gemacht (**Tabelle II.1**; Gallo RC et al., 1982; Armitage JO et al., 2001).

<b>Tabelle II.1:</b> Erreger, die mit der Entstehung von Lymphomen assoziiert sind	
Epstein-Barr Virus	Burkitt Lymphom Extranodales NK/T-Zell-Lymphom, nasales M. Hodgkin (?)
HTLV 1	Primäres diffus-grozzelliges B-Zell-NHL des ZNS
HIV	Adultes T-Zell-Lymphom / T-Zell-Leukämie Diffus-grozzelliges B-Zell-Lymphom
Hepatitis C-Virus	Burkitt Lymphom Lymphoplasmozytisches Lymphom
Humanes Herpes Virus 8	Multizentrische Castleman Krankheit “Primary effusion lymphoma“
<i>Helicobacter pylori</i>	MALT Lymphome des Magens
ZNS: Zentrales Nervensystem; HTLV: human T cell lymphotropic virus; MALT: mucosa associated tissue; NK: natural killer	

Krankheiten und Umwelteinflüsse, die mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung maligner Lymphome einhergehen, sind in **Tabelle II.2** (Armitage JO et al., 2001) aufgeführt. Auf wichtige genetische Alterationen wird im Kapitel 2.4 eingegangen.

<b>Tabelle II.2:</b> Beispiele für Krankheiten und Umweltfaktoren, die ein erhöhtes Risiko für Non-Hodgkin-Lymphome bedingen.	
<b>Erbliche Immundefekte</b> Klinefelter Syndrom Chédiak-Higashi Syndrom Ataxia telangiectasia Wiscott-Aldrich Syndrom	<b>Autoimmunerkrankungen</b> Sjögren Syndrom Zöliakie Rheumatoide Arthritis Systemischer Lupus erythematodes
<b>Erworbene Störungen des Immunsystems</b> Iatrogene Immunsuppression HIV-Infektion Erworbene Hypogammaglobulinämie	<b>Chemikalien und Medikamente</b> Phenytoin, Dioxin, Phenoxyherbizide Radioaktive Strahlung Zytostatika- und Strahlentherapie

## 2.2 Klinische Aspekte

### *Klinisch heterogene Gruppe von Erkrankungen*

Bei den Non-Hodgkin-Lymphomen handelt es sich hinsichtlich der klinischen Präsentation um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die sich nach ihrem natürlichen Verlauf grob in indolente, intermediäre und aggressive Lymphome unterteilen lassen. Indolente Lymphome zeigen einen protrahierten Verlauf meist über mehrere Jahre hinweg und sind häufig nur einer palliativen Therapie zugänglich. Aggressive Lymphome führen ohne Behandlung innerhalb weniger Monate zum Tode. Mit Polychemotherapie bzw. Hochdosis-Chemotherapien mit autologer Stammzelltransplantation besteht bei den aggressiven Lymphomen die Chance auf Heilung bzw. länger dauernde Remission. Intermediäre Lymphome wie etwa das Mantelzell-Lymphom zeichnen sich durch weitgehende Therapieresistenz und im Vergleich zu den indolenten Lymphomen raschere Progredienz aus. Neuere Empfehlungen lauten, die Non-Hodgkin-Lymphome nicht mehr grob nach dem klinischen Verlauf einzuteilen, sondern sie konsequent als eigenständige Krankheiten zu klassifizieren (Harris NL et al., 2000; Armitage JO et al., 2001).

### *Klinische Stadieneinteilung*

Die klinische Stadieneinteilung der NHL erfolgt in der Regel ähnlich wie beim M. Hodgkin nach der Ann-Arbor-Klassifikation (Carbone PP et al., 1971; Lister TA et al., 1989) in modifizierter Form (siehe Anhang: **Tabelle VIII.1**; S. 88).

Auffallend ist, dass jeglicher Befall des Knochenmarks das fortgeschrittenste klinische Stadium IV bedingt. Allerdings hat die Ann-Arbor-Klassifikation weniger prognostische Aussagekraft bei den Non-Hodgkin-Lymphomen als bei den Hodgkin-Lymphomen (Rosenberg SA et al., 1977). Bessere Aussagen – vor allem für aggressive NHL – lassen sich mit dem International Prognostic Index for Non-Hodgkin's lymphoma (IPI) treffen, wobei Alter >60 Jahre, erhöhte Serum LDH, schlechter Allgemeinzustand, Ann-Arbor-Stadium III oder IV und Befall von mehr als einer extranodalen Lokalisation Faktoren für ein erhöhtes Risiko sind (Shipp MA et al., 1993). Folglich spielt auch der Knochenmarksbefall im IPI bei den meisten Patienten eine große Rolle. Dem Knochenmarksbefall wird somit bei Lymphomen eine beträchtliche prognostische Bedeutung zugeordnet (Fisher RI et al., 1981 (a)). So ist es nicht verwunderlich, dass die Knochenmarksbiopsie eine zentrale Rolle bei der Therapieplanung spielt. Die Analyse umfasst in der Regel die Zytologie und die

Durchflusszytometrie des Knochenmarksaspirats und die histologische Untersuchung von Knochenmarksstanzbiopsien.

Im folgenden sollen zwei wichtige Vertreter der B-Zell-Lymphome grob skizziert werden, die auch in der vorliegenden Studie untersucht wurden.

### *Follikuläre Lymphome*

Die follikulären Lymphome sind die zweithäufigsten Non-Hodgkin-Lymphome in den USA (30% aller NHL in den USA, 22% weltweit) und sind dort somit nach der B-CLL die zweithäufigste low-grade Neoplasie der B-Zellreihe. Männer und Frauen sind etwa gleich häufig betroffen. Die meisten Patienten sind älter als 50 Jahre. Das typische klinische Erscheinungsbild ist eine schmerzlose Lymphknotenschwellung. Häufig ist ein multipler Befall von lymphatischen Organen zu beobachten. Die meisten Patienten befinden sich bei der Erstdiagnose wegen des indolenten Verlaufs bereits im klinischen Stadium III oder IV, häufig mit Knochenmarksbefall (Harris NL et al., 1994). Eine Heilung ist nur in seltenen Fällen möglich (Armitage JO et al., 2001). Bei den follikulären Lymphomen tritt häufiger als bei anderen Lymphomen niedriger Malignität eine Transformation in ein hochmalignes Lymphom auf (4% bis 64%, nach neueren Erhebungen ca. 30% im Krankheitsverlauf) – meist in ein diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom (Cullen MH et al., 1979; Risdall R et al., 1979; Hubbard SM et al., 1982; Acker B et al., 1983; Garvin AJ et al., 1983; Horning SJ et al., 1984; Bastion Y et al., 1997; Müller-Hermelink HK et al., 2001).

### *Diffus-großzellige B-Zell-Lymphome*

Diffus-großzellige B-Zell-Lymphome gehören neben den follikulären Lymphomen mit fast 40% der Fälle zu den häufigsten Non-Hodgkin-Lymphomen (die B-CLL ausgenommen) in den USA und Europa. Das Haupterkrankungsalter liegt zwischen 50 und 60 Jahren, allerdings treten die diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome auch relativ häufig in jüngeren Altersgruppen und manchmal sogar im Kindesalter auf. Die Patienten stellen sich typischerweise mit einer sich schnell vergrößernden, häufig symptomatischen Schwellung einzelner Lymphknoten oder extranodaler Lokalisationen (40% sind extranodal) vor (Harris NL et al., 1994). Diffus-großzellige B-Zell-Lymphome zeigen einen aggressiven Verlauf, allerdings lassen sich mit Chemotherapie und weiteren Therapieansätzen – wie Strahlentherapie, Stammzelltransplantation und Immunchemotherapie – in ca. einem Drittel der Fälle Heilungen und bei vielen weiteren Fällen Perioden längerer Remission erreichen (Armitage JO et al., 2001; Coiffier B, 2003).

Knochenmarksbefall findet sich bei der Erstdiagnose bei ca. 15-20% der Patienten mit diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen, wobei die Infiltrate im Knochenmark oftmals eine kleinzellige Zytologie aufweisen im Gegensatz zur großzelligen Zytologie beispielsweise im Lymphknoten (sogenanntes diskordantes Infiltrat – s. u.) (Hodges GF et al., 1994; Jaffe ES et al., 2001).

#### *Die klinische Bedeutung des diskordanten Knochenmarksbefalls*

Die klinische Bedeutung des diskordanten Befalls des Knochenmarks bei Non-Hodgkin-Lymphomen ist bislang nicht eindeutig geklärt. In einer Anzahl von Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass Patienten mit diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen und diskordanter Infiltration des Knochenmarks in puncto Überleben vermutlich eine vergleichbare Prognose wie Patienten ohne Knochenmarksbefall besitzen. (Fisher RI et al., 1981 (a); Fisher RI et al., 1981 (b); Mead GM et al., 1983; Jagannath S et al., 1985; Hodges GF et al., 1994; Fisher DE et al., 1989; Conlan MG et al., 1990).

Jedoch haben Patienten mit diskordantem Knochenmarksbefall möglicherweise ein erhöhtes Rezidivrisiko nach initial erfolgreicher Therapie (Robertson LE et al., 1991). Problematisch ist, dass der Begriff diskordant in diesem Zusammenhang bislang weder morphologisch (vgl. nächster Abschnitt) noch zeitlich eindeutig definiert ist. In den meisten der oben erwähnten Studien wurden allerdings vor allem solche Fälle als diskordant bezeichnet, bei denen die unterschiedliche Zytologie im Knochenmark bereits zum Zeitpunkt der Primärdiagnose vorhanden war (Fisher RI et al., 1981 (a); Fisher DE et al., 1989; Conlan MG et al., 1990; Hodges GF et al., 1994).

Ferner ist kritisch anzumerken, dass in diesen meist retrospektiven Untersuchungen die Fallzahlen mit diskordantem Befall relativ gering waren.

## 2.3 Pathologie

### 2.3.1 Die aktuelle pathologische Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome

#### *Allgemeines*

Das Ziel jeder Lymphom-Klassifikation muss es sein, eine Art internationale Sprache zu schaffen, die von Spezialisten auf der ganzen Welt verstanden und auch einheitlich angewendet wird. Die Klassifikation muss reproduzierbar und zudem klinisch relevant sein, sodass Behandlungsergebnisse – vor allem im Rahmen von Studien – weltweit vergleichbar sind. Ferner sollte sie flexibel für die Aufnahme von neuen Erkenntnissen und Daten sein. Von Bedeutung ist darüber hinaus eine histopathologische Basis, da in den meisten Fällen die initiale Diagnose durch den Pathologen gestellt wird. Leider gab es (und gibt es teilweise bis heute) einige Konfusionen bei der Klassifizierung der Non-Hodgkin-Lymphome. Seit 1925 tauchten mehr als 25 Klassifikationen für NHL am hämatopathologischen Firmament auf. Viele von diesen jedoch waren wegen beträchtlicher Unzulänglichkeiten nur ephemere Erscheinungen (Aisenberg AC, 2000; Isaacson PG, 2000).

#### *Kiel- und R.E.A.L.-Klassifikation*

Ein bedeutender Meilenstein war in den letzten Jahrzehnten in dieser Hinsicht die vornehmlich in Europa angewandte Kiel-Klassifikation, die im Laufe der Zeit auch neueren Erkenntnissen angepasst wurde und somit breite Akzeptanz vor allem im europäischen Raum fand (Gerard-Marchant R et al., 1974; Lennert K et al., 1975; Lennert K, 1978; Lennert K, 1981; Stansfeld A et al., 1988; Lennert K et al., 1991). In Nordamerika hingegen wurden zur selben Zeit vor allem die Lukes-Collins-Klassifikation (Lukes RJ et al., 1974) und die Working-Formulation (Rosenberg SA et al., 1981) verwendet. Mit der Veröffentlichung der „Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms“ (R.E.A.L.-Klassifikation) durch die „International Lymphoma Study Group“ im Jahre 1994 sind die transatlantischen Kommunikationsprobleme weitgehend in den Hintergrund getreten (Harris NL et al., 1994).

Die R.E.A.L.-Klassifikation besteht aus einer Liste von „echten“ Krankheitsentitäten, die sich jeweils aus einer Kombination von Morphologie, Immunphänotyp, genetischen und klinischen Merkmalen definieren. Die relative Bedeutung dieser Kriterien variiert von Erkrankung zu Erkrankung. Es gibt somit keinen Goldstandard der für die Klassifizierung aller Lymphome zutrifft.

Die NHL entsprechen offenbar arretierten Differenzierungsstufen der jeweiligen normalen Ausgangszellpopulation. Die Benennung erfolgt nach dem jeweils vorherrschenden Zelltyp. Die R.E.A.L-Klassifikation der Lymphome ist in aktualisierter Form Bestandteil der neuen WHO-Klassifikation hämatologischer Neoplasien (Jaffe ES et al., 2001).

Die Unterteilung in prognostische Untergruppen wie „niedrig“- oder „hochmaligne“ findet nicht mehr statt, da der histologische Grad nicht immer mit dem klinischen Verlauf einhergeht (Harris NL et al., 2000). Die R.E.A.L-Klassifikation hat sich seit ihrer Veröffentlichung in zahlreichen Studien bewährt (A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma, 1997; Weisenburger D et al., 1997; Armitage JO et al., 1998). In **Tabelle II.3** finden sich die wichtigsten Entitäten der B-Zellreihe in der R.E.A.L./WHO-Klassifikation und in der früher verwendeten Kiel-Klassifikation.

<b>Tab. II.3</b>	B-Zell Neoplasien nach der aktualisierten R.E.A.L./WHO-Klassifikation <sup>1</sup>	B-Zell Neoplasien nach der aktualisierten Kiel-Klassifikation
	<p><b>Reife (periphere) B-Zell Neoplasien</b>  <i>B-CLL/kleinzelliges lymphozytisches Lymphom</i>            Splenisches Marginalzonen B-Zell-Lymphom            B-Zell Prolymphozytenleukämie            Haarzellenleukämie  <i>Plasma Zell Myelom/Plasmozytom</i></p> <p><i>Extranodales Marginalzonen B-Zell Lymphom vom MALT-Typ</i>  <i>Mantelzell-Lymphom</i>  <i>Folikuläre Lymphome</i></p> <p>Nodale Marginalzonen B-Zell Lymphome</p> <p><i>Diffus großzellige B-Zell-Lymphome</i></p> <p><i>Burkitt-Lymphom</i></p> <p><b>Precursor B-Zell-Neoplasien</b>  <i>Precursor B-lymphoblastische Leukämie/ Lymphom: B-ALL/LBL.</i></p>	<p><b>B-Zell-Lymphome niedriger Malignität</b>            Lymphozytische – chronisch lymphozytische Leukämie und            Prolymphozytenleukämie            Haarzellenleukämie            Lymphoplasmazytisches/zytoides Lymphom (Immunozytom)            Plasmazytisches Lymphom</p> <p>Zentrozytisches Lymphom            Zentroblastisch-zentrozytisches Lymphom – follikulär ± diffus            – diffus</p> <p><b>Hochmaligne B-Zell-Lymphome</b>            Zentroblastisch            Immunoblastisch            Burkitt-Lymphom</p> <p>Lymphoblastisches Lymphom</p>
	<sup>1</sup> Häufigere Entitäten sind kursiv gedruckt; B-CLL: (B-Zell) chronische lymphatische Leukämie; B-ALL: (B-Zell) akute lymphoblastische Leukämie; LBL: lymphoblastisches Lymphom	

### 2.3.2 Morphologische Merkmale der Infiltration des Knochenmarks durch ausgewählte Non-Hodgkin-Lymphome

#### *Morphologische Kriterien für konkordante Infiltration*

Bei disseminierten Non-Hodgkin-Lymphomen, die das Knochenmark befallen haben, weisen die Infiltrate im Mark in der Regel eine Zytologie auf, die an die Morphologie des nodalen bzw. extranodalen Tumorgewebes erinnert. Dies bezeichnet man als konkordante Infiltration. Bei diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen findet man in den Infiltraten somit überwiegend Zentro- und Immunoblasten. Bei follikulären Lymphomen stößt man auf kleinzellige lymphoide Populationen, die oftmals ein tapetenartiges endostales (paratrabekuläres) Wachstumsmuster aufweisen. Ferner findet sich im Bereich der Infiltrate häufig eine vermehrte Retikulinfibrose. Bei einem Befall durch eine B-CLL liegen entweder eine markzentrale nodulär-fokale oder eine diffuse dichte Infiltration („packed marrow“) vor, wobei das diffuse Infiltrationsmuster mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Eine ausgeprägte Retikulinfasersklerose findet sich bei einer B-CLL in aller Regel nicht.

Lymphominfiltrate kann man mittels der Chlorazetatesterase-Reaktion, die vorwiegend die Granulopoese anfärbt, hervorheben. Besonders paratrabekulär gelegene Infiltrationen imponieren dabei als Aussparung. Ferner zeigen die Tumorzellen der angesprochenen B-Zell-Lymphome in der Immunhistochemie Positivität für B-Zell-Marker wie CD20 oder eine Leichte-Ketten-Restriktion für Kappa oder Lambda. In der CD3-Färbung (T-Zell-Marker) sind diese Zellen hingegen negativ (Thiele J et al., 1995).

#### *Morphologische Kriterien für diskordanten Knochenmarksbefall*

Diskordante Infiltrate zeigen im Knochenmark eine Zytologie, die von der des extramedullären Tumorgewebes abweicht. Wie bereits in Kapitel 1 erwähnt, tritt diskordanter Befall des Knochenmarks vorwiegend bei diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen auf. Dabei findet sich im Mark im Gegensatz zur großzelligen Zytologie des extramedullären Tumorgewebes eine divergente kleinzellige Morphologie, die häufig – wie bei follikulären Lymphomen – paratrabekulär lokalisiert ist. Wie erwähnt ist der Begriff diskordant bisher leider nicht eindeutig morphologisch definiert (wie auch bis jetzt kein klarer Zeitraum festgelegt worden ist, der zwischen den beiden Biopsien mit der unterschiedlichen Morphologie liegen darf – vgl. Abschnitt 2.2; S. 13).

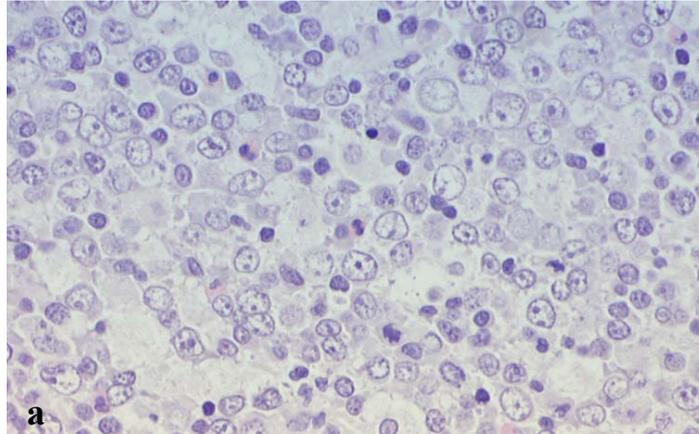
Einige Autoren bezeichnen nur solche Infiltrate als diskordant, bei denen im Knochenmark die malignen Zellpopulationen überwiegend aus kleinzelligen neoplastischen Populationen bestehen (Conlan MG et al., 1990), während andere auch gemischtzellige Infiltrate (groß- und kleinzellige Elemente) mit dazu rechnen (Fisher DE et al., 1989; Kluin PM et al., 1990; Hodges GF et al., 1994; Crisan D et al., 1995).

In einigen Studien waren Fälle mit Hinweisen für eine Vorerkrankung durch ein follikuläres Lymphom und solche, bei denen eine histologische Diskordanz erst im Krankheitsverlauf auftrat, mit eingeschlossen (Conlan MG et al., 1990; Hodges GF et al., 1994; Fisher RI et al., 1981 (b); Kluin PM et al., 1990), während solche Patienten in anderen Arbeiten von der Untersuchung ausgeschlossen wurden (Fisher DE et al., 1989). Ein Beispiel für einen überwiegend kleinzelligen diskordanten Lymphombefall des Knochenmarks findet sich in den **Abbildungen II.1.a-c** auf der nächsten Seite.

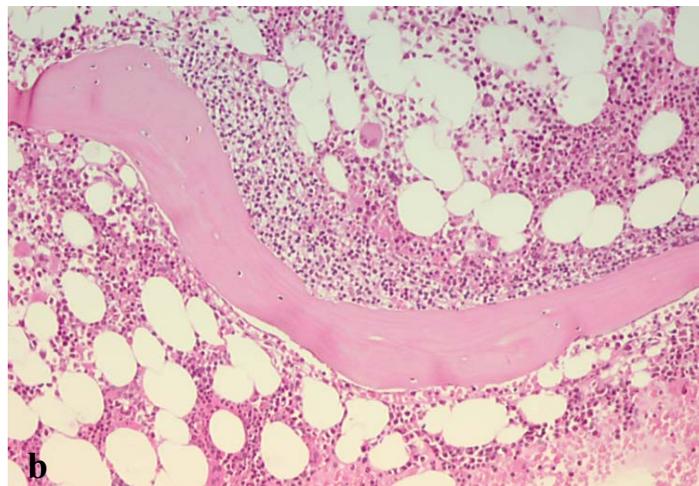
*Reaktive lymphoide Infiltrate: Eine wichtige Differentialdiagnose zum Lymphombefall*

Beim Vorliegen von einzelnen (oder wenigen) kleinen herdförmigen lymphoiden Zellinfiltraten im Knochenmark kann eine Abgrenzung zwischen konkordantem bzw. diskordantem Lymphombefall und benignen reaktiven lymphoiden Infiltraten (auch atypische reaktive Infiltrate genannt) schwierig sein. Reaktive lymphoide Infiltrate, sind kleine Ansammlungen von Lymphozyten im Knochenmark, die gehäuft im höheren Lebensalter und bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen oder Tumoren (besonders Lymphomen) auftreten. Ihre biologische Wertigkeit ist bislang noch nicht eindeutig geklärt (Thiele J, 1995).

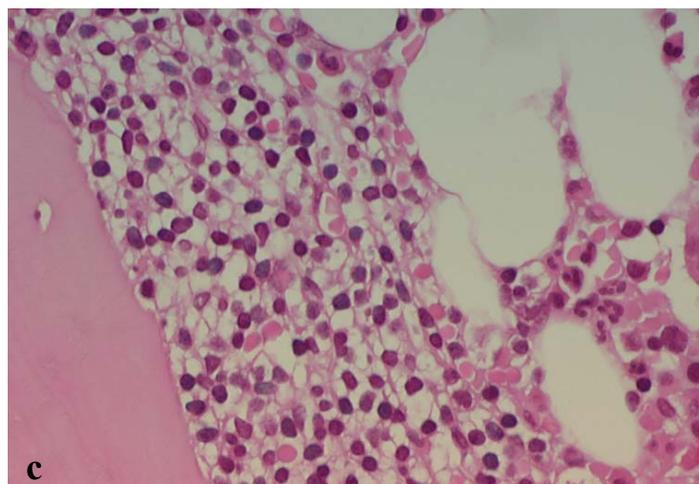
Reaktive Infiltrate zeichnen sich im Gegensatz zu malignen Populationen durch eine relativ scharfe Abgrenzung, keine oder minimale retikuläre Fibrose, zentral-perivaskuläre Lage und herdförmiges Auftreten unter Aussparung der paratrabekulären Zone aus (sowie Keimzentren, die aber selten anzutreffen sind). Immunhistochemisch findet sich eine Mischpopulation von kleinen B- und T-Lymphozyten. In der Regel ist anhand dieser morphologischen und immunhistochemischen Kriterien eine relativ sichere Entscheidung, ob das Infiltrat als maligne oder reaktiv anzusehen ist, möglich (Thiele J, 1995; Kremer M et al., 2000). In unklaren Fällen können Mikrodissektion und molekularpathologische Klonalitätsuntersuchungen des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen-Rearrangements (IgH-Rearrangements) die Differentialdiagnostik unterstützen (siehe nächster Abschnitt), wobei sich bei benignen Infiltraten in aller Regel ein polyklonales Reaktionsmuster zeigt (Kremer M et al., 2000).



**Abb. II.1a:** Diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom, Lymphknoten (Fall 12); (HE; 400fach)



**Abb. II.1b:** Diskordante kleinzellige Infiltration mit paratrabekulärem Wachstumsmuster im zeitgleich biopsierten Knochenmark (Fall 12); (HE; 40fach)



**Abb. II.1c:** Dasselbe diskordante Infiltrat in höherer Vergrößerung (Fall 12); (HE; 400fach)

## 2.4 Die Rolle des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen-Rearrangements (IgH-Rearrangements) bei Non-Hodgkin-Lymphomen

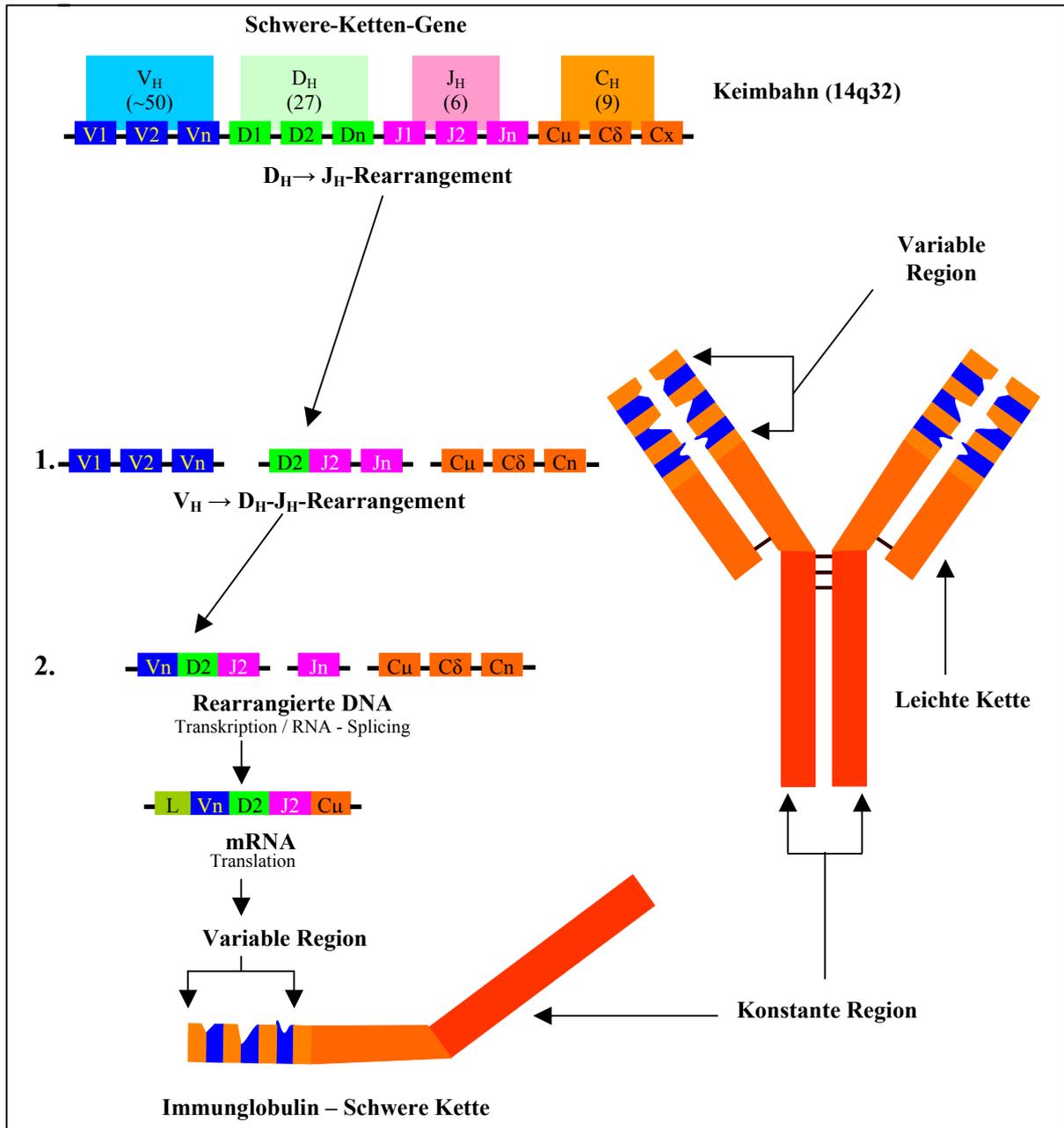
Unkontrolliertes Wachstum ist das herausstechende Merkmal von Tumorzellen. Verantwortlich hierfür sind nach allgemeiner Überzeugung vor allem Mutationen, die es der Zelle ermöglichen, den normalerweise wirksamen Mechanismen der Wachstumshemmung zu entweichen. Im Falle von B-Zell-Lymphomen wird die Aufhebung der Wachstumskontrolle oft mit Fehlern des Immunglobulin-Gen-Rearrangement in Verbindung gebracht, wobei ein Abschnitt des Immunglobulin-Gens mit einem Gen auf einem anderen Chromosom fusioniert. Dieser Vorgang wird als Translokation bezeichnet (siehe auch Abschnitt 2.5; S. 22 ff.).

### *Physiologische genomische Instabilität bei Lymphozyten*

Die enorme Varianz des Antigen-Rezeptors (und somit im Falle der B-Zellen auch der Antikörper) wird durch ein somatisches Genrearrangement erreicht, das bereits früh während der B-Zellreifung im Knochenmark erfolgt. Dabei wird die DNA zwischen den rearrangierten Gen-Elementen deletiert (oder in seltenen Fällen invertiert). Es liegt hier sozusagen eine „Sollbruchstelle“ des Genoms vor. Die Genelemente, die für die L(light)- und die H(heavy)-Kette der Immunglobuline (Ig) kodieren, sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert, haben jedoch einen sehr ähnlichen Aufbau (H-Ketten: Chromosom 14; L-Ketten: Chromosom 2 für Kappa ( $\kappa$ ) bzw. Chromosom 22 für Lambda ( $\lambda$ )).

Im Falle der variablen Region der schweren Kette handelt es sich um die  $V_H$ - (variable),  $D_H$ - (diversity) und  $J_H$ - (joining) Gene; im Falle der Leichtkette dabei um die  $V_\kappa/V_\lambda$ - und die  $J_\kappa/J_\lambda$ -Gene. Das Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen (IgH) wird hierbei zuerst rearrangiert. Streng genommen handelt es sich bei diesen DNA-Sequenzen eigentlich nicht um Gene, sondern um Exons. Dennoch hat es sich eingebürgert, die  $V_H$ -,  $D_H$ - und  $J_H$ - Abschnitte als Gene zu bezeichnen (Tonegawa S, 1983; Schwartz RS, 1995).

Für die H-Kette stehen ca. 50  $V_H$ -, 27  $D_H$ - und 6  $J_H$ -Gene zur Verfügung, wobei jeweils nur eines für die  $V_H$ - $D_H$ - $J_H$ -Sequenz, die schließlich für die variable Region des individuellen Antigen-Rezeptors kodiert, verwendet wird. Da die verschiedenen V-D-J- und V-J-Abschnitte beliebig kombiniert und zusätzlich während dieses Prozesses noch unterschiedliche viele Nukleotide (sog. N-Region Addition zwischen D-J und V-D) eingefügt werden können, ergeben sich zahlreiche Kombinationsmöglichkeiten (vgl. nächste Seite, **Abb. II.2**). Jede normale B-Zelle durchläuft im Rahmen ihrer Reifung diesen Prozess und verfügt somit über ein individuelles H- und L-Ketten-Rearrangement, das sich von dem anderer B-Lymphozyten unterscheidet. Folglich liegt im Normalzustand eine polyklonale B-Zell-Population vor.



**Abb. II.2:** Das Immunglobulinmolekül (Ig) (rechts) besteht aus identischen Paaren von Schwer- und Leichtketten. Jede Kette besitzt eine konstante und eine variable Region. Drei Unterdomänen innerhalb der variablen Regionen – hypervariablen Regionen – sind für den Großteil der Antikörper-Variabilität verantwortlich (blaue Balken). Zwischen den hypervariablen Domänen finden sich die vier „framework“-Regionen (orange Balken), durch die die dreidimensionale Struktur der variablen Bindungsstellen aufrechterhalten wird. Die kodierende Region der Schwere Kette (links) entsteht durch zufällige Genumlagerungen von vier Arten von Gensegmenten:  $V_H$ ,  $D_H$ ,  $J_H$  und  $C_H$ . Zuerst (1.) kommt es zu einer Annäherung eines D- (hier  $D_2$ ) und eines J-Abschnitts (hier  $J_2$ ). Als nächstes (2.) verbindet sich ein  $V_H$  (hier  $V_n$ ) mit der bereits bestehenden  $D_2$ - $J_2$  Einheit. Sowohl bei der D-J-Rekombination als auch bei der Verbindung von  $V_H$  und D-J, kann, bevor es zu einer Fusion der entsprechenden Abschnitte kommt, durch Exonukleasen und die Terminale Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) eine unterschiedliche Anzahl von Nukleotiden entfernt oder hinzugefügt werden (sog. N-Region Addition). Durch diese somatische Modifikation kann die Diversität des B-Zell-Rezeptors noch um einiges erhöht werden. Bei der leichten Kette erfolgt das Rearrangement anschließend analog mit der Ausnahme, dass hierbei keine D-Abschnitte vorhanden sind. Die kleinen schwarzen Balken zwischen den einzelnen Ketten des Immunglobulinmoleküls (rechts) sollen Disulfidbrücken darstellen.  $C_H$ : Genabschnitt für die konstante Region der H-Kette. (Abb. nach Schwartz RS, 2003).

*Einsatz des IgH-Rearrangements für die molekulare Diagnostik*

Bei B-Zell-Neoplasien handelt es sich um monoklonale Erkrankungen bei denen die malignen Zellen denselben klonalen Ursprung haben.

Aus Obigem wird ersichtlich, dass ein B-Zell-Klon, der ursprünglich aus einer einzelnen B-Zelle hervorgegangen ist, wie er wie eben erwähnt bei B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen vorliegt, ein nahezu einzigartiges monoklonales Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen-Rearrangement besitzt, welches als individueller Marker für die Untersuchung von B-Zell-Neoplasien dienen kann (Küppers R et al., 1999; Vanasse GJ et al., 1999).

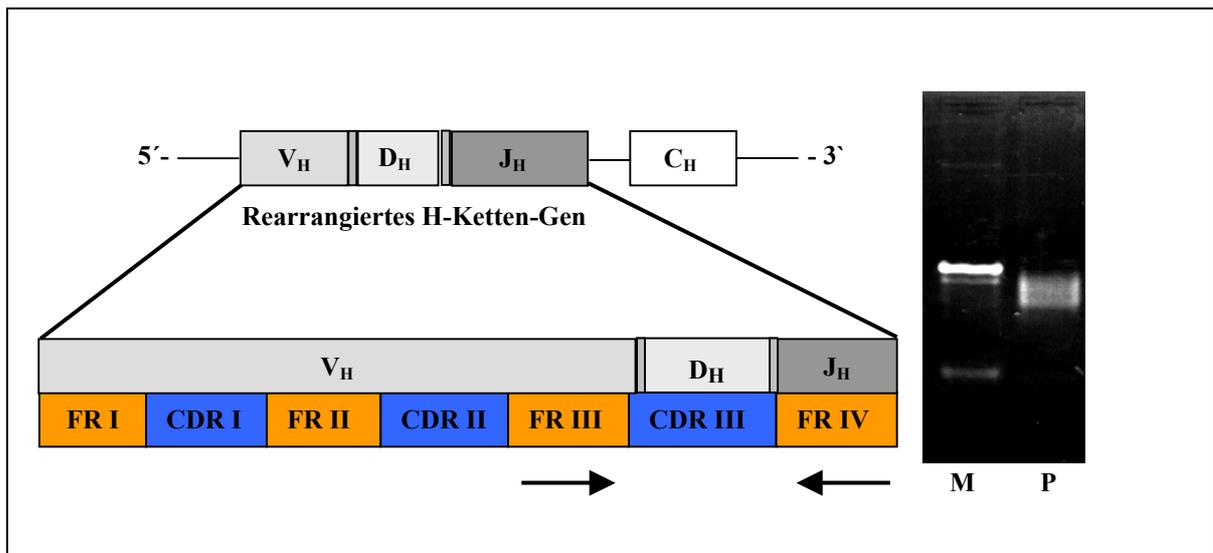
Dieses monoklonale Rearrangement lässt sich beispielsweise mittels verschiedener PCR-Methoden auch im Paraffingewebe nachweisen. Dabei kommen sogenannte „consensus“-Primer für den V- und den J-Abschnitt zum Einsatz (Segal GH et al., 1994). Dabei handelt es sich um Primer, die trotz gewisser Variationen der verschiedenen V- und J-Regionen an diese Sequenzen binden können, auch wenn keine perfekte Übereinstimmung in der Basensequenz vorliegt.

Da unterschiedliche – polyklonale – Rearrangements, wie sie etwa in reaktiven Lymphfollikeln auftreten, PCR-Produkte unterschiedlicher Größe ergeben, resultiert eine verwaschene breite Bande (sog. „smear“), wenn man das erhaltene Produkt mittels Gelelektrophorese auftrennt. Bei einer monoklonalen Population findet man eine oder zwei (bei biallelischem Rearrangement) scharfe schmale Banden (vgl. **Abb. II.3**; S. 22).

Bewährt haben sich zum Nachweis des Schwere-Ketten-Gen-Rearrangements aus Paraffingewebe Primer gegen die sogenannte „framework“-Region 3 (FR3) bzw. 2 (FR2). Es handelt sich bei den vier „frameworks“ um weitgehend konstante Domänen innerhalb des variablen Abschnitts der H-Kette, durch die die dreidimensionale Struktur der variablen Bindungsstellen aufrechterhalten wird (vgl. **Abb. II.2**; S. 20). Mit einer PCR für FR3 lässt sich in ca. 60% aller B-Zell-Neoplasien eine Monoklonalität nachweisen. Durch die Kombination von Untersuchungen für FR3 und FR2 lässt sich diese Rate auf 70% bis 90% erhöhen (Segal GH et al., 1994; Arber DA et al., 2000).

Des Weiteren eignen sich die genannten Methoden auch gut zur Untersuchung von kleinen – auf ein Lymphom verdächtigen – lymphoiden Infiltraten im Knochenmark (Kremer M et al., 2000). Ferner können vergleichende Untersuchungen unternommen werden, um festzustellen, ob zwischen zwei Tumoren eines Patienten eine klonale Verwandtschaft besteht – ist doch mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass Neoplasien mit gleichem klonalen Ursprung ein monoklonales IgH-Rearrangement gleicher Größe aufweisen.

Die PCR-Analyse des IgH-Rearrangements wird gegenüber der des IgL-Rearrangements bevorzugt, da das Rearrangement des Schwere-Ketten-Gens sehr früh während der B-Zell-Entwicklung stattfindet und sich damit auch für Klonalitätsuntersuchungen vieler unreifer B-Zell-Lymphome eignet (Arber DA et al., 2000).



**Abb. II.3:** (links): Lage der „frameworks“ (FR I-IV) und der hypervariablen Regionen (CDR I-III: complementarity determining region) im variablen Abschnitt der schweren Kette. C<sub>H</sub>: Genabschnitt für die konstante Region; (rechts): PCR-Resultate mit Primern für FR III und J<sub>H</sub>. M: Scharfe monoklonale Bande bei diffus-großzelligem B-Zell NHL des Lymphknotens; P: Verwaschene breite polyklonale Bande („smear“) bei reaktiven Lymphfollikeln (chronische Tonsillitis).

## 2.5 Wichtige genetische Alterationen bei B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen

Die unterschiedlichen Neoplasien, die von B-Zellen verschiedener Differenzierungsstufen abstammen, zeigen ein weites Spektrum genetischer Veränderungen. Viele dieser Gene, die meist durch ihre Beteiligung an Translokationen, die den Immunglobulin-Locus betreffen, identifiziert wurden, spielen nicht nur eine Rolle bei der Entstehung von bösartigen Lymphomen, sondern auch bei der Entwicklung und Aktivierung normaler B-Lymphozyten. Dies trifft besonders für die B-Zellen des Keimzentrums zu. Von den angesprochenen Genen scheinen die meisten zumindest an einem der vier folgenden zellulären Regulationsmechanismen anzugreifen: Apoptose, Zellzyklus-Kontrolle, NFκB-Aktivierung und Signalkaskaden des B-Zellrezeptors.

Interessanterweise bedingen die meisten in diesem Zusammenhang exprimierten Gene alleine keine Transformation zu einem B-Zell-Lymphom. Hierzu ist die gleichzeitige oder sekundär erworbene Beteiligung von weiteren Onkogenen bzw. der Ausfall zusätzlicher Tumorsuppressoren notwendig (Willis TG et al., 2000). Im folgenden sollen einige wichtige genetische Veränderungen bei B-NHL besprochen werden.

### 2.5.1 Bcl-2

#### *Bcl-2: Allgemeines*

Untersuchungen von chromosomalen Translokationen in menschlichen Lymphomen führten zur Entdeckung des Bcl-2 („B-cell lymphoma 2“) Gens, das für das anti-apoptotische Bcl-2 Protein kodiert.

Die häufigste chromosomale Translokation die dieses Gen betrifft ist die t(14;18)(q32;q21), die man bei 85% bis 90 % aller folliculären und bei 12% bis 38% der diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome findet. Seltene Varianten sind die Translokationen t(2;18)(p11;q 21) und t(18;22)(q21;q21), die in biologischer Hinsicht als gleichwertig anzusehen sind (Fukuhara S et al., 1979; Yunis JJ et al., 1987; Yunis JJ et al., 1989; Offit K et al., 1991; Jacobson JO et al., 1993; Tang SC et al., 1994; Hill ME et al., 1996; Gascoyne RD et al., 1997; Kramer MH et al., 1998).

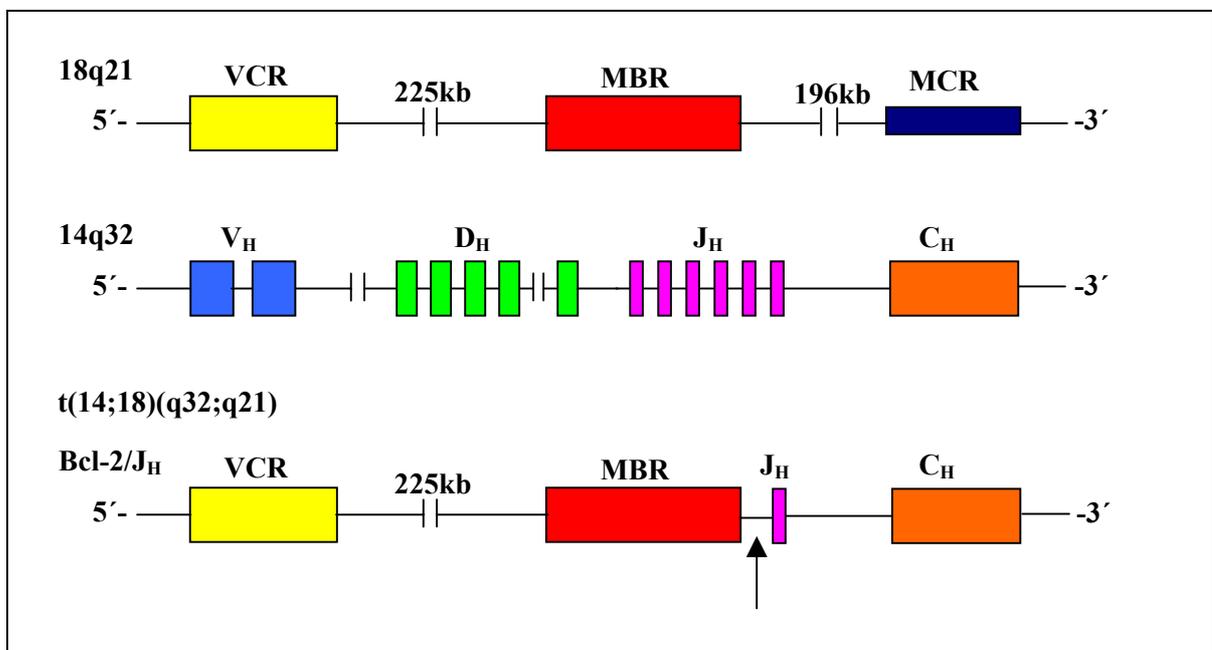
Es stellte sich heraus, dass die Bruchstelle das Ergebnis eines fehlerhaften IgH-Rearrangements ist, wodurch Bcl-2 unter die Transkriptionskontrolle des Immunglobulin-Schwere-Ketten Locus gerät. Dies führt zu einer verstärkten Expression des Bcl-2 Proteins. Hierdurch können die betroffenen Zellen im Keimzentrum überleben, auch wenn physiologische Überlebenssignale ausbleiben (Tsujimoto Y et al., 1985; Bakhshi A et al., 1985; Clearly ML et al., 1985; Tsujimo Y et al., 1986; Korsmeyer SL et al., 1999)(vgl. **Abb. II.4**; S. 24).

Bei transgenen Mäusen mit der t(14;18) entwickelte sich eine folliculäre Hyperplasie, wobei sich die polyklonalen B-Zellen meist in der G0/G1-Phase des Zellzyklus befanden (McDonnell TJ et al., 1989; McDonnell TJ et al., 1990).

Im Laufe der Zeit jedoch entwickelten die Mäuse diffus-großzellige B-Zell-Lymphome. Dies deutet darauf hin, dass für eine Tumorprogression sekundäre genetische Veränderungen stattfinden müssen. Tatsächlich zeigten sich bei ca. der Hälfte der Mäuse mit Transformationen im Verlauf zusätzliche Translokationen, wobei c-myc unter die Kontrolle des Immunglobulin-Schwere-Ketten Locus geriet.

Folglich ergab sich eine Kombination aus einem Überlebensvorteil (Bcl-2) mit einem Proliferationsstimulus (c-myc) – sog. „double hit“ (Mc Donnell TJ et al., 1991). Allerdings scheint das gleichzeitige Auftreten von Bcl-2-Translokationen und Rearrangements von c-myc bei folliculären Lymphomen des Menschen eher eine Rarität zu sein (Yano T et al., 1992).

Die morphologische Transformation von humanen folliculären Lymphomen ist in einem Teil der Fälle mit dem Auftreten von somatischen Mutationen im translokierten Bcl-2-Gen assoziiert (Matolcsy A et al., 1996). Ferner besitzt Bcl-2 auch eine – von der antiapoptotischen Wirkung unabhängige – Hemmfunktion auf den Zellzyklus, wodurch die Notwendigkeit von sekundären genetischen Alterationen für die Tumorprogression ebenfalls unterstrichen wird (Vairo G et al., 1996; Huang DC et al., 1997; Gil-Gómez G et al., 1998).



**Abb. II.4:** Bcl-2/J<sub>H</sub>-Rearrangements finden sich am häufigsten im Bereich der „major breakpoint area“ (MBR, siehe Pfeil) des Bcl-2 Gens, können aber auch in der „minor cluster region“ (MCR) stattfinden. Gelegentlich erfolgt das Rearrangement auch im Bereich der „variable cluster region“ (VCR); kb: Kilobasen; V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub>, J<sub>H</sub>, C<sub>H</sub>: „variable-“, „diversity-“, „joining-“ und „constant“-Abschnitte des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gens (vgl. Abschnitt 2.4)(Abb. nach Arber DA, 2000).

#### *Verwendung der Bcl-2-Translokation für die molekulare Diagnostik*

Die meisten folliculären Lymphome haben – wie erwähnt – eine Bruchstelle bei 18q21 (s. o.). Ungefähr 60-70% dieser chromosomalen Bruchstellen finden sich in der „major breakpoint region“, der Rest liegt in der Regel in der „minor cluster region“ oder in der vor kurzem

identifizierten „intermediate cluster region“, die zwischen den beiden erst Genannten liegt (Albinger-Heygi A et al., 2002; Aster JC et al., 2002) (vgl. **Abb. II.4**; S. 24).

Der Nachweis der t(14;18) ist für die Diagnostik der meisten follikulären Lymphome normalerweise nicht notwendig, da eine sichere diagnostische Zuordnung in aller Regel anhand der Morphologie und der Immunhistochemie möglich ist. Allerdings lassen sich mit dem Nachweis dieser Translokation – ähnlich wie beim IgH-Rearrangement – Mutmaßungen über eine mögliche klonale Verwandtschaft anstellen. Lässt sich aus Tumorgewebe zweier unterschiedlicher Biopsiestellen ein Bcl-2-Rearrangement (z. B. mittels PCR mit Consensus-Primern für die „major breakpoint region“ [MBR]) gleicher Größe nachweisen, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Abstammung vom selben Tumorklon vor, weil die Translokation im Verlauf der Erkrankung stabil bleibt (Raffeld M et al., 1987).

### *Bcl-2: Immunhistochemie*

Das Bcl-2-Protein wird normalerweise in ruhenden B-Lymphozyten exprimiert. Die B-Zellen des Keimzentrums weisen es in der Regel nicht auf. Die Bcl-2-Färbung ist somit in reaktiven Keimzentren negativ. Bei follikulären Lymphomen hingegen ist die Reaktion in 85% der Fälle positiv. Die Bcl-2 Färbung ist deshalb von besonderem Nutzen für die Unterscheidung einer reaktiven follikulären Hyperplasie von follikulären Lymphomen. Ebenso ist die B-CLL sehr häufig positiv für Bcl-2. Folglich lassen sich B-CLL und follikuläre Lymphome hierdurch differentialdiagnostisch nicht abgrenzen. Ferner findet sich eine Positivität in bis zu 72% der diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome (Gelb AB et al., 1994; Wang T et al., 1995; Smith MR, 1996; Lai R et al., 1998; Chu PG et al., 2000).

Es ist von Bedeutung – besonders für den Pathologen – dass die Expression des Bcl-2-Onkogen-Proteins nicht unbedingt von der t(14;18) abhängt. Zellen, die keine t(14;18) aufweisen, können sehr wohl Bcl-2 exprimieren (Pezella F et al., 1990; Papakonstantinou G et al., 2001). Umgekehrt müssen Zellen mit t(14;18) nicht immer eine Expression von Bcl-2 zeigen (Wang J et al., 1993; Kramer MH et al., 1998). Insgesamt scheint die Korrelation zwischen der durch Immunhistochemie detektierbaren Expression und der t(14;18) aber akzeptabel zu sein (Aster JC et al., 2002).

### 2.5.2 p53

#### *p53: Allgemeines*

Bei p53 handelt es sich um ein nukleäres Phosphoprotein, welches als Transkriptionsfaktor fungiert. Es agiert als ein wichtiger Modulator, der verschiedenste Gene an- oder abschalten kann. Ferner hemmt es die DNA-Replikation und dient als wichtiges Kontrollelement für die Progression des Zellzyklus von der G1- zur S-Phase, sowie von der G2- zur M-Phase („Wächter des Genoms“). Wild-Typ p53 hemmt die Proliferation von Zellen (Milner J, 1997; Lane DP, 1999). Des Weiteren spielt p53 eine wichtige Rolle bei der Induktion und Regulation der Apoptose. Durch die Blockade der Angiogenese vermag p53 einen weiteren für die Entstehung und Progression von Tumoren entscheidenden Faktor zu beeinflussen (Kirsch DG et al., 1998).

Die Inaktivierung von p53 z. B. durch Mutation, Sequestration oder die Bindung an andere Proteine führt zu einer erhöhten Proliferationsrate, vermehrter genetischer Instabilität und dem Verlust von wichtigen Kontrollpunkten beim Durchlaufen des Zellzyklus, wodurch die Vermehrung von transformierten Zellen gefördert wird. Der Verlust der Funktionstüchtigkeit von p53 kann zur Resistenz gegen Apoptose führen, und kann somit als Erklärungsmöglichkeit für eine Therapieresistenz gegen verschiedene Zytostatika dienen (Chin KV et al., 1992; Lowe SW et al., 1993).

#### *Die Bedeutung von p53 bei ausgewählten B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen*

p53-Mutationen scheinen bei menschlichen Lymphomen relativ spät aufzutreten und korrelieren dann häufig mit aggressiveren Subtypen und Rezidiven. Die Inaktivierung von p53 bei NHL ist folglich vermutlich mit einer schlechteren Prognose assoziiert. (Hollstein M et al., 1991; Ichikawa A et al., 1997; Levine AJ, 1997; Milner J, 1997; Amundson SA et al., 1998; Kirsch DG et al., 1998; Nieder C et al., 2001; Hsi ED et al., 2001).

Durchschnittlich ließen sich bei 12,5% aller Lymphome Mutationen im p53-Gen nachweisen. Bei den diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen wurde in 22% der Fälle mutiertes p53 gefunden (Ichikawa A et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass p53-Mutationen bei folliculären Lymphomen mit histologischer Transformation in mindestens 25-30% (teilweise bis 80%) der Fälle vorhanden sind (Sander CA et al., 1993; Lo Coco F et al., 1993). Bei indolenten Lymphomen wie der CLL und folliculären Lymphomen ohne Hinweise für histologische Transformation treten p53-Alterationen hingegen deutlich seltener auf (Sanchez-Beato M et al., 2003).

Insgesamt sind die Daten über die prognostische Bedeutung von p53-Mutationen bei B-NHL uneinheitlich. Lediglich bei Mantellzell-Lymphomen scheinen p53-Alterationen eindeutig mit einer schlechteren Prognose und histologisch aggressiveren Varianten einherzugehen (Louie DC et al., 1995; Greiner TC et al., 1996; Hernandez L et al., 1996; Nieder C et al., 2001).

#### *p53: Immunhistochemie*

Die gängigen Antikörper für p53 erkennen sowohl mutiertes als auch normales p53-Protein. Allerdings ist die Halbwertszeit des mutierten Proteins verlängert und die Menge des exprimierten p53-Wild-Typs normalerweise gering. Eine eindeutige Anfärbung durch den Antikörper ist somit ein relativ starker Hinweis für eine p53-Mutation (vor allem bei B-NHL), auch wenn die Korrelation zwischen positiver Immunhistochemie und nachweisbarer p53-Mutation nicht ideal ist (Sander C et al., 1993; Amundsen SA et al., 1998; Kirsch DG et al., 1998; Hsi et al., 2001; Sanchez-Beato M et al., 2003).

Immunhistochemisch zeigen 17-40% aller diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome, 12-22% aller Mantelzell-Lymphome und ca. 30% aller transformierten follikulären Lymphomen eine Positivität für p53. (Piris MA et al., 1994; Kramer MH et al., 1996; Sanchez E et al., 1998; Louie DC et al., 1995; Greiner TC et al., 1996; Hernandez L et al., 1996; Sander CA et al., 1993).

### **2.5.3 Bcl-6**

#### *Bcl-6: Allgemeines*

Das Proto-Onkogen Bcl-6 wurde ursprünglich durch seine Beteiligung bei chromosomalen Translokationen im Bereich von 3q27 bei diffus-großzelligen Lymphomen der B-Zellreihe entdeckt (Ye BH et al., 1993; Baron BW et al., 1993; Kerckaert JP et al., 1993). Das Bcl-6-Protein ist ein POZ/Zinkfinger-Transkriptions-Repressor-Protein, welches in der B-Zellreihe selektiv durch B-Zellen der Keimzentren exprimiert wird. Keine Expression von Bcl-6 wird bei unreifen B-Zellen und ausdifferenzierten Plasmazellen gefunden (Cattoretti G et al., 1995).

In experimentellen Tiermodellen wurde gezeigt, dass Bcl-6 von großer Bedeutung für die Bildung und Funktion von Keimzentren ist. Die alterierte Expression von Bcl-6 in Lymphomen scheint also eine Störung des Weges, der normalerweise zur B-Zell-Proliferation und Bildung von funktionstüchtigen Keimzentren führt, zu repräsentieren (Dent AL et al., 1997; Ye BH et al., 1997).

Es existieren zwei Wege für mögliche Alterationen von Bcl-6. Zum einen handelt es sich hierbei um Translokationen, die zur Substitution des Promotors führen. Solche Rearrangements treten in 30% der diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome auf (Bastard C et al., 1994; Lo Coco F et al., 1994; Offit K et al., 1994; Ye BH et al., 1995; Volpe G et al., 1996). Translokationen mit einem Abschnitt des Immunglobulin-Gens als Partner (wodurch es zu einer vermehrten Expression von Bcl-6 kommt) scheinen mit einer besseren, Translokationen mit anderen Partnern (die dazu führen, dass weniger Bcl-6 exprimiert wird) hingegen mit einer schlechteren Prognose einherzugehen (Offit K et al., 1994; Akasaka T et al., 2000; Ueda C et al., 2002).

Zum anderen treten – unabhängig von zytogenetischen Translokationen im Bereich von 3q27 – Punktmutationen in der 5'-nicht-codierenden Region des Gens auf. Diese Mutationen werden als eine Art Marker für das Durchlaufen des Keimzentrums durch eine B-Zelle angesehen, weil sie in 30% bis 50% aller normalen Keimzentrums- und Memory-B-Zellen auftreten. Bei B-Lymphozyten hingegen, die das Keimzentrum noch nicht durchlaufen haben, scheinen sie nicht aufzutreten (Migliazza A et al., 1995; Pasqualucci L et al., 1998; Shen HM et al., 1998; Peng HZ et al., 1999; Capello D et al., 2000).

In der vorliegenden Studie wurde allerdings nur die Bcl-6-Expression immunhistochemisch als Marker für den Keimzentrumsursprung von Zellen untersucht.

#### *Bcl-6: Immunhistochemie*

Wie eben erwähnt kann die Expression von Bcl-6 als Marker für B-Zell-Neoplasien dienen, die ihren Ursprung von B-Zellen des Keimzentrums haben. So exprimieren bei folliculären Lymphomen fast 100% und bei diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen ca. 80% der Fälle Bcl-6. Allgemein scheint eine starke Bcl-6-Expression auch einen hohen Proliferationsindex von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen anzuzeigen (außer bei folliculären Lymphomen) (Sanchez-Beato M et al., 2003).

Vermutlich ist eine starke Expression von Bcl-6 bei diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen ein prognostisch günstiges Zeichen (Artiga MJ et al., 2002).

## 2.6 Einige immunhistochemische Marker bei Non-Hodgkin-Lymphomen

### *CD20*

Antikörper wie L26, die gegen CD20 gerichtet sind, erkennen ein membranständiges Phosphoprotein, das in nennenswerter Menge nur auf B-Zellen vorhanden ist. Das CD20 - Antigen wird ab dem späten Prä-B-Zellstadium bis hin zu reifen B-Zellen exprimiert und verschwindet erst unmittelbar vor der Differenzierung zu Plasmazellen (Tedder F et al., 1994; Chu PG et al., 2000). Eine starke Expression von CD20 findet sich auf reifen B-Zellen, allerdings exprimieren möglicherweise – wenn auch sehr schwach – bestimmte T-Zellen vereinzelt CD20. Andere Zellen der hämatopoietischen Reihe und mesenchymale Zellen besitzen normalerweise kein CD20 (Kurtin PJ et al., 1985; Hall PA et al., 1988; Gelb AB et al., 1994).

Immunhistochemisch zeigen 95% aller B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome und 92% aller nodulären lymphozytenreichen Hodgkin Lymphome eine Positivität für CD20, ausgenommen das Vorläufer-B-Zell lymphoblastische Lymphom, welches CD20 in nur 50% der Fälle exprimiert. B-Zell Neoplasien, die von Plasmazellen abstammen wie Multiple Myelome sind in der Regel negativ. Die CD20-Expression ist bei der B-CLL/dem kleinzelligen lymphozytischen Lymphom meist schwach ausgeprägt. Darüber hinaus kommt eine CD20-Positivität bei Reed-Sternberg Zellen in 25% der Fälle von klassischem Morbus Hodgkin vor (Cartun RW et al., 1987; Medeiros LJ et al., 1988; Davey FR et al., 1990; Schmid C et al., 1991; Contos MJ et al., 1992; Rudiger T et al., 1998; Chu PG et al., 2000).

### *CD3*

Gegen CD3 gerichtete Antikörper detektieren ein Protein auf der Oberfläche von reifen T-Zellen, das mit dem T-Zellrezeptor assoziiert ist. Unreife T-Zellen, bei denen das T-Zellrezeptor Gen noch nicht rearrangiert ist, besitzen kein CD3 auf der Zelloberfläche, weisen allerdings das Protein oftmals im Zytoplasma auf. Eine CD3-Expression findet sich im Laufe der T-Zell Entwicklung nämlich zuerst im Zytoplasma, im späteren Stadien dann an der Zelloberfläche. Im Paraffin-Gewebe lässt sich eine Positivität in ca. 80% aller T-Zell Lymphome nachweisen (Picker LJ et al., 1988; Mason DY et al., 1989; Cabecadas JM et al., 1991; Schmid C et al., 1991).

Eine positive Färbung für CD3 auf der Zellmembran ist ziemlich spezifisch für T-Zellen bzw. T-Zell Lymphome. Der immunhistochemische Nachweis von CD3 ist deshalb auch sehr hilfreich bei der Abgrenzung von reaktiven Infiltraten gegenüber einem Befall durch ein B-Zell-Lymphom im Knochenmark. (Arber DA et al., 1996; Chu PG et al., 2000)

### *CD10*

CD 10 ist eine Metalloendopeptidase der Zellmembran, die auch unter dem Namen „common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA)“ bekannt ist. CD10 kommt auf der Zelloberfläche von normalen frühen lymphatischen B-Vorläuferzellen des Knochenmarks und besonders bei B-Zellen des Keimzentrums vor. Ebenso besteht eine schwache Expression auf reifen Granulozyten und fetalen Leberzellen. Auf reifen T-Zellen und B-Zellen außerhalb des Keimzentrums wird es in der Regel nicht exprimiert (Kiyokawa N et al., 1990).

Follikuläre Lymphome exprimieren CD10 in ca. 60% und diffus-großzellige B-Zell-Lymphome in ca. 25% der Fälle (Kaufmann O et al., 1999).

Es ist wichtig zu wissen, dass auch zahlreiche nicht-lymphatische Gewebe und Tumoren CD10 positiv sein können wie Bürstensaumzellen der Niere, Darmepithelien, Myoepitheliale Zellen der Brustdrüse, Gallen-Canaliculi, Nierenzellkarzinome und Sarkome des endometrialen Stromas (Chu PG et al., 2000; Arber DA, 2000).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Herkunft und Sammlung des Materials

##### *Studienfälle*

Für die Studie wurde das Archivregister des Instituts für Pathologie und pathologische Anatomie des Klinikums rechts der Isar der TU München von Januar 1992 bis Dezember 2001 untersucht. Hierzu wurden primär alle Knochenmarksbefunde, die positiv für ein NHL waren, daraufhin durchgesehen, ob sich Hinweise auf eine diskordante Infiltration fanden. Registriert wurden vorerst sowohl Befunde mit Hinweisen auf eine klassische Diskordanz (zeitgleiches Vorhandensein eines niedrigmalignen NHL im KM bei hochmalignem Befall außerhalb des Marks zum Zeitpunkt der Primärdiagnose), als auch im weiteren Sinne diskordante NHLs (Fälle mit extramedullärer Transformation eines vorbestehenden niedrigmalignen Lymphoms).

Das Hauptaugenmerk der Studie war zwar auf die klassisch diskordanten Fälle gerichtet, dennoch wurde zu Beginn eine etwas umfassendere Suche durchgeführt, um eine möglichst umfassende Aufstellung zu erhalten.

Zudem wurden auch alle extramedullären Befunde mit Befall durch ein NHL durchgesehen, um die Fälle zu finden, bei denen der Knochenmarksbefund im Register nicht richtig verschlüsselt war.

Dadurch wurde eine vollständige Erfassung aller Fälle mit Material für beide Biopsie-Stellen (Knochenmark und primäre diagnostische Gewebeprobe) sichergestellt.

Die Gewebeblöcke der betreffenden Fälle wurden aus dem Archiv des Instituts für Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie herausgesucht.

##### *Kontrollfälle*

Hierzu wurden Lymphknoten- und Knochenmarkbiopsien von 4 Patienten mit follikulären Lymphomen (Grad I bzw. II) und konkordantem Knochenmarksbefall herausgesucht. Ferner wurden die Gewebelöcke von 3 Patienten mit diffus-großzelligen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen mit eindeutig (benignen) reaktiven lymphoiden Infiltraten im Knochenmark für eine weitere Kontrollgruppe herangezogen. Alle Schnitte wurden mit zwei erfahrenen Pathologen (Prof. Dr. Falko Fend, Dr. Marcus Kremer) nach der R.E.A.L.-Klassifikation evaluiert und gegebenenfalls reklassifiziert.

### *Sammlung klinischer Daten*

Alle klinischen Unterlagen, der immunhistochemisch und molekular untersuchten Fälle wurden eingesehen und die relevanten Daten zu Diagnose und Behandlung katalogisiert. Besondere Beachtung fanden dabei die Ergebnisse durchflusszytometrischer Untersuchungen des Knochenmarks.

## **3.2 Herstellung von Präparaten für Histologie, Immunhistochemie und Mikrodissektion**

Das Gewebe der Biopsien war unmittelbar nach dem operativen Eingriff entsprechend histologischen Standardprotokollen des Instituts für Allgemeine und Pathologische Anatomie in Formalin (4%) fixiert und in Paraffinblöcke eingebettet worden. Die Knochenmarksbiopsien aus dem Beckenkamm waren z. T. in 1% Formaldehyd/ 0,5% Glutaraldehyd (pH 7,4) und z. T. in 10%-igen Formalin über 24 Stunden fixiert, 48 Stunden lang in gepufferten Na-EDTA (pH 7,0) entkalkt und in Paraffin eingebettet worden.

Zur Primärdiagnose dienten histologische Standard-Färbungen wie HE, Giemsa, PAS, Naphthol-AS-D-Chloroacetatesterase und Gomori sowie immunhistochemische Untersuchungen (siehe unten).

Die Gewebelöcke wurden im Institut für Pathologie des Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit (GSF), Oberschleißheim, nach Standardprotokollen für die Immunhistochemie geschnitten (Dicke: 1–2 µm), auf dünne Glasobjektträger (Länge: 76 mm, Breite: 34 mm, Dicke: 0,17 mm; Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim) aufgebracht. Zur Re-Evaluation wurde pro Gewebelöck ein Schnitt entparaffiniert und HE gefärbt. Von den Knochenmarksbiopsien wurden Schnitte von ca. 1–2 µm Dicke angefertigt und pro Gewebelöck auch jeweils ein HE-Präparat hergestellt.

### 3.3 Immunhistochemie

#### *Antikörper*

Bei allen nodalen wie extranodalen Lymphom-Biopsien wurden immunhistochemische Färbungen gegen CD20 (L26, Dako, Kopenhagen, Dänemark), CD3 (polyklonal, Dako), CD10 (Novocastra, Newcastle, Großbritannien), Bcl-2 (Dako), Bcl-6 (Novocastra) und p53 (Dako) durchgeführt. In ausgewählten Fällen wurden zudem noch CD5 (Klon 4C7, Novocastra), Cyclin D1 (Klon P2D11F11, Novocastra), Ki67 (MIB 1, Dako) und p27<sup>Kip1</sup>-Antikörper (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA) eingesetzt. Aufgrund der Tatsache, dass die Fixierung des Knochenmarks mit einprozentigem Formaldehyd und Glutaraldehyd (0,4%) eine zu starke Proteinvernetzung und dadurch eine herabgesetzte Immunreaktivität bewirkt, wurden von den Knochenmarksschnitte ausschließlich CD20- und CD3-Färbungen angefertigt.

#### *Durchführung der Immunhistochemie*

Die Schnitte wurden nach folgendem Protokoll entparaffiniert:

2 x 5 Minuten	in jeweils frischem Xylol
2 x 5 Minuten	in 100% Ethanol
1 Minute	in 100% Ethanol
2 x 1 Minute	in jeweils 96% Ethanol
1 Minute	in 80% Ethanol
3 Minuten	Waschen in fließendem Wasser

Während des Entparaffinierens wurde der Puffer für den nächsten Schritt (Kochen der Schnitte in der Mikrowelle) hergestellt. Pro Arbeitsgang wurden 1,5 Liter eines 10 mM Citratpuffers (pH = 6) eingesetzt. Die genaue Anleitung zur Herstellung der Lösung ist im Anhang (Abschnitt **8.2**; S. 88 f.) aufgeführt.

In den Versuchsreihen kam die Antigenwiederherstellungsmethode („antigen retrieval“) durch Erhitzen zum Einsatz. Durch das Formalin, das zur Fixierung der Präparate eingesetzt wurde, werden die Proteine des Gewebes stark vernetzt. Kochen bei ausreichend hoher Temperatur bewirkt, dass diese Proteinvernetzung gelöst wird und die Bindungen für die Immunhistochemie geöffnet werden.

Die nun paraffinfreien Schnitte wurden in Glasschaukeln in einem Schnellkochtopf für die Mikrowelle so nebeneinander platziert, dass ein vollständiges und berührungsfreies Eintauchen der Objektträger in den Citratpuffer gewährleistet war.

Die Glasschaukeln wurden immer voll beladen. Wenn weniger als die maximale Anzahl an Gewebeschnitten in den Kochtopf geladen waren, wurden – zur besseren Wärmeverteilung – die verbleibenden Plätze mit leeren Objektträgern aufgefüllt.

Der Topf wurde mit den vorbereiteten 1,5 Liter Puffer aufgefüllt, wobei besonders darauf geachtet wurde, dass die Ränder und der einzulegende Gummiring des Schnellkochtopfs trocken blieben (notwendig für dichten Verschluss), und verschlossen. Nach Verschließen des Topfes wurde die Mikrowelle für 35 Minuten auf Höchstleistung (800 Watt) gestellt. Unter diesen Bedingungen dauert es ca. 20 Minuten bis die maximale Temperatur erreicht ist.

Nach dem Kochen wurde unter den notwendigen Sicherheitsvorkehrungen (Handschuhe und Schutzbrille) der Druck abgelassen und die Objektträger sofort in 20°C TBS („tris-buffered saline“: genaue Zusammensetzung: siehe Anhang, Abschnitt **8.2**; S. 89) mit 3% Ziegen Serum (Sigma, Deisenhofen) überführt und darin für mindestens 20 Minuten inkubiert. Das Ziegen Serum soll dazu dienen, unspezifische Bindungen des Gewebes zu blockieren, so dass sich der Antikörper nur an die gewünschten Bindungen anheften kann.

Währenddessen wurden computerlesbare Klebeetiketten, mit exakter Bezeichnung des Falls, des Antikörpers, der Verdünnung und des Datums, für die Ventana-Immunhistochemie-Maschine (automated immunostainer, Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA) hergestellt. In der Zwischenzeit wurde zudem der Antikörper nach Vorschrift mit Diluent (Dako, Kopenhagen, Dänemark) verdünnt und in benötigter Menge bereitgestellt.

Folgende Verdünnungsstufen und Postivkontrollen wurden verwendet:

Antikörper	Verdünnung	Positivkontrolle
CD20	1:500	Tonsille (mit chronischer Tonsillitis)
CD3	1:200	Tonsille (mit chronischer Tonsillitis)
p53	1:100	Kolonkarzinom
Bcl-2	1:100	Tonsille (mit chronischer Tonsillitis)
Bcl-6	1:40	Tonsille (mit chronischer Tonsillitis)
CD10	1:100	Tonsille (mit chronischer Tonsillitis)
cyclinD1	1:10	Mantelzell-Lymphom mit der t(11;14)
p27	1:1000	Lymphknoten mit folliculärer Hyperplasie
MIB1	1:10	Tonsille (mit chronischer Tonsillitis)

Nach der Inkubation wurden die Objektträger unten und rund um das Gewebe abgetrocknet, damit alle Ränder und die gesamte Unterseite trocken waren, und die Schnitte mit den entsprechenden Etiketten für die Ventana-Maschine versehen. Als nächstes wurden die Schnitte in eine zuvor vorbereitete feuchte Kammer gelegt und jeweils 100 µl des verdünnten Antikörpers auf das Gewebe pipettiert – ohne Luftblasenbildung und ohne Überlaufen der Flüssigkeit über den Glassrand. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die weiteren Schritte – sekundärer Antikörper, Avidin-Biotin Komplex (ABC), Farbentwicklung und Gegenfärbung – erfolgten automatisiert in einem „immunostainer“ (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA) gemäß dem für den jeweiligen Antikörper notwendigen Programm. Zum Abschluss wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (1 x 80%, 2 x 96%, 2 x 100 % Ethanol, 2 x Xylol und Aufkleben des Deckelchens mit Eukitt), eingedeckelt und getrocknet.

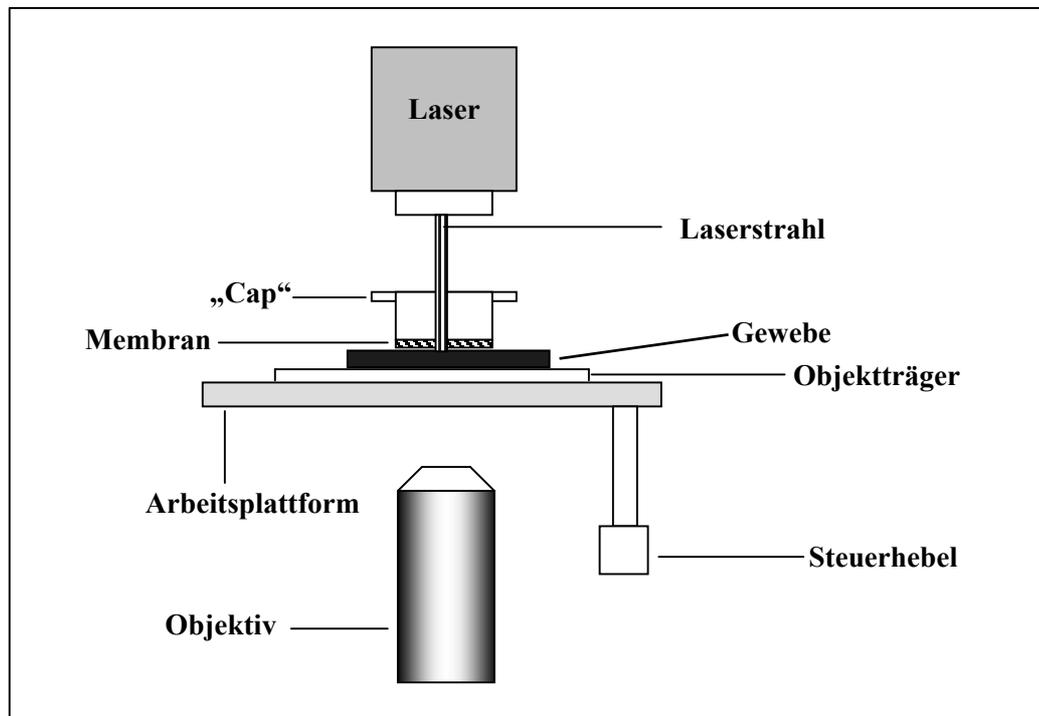
### **3.4 Mikrodissektion**

#### **3.4.1 Laser Capture Mikrodissektion (LCM)**

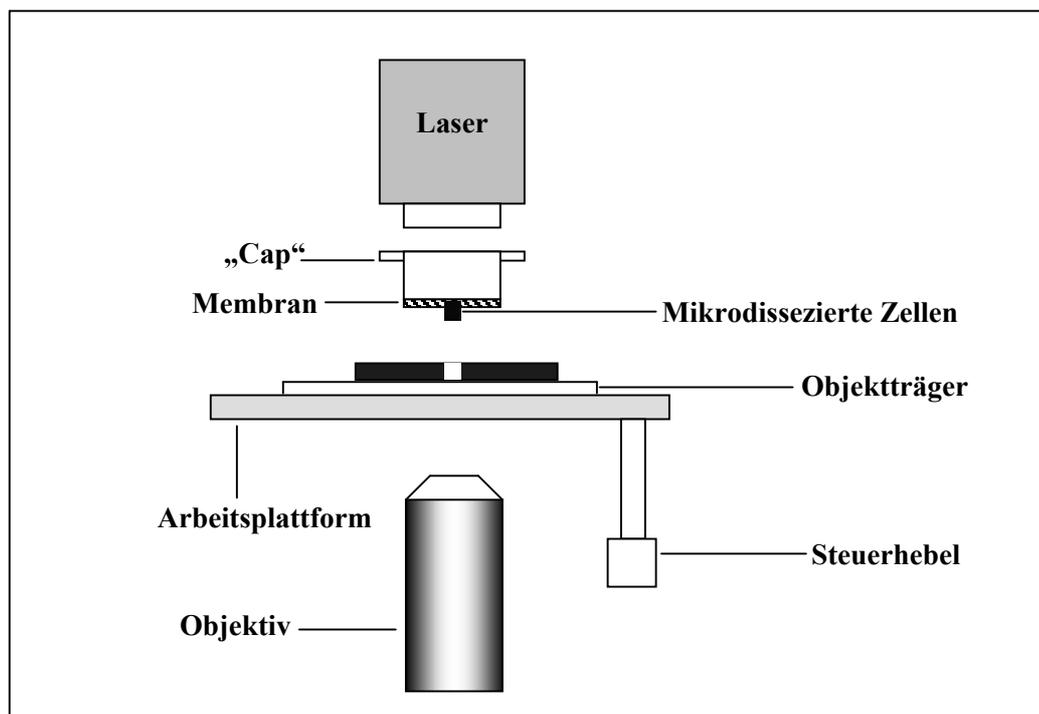
##### *Prinzip der Laser Capture Mikrodissektion (LCM)*

Mit der Laser Capture Mikrodissektion (LCM) steht eine elegante Methode zur Gewinnung von ausgewählten Zell-Populationen aus histopathologischen Schnitten mit verschiedenen komplexen Gewebeanteilen zur Verfügung. Bei dieser Technik wird ein durchsichtiger, thermoplastischer Film (aus Ethylen Vinyl Acetat) in direkten Kontakt mit der Oberfläche des Objektträgers gebracht. Unter mikroskopischer Kontrolle kann dann mittels eines Infrarotlaser-Impulses mit definierter Energie auf einem 7,5 bis 30 µm großen Areal (je nach Voreinstellung durch den Anwender) der Film mit den interessierenden Zellen zur Verschmelzung gebracht werden. Die hierbei entstehenden Adhäsionskräfte zwischen geschmolzenem Film und Gewebe erlauben das selektive Abheben der zu untersuchenden Zellen vom Glasobjektträger. Da die meiste Energie des Lasers durch die Membran absorbiert wird, bleiben die zu untersuchenden biologischen Makromoleküle wie die DNA weitgehend intakt. Ferner entstehen durch die niedrige Energie des Infrarot-Lasers kaum für das Material schädliche photochemische Effekte (Emmert-Buck MR et al., 1996; Bonner RF et al., 1997; Goldstein SR et al., 1998; Fend F et al., 2000 (a)).

Die Funktionsweise der LCM sei durch folgende Abbildungen (**Abb. III.1a** und **Abb. III.1b**) grob skizziert:



**Abb. III.1a:** Die Aktivierung des Lasers führt zur Verschmelzung der Membran mit dem Gewebeschnitt in einem unter mikroskopischer Kontrolle definiertem Areal. Abbildung nach Fend F et al., 2000 (a).



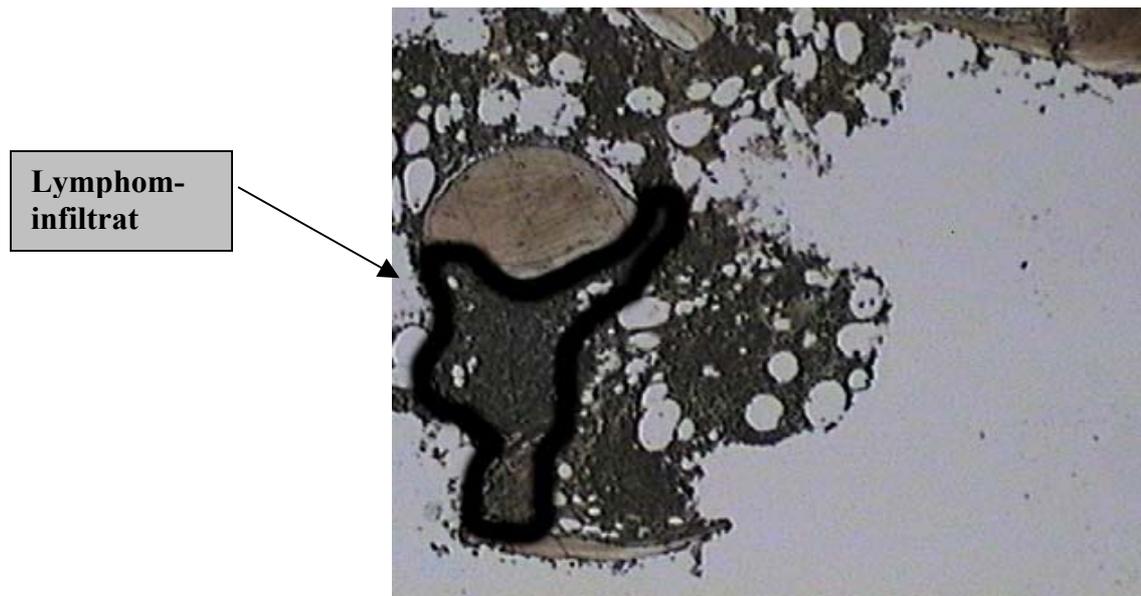
**Abb. III.1b:** Durch das Anheben des „Caps“ werden die mit der Membran verschmolzenen Zellen vom Schnitt entfernt. Abbildung nach Fend F et al., 2000 (a).

### *Durchführung der Laser Capture Mikrodissektion*

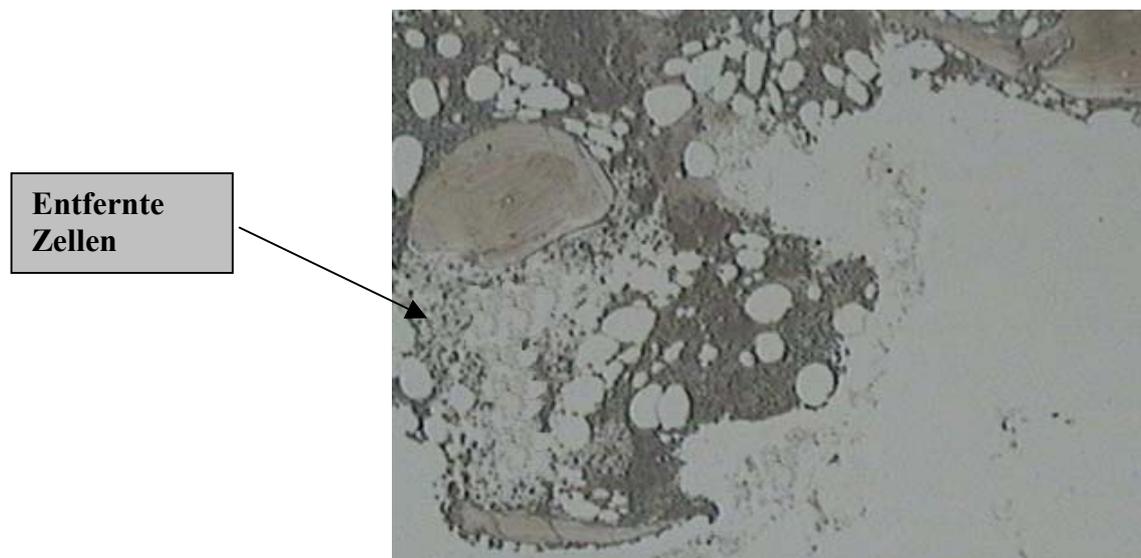
Die Schnitte für die LCM wurden nach folgendem Verfahren vorbereitet (modifiziert nach Jin L et al., 1999):

Schnitte des in Paraffin eingebetteten Knochenmarks von 4 bis 5  $\mu\text{m}$  Dicke wurden nach Standardmethoden angefertigt. Die Knochenmarksschnitte wurden entparaffiniert, kurz mit Hämalaun gegengefärbt und für 20 Minuten in eine 3%-ige Glycerinlösung gestellt, um die Ablösung der Zellen nach der LCM vom Glasobjektträger zu erleichtern. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit einer aufsteigenden Reihe, bestehend aus 96% und 100% Ethanol dehydriert, und für mindestens 20 Minuten in reines Xylol überführt. Schließlich wurden die Schnitte für mindestens einen Tag in einem mit Xylol gefüllten Gefäß luftdicht verschlossen aufbewahrt. Unmittelbar vor der LCM wurden die Schnitte entnommen und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Für die LCM kam das Pix Cell II System (Arcturus Engineering Inc., Mountain View, California, USA) in Verbindung mit einem Computer für zusätzliche Laserkontrolle und zur Bilddokumentation zum Einsatz. Die in Serie angefertigten HE bzw. Hämalaun-Färbungen dienten dabei als Orientierungshilfe zum Auffinden der Infiltrate. Bei kleinen Infiltraten wurde eine immunhistochemische Untersuchung gegen CD20 herangezogen, um die Infiltratzellen sicher detektieren zu können. Je nach Infiltratgröße wurden dann gezielte Laserstrahlpulse mit einem Durchmesser von 30  $\mu\text{m}$  mit 60 mW (großes Infiltrat) bzw. von 7,5  $\mu\text{m}$  Durchmesser mit 43 mW (kleines Infiltrat) auf die Folie über den zu untersuchenden Zellen abgegeben. Die Zellen, die mit der Folie – welche wiederum fest mit dem „cap“ (siehe **Abb. III.1a** und **Abb. III.1b**; S.36) verbunden war – verschmolzen waren, wurden mit dem mechanischen Transportarm abgehoben (vgl. ferner **Abb. III.2a** und **Abb. III.2b**; S. 38). Anschließend wurden der Bereich der Folie auf dem sich Zellen befanden unter dem Mikroskop mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und das betreffende Folienstück mit der Skalpellspitze in ein 0,5 ml Mikrozentrifugen-Gefäß überführt. Auf diese Weise wurde Zellmaterial von 4 bis 5 Schnitten je Fall in einem 0,5 ml Gefäß gesammelt. Schließlich wurden auf die Folienstückchen 20  $\mu\text{l}$  PK-(DNA)-Puffer (Zusammensetzung: vgl. Anhang, Abschnitt **8.3**) und 2  $\mu\text{l}$  Proteinase K pipettiert und der Ansatz für ca. 12 Stunden bei 56°C inkubiert. Nach Inaktivierung der Proteinase K (10 min bei 95°C) verwendete man den Ansatz für die PCR (siehe dort).

In einem Fall (Fall 24) musste wegen der Kleinheit des Infiltrats zuerst eine immunhistochemische Färbung mit CD20 (L26) durchgeführt werden (Methode s. o.). Die nicht eingedeckelten Immunfärbungen wurden dann nach dem selben Verfahren wie die anderen Fälle bearbeitet. Lediglich die Gegenfärbung mit Hämalaun o. ä. entfiel (nach Fend F et al., 1999 und Fend F et al., 2000 (b)).



**Abb. III.2a:** Präparat vor LCM



**Abb. III.2b:** Präparat nach LCM

### 3.4.2 Manuelle Mikrodissektion

Bei größeren Infiltraten genügte es, eine manuelle Mikrodissektion durchzuführen. Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte nach dem selben Schema wie bei der Laser Capture Mikrodissektion. Die Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop mittels einer sterilen Injektionskanüle vom leicht mit destilliertem (und DNA-freiem Wasser) angefeuchteten Objektträger abgekratzt. Das so erhaltene Gewebe führte man ebenfalls sofort in ausreichend PK-(DNA)-Puffer über.

### 3.5 PCR

Ziel der meisten PCR-Verfahren ist, einen durch zwei flankierende Oligonukleotide (Primer) definierten Sequenzbereich aus einer im Gewebe vorliegenden DNA zu vermehren (Mullis KB, 1990). Eine detaillierte Aufstellung der eingesetzten Chemikalien findet sich im Anhang (Abschnitt 8.3; S. 89).

#### *Extraktion von DNA aus Paraffingewebe*

Alle zu untersuchenden Schnitte wurden nach dem gleichen Verfahren entparaffiniert unabhängig davon, ob eine Laser Capture oder eine manuelle Mikrodissektion bzw. keine Mikrodissektion notwendig war.

Bei allen Fällen erfolgte die Extraktion genomischer DNA auf die selbe Art und Weise: 18-100 µl PK-Puffer – je nach Menge des extrahierten Gewebes – und 5 µl Proteinase K (500 µg/ml) je Probe (versetzt mit Proteinase K: 4µl der Stocklösung auf 100 µl PK-Puffer); Inkubation des Ansatzes bei 56° C über Nacht; Inaktivierung der Proteinase K (10 Minuten bei 95°C). Anschließend folgte eine Zentrifugation der Ansätze (3.000 U/Minute) für 3 Minuten. Die DNA wurde nun entweder bei -20°C gelagert oder sofort in die PCR eingesetzt. (Darauffolgend wurde der Puffer mit der darin gelösten DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert).

#### *β-Globin-Kontrolle aller Fälle*

Die Effizienz einer PCR mit DNA aus Archivmaterial beträgt – besonders bei wenigen zu analysierenden Zellen nie 100% (Roehrl, MH et al., 1997). Die DNA-Qualität lässt sich mittels einer PCR für β-Globin – einem in allen Zellen vorhandenen „housekeeping“-Gen überprüfen.

Dies geschah bei allen vorhandenen Proben (Lymphknoten, Knochenmark etc.) nach folgendem Protokoll:

25 µl Ansatz in 0.5 ml Reaktionsgefäßen, bestehend aus 2,5 µl PCR-Puffer (20 mM MgCl<sub>2</sub>), 4 µl dNTPs mit einer Endkonzentration von 0,025 mM, je 0,5 µl der beiden Primer (Endkonzentration von jeweils 20 pmol):

Globin PC 04: 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'

Globin GH 20: 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'

0,25 µl Taq-Polymerase (5 units/µl), 2 µl der unverdünnten und 1: 10 verdünnten DNA und 15,25 µl (DNA-freiem) destilliertem Wasser. Um Kontaminationen mit Fremd-DNA auszuschließen, wurden bei jedem Reaktionsansatz Negativkontrollen, Ansatz ohne Proben-DNA, mit eingesetzt. Bei allen PCR-Untersuchungen kam derselbe Thermo-Cycler (Primus 96 plus, MWG Biotech AG, Ebersberg) zum Einsatz.

Die Zykluszahl betrug im Falle der β-Globin-Kontrollen 40. Initial wurde für 4 Minuten bei 94°C denaturiert, es folgten die Zyklen bestehend aus 1 Minute Denaturierung bei 94°C, 1 Minute Anlagerung der Primer an die Ziel-DNA bei 55°C sowie 1 Minute Synthesezeit bei 72°C. Nach Beendigung der Zyklen schlossen sich 7 weitere Minuten bei 72°C an. Am Ende des Programms wurden die PCR-Produkte auf 4°C abgekühlt.

5 µl des Ansatzes kamen bei der sich nun anschließenden Gelelektrophorese zum Einsatz, den Rest lagerte man bei -20°C. Die Elektrophorese erfolgte in einem 2%-igen Agarosegel (2g Agarose in 100ml 1xTBE [20 ml TBE Puffer, 80 ml Aqua dest.]), versetzt mit 1 Tropfen (3 µl) Ethidiumbromid. Als Elektrophorese-Puffer wurde 1xTBE verwendet. Die zu untersuchenden 5 µl PCR-Produkt wurden mit 1 µl PCR-Ladepuffer (10x Dyes) vermischt und in die Probentaschen pipettiert. Ebenso setzte man bei jedem Gel einen geeigneten Längenmarker ein (10 µl des verdünnten Markers IX: 1 µl Marker vermischt mit 1 µl Dyes und 8 µl Aqua dest.). Der Lauf des Gels fand für 30 Minuten bei 130 Volt statt. Anschließend wurden die DNA-Banden unter UV-Licht visualisiert und zur Dokumentation photographiert.

*PCR für das Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen-Rearrangement (FR3A)*

Die Untersuchung erfolgte mit Konsensusprimern für die „Framework“-Region 3 des variablen Abschnitts und für die J(joining)-Region (JHa) des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gens (nach Segal GH et al., 1994).

Primersequenzen:

FR3A: 5'-ACA CGG C(C/T)(G/C) TGT ATT ACT GT-3';

JHa: 5'-ACC TGA GGA GAC GGT CAC C-3' (jeweilige Konzentration: 20 pmol).

Da im Anschluss an die PCR eine Fragment-Längen-Analyse durchgeführt werden sollte, war einer der beiden Primer fluoreszenzmarkiert (JHa).

Jeder Fall wurde – zwecks Nachweis der Reproduzierbarkeit – mindestens im doppelten Ansatz untersucht (meist unverdünnte und 1:10 verdünnte Proben-DNA).

25 µl des Reaktionsansatzes hatten folgende Zusammensetzung:

Aqua dest.	15,25 µl	Primer 1 (FR3A)	0,5 µl
dNTPs	4 µl	Primer 2 (JHa)	0,5 µl
Puffer 20mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl	<i>AmpliTag</i> Gold	0,25 µl

Am Ende pipettierte man 2 bis 8 µl DNA dazu. Bei mehr als 2 µl eingesetzter DNA reduzierte man die Menge des destillierten DNA-freien Wassers entsprechend, um ein Gesamtvolumen von 25 µl zu erhalten. Vor allem bei den mikrodisezierten Knochenmarksfällen mussten oftmals höhere Volumina DNA zugegeben werden (6 bis 8 µl). Als Kontrollfälle dienten bekannte monoklonale (Lymphom-DNA) und polyklonale (DNA eines reaktiven Lymphknotens) Proben. Auch Negativkontrollen zum Ausschluss von Kontaminationen fanden bei jedem Reaktionsansatz Verwendung.

Das eigentliche PCR-Programm lief dann folgendermaßen ab:

10 Minuten Denaturierung bei 95°C

40 Zyklen bestehend aus

1 Minute Denaturierung bei 94°C

1 Minute Anlagerung der Primer bei 56°C

1 Minute Synthesezeit bei 74°C

Vor dem Abkühlen auf 4°C schlossen sich dann noch 6 Minuten bei 74°C an. Die Elektrophorese erfolgte analog der β-Globin-Kontrollen. Allerdings wurde zur besseren Trennschärfe der Banden ein 3%-iges MetaPhor®-Gel eingesetzt. Bei den meisten Patienten konnten die PCR-Produkte von Lymphknoten bzw. sonstigem Lymphomgewebe und Knochenmark nebeneinander im gleichen Elektrophoresegel analysiert werden.

*PCR für FR2A des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gens*

Bei allen Proben, bei denen keine Klonalität mittels PCR für die „Framework“-Region 3 nachgewiesen werden konnte, versuchten wir die Amplifikation der „Framework“-Region 2 (FR2) mit Hilfe einer zweistufigen PCR („seminested“).

Die Vorgehensweise in der Übersicht (modifiziert nach Ramasamy I et al., 1992):

Primersequenzen:

FR2A: 5'-TGG RTC CGM CAG SCY YCN GG-3' (Konsensusprimer)  
(R: A oder G; M: A oder C; S: G oder C; Y: C oder T; N: A oder C oder G oder T)

LJH: 5'-TGA GGA GAC GGT GAC C-3'

VLJH\*: 5'-GTG ACC AGG GT(AGCT) CCT TGG CCC CAG-3'

\* je nach Aufgabenstellung fluoreszenzmarkiert oder nicht

Pro Ansatz 25 µl:

<b><u>FR2A, LJH (extern)</u></b> 35 Zyklen		<b><u>FR2A, VLJH (intern)</u></b> 25 Zyklen	
Aqua dest.	14,7 µl	Aqua dest.	15,0 µl
dNTPs	4,0 µl	dNTPs	4,0 µl
20 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl	15 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
FR2A Primer	0,65 µl	FR2A Primer	0,5 µl
LJH Primer	0,65 µl	VLJH Primer	0,5 µl
<i>AmpliTaqGold</i>	0,5 µl	<i>AmpliTaqGold</i>	0,3 µl
DNA (unverd. bzw. 1:10 verdünnt)	2,0 µl	DNA (aus 1. Runde unverd. und 1:50 verdünnt)	2,0 µl

Zudem wurden immer geeignete Positiv- (monoklonal und polyklonal) sowie Negativkontrollen eingesetzt.

PCR-Programm:

10 Minuten bei 95°C

35 bzw. 25 Zyklen mit 45 Sekunden Denaturierung (94°C)

1 Minute Anlagerung der Primer (74°C)

1 Minute Synthesezeit (74°C)

Am Ende folgten 10 Minuten bei 74°C und Abkühlen auf 4°C. Nach Beendigung der zweiten PCR schloss sich die Auftrennung der Banden in einem 3%-igen MetaPhor®-Gel an.

*PCR für die Bcl-2-Translokation t(14;18)*

Die Proben aller Patienten wurden auf die Translokation t(14;18) „major breakpoint region“ (mbr) untersucht (nach Stetler-Stevenson M et al., 1988):

Primersequenzen:

<u>Bcl-2:</u>	5'-TTA GAG AGT TGC TTT ACG TGG CCT-3'
<u>JH1-2-4-5:</u>	5'-GGA CTC ACC TGA GGA GAC GGT GAC C-3'
<u>JH3:</u>	5'-CAT CTT ACC TGA AGA GAG GGT GAC C-3'
<u>JH6:</u>	5'-AAA CAA AGG CCC TAG AGT GGC CAT T-3'

Pro 25 µl Reaktionsansatz:

Aqua dest.	14 µl	JH1-2-4-5	0,5 µl
dNTPs	4 µl	JH3	0,5 µl
Puffer 10 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl	JH6	0,5 µl
Bcl-2 Primer	0,5 µl	<i>AmpliTag</i> Gold	0,5 µl

Zugabe 2 µl DNA (meistens in einer 1:10 Verdünnung).

Als Positivkontrolle fand Material eines follikulären Lymphoms mit bekannter Bcl-2 Translokation (mbr) Verwendung.

PCR-Programm (Bcl-2):

	10 Minuten bei 95°C
40 Zyklen mit	1 Minute Denaturierung (94°C)
	1 Minute Anlagerung der Primer (57°C)
	1 Minute Synthesezeit (72°C)

Danach 7 Minuten bei 72°C und Abkühlung auf 4°C Elektrophorese im Agarose- bzw. MetaPhor®-Gel (alle Proben eines Patienten nebeneinander).

**3.6 Fragment-Längen-Analyse**

Um eine möglichst eindeutige Interpretation der Ergebnisse zu gewährleisten, führten wir bei fast allen fluoreszenzmarkierten FR3A- und FR2A-PCR-Produkten (außer bei eindeutig polyklonalen Banden) eine automatisierte Fragment-Längen-Analyse durch (Genescan, Perkin Elmer, Weiterstadt).

Hierdurch gelingt eine bessere Auftrennung der Banden, besonders von schwächeren monoklonalen Banden mit polyklonalem Hintergrund, der durch reaktive Lymphozyten, die in Lymphominfiltraten vorkommen können, hervorgerufen wird. Zudem ist mit dieser Methode eine exakte Längenbestimmung und somit ein guter Vergleich der einzelnen Produktgrößen möglich (Worley J et al., 1997; Kremer M et al., 2000).

#### *Herstellung des Polyacrylamid-Gels*

Eingesetzte Chemikalien (vgl. Anhang, Abschnitt 8.4; S. 90):

21g Harnstoff

5 ml 10xTBE/EDTA

Hydrolink 5 ml (long ranger hydrolink gel)

Die denaturierenden Eigenschaften des Harnstoffs sorgen dafür, dass die DNA im Gel einzelsträngig vorliegt.

Die obigen Reagenzien wurden mit Aqua-Spüllösung auf 50 ml aufgefüllt und vollständig darin gelöst. Anschließend erfolgte das Filtern und die Entgasung der Lösung, bis diese luftblasenfrei war. Danach gab man 350 µl einer 10%-igen Ammoniumpersulfatlösung (-20°C) und 15 µl TEMED für die Polymerisation zu.

Nun wurde das Gel mittels einer großvolumigen Spritze und einer eigens dafür vorgesehenen Gießvorrichtung zwischen die zuvor vorbereiteten Platten gegossen. Der 34-well Kamm wurde vorsichtig eingesetzt. Die Polymerisation dauerte etwas 1,5 Stunden.

#### *Probenvorbereitung und Gellauf*

In der Zwischenzeit fand die Aufbereitung der Proben statt. Für 40 Proben wurde je ein Gel verwendet und die „Lauflösung“ unter Einsatz folgender Reagenzien zubereitet:

20 µl Genescan 500 TAMRA

20 µl „Loading“-Puffer

80 µl Formamid

In einer 96-well-Platte wurden je 3µl der Mischung vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 µl des interessierenden PCR-Produkts (je nach Signalstärke im Gel unverd. bzw. bis 1:40 verd.). Die Proben wurden im Brutschrank denaturiert (5 Minuten bei 95°C) und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gelagert. Zwischenzeitlich war der Heizblock der Genescan-Maschine auf 95°C aufgeheizt worden.

Der Laufpuffer (150 ml 10xTBE/EDTA auf 1,5 l a. d.) wurde vorbereitet und das „Sample-sheet“ mit der Auftragsfolge, der Beschriftung der Bahnen, den Primerinformationen usw. in den Computer eingegeben. Aus dem polymerisierten Gel wurde der Kamm vorsichtig entfernt, die überschüssigen Gelreste entsorgt und das Polyacrylamid-Gel wurde nach Vorschrift in die Maschine eingehängt und der „Loading“-Puffer in ausreichender Menge zugegeben. Nun startete man den Vorlauf. Dies diente nicht nur zur Erwärmung des Laufpuffers, sondern gleichzeitig der Kontrolle, ob die Platten sauber sind und somit der Lauf nicht gestört wird. Die Proben wurden aufgetragen und schließlich die eigentliche Fragment-Längen-Analyse gestartet. Der Lauf selbst dauerte immer zwei Stunden. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der zugehörigen Software (Genescan).

### **3.7 Sequenzierung ausgewählter PCR-Produkte**

Bei Fällen, bei denen sich bei der PCR von FR3 bzw. FR2 klonale Produkte mit unterschiedlicher Länge zwischen den beiden Biopsiestellen ergaben, wurden die entsprechenden Amplifikate direkt sequenziert (eingesetzte Chemikalien: vgl. Anhang, Abschnitt 8.5; S. 90).

#### *Extraktion der klonalen Amplifikationsprodukte*

Zu Beginn wurde nochmals eine PCR für FR3 bzw. FR2 der jeweiligen Proben durchgeführt (Protokoll siehe oben). Um genügend Material zur Verfügung zu haben, erfolgte die Durchführung dieser PCR-Reaktionen möglichst im 50 µl-Ansatz. Ein weiterer Unterschied zur ersten PCR (siehe Abschnitt 3.5) bestand darin, dass diesmal keine fluoreszenzmarkierten Primer Verwendung fanden. Die Produkte wurden auf ein „low-melting“ Agarose-Gel (für ein 2% Agarosegel wurden 1,5 g „low-melting“ Agarose und 0,5 g einer Standardagarose auf 100 ml mit 1xTBE-Puffer verwendet) aufgetragen, nach dem Gellauf ausgeschnitten und bei -20°C gelagert oder es erfolgte die sofortige Extraktion.

Für die eigentliche Extraktion der betreffenden PCR-Produkte kam ein Extraktions-Kit zum Einsatz (QIAquick gel extraction KIT, Qiagen, Hilden). Hierzu wurden die Gelstückchen aufgetaut, 600 µl QG-Puffer (in ein 1,5 ml Reaktionsröhrchen) zugegeben und der Ansatz für 15 Minuten bei 50°C im Thermoblock erwärmt, wodurch eine vollständige Auflösung des Agarosegelstückchens erreicht wurde. Zwischenzeitlich erfolgte die Vorbereitung der Extraktionssäule und des Auffanggefäßes.

Nach dem Erwärmen wurde – falls notwendig – der pH des Röhrcheninhalts mit einigen Mikrolitern Natriumacetat auf 5,0 eingestellt. Zudem gab man noch 100 µl Isopropanol zum Ansatz hinzu. Nun wurde die Lösung auf das QIAquick spin-Säulchen geladen (maximal 800 µl). Die Entfernung ungebundener Moleküle und Verunreinigungen geschah durch mehrmaliges Zentrifugieren bei 14.000 rpm für jeweils eine Minute. Anschließend wurde die Säule mit 750 µl des Qiagen PE-Waschpuffers beladen, für 3 Minuten stehengelassen, zentrifugiert (1 Minute, 14.000 rpm) und nochmals „trocken zentrifugiert“ (5 Minuten, 14.000 rpm).

Abschließend wurde die DNA (je nach Ausgangsmenge) mit 20-50 µl Elutionspuffer (Qiagen, ddH<sub>2</sub>O) eluiert, indem nochmals für eine Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert wurde. Die gereinigte DNA wurde bei -20°C gelagert oder gleich in die „Cycle-PCR“ eingesetzt.

Nach der Extraktion trug man 5 µl des Eluats auf ein Agarosegel auf. Anhand der Signalstärke erfolgte eine Abschätzung, wieviel vom Ansatz in die Cycle-PCR eingesetzt werden sollten (zwischen 7 und max. 14 µl pro Reaktionsansatz).

#### *Big Dye Terminator Cycle Sequencing*

Für die nicht-radioaktive, automatische Sequenzierung kamen fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide zum Einsatz. Beim eigentlichen Sequenzierlauf werden diese während der Elektrophorese mittels Laser angeregt und gemessen.

In der vorliegenden Arbeit fanden folgende, nicht markierte Primer Verwendung:

FR3A: 5'-ACA CGG C(C/T)(G/C) TGT ATT ACT GT-3';

FR2: 5'-TGG RTC CGM CAG SCY YCN GG-3'

#### Pro 20µl Reaktionsansatz:

„Premix“ (wurde von Applied geliefert): 4 µl

Primer: 1 µl (Endkonzentration von 10 pmol)

DMSO: 1 µl

Entionisiertes Wasser: x µl (nach Abzug vom Volumen des PCR-Produkts, in Summe 20 µl)

PCR-Produkt: x µl hier zwischen 7 und maximal 14 µl

#### „Cycle Sequencing“ PCR-Programm:

25 Zyklen: 96°C für 10 sec.

Annealingtemperatur: zwischen 50°C und 60°C für 5 sec (abhängig von der Primersequenz) \*

60°C für 4 min

Cycler Bedingung „rapid thermal ramp“: ramp 1°C/sec

\*Annealingtemperaturformel: für A+T werden je 2°C, für G+C je 4°C berechnet; von dieser Gesamttemperatur werden 5°C abgezogen; aber die Annealingtemperatur darf nicht unter 50°C und nicht über 60°C liegen.

#### *Dye Ex (Qiagen) – Beseitigung der nicht eingebauten Terminatoren*

Von den Säulchen (im Kit) entfernte man unten die Kappe und lockerte den Deckel. Die Säulchen stellte man auf die mitgelieferten Auffanggefäße und zentrifugierte diese so für 3 Minuten bei 2.700 rpm. Die Auffanggefäße wurden entfernt und die Säulchen auf neue, beschriftete Eppendorf-Röhrchen gestellt. Anschließend wurden die oben beschriebenen 20 µl-Ansätze auf die Säulchen pipettiert. Es schloß sich eine erneute Zentrifugation bei 2.700 rpm für 3 Minuten an. Nach Entfernen der Säulchen wurden die nun gereinigten Proben für ca. 25 Minuten eingedampft (die gesamte Flüssigkeit musste entfernt sein). Nun konnten die Proben entweder aufbewahrt (bei –20°C, möglichst nicht länger als drei Wochen), oder auf das Sequenzgel aufgetragen werden.

#### *Sequenzlauf auf ABI 377*

Die Zusammensetzung des Gels für den Sequenzlauf auf der automatischen Sequenzieranlage ABI 377 entsprach jener für das Fragment-Längen-Analyse-Gel (siehe Abschnitt 3.6). Nur kam hier, im Gegensatz zum Fragment-Längen-Analyse-Gel, kurz nach dem Gießen des Gels die Kammaussparung (= Rückseite des 36-Zähnekammes) zum Einsatz. Diese wurde nach Abschluss des Polymerisierens herausgezogen und nach einer Reinigung verkehrt eingesetzt, d. h. der 36-Zähnekamm wurde für das Auftragen der Proben benötigt und blieb während des gesamten Laufes in der Apparatur.

Die Proben selbst wurden in je 6 µl Ladepuffer aufgenommen und gut resuspendiert. Der Ladepuffer bestand wie bei der Fragment-Längen-Analyse (siehe Abschnitt 3.6) aus einem Teil „Loadingpuffer“ und aus 5 Teilen Formamid. Die Denaturierung der Proben erfolgte auf die gleiche Art und Weise wie bei der Fragment-Längen-Analyse. In der vorliegenden Arbeit war ein Gellauf von 3,5 Stunden immer ausreichend, da mit dieser Dauer eine Sequenzlänge von bis zu 450 bp lesbar ist.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Retrospektive Archivsuche (Januar 1992 bis Dezember 2001)

Bei der retrospektiven Archivsuche fanden sich 594 Knochenmarksbiopsien von 422 Patienten mit Befall durch ein Non-Hodgkin-Lymphom. Im Einzelnen wurden die Infiltrationen laut den Befunden auf folgende Non-Hodgkin-Lymphome zurückgeführt (bei Patienten mit Progression im Verlauf ist immer der höhergradige Befall aufgeführt).

(Tabelle IV.1):

<b>Tabelle IV.1:</b>		<b>Verteilung der Befunde im Knochenmark</b>
B-CLL		179 Patienten
Haarzell-Leukämie		11 Patienten
Lymphoplasmozytoides Lymphom		29 Patienten
Niedrig maligne (kleinzellig, ohne weitere Klassifikation)		38 Patienten
Marginalzonen B-Zell-Lymphom		12 Patienten
Mantelzell-Lymphom		20 Patienten
Follikelzentrumslymphom (follikulär Grad I oder II)		61 Patienten
Diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom		30 Patienten
Hochmalignes B-Zell-Lymphom (ohne weitere Klassifikation, 7 bei transformierten follikulären Lymphomen)		11 Patienten
Burkitt-Lymphom		3 Patienten
Mycosis fungoides		4 Patienten
T-CLL		12 Patienten
T-Zell-Lymphom, niedrig maligne (ohne weitere Klassifikation)		3 Patienten
Peripheres T-Zell-Lymphom		3 Patienten
Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom		2 Patienten
Vorläufer T-Zell-Lymphom		2 Patienten
Anaplastisches Großzelliges T-Zell-Lymphom		1 Patient
Hochmalignes T-Zell-Lymphom (ohne weitere Klassifikation)		1 Patient
<b>Gesamt</b>		<b>422 Patienten</b>

Nur bei 134 von diesen 422 Patienten lag sowohl Gewebe aus dem Knochenmark als auch aus mindestens einer extramedullären Lokalisation vor. Bei 36 dieser Patienten fand sich laut Auswertung der Befundberichte eine mindestens einmalige Diskordanz zwischen Knochenmark und extramedullärer Lokalisation (meist Ort der Primärdiagnose).

In folgender Tabelle sind sowohl klassisch diskordante Lymphome (zeitgleiches Vorhandensein eines niedrigmalignen NHL im KM bei hochmalignem Befall außerhalb des Markes zum Zeitpunkt der Primärdiagnose) als auch im weiteren Sinne diskordante Non-Hodgkin-Lymphome bei extramedullärer Transformation eines vorbestehenden niedrigmalignen Lymphoms (meist folliculäre Lymphome) erfasst. Im Knochenmark lautete der Wortlaut der Befundberichte häufig „die vorliegende Infiltration spricht für Befall durch ein folliculäres Lymphom...“, da die Klassifikation von Lymphomen allein am Knochenmarksbefund oftmals nicht eindeutig ist (Deverell MH et al., 1997).

Die Befunde verteilten sich demnach folgendermaßen (**Tabelle IV.2**):

<b>Tabelle IV.2:</b> Anzahl und Verteilung der Patienten mit konkordanten und diskordanten Lymphominfiltraten			
<b>Diagnose</b>	<b>Patientenzahl</b>	<b>Konkordant im KM</b>	<b>Diskordant im KM</b>
CLL (hiervon eine T-CLL)*	18	17	*1
Lymphoplasmazytoides Lymphom	2	2	-
Niedrig malignes B-Zell-Lymphom (ohne weitere Klassifikation)	2	2	-
Marginal B-Zell-Lymphom	9	9	-
Mantelzell-Lymphom**	12	10	**2
Folliculäre Lymphome Grad I und II (ohne später transformierte folliculäre Lymphome)	34	33	***1
Diffus großzelliges B-Zell- Lymphom (incl. transformierter folliculärer L.)	42	13	29
Burkitt Lymphom	2	2	-
Hochmalignes B-Zell-Lymphom (ohne weitere Klassifikation)	3	3	-
Peripheres T-Zell-Lymphom	2	2	-
Angioimmunoblastisches T-Zell- Lymphom	1	1	-
Mycosis fungoides****	3	3	-
Vorläufer T-Zell-Lymphom	2	1	1
Anaplastisch-großzelliges T-Zell- Lymphom	1		1
Hochmalignes T-Zell-Lymphom (ohne weitere Klassifikation)	1	1	
<b>Gesamt</b>	<b>134</b>	<b>99</b>	<b>35</b>
*Patient mit Richter Syndrom, **2 Patienten mit blastoider Variante, ***1 Patient mit B-CLL im Knochenmark (Zweiterkrankung), ****1 Patient entwickelte im Verlauf ein Sézary-Syndrom.			

Von den 35 Fällen waren 33 B-Zell-Lymphome, von denen die histologischen Schnitte zur Reklassifikation angesehen wurden. Hinzu kam noch ein Fall von der Universitätsklinik Innsbruck.

Die Gewebeblöcke der betreffenden Fälle wurden aus dem Archiv des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie herausgesucht und die Schnitte wurden von zwei Pathologen (Prof. Dr. Falko Fend, Dr. Marcus Kremer) evaluiert und gegebenenfalls reklassifiziert. In die Studie wurden dabei nur diffus-großzellige B-Zell-Lymphome und zu Beginn auch blastoide Mantelzell-Lymphome mit diskordantem Knochenmarksbefall aufgenommen. Auffällig ist, dass im untersuchten Patientengut nur knapp ein Drittel der diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome mit Knochenmarksbefall ein eindeutig konkordantes Mark aufwiesen (13 [30%] von 42 Patienten).

Insgesamt verblieben somit 29 diffus-großzellige B-Zell-Lymphome und 2 blastoide Mantelzell-Lymphome, die in Frage kamen. Nach Evaluation der klinischen Daten wurden 5 Fälle ausgeschlossen, da die betreffenden Patienten eine Erkrankung an einem folliculären Lymphom in Ihrer Vorgeschichte aufwiesen. Folglich wurden nur klassisch diskordante (Definition siehe oben) Fälle weiter untersucht. Bei zwei weiteren war leider nicht mehr ausreichend Gewebe für zusätzliche Analysen vorhanden (jeweils ein Patient mit einem diffus-großzelligen B-Zell-Lymphom und ein Patient mit einem Mantelzell-Lymphom). Weitere Ausschlussgründe waren morphologisch reaktive lymphoide Infiltrate im Knochenmark (ein Patient) und ein nicht eindeutig klassifizierbarer Primärtumor (ein weiterer Patient). Für die immunhistochemische und molekulare Untersuchung verblieben 21 Patienten mit diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen und nur 1 Patient mit blastoidem Mantelzell-Lymphom (der zugesandte Fall eingeschlossen). Deshalb erfolgte der Beschluss, nur die diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome genauer zu analysieren, um eine möglichst homogene Studiengruppe zu erhalten.

## 4.2 Klinische Daten

Von den 21 Patienten mit diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen und diskordantem Knochenmarksbefall waren 11 weiblich und 10 männlich mit einem Altersmedian zum Zeitpunkt der Primärdiagnose von 60 Jahren (30 bis 78 Jahre). Bei keinem dieser 21 Patienten fanden sich Hinweise für eine HIV-Infektion. 14 waren mit alleiniger Chemotherapie, 4 mit einer Kombination aus Radio- und Chemotherapie und 3 mit Chemotherapie kombiniert mit peripherer Stammzelltransplantation behandelt worden.

9 Patienten sind bis jetzt aufgrund Ihrer Erkrankung an einem NHL verstorben. 12 Patienten sind noch am Leben, allerdings ist der Beobachtungszeitraum bei einigen recht kurz. Bei 3 erst kürzlich diagnostizierten Fällen (6, 7, und 21; vgl. **Tabelle IV.3**) beträgt er gar weniger als ein Jahr. 5 Patienten haben ein persistierendes „low grade“ NHL und 4 sind zur Zeit krankheitsfrei. Die mittlere – retrospektive – Beobachtungszeit betrug 25,2 Monate (allerdings mit einer großen Streubreite: 2-120 Monate). Die klinischen Charakteristika sind in folgender Tabelle aufgeführt:

**Tabelle IV.3: Klinische Daten**

Fall	Alter	Geschlecht	Therapie	Follow-up Endpunkt	Monate
1	55	M	CT	verstorben (K)	60
2	60	W	CT	verstorben (K)	12
3	78	M	CT	lebt (K) <sup>1</sup>	17
4	36	M	CT	lebt (K) <sup>1</sup>	19
5	67	W	CT	lebt (o. K.)	12
6	60	W	CT + RT	lebt (o. K.)	9
7	30	W	CT + PST	aktueller Fall	5
8	53	W	CT + RT	verstorben (K)	9
9	66	M	CT	lebt (K) <sup>1</sup>	16
10	30	M	CT + PST	lebt (K) <sup>2</sup>	58
11	48	M	CT + RT	lebt (o. K.)	48
12	45	M	CT + PST	verstorben (K)	6
13	73	W	CT	verstorben (K)	5
14	73	W	CT	verstorben (K)	10
15	73	M	CT	verstorben (K)	7
16	65	W	CT	lebt (K) <sup>1</sup>	12
17	67	M	CT	verstorben (K)	4
18	78	M	CT	verstorben (K)	2
19	65	W	CT	lebt (o. K.)	120
20	68	W	CT + RT	lebt (o. K.)	90
21	77	W	CT	lebt (o. K.)	9

CT: Chemotherapie; RT: Radiotherapie; PST: Periphere Stammzelltransplantation; verstorben (K): an Krankheit verstorben; lebt (K): lebt mit Krankheit; lebt (o. K.): lebt, ohne dass Hinweise auf ein Fortbestehen der Erkrankung vorliegen; aktueller Fall: Patient lebt, Primärdiagnose aber erst vor wenigen Monaten.

<sup>1</sup>Persistenz des low-grade NHLs.

<sup>2</sup>Rezidiv des low-grade NHLs.

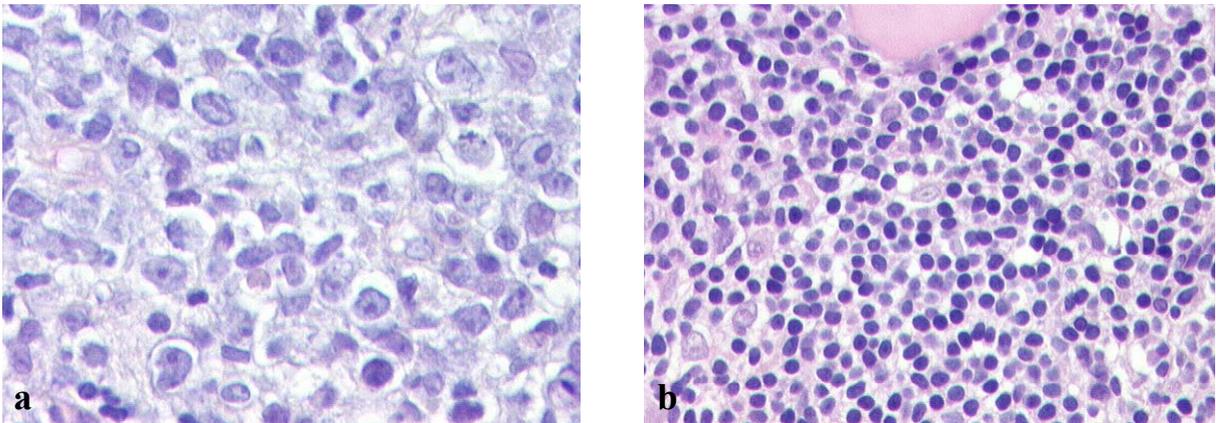
Von den drei Kontrollfällen mit atypischen lymphoiden Infiltraten litten zwei der Patienten an einer rheumatoiden Arthritis und einer an einem systemischen Lupus Erythematoses. Die vier follikuläre Lymphome mit konkordantem niedrigmalignen Befall des Knochenmarks stammten alle von Patienten mit erst kürzlich gestellter Diagnose.

### 4.3 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

Die Primärdiagnose diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom wurde anhand von Lymphknotenbiopsien (n = 10) und extranodalem Tumorgewebe (n = 11) gestellt.

Die diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome zeigten eine Prädominanz großer Zentro- oder Immunblasten mit großen Kernen und wenig Zytoplasma. Keiner der Fälle wies ein folliculäres Wachstumsmuster bzw. eine niedrigmaligne Komponente auf (**Abb. IV.1a**).

Die malignen Lymphominfiltrate im Knochenmark bestanden aus kleinen bis mittelgroßen Lymphozyten mit dichtem Kernchromatin, wenig Zytoplasma und wiesen eine ausgeprägte Retikulinfibrose auf. Zentroblasten waren – wenn überhaupt – nur in sehr geringem Ausmaß vorhanden. Zwei verschiedene Infiltrationsmuster wurden bei den 21 Studienfällen beobachtet. 14 Fälle wiesen paratrabekuläre Infiltrate auf, wie sie typischerweise bei folliculären Lymphomen beobachtet werden (**Abb. IV.1b**). Bei den verbleibenden 7 Fällen fanden sich zentral gelegene, dichte Lymphominfiltrate, mit einer weitgehend homogenen Lymphozyten-Population und unscharfer Begrenzung.

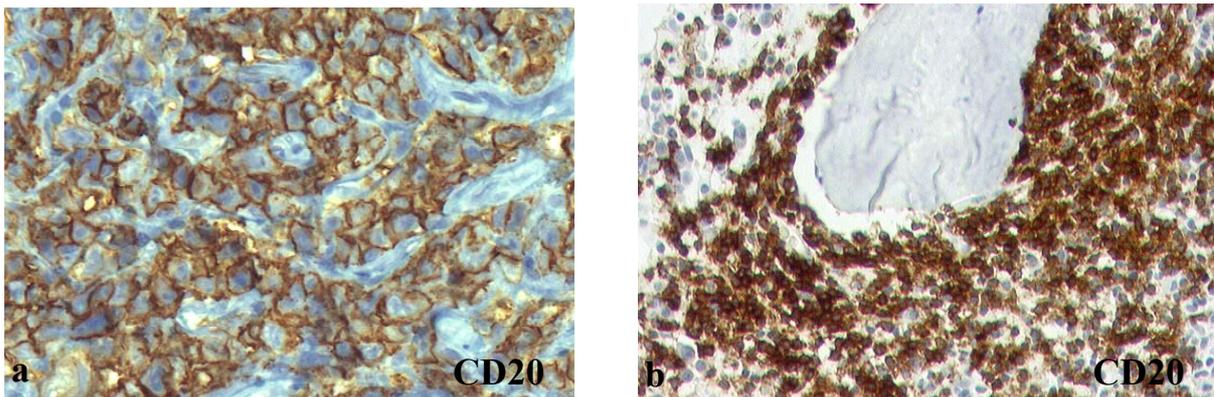


**Abb. IV.1:** Fall 2: Diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom (a) mit diskordantem Befall des Knochenmarks (b). a: Lymphknoten (HE; 400fach); b: Knochenmark mit paratrabekulärem Infiltrationsmuster – vor allem kleine lymphoide Zellen (HE; 400fach).

Die drei Kontrollfälle mit reaktiven Infiltraten hingegen zeigten scharf begrenzte, zentral gelegene Ansammlungen kleiner Lymphozyten mit wenigen eingestreuten Plasmazellen. Eine retikuläre Fibrose fehlte bzw. war nur minimal vorhanden. Bei den 4 folliculären Lymphomen (Grad I/II), die ebenfalls als Kontrollen dienten, zeigte sich im Lymphknoten das typische folliculäre Wachstumsmuster von Zentrozyten und Zentroblasten und im zugehörigen Knochenmark fanden sich paratrabekuläre Infiltrate kleiner lymphoider Zellen durchmischt mit sehr wenigen Blasten und vermehrter Retikulinfibrose.

#### 4.4 Ergebnisse der Immunhistochemie

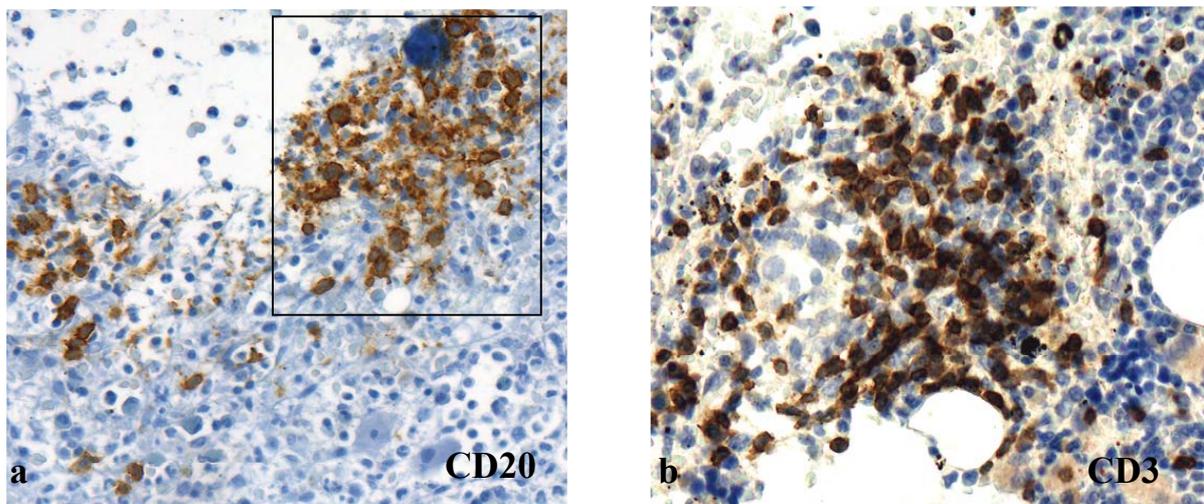
Alle untersuchten Lymphome wiesen eine starke Positivität für CD20 auf (**Abb. IV.2a**). Für CD3 hingegen waren die neoplastischen Zellen negativ. Die malignen Zellen der diffusgroßzelligen B-Zell-Lymphome exprimierten in 18 von 21 Fällen (85%) das Bcl-2-Protein. 13 von 21 (62%) waren positiv für Bcl-6 und wiederum 13 positiv für CD10 (62%). 9 (43%) zeigten eine Expression des p53-Proteins in mehr als einem Fünftel der Tumorzellen (**Abb IV.4**; S. 54). Alle folliculären Lymphome (Kontrollfälle) zeigten Positivität für Bcl-2 und Bcl-6 (4 von 4; 100%). 2 davon waren auch positiv für CD10 (50%). p53 dagegen wurde nur sehr schwach exprimiert (deutlich unter 20% aller neoplastischen Zellen). Im Knochenmark herrschten in den meisten Fällen kleine, CD20-positive Lymphozyten vor (bei 16 der 21 Studienfälle (76%) und bei allen 4 Patienten mit folliculären Lymphomen) (**Abb. IV.2b**).



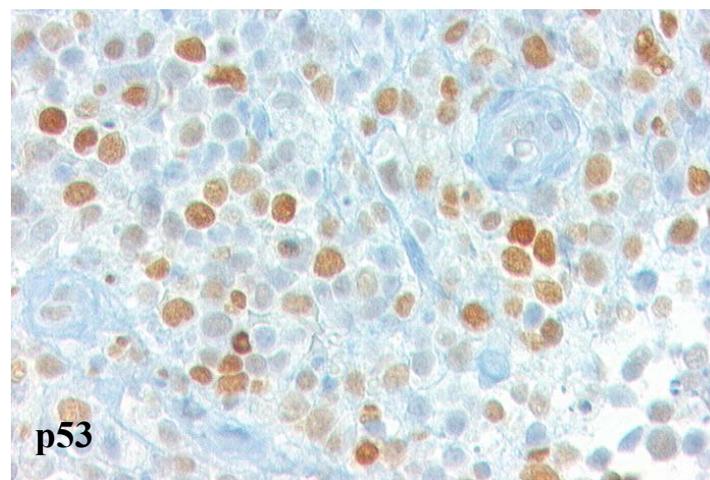
**Abb. IV.2:** Fall 2: Zahlreiche CD20-positive Blasten im Lymphknoten (**a**), CD20-positive kleine, paratrabekuläre gelegene, lymphoide Zellen (**b**) im zugehörigen Mark (jeweils 400fach).

5 Studienfälle mussten aufgrund der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen reklassifiziert werden. Bei dreien zeigte sich nämlich ein Überwiegen von kleinen CD3-positiven T-Lymphozyten mit nur wenig eingestreuten kleinen CD20-positiven B-Lymphozyten. Wegen der zentralen Lage, der relativ scharfen Begrenzung und einem nicht übermäßig ausgeprägten Retikulinfasergehalt der Infiltrate mussten diese 3 Fälle folglich als reaktive Infiltrate klassifiziert werden (Fälle 19-21). Diese Diagnose wurde auch dadurch unterstützt, dass sich im Rahmen der molekularen Untersuchung ein polyklonales „Rearrangement“-Muster ergab (siehe nächster Abschnitt).

Zwei weitere Knochenmarksbiopsien, die zuvor als „diskordante Infiltrate eines hochmalignen Lymphoms“ klassifiziert wurden, zeigten bei der immunhistochemischen Färbung überraschenderweise einige CD20-positive Blasten, ohne dass aber zugleich eine nennenswerte Anzahl von kleinen CD20-positiven Lymphozyten vorhanden gewesen wäre. Die in den Biopsien vorhandenen zahlreichen kleinen Zellen dagegen stellten sich als ein ausgeprägter Hintergrund von kleinen CD3-positiven T-Lymphozyten heraus. Folglich mussten die beiden Fälle als konkordanter Knochenmarksbefall durch ein diffus-großzelliges-B-NHL reklassifiziert werden (Fallnummer 17 und 18) (**Abb. IV.3**). Diese 5 Fälle (Nr. 17-21) wurden – wie gesagt – von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.



**Abb. IV.3:** Fall 17: CD20-positive Blasten mit prominentem kleinzelligem Hintergrund, der zur Fehldiagnose diskordantes Infiltrat verleiten kann (**a**) (200fach); die kleinen Zellen erweisen sich als eine ausgeprägte Ansammlung reaktiver CD3-positiver T-Lymphozyten (**b**) (400fach).



**Abb. IV.4:** Fall 8: Diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom, Lymphknoten: deutlich positive Reaktion in der p53-Immunhistochemie (400fach).

#### 4.5 Durchflusszytometrische Daten

Von 18 der 21 Patienten mit diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen waren Unterlagen über die Ergebnisse von durchflusszytometrischen Immunphänotypisierungen vorhanden. Nur bei 9 Patienten (9 von 18; [50%]) konnte mittels der FACS-Analyse des Knochenmarks ein niedrig-malignes B-NHL festgestellt werden.

Bei 4 Patienten wurde das Knochenmarksaspirat aufgrund einer Koexpression von CD5 und CD23 als positiv für eine Infiltration durch eine B-CLL befunden (Fälle 1, 3, 9 und 16). Die zugehörigen Knochenmarksbiopsien wiesen alle zentral gelegene Lymphominfiltrate auf.

Die anderen 5 Fälle wurden als „gut vereinbar mit der Infiltration durch ein niedrigmalignes B-Zell-NHL“ klassifiziert. Eine genauere Einteilung erfolgte dabei allerdings nicht (siehe auch **Tabellen IV.4a-c**; S. 56 ff.). Der bereits weiter oben erwähnte Fall 17 – der als konkordanter Befall durch ein hochmalignes Lymphom reklassifiziert werden musste – zeigte in der Durchflusszytometrie eine klonale Population blastärer B-Zellen.

Bei 8 der Patienten fanden sich in der Durchflusszytometrie keine Hinweise auf eine Infiltration durch ein malignes Lymphom. Unter diesen durchflusszytometrischen negativen Fällen befanden sich auch die Patienten 19 und 21, die anhand der Immunhistochemie als reaktiv reklassifiziert werden mussten (siehe oben).

#### 4.6 Ergebnisse der molekularen Untersuchungen

Die verbleibenden 16 Patienten konnten – nach Ausschluss der 5 reklassifizierten Fälle – mittels der Ergebnisse der Analyse des IgH- und des Bcl-2-Rearrangements in 3 Gruppen unterteilt werden. In die Gruppen 1 und 2 wurden nur die 12 Fälle aufgenommen, deren  $\beta$ -Globin-Kontrollen eindeutig positiv waren (vgl. **Tabellen IV.4a – c**; S. 56 ff.).

##### *1. Gruppe: Klonal verwandte Fälle*

Bei 8 Patienten zeigte sich ein reproduzierbares IgH- (mit Primern gegen FR3 bzw. FR2) oder Bcl-2-Rearrangement gleicher Größe. Somit fand sich bei zwei Drittel (8 von 12) der auswertbaren Fälle eine klonale Verwandtschaft.

4 hatten ein FR3- (siehe auch **Abb. IV.5**; S. 57), 2 ein FR2-Rearrangement und 4 ein Bcl-2-Rearrangement identischer Größe sowohl im Knochenmark als auch im zugehörigen Lymphknoten bzw. extranodalen Gewebe.

Bei 2 Patienten (5 und 8) war das gleichgroße Bcl-2-Rearrangement der einzige Marker, der zum Vergleich herangezogen werden konnte, da die PCR für FR2 bzw. FR3 kein eindeutig interpretierbares Muster ergab (siehe **Abb. IV.6**; S. 57).

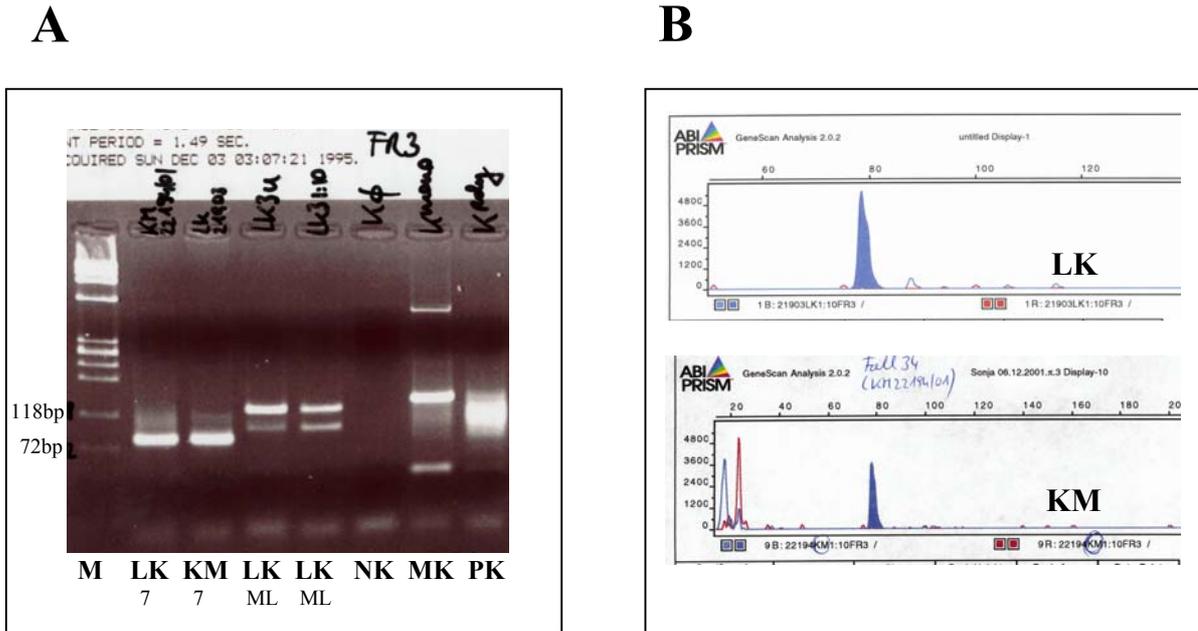
Des Weiteren gehörten zur Gruppe der klonal verwandten Fälle zwei Patienten, bei denen in der Durchflusszytometrie des Knochenmarks die Diagnose einer B-CLL gestellt wurde. Beide (Nummer 1 und 3) waren negativ für das Bcl-2-Rearrangement.

**Tabelle IV.4a: Gruppe 1: Klonal verwandte Fälle**

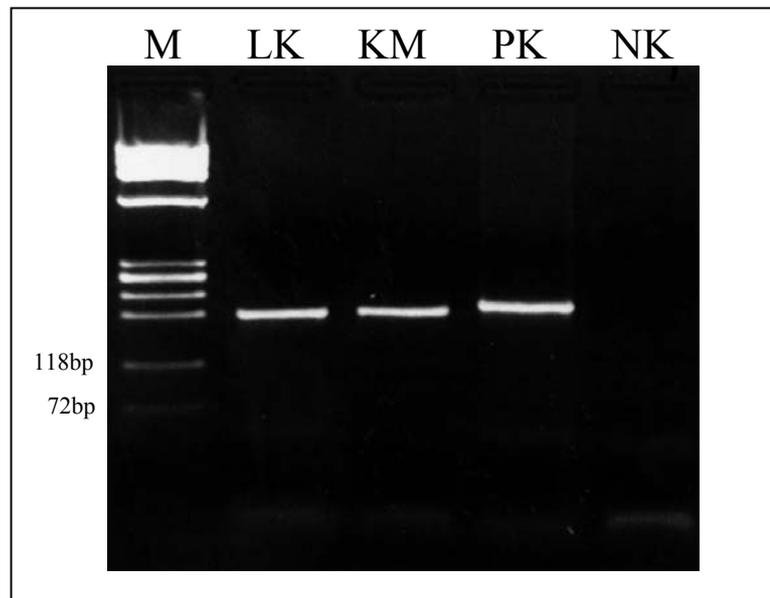
**Molekulare, immunhistochemische und durchflusszytometrische Ergebnisse**

Molekulare Ergebnisse					Immunhistochemie					FACS (KM)
Fall	Gew.	FR3	FR2	Bcl-2	CD20	CD10	Bcl-2	Bcl-6	p53	
<b>Gruppe 1:</b> (klonal verwandt, n = 8)										
<b>1</b>	LK	102 <sup>§</sup>	n. d.	neg	pos	pos	neg	neg	neg	B-CLL (CD19+, CD5+, CD23+, kappa)
	KM	102 <sup>§</sup>	n. d.	n. d.	pos•					
<b>2</b>	LK	88 <sup>§</sup>	n. d.	neg	pos	neg	+++	neg	neg	negativ
	KM	88 <sup>§</sup>	n. d.	n. d.	pos•					
<b>3</b>	EN	poly	245	neg	pos	pos	+	+	+	B-CLL (CD19+, CD5+, CD23+, kappa)
	KM	n. a.	245	n. d.	pos•					
<b>4</b>	LK	82 <sup>§</sup>	n. d.	pos*	pos	pos	+++	++	neg	negativ
	KM	82 <sup>§</sup>	n. d.	pos*	pos•					
<b>5</b>	EN	poly	mono	pos*	pos	pos	+++	+	neg	l. g. B-NHL (CD19+, CD20+, CD10+)
	KM	n. a.	n. a.	pos*	pos•					
<b>6</b>	EN	poly	237 <sup>§</sup>	neg	pos	pos	+++	+	+	l. g. B-NHL (CD19+, CD20+, CD10+)
	KM	poly	237 <sup>§</sup>	neg	pos•					
<b>7</b>	EN	78 <sup>§</sup>	n. d.	pos*	pos	pos	+++	+	neg	l. g. B-NHL (CD19+, CD20+, CD10+)
	KM	78 <sup>§</sup>	n. d.	pos*	pos•					
<b>8</b>	EN	poly	n. d.	pos*	pos	neg	++	+	+++	negativ
	KM	poly	n. d.	pos*	pos•					

Gew.: Gewebe; LK: Lymphknoten; EN: Extranodales Gewebe; KM: Knochenmark; l. g. B-NHL: „low grade“ B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom, poly: polyklonales Rearrangements-Muster; mono: monoklonales PCR-Produkt; n. d.: nicht durchgeführt; n. a.: nicht auswertbar; §: Länge des PCR-Produkts in Basenpaaren, bestimmt durch Fragment-Längen-Analyse; pos\*: Bcl-2-Amplifikationsprodukte identischer Größe; pos•: an den Knochenmarksbiopsien wurden nur Färbungen gegen CD20 und CD3 durchgeführt. p53: mehr als 20% (+), 40% (++) bzw. 60% (+++) der Tumorzellen exprimierten p53; Bcl-2 und Bcl-6: schwache (+), mittlere (++) bzw. starke (+++) immunhistochemische Anfärbbarkeit.



**Abb. IV.5:** Fall 7: Klonal verwandtes diskordantes Infiltrat des Knochenmarks. **A:** Monoklonales Schwere-Ketten-Gen-Amplifikat des Lymphknotens (LK 7) und des zugehörigen Knochenmarks (KM 7) auf gleicher Höhe im MetaPhor®-Gel. M: Molekulargewichtsmarker; ML: Gewebe eines blastoiden Mantelzell-Lymphoms – ausgeschlossener Fall; NK: Negativkontrolle; MK: monoklonale Kontrolle; PK: polyklonale Kontrolle (reaktiver LK); bp: Basenpaare. **B:** Die Fragment-Längen-Analyse (Genescan) bestätigt die identische Größe der PCR-Produkte. LK: oben rechts: Lymphknoten 78 Basenpaare; KM: unten rechts: Knochenmark 78 Basenpaare.



**Abb. IV.6:** Fall 5: Klonal verwandtes diskordantes Knochenmarksinfiltrat. Nachweis der Bcl-2-Translokation im Lymphknoten und zugehörigem Knochenmark. PCR-Amplifikation mit Primer-Paaren für die „major breakpoint region“. Lymphknoten (LK) und Knochenmark (KM) besitzen PCR-Banden gleicher Größe. M: Molekulargewichtsmarker; PK: follikuläres Lymphom mit Bcl-2-Translokation als Positivkontrolle; NK: Negativkontrolle; bp: Basenpaare.

## 2. Gruppe: Klonal unverwandte Fälle

Bei 4 der 12 (33%) auswertbaren Fälle ergaben sich bei den Klonalitätsuntersuchungen von Lymphknoten bzw. extranodalem Gewebe und dem jeweilig zugehörigen Knochenmark PCR-Produkte unterschiedlicher Größe (**Tabelle IV.4b; Abb. 4.7**). Dies wurde durch die direkte Sequenzierung der betreffenden Produkte bestätigt, wobei die verschiedenen Sequenzen die Nicht-Verwandtschaft unterstrichen (**Abb 4.8; S. 59**).

Einer der vier Fälle, bei denen in der Durchflusszytometrie des Knochenmarks die Diagnose einer CLL gestellt wurde (Fall 9), gehörte mit zu dieser Gruppe.

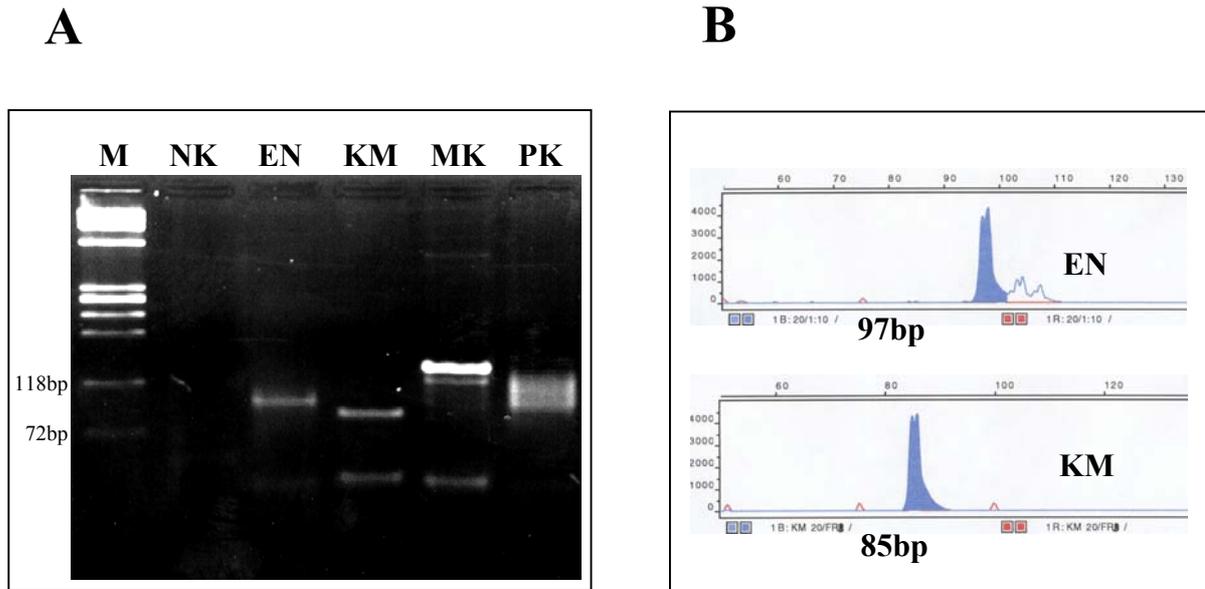
Das Gewebematerial des Patienten mit der Fallnummer 12 zeigte Bcl-2-Rearrangement-Produkte unterschiedlicher Größe. Leider gelang mit Primern für die FR3- und FR2-Region des Schwere-Ketten-Gens kein Klonalitätsnachweis mittels der PCR. Bei allen Fällen der Gruppe 2 waren die Unterschiede bei mehrfachen Untersuchungsansätzen der PCR reproduzierbar vorhanden. Alle Proben der Gruppe 2 wiesen bei Durchführung der  $\beta$ -Globin-Kontrollen einen ausreichenden DNA-Gehalt auf.

### Tabelle IV.4b: Gruppe 1: Klonal unverwandte Fälle

#### Molekulare, immunhistochemische und durchflusszytometrische Ergebnisse

Molekulare Ergebnisse		Immunhistochemie					FACS (KM)			
Fall	Gew.	FR3	FR2	Bcl-2	CD20	CD10	Bcl-2	Bcl-6	p53	
<b>Gruppe 2:</b> (klonal nicht verwandt, n = 4)										
<b>9</b>	LK	103 $\infty$	n. d.	neg	pos	pos	+	neg	neg	B-CLL (CD19+, CD5+, CD23+, kappa)
	KM	115 $\infty$	n. d.	neg	pos•					
<b>10</b>	EN	97 $\infty$	n. d.	neg	pos	pos	+	+	++	l. g. B-NHL (CD19+, CD20+, CD10+)
	KM	85 $\infty$	n. d.	n. d.	pos•					
<b>11</b>	EN	105 $\infty$	n. d.	neg	pos	neg	+++	++	neg	l. g. B-NHL (CD19+, CD20+, CD10+)
	KM	94 $\infty$	n. d.	pos	pos•					
<b>12</b>	LK	poly	mono	pos#	pos	pos	+++	+	++	negativ
	KM	poly	n. a.	pos#	pos•					

Gew.: Gewebe; LK: Lymphknoten; EN: Extranodales Gewebe; KM: Knochenmark; l. g. B-NHL: „low grade“ B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom; poly: polyklonales Rearrangements-Muster; mono: monoklonales PCR-Produkt; n. d.: nicht durchgeführt; n. a.: nicht auswertbar; pos#: Bcl-2 Amplifikationsprodukte unterschiedlich groß;  $\infty$ : sequenzierte Amplifikate, Länge der sequenzierten PCR-Produkte in Basenpaaren; pos•: an den Knochenmarksbiopsien wurden nur Färbungen gegen CD20 und CD3 durchgeführt. p53: mehr als 20% (+), 40% (++) bzw. 60% (+++) der Tumorzellen exprimierten p53; Bcl-2 und Bcl-6: schwache (+), mittlere (++) bzw. starke (+++) immunhistochemische Anfärbbarkeit.



**Abb. IV.7:** Fall 10: Klonal unverwandtes diskordantes Knochenmarksinfiltrat. **A:** Nachweis eines IgH-Rearrangement-Produkts unterschiedlicher Größe in den beiden Tumorbiopsien. PCR mit FR3-Primern. M: Molekulargewichtsmarker; NK: Negativkontrolle; EN: Extranodales diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom; KM: Knochenmark; MK: monoklonale Kontrolle; PK: polyklonale Kontrolle (LK mit reaktiven Veränderungen); bp: Basenpaare. **B:** Die Fragment-Längen-Analyse (Genescan) bestätigt die unterschiedliche Größe der PCR-Produkte. EN: oben rechts - Extranodales Tumorgewebe 97 Basenpaare; KM: unten rechts - Knochenmark 85 Basenpaare.

**EN:**

5'-TTNGNACTTCCTTTTCGAAATGCCCTGGTAGATTGGCATCGAGTCGTNCGGGCCGGGG  
AACATGGTGACCGTCTCCTCAGGT-3'

**KM:**

5'-TTGNGNTATGCCNTTAGGCAACGATATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTG  
ACGTCTCCTCAGGT-3'

**Abb. IV.8:** Fall 10: Bestätigung der unterschiedlichen Klonalität durch direkte Sequenzierung. Abgleich der IgH-Sequenz durch Genbank: [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) (26.07.2003). EN: Extranodales diffus-großzelliges B-Zell-NHL; KM: Knochenmark. Grau unterlegt zum Jha-Primer komplementäre Sequenz; kursiv dem FR3A-Primer zugehörig.

### 3. Gruppe: Technisch nicht verwertbare Fälle

Das Material von 4 Patienten war leider aus technischen Gründen nicht aussagekräftig. Bei drei der betreffenden Patienten konnte keine DNA im Knochenmark (Fälle 13, 14 und 15) amplifiziert werden. Die betreffenden Knochenmarksbiopsien waren bei der  $\beta$ -Globin-Kontrolle negativ bzw. nur schwach positiv. Ein Fall (Nummer 16) zeigte bei beiden Primer-Ansätzen (FR3 und FR2) sowohl im Lymphknoten- als auch im Knochenmarksgewebe ein polyklonales Muster und ebenso konnte keine Bcl-2-Translokation nachgewiesen werden.

**Tabelle IV.4c: Technisch nicht verwertbare Fälle****Molekulare, immunhistochemische und durchflusszytometrische Ergebnisse**

Molekulare Ergebnisse			Immunhistochemie							FACS (KM)
Fall	Gew.	FR3	FR2	Bcl-2	CD20	CD10	Bcl-2	Bcl-6	p53	
<b>Gruppe 3: (technisch nicht verwertbar, n =4)</b>										
13	LK	94 <sup>▲</sup>	mono	neg	pos	pos	+	++	neg	n. d.
	KM	poly	n. d.	n. d.	pos•					
14	EN	100 <sup>▲</sup>	n. d.	pos	pos	pos	+++	neg	neg	negativ
	KM	n. a.	n. a.	n. a.	pos•					
15	LK	n. a.	n. a.	n. a.	pos	neg	+	neg	+	negativ
	KM	111 <sup>▲</sup>	n. d.	neg	pos•					
16	LK	poly	poly	neg	pos	pos	+++	neg	+	B-CLL (CD19+, CD5+, CD23+, kappa)
	KM	poly	poly	neg	pos•					

Gew.: Gewebe; LK: Lymphknoten; EN: Extranodales Gewebe; KM: Knochenmark; l. g. B-NHL: low grade B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom, poly: polyklonales Rearrangements-Muster; mono: monoklonales PCR-Produkt; n. d.: nicht durchgeführt; n. a.: nicht auswertbar; ▲: Länge des PCR-Produkts in Basenpaaren, bestimmt durch Fragment-Längen-Analyse; pos•: an den Knochenmarksbiopsien wurden nur Färbungen gegen CD20 und CD3 durchgeführt. p53: mehr als 20% (+), 40% (++) bzw. 60% (+++) der Tumorzellen exprimierten p53; Bcl-2 und Bcl-6: schwache (+), mittlere (++) bzw. starke (+++) immunhistochemische Anfärbbarkeit.

**Kontrollfälle**

Die vier untersuchten folliculären Lymphome wiesen IgH-Rearrangements von gleicher Größe in Lymphknoten und Knochenmark auf (3 Fälle mit FR3, 1 Fall mit FR2). Eine identische Bcl-2-Translokation wiesen 2 der Fälle auf (die anderen waren negativ mit Primern für die „major breakpoint region“).

Die Untersuchung des Materials der drei Patienten mit diffus-großzelligem B-Zell-Lymphom und reaktiven lymphoiden Infiltraten ergab ein monoklonales Amplifikationsprodukt in allen drei Lymphombiopsien. Die mikrodissezierten Infiltrate der zugehörigen Knochenmarksbiopsien dagegen zeigten ein polyklonales PCR-Produkt. Wie zu erwarten, resultierte auch bei den drei als reaktiv reklassifizierten Fällen (Nummer 19 bis 21) ein polyklonales Muster in der PCR für das Schwere-Ketten-Gen.

Das im Laufe der Studie nicht weiter berücksichtigte blastoide Mantezell-Lymphom mit kleinzelligem malignen Knochenmarksinfiltrat wies ein monoklonales IgH-Rearrangement identischer Größe auf (durch Fragment-Längen-Analyse bestätigt).

## 5. Diskussion

Die vorliegende Studie zeigt, dass der diskordante Befall des Knochenmarks bei Patienten mit diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen eine heterogene Gruppe von Befunden repräsentiert. In der Mehrheit der auswertbaren Fälle fand sich anhand der vergleichenden molekularen Analyse ein Beleg dafür, dass die Expansion eines einzelnen B-Zell Klons mit unterschiedlicher morphologischer Manifestation vorlag.

Bei einem Drittel der Patienten deren Proben technisch verwertbar waren, sind die Infiltrate im Knochenmark Ausdruck eines zweiten – klonal nicht verwandten – niedrig-malignen Non-Hodgkin-Lymphoms.

Bei Patienten mit diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen ist die diskordante Infiltration des Knochenmarks durch eine mehr einem niedrigmalignen NHL entsprechende kleinzellige Population seit langem bekannt. In der Literatur wird berichtet, dass dieses Phänomen bei 14 bis über 40% aller Patienten mit primär diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen mit Knochenmarksbefall auftritt (Fisher RI et al., 1981 (a) und (b); Mead GM et al., 1983; Bartl R et al., 1988; Fisher DE et al. 1989; Conlan MG et al., 1990; Juneja SK et al., 1990; Kluin PM et al., 1990; Robertson LE et al., 1991; Hodges GF et al., 1994).

Es wird vermutet, dass der diskordante Befall des Knochenmarks durch eine gemeinsame klonale maligne Grunderkrankung hervorgerufen wird. Dennoch gibt es bislang wenige molekularpathologische Arbeiten, die diese Hypothese untermauern. Eine Studie untersuchte mittels Southern Blotting das Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen- bzw. das T-Zell-Rezeptor-Gen-Rearrangement von diskordanten Knochenmarksinfiltraten und konnte in der Mehrheit der Fälle eine Monoklonalität nachweisen. Allerdings führten die Autoren keine vergleichenden Untersuchungen von Knochenmark und Primärlokalisation durch (Crisan D et al., 1995). Eine weitere Arbeit konnte bei einem von vier – nach stringenten Kriterien – diskordanten Fällen durch eine PCR für das Schwere-Ketten-Gen-Rearrangement (FR3) Monoklonalität im Knochenmarksgewebe nachweisen. Die Knochenmarksinfiltrate wurden allerdings nicht mikrodiseziert. Dies könnte erklären, weshalb in der Mehrheit der Fälle kein Klonalitätsnachweis gelang. Zudem fand auch hier keine vergleichende Klonalitätsuntersuchung mit Gewebe von der Primärlokalisation statt (Maes B et al., 2000). Folglich ist die vorliegende Arbeit die erste, die dies in größerem Umfang unternommen hat.

Für die Studie wurden retrospektiv alle Fälle herausgesucht, bei denen ausreichend Gewebe von beiden Tumorlokalisationen vorhanden war, um die Frage nach einer möglichen klonalen Verwandtschaft auf molekularer Ebene zu klären.

Schließlich handelt es sich bei diskordanten Lymphomen um ein Problem, auf das der Pathologe und der Kliniker mit gewisser Regelmäßigkeit stoßen. Alle Patienten, bei denen sich bei Durchsicht der Krankenakten Hinweise für eine Vorerkrankung an einem folliculären Lymphom fanden, wurden ausgeschlossen, da die Diskordanz in diesen Fällen vermutlich durch Transformation zustande kam, die in aller Regel zuerst außerhalb des Knochenmarks auftritt.

## **5.1 Bislang ungenaue Definition des Begriffs diskordantes Lymphominfiltrat**

### *Zeitliche und terminologische Aspekte*

Als „klassisch diskordant“ kann man alle Fälle bezeichnen, bei denen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eines „high grade“-Lymphoms im Rahmen des primären Stagings im Knochenmark ein divergierender kleinzelliger maligner Befall gefunden wird, ohne dass sich aus der Vorgeschichte des Patienten Hinweise für eine Erkrankung an einem niedrigmalignem Lymphom ableiten lassen. Die vorliegende Arbeit beschränkte sich auf solche „klassisch diskordanten“ Fälle.

Fälle mit Vorbefunden einer Erkrankung an einem niedrigmalignen Lymphom und Lymphome, bei denen erst im Krankheitsverlauf ein unterschiedliches histologisches Muster im Knochenmark auftritt, sollten besser als „diskordant im weiteren Sinne“ bezeichnet werden. Bei der ersten Gruppe handelt es sich meist um transformierte indolente Lymphome (vgl. voriger Abschnitt), bei der zweiten möglicherweise um eine Zweiterkrankung oder um eine Folge der Behandlung durch Chemotherapie (sog. „downgraded lymphoma“, wobei dessen Existenz umstritten ist) (Muller-Hermelink HK et al., 2001).

Außerdem ist noch der Begriff „composite lymphoma“ vom diskordanten Lymphom abzugrenzen. „Composite lymphomas“ (Kombinationslymphome) sind Lymphome bei denen zwei oder mehr unterschiedliche Lymphomarten in einem Lymphknoten oder einer extranodalen Tumorlokalisierung vorliegen (Hodges GF et al., 1994; Fend F et al., 1999). Diskordante Lymphome hingegen zeigen verschiedene histologische Subtypen an unterschiedlichen anatomischen Stellen, wobei aber beispielsweise in einem befallenen Lymphknoten nur ein Lymphomtyp anzutreffen ist (Fisher RI et al., 1981 (a); Hodges GF et al., 1994).

### *Morphologische Kriterien*

Leider ist der Begriff diskordant in diesem Zusammenhang bislang noch nicht eindeutig morphologisch definiert. In der vorliegenden Studie wurden nur solche Knochenmarksinfiltrate als diskordant angesehen, bei denen Zentroblasten entweder fehlten oder nur in sehr geringer Anzahl vorhanden waren (weniger als 5 Zentroblasten bei 400facher Vergrößerung). Der vorherrschende Zelltyp war somit kleinzellig. Einige Autoren hingegen subsumieren unter diskordant auch solche Infiltrate, die eine gemischtzellige Zellpopulation aufweisen (klein- und großzellig) (Hodges GF et al., 1994). Wenn zusätzlich noch folliculäre Lymphome mit unterschiedlichen zytologischen Differenzierungsstufen in zwei verschiedenen Biopsiestellen mit eingeschlossen werden, steigt die Inzidenz der diskordanten Lymphome auf 50 bis über 60% (Jagannath S et al., 1985; Fisher DE et al., 1989; Hodges GF et al., 1994). Der Begriff diskordantes Lymphominfiltrat sollte – wie in der vorliegenden Studie – für die Fälle reserviert bleiben, bei denen der vorherrschende Zelltyp im Knochenmark überwiegend bzw. ausschließlich kleinzellig ist. Schließlich zeigte sich in zwei Studien, bei denen die Definition der Diskordanz großzügiger gefasst wurde, dass bei Patienten mit einer gemischtzelligen malignen Population im Knochenmark (klein- und großzellige lymphoide Zellen), die Prognose ähnlich ungünstig war wie bei konkordantem Befall (Conlan MG et al., 1990; Hodges GF et al., 1994). Allerdings wurde bei diesen Studien keine immunhistochemische Untersuchung der Infiltrate im Knochenmark unternommen (vgl. nächster Abschnitt: *Bedeutung der Immunhistochemie*).

### *Bedeutung der Immunhistochemie*

Bei zwei Fällen (17 und 18) wurde der – erst im Rahmen dieser Studie festgestellte – konkordante Befall des Knochenmarks aufgrund eines starken reaktiven Hintergrunds durch T-Lymphozyten initial als diskordant fehlgedeutet. Erst durch die Immunhistochemie (CD20 und CD3) konnte die Konkordanz aufgedeckt werden (siehe **Abb. IV.3**; S. 54). Der Unterscheidung zwischen konkordanter und diskordanter Infiltration des Knochenmarks kommt große Bedeutung zu, da Patienten mit einer überwiegend blastären (konkordanten) neoplastischen Zell-Population eine ungünstigere Prognose besitzen (Fisher RI et al., 1981 (a) und (b); Jagannath S et al., 1985; Fisher DE et al., 1989; Hodges GF et al., 1994). Im Einklang damit steht, dass die betreffenden Patienten (17 und 18) bereits 2 bzw. 4 Monate nach Diagnosestellung an ihrer Erkrankung verstorben waren (siehe **Tabelle IV.3**; S. 51). Dies unterstreicht die Wertigkeit der Immunhistochemie bei scheinbar offensichtlich diskordanten (niedrigmalignen) Lymphominfiltraten des Knochenmarks.

Des weiteren mussten drei Fälle nach Reevaluation und Immunhistochemie als reaktiv reklassifiziert werden. Die Unterscheidung zwischen reaktiven (also benignen) und malignen Infiltraten gelingt in der Regel zuverlässig anhand morphologischer Kriterien und der immunhistochemischen Untersuchung. In unklaren Fällen kann eine PCR für das IgH-Rearrangement der mikrodissierte Infiltratzellen weiterhelfen (Kremer M et al., 2000). Alle als reaktiv reklassifizierten Fälle (19 bis 21) zeigten hierbei ein polyklonales Muster, während sich bei der Analyse der zugehörigen Lymphknoten eine reproduzierbare monoklonale Bande ergab. Ebenso zeigte sich bei den drei Kontrollfällen mit reaktiven lymphoiden Infiltraten eine polyklonale Bande bei der Analyse der betreffenden Zellen des Knochenmarks.

Selbst unter Anwendung möglichst stringenter Kriterien wie in der vorliegenden Studie, tritt diskordanter Knochenmarksbefall bei diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen überaus häufig auf. Von den 42 untersuchten Patienten mit diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen mit Beteiligung des Knochenmarks, hatten nur 15 (36%) einen konkordanten (großzelligen) Befund im Knochenmark. Hierbei sind die beiden später als konkordant reklassifizierten Fälle bereits mit eingeschlossen (s. o.).

16 der 42 (38%) der herausgesuchten diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome erfüllten die Einschlusskriterien für ein diskordantes Lymphominfiltrat. Die verbleibenden 11 Fälle (26%) mussten ausgeschlossen werden. Die Ausschlussgründe waren eine vorbestehende Erkrankung an einem niedrigmalignen B-Zell-NHL (meist follikuläre Lymphome) oder eine notwendige Reklassifikation der Infiltrate als konkordant bzw. reaktiv. Somit wiesen etwas mehr als 50% (16 von 31) aller Patienten im untersuchten Krankengut mit einer Erkrankung an einem diffus-großzelligen B-Zell-Lymphom und Knochenmarksbefall eine morphologisch diskordante maligne Infiltration auf.

## **5.2 Molekularpathologie diskordanter Lymphominfiltrate des Knochenmarks bei diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen**

### *Zur Vorgehensweise bei den molekularen Untersuchungen*

Mit der Analyse des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen-Rearrangements steht eine Methode zur Verfügung, die eine vergleichende Untersuchung am Paraffingewebe beider Biopsiestellen ermöglicht. Dies erlaubt eine retrospektive Herangehensweise mittels Archivmaterial.

Zur Erreichung einer möglichst großen Sensitivität und Spezifität kam bei kleinen Infiltraten die Laser Capture Mikrodissektion (LCM) zum Einsatz. Dadurch gelang es, nur die interessierenden neoplastischen Zellen für die PCR zu verwenden, ohne dass deren Monoklonalität durch den Hintergrund sonstiger vorhandener benigner B-Lymphozyten verdeckt worden wäre. Eine Pseudo-Klonalität (Amplifikation von einzelnen benignen Lymphozyten, wodurch aufgrund des geringen DNA- und Zell-Gehalts der Probe eine nicht vorhandene Klonalität suggeriert wird) wurde durch Mikrodissektion mehrerer Schnitte (durchschnittlich 5) und Sammeln des erhaltenen Gewebes in einem Gefäß („Pooling“) vermieden (Zhou XG et al., 1999).

Zudem erfolgte bei allen Proben – wie bereits erwähnt – eine orientierende Kontrolle der DNA-Menge durch Amplifikation des  $\beta$ -Globin-Gens. Alle Fälle, bei denen eine Monoklonalität nachgewiesen werden konnte, wiesen eine eindeutig positive  $\beta$ -Globin-Kontrolle auf. Ferner wurden alle Proben in der PCR in mehrfachen (mindestens doppelten) Ansätzen eingesetzt. Ein zweifach pseudo-klonales Ergebnis mit gleicher Größe ist sehr unwahrscheinlich. Des weiteren erfolgte eine genaue Größenbestimmung der monoklonalen PCR-Produkte mittels Fragment-Längen-Analyse. Dieses Vorgehen hat sich zum Nachweis kleiner maligner klonaler Zell-Populationen bewährt (Kremer M et al., 2000).

Darüber hinaus kam für die vergleichende Analyse eine PCR für die Bcl-2-Translokation zum Einsatz, da diese bei ungefähr 30% aller diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome vorkommt. Wenn ein Bcl-2-Rearrangement vorhanden ist, kann die Länge des PCR-Produkts als zusätzlicher klonaler Marker dienen, da die Bcl-2-Translokation im Verlauf der Erkrankung stabil bleibt (Raffeld M et al., 1987). Man vermutet, dass viele diskordante Knochenmarksinfiltrate auf ein follikuläres Lymphom zurückzuführen sind. Der Nachweis einer Bcl-2-Translokation kann diese Annahme unterstützen. In der vorliegenden Arbeit beschränkte sich die Untersuchung auf die „major breakpoint region (mbr)“, da sie die häufigste ist, und sich dadurch die meisten Bcl-2-Translokationen erfassen lassen (Tang SC et al., 1994; Hill ME et al., 1996; Kramer MH et al., 1998).

#### *Klonal verwandte Fälle*

Durch den Einsatz der beschriebenen Methodik gelang es, in zwei Drittel der technisch verwertbaren Fälle (Nummer 1 bis 8) einen gemeinsamen klonalen Ursprung von Knochenmarksinfiltraten und extramedullärem Tumorgewebe nachzuweisen. Es ließ sich also ein IgH- und/oder ein Bcl-2-Rearrangement gleicher Länge im Material beider Biopsiestellen aufzeigen (vgl. **Tabelle IV.4a**; S. 56).

Drei Viertel (6 von 8; 75%) der klonal verwandten Fälle scheinen aus einem folliculären Lymphom hervorgegangen zu sein. Diese Annahme resultiert aus der typischen paratrabekulären Morphologie der Knochenmarksinfiltrate, der immunhistochemischen Untersuchung des Primärtumors und der großen Häufigkeit der Bcl-2-Translokation (Fallnummern 2, 4, 5, 6, 7 und 8).

Folglich kann man diese Erkrankungen als transformierte folliculäre Lymphome ansehen, die bis zur Diagnosestellung des hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphoms klinisch noch nicht in Erscheinung getreten sind. Dieses Resultat ist nicht unbedingt überraschend, da 30 bis 60% aller folliculären Lymphome im Krankheitsverlauf eine Transformation zu einem diffusgroßzelligen B-Zell-Lymphom zeigen. Bei sekundären Lymphomen, die aus folliculären Lymphomen hervorgegangen sind, gelingt in der Mehrheit der Fälle der Nachweis eines gemeinsamen klonalen Ursprungs (de Jong D et al., 1989; Zelenetz et al., 1991; Matolcsy A, 1999 (a); Matolcsy A et al., 1999 (b)). Die gefundene klonale Verwandtschaft steht also im Einklang mit diesen Vorarbeiten, auch wenn auf eine Sequenzierung der PCR-Produkte mit gleicher Länge in beiden Gewebeproben verzichtet wurde. Unterschiedliche Sequenzen sind bei gleicher Größe der FR3- bzw. FR2-PCR-Produkte allerdings sehr unwahrscheinlich. Wenn durch Fragment-Längen-Analyse exakt eine identische Basenpaar-Anzahl ermittelt wird, liegt praktisch immer dieselbe Gensequenz zugrunde.

Ferner fanden sich bei 4 dieser 6 Fälle reproduzierbar Bcl-2-Rearrangements gleicher Länge in der PCR (Fallnummern 4, 5, 7 und 8).

Auch die relativ starke Expression von p53, die auf eine p53-Mutation hindeutet, bei 3 dieser 8 Fälle aus Gruppe 1 kann als Hinweis auf eine Transformation in ein höhermalignes Lymphom dienen (vgl. **Abb. IV.4**; S. 54). Schließlich handelt es sich bei einer p53-Mutation um ein Ereignis, das bei B-NHLs meist sekundär im Verlauf der Erkrankung auftritt. Ferner konnte in einer Studie gezeigt werden, dass bei folliculären Lymphomen mit histologischer Transformation in einem Drittel der Fälle p53-Mutationen auftreten (Sander CA et al., 1993). In einer weiteren Untersuchung – mit allerdings nur geringer Fallzahl – wurden Mutationen bei histologisch transformierten folliculären Lymphomen sogar in 4 von 5 Fällen festgestellt (Lo Coco F et al., 1993).

Bei indolenten Lymphomen wie der CLL und folliculären Lymphomen ohne Hinweise für histologische Transformation treten p53-Alterationen hingegen nur sehr selten auf (Sander CA et al., 1993).

2 Fälle (Nr. 1 und 3) mit gemeinsamem klonalem Ursprung zeigten in der Durchflusszytometrie kleine lymphoide Zellen mit einer Koexpression von CD5 und CD23 – ein

typischer Befund für eine B-CLL (vgl. **Tabelle IV.4a**; S. 56). Im Gegensatz zu den oben erwähnten Fällen mit paratrabekulären Infiltraten lagen die monomorphen neoplastischen Zellen bei diesen beiden Patienten eher zentral in einiger Entfernung von den Knochen-Trabekeln.

Die Morphologie entsprach somit einem nodulären Infiltrationsmuster wie es bei einer B-CLL gesehen wird. Es handelte sich hier somit wahrscheinlich um eine extramedulläre Richter-Transformation einer bislang unentdeckten B-CLL in ein diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom mit einem daraus resultierenden diskordantem Knochenmarksbefall. Erstaunlicherweise war bei beiden Patienten bislang noch keine B-CLL diagnostiziert worden. Bemerkenswert ist zudem, dass sich in unserem Patientenkollektiv gleich mehrere solche Fälle befanden, tritt eine Richter-Transformation doch relativ selten im Verlauf einer B-CLL auf (bei ca. 5% der Erkrankten) (Harris NL et al., 1994).

#### *Klonal unverwandte Fälle*

Bei einem Drittel (4 von 12) der technisch verwertbaren Fälle konnte im Knochenmark ein vom Lymphknoten verschiedener Klon nachgewiesen werden (vgl. **Tabelle IV.4b**; S. 58). Bei drei Patienten dieser Gruppe konnten mit FR3-Primern reproduzierbar zwei verschieden große monoklonale PCR-Produkte aus beiden Gewebeproben gewonnen werden.

Mittels direkter Sequenzierung konnte die unterschiedliche Klonalität belegt werden. Dadurch konnten somatische Mutationen (sog. „ongoing mutations“, die v. a. bei Antigenkontakt in Keimzentren auftreten) wie Basenaustausche, Deletionen oder Insertionen, wodurch sich trotz klonaler Verwandtschaft eine unterschiedliche Produktlänge ergeben könnte, ausgeschlossen werden.

Ebenso ist es unwahrscheinlich, dass die zwei divergierenden Sequenzen auf eine einseitige starke Amplifikation eines biallelischen Rearrangements zurückzuführen sind, da das eine PCR-Produkt reproduzierbar und ausschließlich im Lymphknotengewebe vorhanden war, während das andere reproduzierbar und ausschließlich in der Knochenmarksbiopsie zu finden war (Fend F et al., 1999).

Bei einem Fall (Nr. 12) konnte kein reproduzierbares monoklonales IgH-Rearrangement nachgewiesen werden. Die unterschiedlich großen Bcl-2-Rearrangements des Lymphknotens und des Knochenmarks erlauben aber die Annahme, dass auch hier eine klonale Divergenz vorliegt.

Folglich darf nicht jedes diffus-großzellige B-Zell-Lymphom, das im Zusammenhang mit einem „low grade“-Lymphom auftritt als direkte Transformation desselbigen angesehen

werden. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass bei manchen Patienten mit einer B-CLL mit vermuteter Richter-Transformation die beiden Erkrankungen keinen gemeinsamen klonalen Ursprung haben (Matolcsy A et al., 1994). Selbiges konnte auch bei Fall 9 beobachtet werden.

Schließlich treten bei Patienten, die an einem B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom erkrankt sind, sekundäre hämatologische Erkrankungen auch ohne vorausgegangene Chemo- oder Strahlentherapie mit gewisser Regelmäßigkeit auf (Armitage JO et al., 2001) (vgl. **Tabelle IV.4b**; S. 58).

#### *Technisch nicht verwertbare Fälle*

4 der 16 molekular untersuchten Fälle waren aus technischen Gründen leider nicht verwertbar (vgl. **Tabelle IV.4c**; S. 60).

Es sollte angemerkt werden, dass die Effizienz einer PCR Reaktion mit DNA aus Archivmaterial – gerade bei wenigen zu analysierenden Zellen nie 100%-ig ist. Einfluß auf die Amplifikation von DNA von histologischen Schnitten können haben:

- das Alter des Materials (älteres Material ist meist weniger gut zu amplifizieren)
- die Asservierung des Gewebes (Fixiermaterial, Fixierdauer, Entkalkung des Knochenmarks, Paraffineinbettung, Färbungen)
- die Dicke des Schnittes (Teile des Kerns sind in der Regel abgeschnitten, was zum Verlust von DNA führt)
- die DNA-Extraktion (die Proteinase K Behandlung kann z. B. unvollständig sein)

(Roehrl MH et al., 1997).

Diese Problematik trifft in besonderem Maße auf das Knochenmark-Material zu, da hier die Fixierdauer des Gewebes sehr lang ist (48 Stunden) (Coad JE et al., 1997). Ferner waren die Infiltratzellen in einem Fall mit der Laser Capture Mikrodisektion leider nur sehr schwer zu gewinnen (Fall 13). Somit ist es nicht ungewöhnlich, dass bei 3 der 4 technisch nicht verwertbaren Fälle nicht genügend DNA aus dem Knochenmarksgewebe extrahiert werden konnte – wie es durch das negative bzw. sehr schwach positive Ergebnis der  $\beta$ -Globin-Kontrollen der betreffenden Proben (Fall-Nr. 13, 14 und 15) bestätigt wurde. Das Paraffingewebe dieser drei Fälle war bereits 5 bis 7 Jahre alt.

Ferner soll nicht unerwähnt bleiben, dass Ende 1999 die bis dahin zur Fixierung der Knochenmarksbiopsien verwendete Schäfer-Lösung (1% Formaldehyd/ 0,5% Glutaraldehyd) durch gepuffertes 10%-iges Formalin ersetzt wurde. Das gepufferte 10%-ige Formalin erleichterte möglicherweise auch die DNA-Amplifikation.

Bei einem Fall (Nr. 16) ließ sich mit den verwendeten Primern leider keine Monoklonalität nachweisen, obwohl der DNA-Gehalt laut  $\beta$ -Globin-Kontrollen ausreichend war. Auch dieses Problem ist schon mehrfach beschrieben worden. Selbst bei Verwendung mehrerer PCR-Analysen mit unterschiedlichen Primern lässt sich nicht in 100% der Fälle eine Klonalität nachweisen. Ursächlich sind beispielsweise somatische Mutationen des rearrangierten Schwere-Ketten-Gens, wodurch ein Anheften der Primer erschwert wird. Dieses Problem tritt besonders bei „consensus-Primern“ auf wie sie bei der Untersuchung des IgH-Rearrangements zum Einsatz kamen (Segal GH et al., 1994; Maes B et al., 2000).

### 5.3 Korrelation der Ergebnisse mit durchflusszytometrischen Untersuchungen

#### *Wertigkeit von Durchflusszytometrie und Histologie*

Eine interessante Beobachtung war die relativ hohe Rate falsch negativer Ergebnisse in der Durchflusszytometrie (6 von 15 Fällen; 40%) (vgl. **Tabellen IV4.a-c**; S. 56 ff.; Patienten 2, 4, 8, 12, 14 und 15). Dies bestätigt eindrucksvoll die Wichtigkeit der histologischen Untersuchung einer Knochenmarksstanzbiopsie – neben der zytologischen und durchflusszytometrischen Analyse des Knochenmarksaspirats. Besondere Bedeutung kommt der Histologie bei follikulären Lymphomen zu, bei denen die malignen Infiltrate meist paratrabekulär gelegen sind und deshalb nicht selten bei der Untersuchung des Knochenmarksaspirats unentdeckt bleiben. Auch die vermehrte retikuläre Fibrose im Bereich der Lymphominfiltrate kann zu einem falsch-negativen Ergebnis in der Durchflusszytometrie führen, da dadurch die Aspiration der neoplastischen Zellen erschwert wird (Hanson CA et al., 1999). So ist es nicht verwunderlich, dass alle 6 Fälle, die in unserer Studie in der FACS-Analyse falsch negativ waren, eine paratrabekuläre Infiltration mit vermehrter Retikulinfibrose aufwiesen (Fälle 2, 4, 8, 12, 14 und 15).

#### *Vergleichende Untersuchungen diskordanter Lymphominfiltrate des Knochenmarks mittels Durchflusszytometrie*

Obwohl bislang noch keine vergleichende molekularpathologische Studie diskordanter Lymphominfiltrate des Knochenmarks unternommen wurde, konnten vor kurzem in einer Studie anhand durchflusszytometrischer Untersuchungen ebenfalls in einem Drittel der analysierten diskordanten Fälle Belege für das Vorliegen zwei verschiedener Erkrankungen gefunden werden (Wright BF et al., 2002).

Eine weitere Arbeit, in der simultan gewonnenes Material unterschiedlicher anatomischer Lokalisationen bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen mittels Durchflusszytometrie untersucht wurde, kam zu ähnlichen Resultaten. Allerdings waren hierbei auch – im Gegensatz zur vorliegenden Studie – zahlreiche Patienten mit eingeschlossen, die bereits eine Behandlung mit Chemotherapie hinter sich hatten. Die Primärdiagnose war bei diesen Fällen also schon zu einem früheren Zeitpunkt gestellt worden (Onciu M et al., 2002).

#### **5.4 Klinische Relevanz der Ergebnisse**

Über die prognostische Bedeutung des diskordanten Knochenmarksbefalls bei B-NHLs kann die vorliegende Arbeit keine Aussage treffen. Zum einen weil die Beobachtungszeit bei einem Teil der Patienten nur wenige Monate lang war (erst kurz zurückliegende Diagnosestellung), und zum anderen weil keine geeignet große Vergleichsgruppe mit konkordanter Erkrankung des Knochenmarks untersucht wurde. Dennoch scheint die – wenn auch nur in relativ geringem Umfang – vorhandene Literatur dafür zu sprechen, dass der diskordante Befall des Knochenmarks nicht unbedingt mit einem disseminierteren Krankheitsstadium des hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphoms (Stadium IV nach der Ann-Arbor-Klassifikation) gleichgesetzt werden sollte – unabhängig davon wie geartet die klonale Beziehung der beiden vorliegenden Zell-Populationen ist. In einigen Vorarbeiten, in denen die prognostische Bedeutung der diskordanten Erkrankung retrospektiv analysiert wurde konnte gezeigt werden, dass Patienten mit diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen die im Knochenmark maligne Infiltrate mit überwiegend kleinzelligen Lymphozyten aufwiesen, eine Überlebenserwartung hatten die in etwa der Patienten ohne Knochenmarksbefall gleichkam (Fisher RI et al., 1981 (a) und (b); Mead GM et al., 1983; Fisher DE et al., 1989; Conlan MG et al., 1990; Robertson LE et al., 1991; Hodges GF et al., 1994).

Andererseits haben Patienten mit diskordantem Knochenmarksbefall möglicherweise ein erhöhtes Rezidivrisiko, das folglich bei der Therapieplanung und der Nachsorge berücksichtigt werden sollte (Robertson LE et al., 1991). Hinweise für die erhöhte Rezidivgefahr zeigen sich auch in der vorliegenden Arbeit. So wiesen 3 Patienten eine Persistenz und 2 ein Rezidiv der indolenten Komponente im Beobachtungszeitraum auf, während nur 2 keinerlei Anzeichen für eine fortbestehende Erkrankung hatten (von den verbleibenden 9 Patienten waren 7 Patienten an ihrer Grunderkrankung verstorben und die 2 anderen Fälle erst kürzlich diagnostiziert worden).

Bislang liegen keine nennenswerten prospektiven Untersuchungen über den Krankheitsverlauf von Patienten mit Lymphomen mit histologischer Diskordanz zwischen Knochenmark und Primärlokalisierung vor, obwohl das Phänomen v. a. bei diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen alles andere als selten ist.

### 5.5 Noch ungeklärte Fragen

Es ist anzunehmen, dass auch das „microenvironment“ des Knochenmarks mitverantwortlich für das Auftreten des Phänomens diskordanter Knochenmarksinfiltrate ist. Auf welche Weise dies geschehen könnte, ist allerdings bisher weitgehend unklar. Eine zentrale Funktion für die Schaffung des Mikro-Milieus im Knochenmark scheint der Knochenmarks-Stromazelle zuzukommen (Bertrand FE et al., 2000). Möglicherweise ist in diesem speziellen „microenvironment“, die Ursache dafür zu sehen, dass bei diskordanten Lymphomen die aggressivere Komponente praktisch ausschließlich außerhalb des Marks zu finden ist (Ghia P et al., 2000).

Dies wäre vielleicht eine Erklärung dafür, dass auch bei T-Zell-Lymphomen vereinzelt diskordante Infiltrate auftreten können (Crisan D et al., 1994). Auch bei der hier vorgelegten Arbeit fanden sich bei der Archivsuche Anhaltspunkte für eine diskordante Infiltration bei zwei Patienten mit aggressiven T-Zell-Lymphomen (vgl. **Tabelle IV.2**; S. 49).

Unklar ist zudem, ob eine mögliche präferentielle Rezirkulation kleiner maligner Lymphozyten zur Entstehung diskordanter Knochenmarksinfiltrate beiträgt (Kluin PM et al., 1990; Hodges GF et al., 1994).

Weiterhin ist offen, ob alle Subtypen diffus-großzelliger B-Zell-Lymphome diskordante Infiltrate des Knochenmarks zeigen können, schließlich handelt es sich bei den diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen.

Eine Subklassifizierung diffus-großzelliger B-Zell-Lymphome erscheint neuerdings klinische Relevanz zu erlangen, seitdem mit der Microarray-Technik eine Stratifizierung in Subtypen gelungen ist, die allen Anschein nach prognostische Bedeutung hat (Alizadeh AA et al., 2000; Rosenwald A et al., 2002). So konnten mit der Expressionsanalyse durch cDNA-Microarrays die diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome in DLBCL vom Keimzentrumstyp, DLBCL vom Typ aktivierter B-Zellen und Typ 3 DLBCL unterteilt werden. Es ist bislang nicht geklärt, ob eine dieser Untergruppen bevorzugt mit diskordantem Knochenmarksbefall in Erscheinung tritt. Dennoch darf spekuliert werden, ob zumindest die Mehrheit der diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome der Gruppe 1 (klonal verwandte Fälle) der hier präsentierten Studie den

diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen vom Keimzentrumstyp angehören. Schließlich scheinen nur die – möglicherweise mit einer besseren Prognose assoziierten – diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome vom Keimzentrumstyp, die Bcl-2-Translokation aufzuweisen und folglich vorwiegend von folliculären Lymphomen abzustammen (Rosenwald A et al., 2002). Allerdings gibt es auch teilweise widersprüchliche Angaben über die prognostische Bedeutung dieser neu beschriebenen Subtypen (Shipp MA et al., 2002).

## 5.6 Fazit für die Praxis

Klassisch diskordante Lymphominfiltrate bei Patienten mit diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen zeichnen sich dadurch aus, dass zum Zeitpunkt der Erstdiagnose im Rahmen des primären Stagings im Knochenmark ein divergierender kleinzelliger maligner Befall gefunden wird. Bei der Analyse der Vorgeschichte des Patienten dürfen sich keine Hinweise für eine Erkrankung an einem niedrigmalignem Lymphom finden.

Wie erwähnt ist eine konkordante Infiltration des Knochenmarks eindeutig mit einer schlechteren Prognose verbunden (Armitage JO et al., 2001). Deshalb muss unbedingt ein konkordanter Befall ausgeschlossen werden, bevor die Diagnose einer diskordanten Lymphominfiltration gestellt werden darf. Folglich sollte man die diskordanten Infiltrate einer genaueren Analyse unterziehen (Immunhistochemie und evtl. molekularpathologische Untersuchungen), vor allem dann, wenn Durchflusszytometrie und molekulare Methoden für Staging und Nachsorge eingesetzt werden. In einigen Fällen kann eine konkordante Erkrankung im Knochenmark erst mit der Immunhistochemie nachgewiesen werden, wie bei den Fällen 17 und 18 eindrucksvoll demonstriert werden konnte (vgl. **Abb. IV.3** und **Abschnitt 4.4**; S. 53 ff.). Deshalb sollte in der Regel erst nach Durchführung einer immunhistochemischen Untersuchung beurteilt werden, ob ein diskordanter Befall vorliegt (siehe oben: *Bedeutung der Immunhistochemie*).

Bei Patienten mit diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen bei denen nach der Analyse der Vorgeschichte und der immunhistochemischen Untersuchung ein diskordanter Befall des Knochenmarks diagnostiziert wird, sollte der diskordante Knochenmarksbefund nicht als Kriterium für die Zuordnung zum Krankheitsstadium IV (nach der Ann-Arbor-Klassifikation; vgl. Anhang, **Tab. VIII.1**; S. 88) angesehen werden.

Das möglicherweise bei diesen Patienten vorliegende erhöhte Rezidivrisiko sollte bei der Therapieplanung und der Nachsorge berücksichtigt werden (vgl. Abschnitte **2.2.** und **5.5**).

## 6. Zusammenfassung

Diskordanter Knochenmarksbefall bei Patienten mit diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen zeichnet sich im Knochenmark – abweichend von der großzelligen Zytologie des Primärbefunds – durch eine überwiegend aus kleinen lymphoiden Zellen bestehende Infiltration aus, die morphologisch eher einem niedrigmalignem Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) entspricht. Die vorliegende Dissertation versuchte mittels vergleichender molekularpathologischer Untersuchungen die klonalen Beziehungen zwischen dem diskordanten Befall des Knochenmarks bei diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen und dem zugehörigen extramedullären Tumorgewebe zu klären.

Hierzu erfolgte zuerst eine ausführliche Archivsuche, bei der auch die Häufigkeit des Auftretens von diskordanten Infiltraten des Knochenmarks bei Patienten mit diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen und Knochenmarksbefall zum Zeitpunkt der Primärdiagnose ermittelt wurde (im untersuchten Krankengut waren dies knapp über 50%). Bei den hierbei gefundenen Fällen wurden alle relevanten klinischen Verlaufsdaten erhoben und alle Patienten mit einer Vorerkrankung an einem niedrigmalignen NHL ausgeschlossen. Eine erneute histologische Evaluation aller Fälle schloss sich an.

Insgesamt fanden sich 21 Fälle bei denen vergleichende Klonalitätsuntersuchungen anhand des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gens- (IgH) und Bcl-2-Rearrangements als molekulare Marker zum Einsatz kamen. Das IgH-Rearrangement wurde mittels PCR mit Konsensus-Primern für das „framework“ 3 bzw. 2 (FR3 und FR2) amplifiziert, anschließend einer automatisierten Fragment-Längen-Analyse unterzogen und in ausgewählten Fällen sequenziert. Die Bcl-2-Translokation wurde anhand einer PCR mit Primern für die „major breakpoint region“ untersucht. Bei kleinen Infiltraten erfolgte die Mikrodissektion der Knochenmarksinfiltrate mit Hilfe der Laser Capture Mikrodissektion (LCM), ansonsten manuell.

Ferner wurden immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen CD3, CD10, CD20, Bcl-2, Bcl-6 und p53 vorgenommen.

Nach der Reevaluation anhand der immunhistochemischen Färbungen mussten 5 der 21 Fälle von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen werden (2 Fälle als konkordant mit einem starken Hintergrund kleiner reaktiver T-Zellen; 3 Fälle wegen dem Vorliegen benigner reaktiver Infiltrate ohne Hinweise auf Lymphombefall – als Bestätigung der Tumorfreiheit wiesen diese 3 reaktiven Fälle eine polyklonales IgH-Rearrangement auf).

Bei 8 der verbleibenden 16 Fälle konnte durch gleich große IgH- oder Bcl-2-Rearrangements eine gemeinsamer klonaler Ursprung nachgewiesen werden. 4 Fälle (von 16) zeigten reproduzierbar ein IgH- oder Bcl-2-Rearrangement verschiedener Größe, was für eine unterschiedliche klonale Herkunft spricht. Bei 4 Patienten war das vorhandene Gewebe aus technischen Gründen leider nicht verwertbar.

In der Mehrheit der technisch auswertbaren Fälle sprachen die morphologischen, die immunphänotypischen und die molekularen Befunde für einen Keimzentrumsursprung der betreffenden B-Zell-Lymphome. Allerdings fand sich in der Durchflusszytometrie bei 4 dieser 16 Fälle der Phänotyp einer B-CLL. 2 dieser 4 Fälle wiesen eine klonale Verwandtschaft mit dem zugehörigen extramedullären diffus-großzelligen B-Zell-Lymphom auf. Folglich lag bei diesen 2 Patienten eine Richter-Transformation vor.

Die vorgelegte Studie zeigt, dass es sich beim diskordanten Befall des Knochenmarks durch diffus-großzellige B-Zell-Lymphome um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen handelt. In der Mehrheit der Fälle handelt es sich dabei um klonale verwandte Neoplasien, wobei das extramedulläre diffus-großzellige B-Zell-Lymphom wahrscheinlich durch Transformation aus einem klinisch bislang unentdeckten niedrigmalignen Lymphom hervorgegangen ist. Bei einem relevanten Teil (in der vorliegenden Arbeit bei einem Drittel der technisch verwertbaren Fälle) der Patienten lassen sich aber zwei klonal verschiedene B-Zell-Populationen nachweisen.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aarts WM, Bende RJ, Bossenbroek JG, Pals ST, van Noesel CJ. Variable heavy-chain gene analysis of follicular lymphomas: subclone selection rather than clonal evolution over time. *Blood* 2001; 98(1): 238-240.
- Albinger-Hegyí A, Hochreutener B, Abdou MT, Hegyí I, Dours-Zimmerman MT, Kurrer MO, Hietz PU, Zimmerman DR: High frequency of t(14;18)-translocation breakpoints outside of major breakpoint and minor cluster regions in follicular lymphoma: improved polymerase chain reaction protocols for their detection. *Am J Pathol* 2002; 160: 823-832.
- Acker B, Hoppe RT, Colby TV, Cox RS, Kaplan HS, Rosenberg SA. Histologic conversion In the non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 1983; 1: 11-16.
- A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 89: 3909-3918.
- Aisenberg AC. Historical Review of lymphomas. *Br J Haematol* 2000; 109(3): 466-476.
- Akasaka T, Ueda C, Kurata M, Akasaka H, Yamabe H, Uchiyama T, Ohno H. Nonimmunoglobulin (non-Ig)/Bcl-6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma results in worse prognosis than Ig/Bcl-6. *Blood* 2000; 96: 2907-2909.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald AA, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JJ, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson Jr J, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503-511.
- American Cancer Society. Cancer facts and figures 2002. Atlanta: American Cancer Society, 2002. [www.cancer.org/downloads/STT/CancerFacts&Figures2002TM.pdf](http://www.cancer.org/downloads/STT/CancerFacts&Figures2002TM.pdf) (15.06.2003)
- Amundson SA, Myers TG, Fornace AJ. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* 1998; 17: 3287-3299.
- Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland. 2. aktualisierte Auflage, Saarbrücken, 1999; S. 50-53.
- Arber DA, Jenkins KA. Paraffin section immunophenotyping of acute leukemias in bone marrow specimens. *Am J Clin Pathol* 1996; 106(4): 462-468.
- Arber DA. Molecular diagnostic approach to non-Hodgkin's lymphoma. *J Mol Diagn* 2000; 2(4): 178-190.
- Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsmann DE, Gascoyne RD. Mantle cell lymphoma: a clinicopathological study of 80 cases. *Blood* 1997; 89(6): 2067-2078.
- Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: Clinical features of the major histologic subtypes. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2780-2795.
- Armitage JO, Dan LL. Malignancies of lymphoid cells. In "Harrison's Principles of Internal Medicine 15<sup>th</sup> ed.", Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (Ed.), McGraw-Hill, New York 2001, 15<sup>th</sup> edition; S. 715-727.

- Artiga MJ, Saez AL, Romero C. A short mutational hot spot in the first intron of Bcl-6 is associated with increased Bcl-6 expression and with longer overall survival in large B-cell lymphomas. *Am J Pathol* 2002; 160: 1370-1380.
- Aster JC, Longtine JA. Detection of Bcl-2 Rearrangements in follicular lymphoma. *Am J Pathol* 2002; 160: 759-763.
- Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985; 41(3): 899-906.
- Baron BW, Nucifora G, McCabe N, Espinosa R 3rd, Le Beau MM, McKeithan TW. Identification of the gene associated with the recurring chromosomal translocations t(3;14)(q27;q32) and t(3;22)(q27;q11) in B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(11): 5262-5266.
- Bartl R, Hansmann ML, Frisch B, Burkhardt R. Comparative histology of malignant lymphomas in lymph node and bone marrow. *Br J Haematol* 1988; 69: 229-237.
- Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP, Lenormand B, Rossi A, Pezzella F, Fruchart C, Duval C, Monconduit M, Tilly H. LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients. *Blood* 1994; 83(9): 2423-2427.
- Bastion Y, Sebban C, Berger F, Felman P, Salles G, Dumontet C, Bryon PA, Coiffier B. Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol* 1997; 15(4): 1587-1594.
- Bertrand FE, Eckfeldt CE, Fink JR, Lysholm AS, Pribyl JAR, Shah N, LeBien TW. Micro-environmental influences on human B-cell development. *Immunological Reviews* 2000; 175: 175-186.
- Bonner RF, Emmert-Buck M, Cole K, Pohida T, Chuaqui R, Goldstein S, Liotta LA. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science* 1997; 278(5342): 1481-1483.
- Cabecadas JM, Isaacson PG. Phenotyping of T-cell lymphomas in paraffin sections - which antibodies? *Histopathology* 1991; 19(5): 419-424.
- Capello D, Vitolo U, Pasqualucci L, Quattrone S, Migliaretti G, Fassone L, Ariatti C, Vivenza D, Gloghini A, Pastore C, Lanza C, Nomdedeu J, Botto B, Freilone R, Buonaiuto D, Zagonel V, Gallo E, Palestro G, Saglio G, Dalla-Favera R, Carbone A, Gaidano G. Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia. *Blood* 2000; 95(2): 651-659.
- Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer Research* 1971; 31: 1860-1861.
- Carli PM, Boutron MC, Maynadie M, Bailly F, Caillot D. Increase in the incidence of non-Hodgkin's lymphomas: evidence for a recent sharp increase in France, independent of AIDS. *Br J Cancer* 1994; 70: 713-715.
- Cartun RW, Coles FB, Pastuszak WT. Utilization of monoclonal antibodies L26 in the identification and conformation of B-cell lymphomas. A sensitive and specific marker applicable of formalin- and B5 fixed paraffin embedded tissues. *Am J Pathol* 1987; 129(3): 415-421.

- Cartwright R, Brincker H, Carli PM, Clayden D, Coebergh JW, Jack A, McNally R, Morgan G, Sanjose de S, Tumino R, Vornanen M: The rise in incidence of lymphomas in Europe 1985-1992. *Eur J Cancer* 1999; 35(4): 627-663.
- Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 1995; 86(1): 45-53.
- Chen W, Iida S, Louie DC, Dalla-Favera R, Chaganti RS. Heterologous promoters fused to BCL6 by chromosomal translocations affecting band 3q27 cause its deregulated expression during B-cell differentiation. *Blood* 1998; 91(2): 603-607.
- Chin KV, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM. Modulation of activity of the human MDR1 gene by RAS and p53. *Science* 1992; 255: 459-462.
- Chu PG, Chang KL, Arber DA, Weiss LM. Immunophenotyping of hematopoietic neoplasms. *Semin Diagn Pathol* 2000; 17(3): 236-256.
- Chu P, Arber DA. Paraffin-section detection of CD10 in 505 nonhematopoietic neoplasms. Frequent expression in renal cell carcinoma and endometrial stromal sarcoma. *Am J Clin Pathol* 2000; 113(3): 374-382.
- Cleary ML, Sklar J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7439-7434.
- Coad JE, Olson DJ, Christensen DR, Lander TA, Chibbar R, McGlennen RC, Brunning RD. Correlation of PCR-detected clonal gene rearrangements with bone marrow morphology in patients with B-lineage lymphomas. *Am J Surg Pathol* 1997; 21(9): 1047-1056.
- Coiffier B. Immunochemotherapy: the new standard in aggressive non-Hodgkin's lymphoma in the elderly. *Semin Oncol* 2003; 30(1 Suppl 2): 21-27.
- Conlan MG, Bast M, Armitage JO, Weisenburger DD. Bone marrow involvement by non-Hodgkin's lymphoma: the clinical significance of morphologic discordance between the lymph node and bone marrow. Nebraska Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 1990; 8(7): 1163-1172.
- Contos MJ, Kornstein MJ, Innes DJ. The utility of CD20 and CD43 in subclassification of low-grade B-cell lymphoma of paraffin sections. *Mod Pathol* 1992; 5: 631-633.
- Crisan D, Mattson J. Discordant morphologic features in bone marrow involvement by malignant lymphomas: Use of Gene rearrangement patterns for diagnosis. *Am J Hematol* 1995; 49: 299-309.
- Cullen MH, Lister TA, Brearley RI, Shand WS, Stansfeld AG. Histologic transformation of non-Hodgkin's lymphoma: a prospective study. *Cancer* 1979; 44: 645-651.
- Davey FR, Elghetany M, Kurec A. Immunophenotyping of hematologic neoplasms in paraffin-embedded tissue sections. *Am J Clin Pathol* 1990; 93: 17-26.
- de Jong D, Voetdijk BM, van Ommen GJ, Kluin PM. Alterations in immunoglobulin genes reveal the origin and evolution of monotypic and bitypic B cell lymphomas. *Am J Pathol* 1989; 134: 1233-1242.
- Dent AL, Shaffer AL, Yu X, Allman D, Staudt LM. Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 1997; 276(5312): 589-592.

- Deverell MH, Best E, Salisbury JR. Lymphoid infiltrates in B cell non Hodgkin's lymphoma: Comparing nuclear characteristics between lymph node and bone marrow; and evaluating diagnostic features of bone marrow infiltrates in paraffin embedded tissues. *Analytical Cellular Pathology* 1997; 14: 1-7.
- Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA. Laser capture microdissection. *Science* 1996; 274: 998-1001.
- Epstein MA, Archong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964; I: 702-703.
- Fend F, Quintanilla-Martinez L, Kumar S, Beaty MW, Blum L, Sorbara L, Jaffe ES, Raffeld M. Composite low grade B-cell lymphomas with two immunophenotypically distinct cell populations are true biclonal lymphomas. A molecular analysis using laser capture microdissection. *Am J Pathol* 1999; 154(6): 1857-1866.
- Fend F, Raffeld M. Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol* 2000; 53: 666-672. **(a)**
- Fend F, Kremer M, Quintanilla-Martinez L. Laser capture microdissection: methodical aspects and applications with emphasis on immuno-laser capture microdissection. *Pathobiology* 2000; 68(4-5): 209-214. **(b)**
- Fisher DE, Jacobson JO, Ault KA, Harris NL. Diffuse large cell lymphoma with discordant bone marrow histology: Clinical features and biological implications. *Cancer* 1989; 64: 1879-1887.
- Fisher RI, Jones RB, DeVita VT Jr, Simon RM, Garvin AJ, Berard CW, Young RC. Natural history of malignant lymphomas with divergent histologies at staging evaluation. *Cancer* 1981; 47(8): 2022-2025. **(a)**
- Fisher RI, Hubbard SM, DeVita VT, Berard CW, Wesley R, Cossman J, Young RC. Factors predicting long term survival in diffuse mixed, histiocytic, or undifferentiated lymphoma. *Blood* 1981; 58(1): 45-51. **(b)**
- Fukuhara S, Rowley JD, Variakojis D, Golomb HM. Chromosomal abnormalities in poorly differentiated lymphocytic lymphoma. *Cancer Res* 1979; 39: 3119-3128.
- Gallo RC, Wong-Staal F. Retroviruses as etiologic agents of some animal and human leukemias and as tools for elucidating the mechanisms of leukemogenesis. *Blood* 1982; 60: 545-557.
- Garvin AJ, Simon RM, Osborne CK, Merrill J, Young RC, Berard CW. An autopsy study of histologic progression in non-Hodgkin's lymphomas: 192 cases from the National Cancer Institute. *Cancer* 1983; 52: 393-398.
- Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewska M, Horsman DE, Tolcher AW, O'Reilly SE, Hoskins P, Coldman AJ, Reed JC, Connors JM. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90(1): 244-251. **(a)**
- Gascoyne RD. Pathologic prognostic factors in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1997; 11(5): 847-862. **(b)**
- Gelb AB, Rouse RV, Dorfman RF, Warnke RA. Detection of immunophenotypic abnormalities in paraffin-embedded B-lineage non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Clin Pathol* 1994; 102 (6): 825-834.
- Gerard-Marchant R, Hamlin I, Lennert K, Rilke F, Stansfeld A, van Unnik J. Classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 1974; 2: 406-408.

- Ghia P, Caligaris-Cappio F. The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms. *Adv Cancer Res* 2000; 79: 157-173.
- Gil-Gomez G, Berns A, Brady HJ. A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *EMBO J* 1998; 17(24): 7209-7218.
- Goldstein SR, McQueen PG, Bonner RF. Thermal modelling of laser capture microdissection. *Applied Optics* 1998; 37: 7378-7391.
- Greiner TC, Moynihan MJ, Chan WC, Lytle DM, Pedersen A, Anderson JR, Weisenburger DD. p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict poor prognosis. *Blood* 1996; 87: 4302-4310.
- Hall PA, D'Ardenne AJ, Stansfeld AG. Paraffin section immunohistochemistry. I. Non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 1988; 13: 149-160.
- Hanson CA, Kurtin PJ, Katzmann JA, Hoyer JD, Li CY, Hodnefield JM, Meyers CH, Habermann TM, Witzig TE. Immunophenotypic analysis of peripheral blood and bone marrow in the staging of B-Cell malignant lymphoma. *Blood* 1999; 94: 3889-3896.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Clearly ML, Delsol G, De Wolf-Peters C, Fallini B, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink H-K, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiar E, Warnke RA: A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84: 1361-1392.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J. Lymphoma classification – from controversy to consensus: The R.E.A.L. and WHO Classification of lymphoid neoplasms. *Annals of Oncology* 2000; 11 Suppl. 1: 3-10.
- Hauke RJ, Armitage JO. A new approach to non-Hodgkin's lymphoma. *Intern Med* 2000; 39(3): 197-208.
- Hernandez L, Fest T, Cazorla M, Teruya-Feldstein J, Bosch F, Peinado MA, Piris MA, Montserrat E, Cardessa A, Jaffe ES, Campo E, Raffeld M. p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 1996; 87: 3351-3359.
- Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, Vaughan Hudson B, Burke M, Clarke P, Di Stefano F, Anderson L, Vaughan Hudson G, Mason D, Selby P, Linch DC. Prognostic significance of BCL-2 expression and Bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 1996; 88(3): 1046-1051.
- Hodges GF, Lenhardt TM, Cotelingam JD. Bone marrow involvement in large-cell lymphoma – prognostic Implications of discordant disease. *Am J Clin Pathol* 1994; 101(3): 305-311.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253(5015): 49-53.
- Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *N Engl J Med* 1984; 311: 1471-1475.
- Horning SJ. Natural history of and therapy for the indolent non-Hodgkin's lymphomas. *Semin Oncol.* 1993; 20 (Suppl 5): 75-88.

- Huang DC, O'Reilly LA, Strasser A, Cory S. The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J* 1997; 16(15): 4628-4638.
- Hsi ED. The search for meaningful prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2001; 115(4): 481-483.
- Hubbard SM, Chabner BA, DeVita VT Jr, Simon R, Berard CW, Jones RB, Garvin AJ, Canellos GP, Osborne CK, Young RC. Histologic progression in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1982; 59: 258-264.
- Ichikawa A, Kinoshita T, Watanabe T, Kato H, Nagai H, Tsushita K, Saito H, Hotta T. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1997; 337: 529-534.
- Isaacson PG. The current status of lymphoma classification. *British Journal of Haematology* 2000; 109: 258-266.
- Jacobson JO, Wilkes BM, Kwaiatkowski DJ, Medeiros LJ, Aisenberg AC, Harris NL. Bcl-2 rearrangements in de novo diffuse large cell lymphoma. Association with distinctive clinical features. *Cancer* 1993; 72 (1): 231-236.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 2001 Lyon, France: IARC Press.
- Jagannath S, Velasquez WS, Tucker SL, Manning JT, McLaughlin P, Fuller LM. Stage IV diffuse large-cell lymphoma: A long-term analysis. *J Clin Oncol* 1985; 3: 39-47.
- Jin L, Thompson CA, Qian X, Kuecker SJ, Kulig E, Lloyd RV. Analysis of anterior pituitary hormone mRNA expression in immunophenotypically characterized single cells after laser capture microdissection. *Lab Invest* 1999; 79: 511-512.
- Juneja SK, Wolf MM, Cooper IA. Value of bilateral bone marrow biopsy specimens in non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol* 1990; 43(8): 630-632.
- Kaufmann O, Flath B, Spath-Schwalbe E, Possinger K, Dietel M. Immunohistochemical detection of CD10 with monoclonal antibody 56C6 on paraffin sections. *Am J Clin Pathol* 1999; 111(1): 117-122.
- Kerckaert JP, Deweindt C, Tilly H, Quief S, Lecocq G, Bastard C. LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas. *Nat Genet* 1993; 5(1): 66-70.
- Kirsch DG, Kastan MB. Tumor suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3158-3168.
- Kiyokawa N, Kokai Y, Ishimoto K, Fujita H, Fujimoto J, Hata JI. Characterization of the common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CD10) as an activation molecule on mature human B cells. *Clin Exp Immunol* 1990; 79(3): 322-327.
- Kluin PM, van Krieken JH, Kleiverda K, Kluin-Nelemans HC. Discordant morphologic characteristics of B-cell lymphomas in bone marrow and lymph node biopsy. *Am J Clin Pathol* 1990; 94 (1): 59-66.
- Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res.* 1999; 59(7 Suppl): 1693s-1700s.

- Kramer MH, Hermans J, Parker J, Krol AD, Kluin-Nelemans JC, Haak HL, van Krieken JH, de Jong D, Kluin PM. Clinical significance of bcl-2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population based study. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2131-2138.
- Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, van Krieken JH, de Jong D, Maartense E, Schuurin E, Kluin PM. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998; 92 (9): 3152-3162.
- Kremer M, Cabras AD, Fend F, Schulz S, Schwarz K, Hoefler H, Werner M. PCR analysis of IgH-gene rearrangements in small lymphoid infiltrates microdissected from sections of paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. *Hum Pathol* 2000; 31(7): 847-853.
- Krikorian JG, Portlock CS, Cooney P, Rosenberg SA. Spontaneous regression of non-Hodgkin's lymphoma: a report of nine cases. *Cancer* 1980; 46: 2093-2099.
- Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 1999; 341(20): 1520-1529.
- Kurtin PJ, Pinkus GS. Leukocyte common antigen a diagnostic discriminant between hematopoietic and non-hematopoietic neoplasms in paraffin sections using monoclonal antibodies: Correlation with immunologic studies and ultrastructural localization. *Hum Pathol* 1985; 16: 353-365.
- Lai R, Arber DA, Chang KL, Wilson CS, Weiss LM. Frequency of bcl-2 expression in non-Hodgkin's lymphoma: a study of 778 cases with comparison of marginal zone lymphoma and monocytoid B-cell hyperplasia. *Mod Pathol* 1998; 11(9): 864-869.
- Lane DP. Exploiting the p53 pathway for cancer diagnosis and therapy. *Br J Cancer* 1999; 80 Suppl 1: 1-5.
- Lennert K, Mohri N, Stein H, Kaiserling E. The histopathology of malignant lymphoma. *Br J Haematol* 1975; 31: 193 (suppl).
- Lennert K. Malignant Lymphomas Other Than Hodgkin's Disease. New York, NY, Springer-Verlag, 1978.
- Lennert K. Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas: Based on the Kiel classification. New York, NY, Springer-Verlag, 1981.
- Lennert K, Feller A. Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas (ed2). New York, NY, Springer-Verlag, 1991.
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88(3): 323-331.
- Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, Rosenberg SA, Coltman CA, Tubiana M. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswold Meeting. *Journal of Clinical Oncology* 1989; 7: 1630-1636.
- Lo Coco F, Gaidano G, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. p53 Mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood* 1993; 82(8): 2289-2295.
- Lo Coco F, Ye BH, Lista F, Corradini P, Offit K, Knowles DM, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Rearrangements of the BCL6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1994; 83(7): 1757-1759.

- Louie DC, Offit K, Jaslow R, Parsa NZ, Murty V, Schluger A, Chaganti RS. p53 overexpression as a marker of poor prognosis in mantle cell lymphomas with t(11;14)(q12;q32). *Blood* 1995; 86(8): 2892-2899.
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74: 957-967.
- Lukes RJ, Collins RD. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer* 1974; 34: 1488-1503.
- Maes B, Achten R, Demunter A, Peeters B, Verhoef G, De Wolf-Peeters C. Evaluation of B cell lymphoid infiltrates in bone marrow by morphology, immunohistochemistry and molecular analysis. *J Clin Pathol* 2000; 53: 835-840.
- Mason DY, Cordell J, Brown M, Pallesen G, Ralfkiaer E, Rothbard J, Crumpton M, Gatter KC. Detection of T cells in paraffin wax embedded tissue using antibodies against a peptide sequence from the CD3 antigen. *J Clin Pathol* 1989; 42(11): 1194-1200.
- Matolcsy A, Inghirami G, Knowles DM. Molecular genetic demonstration of the diverse evolution of Richter's syndrome (chronic lymphocytic leukemia and subsequent large cell lymphoma). *Blood* 1994; 83: 1363-1372.
- Matolcsy A, Casali P, Warnke RA, Knowles DM. Morphologic transformation of follicular lymphoma is associated with somatic mutation of the translocated Bcl-2 gene. *Blood* 1996; 88(10): 3937-3944.
- Matolcsy A. High-grade transformation of low-grade non-Hodgkin's lymphomas: mechanisms of tumor progression. *Leuk Lymphoma* 1999; 34: 251-259. (a)
- Matolcsy A, Schattner EJ, Knowles DM, Casali P. Clonal evolution of B-cells in transformation from low- to high-grade lymphoma. *Eur J Immunol* 1999; 29: 1253-1264. (b)
- McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, Korsmeyer SJ. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*. 1989; 57 (1): 79-88.
- McDonnell TJ, Nunez G, Platt FM, Hockenberry D, London L, McKearn JP, Korsmeyer SJ. Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M- and D-expressing B-cell population. *Mol Cell Biol* 1990; 10 (5): 1901-1907.
- McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 1991; 349(6306): 254-256.
- McNally RJ, Alexander FE, Staines A, Cartwright RA. A comparison of three methods of analysis for age-period-cohort models with application to incidence data on non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Epidemiol* 1997; 26(1): 32-46.
- Mead GM, Kushlan P, O'Neil M, Burke JS, Rosenberg SA. Clinical Aspects of non-Hodgkin's lymphomas presenting with discordant histologic subtypes. *Cancer* 1983; 52: 1496-1501.
- Medeiros LJ, Weiss LM, Warnke RA, Dorfman RF. Utility of combining antigranulocyte with antileukocyte antibodies in differentiating Hodgkin's disease from non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 1988; 62: 2475-2481.
- Migliazza A, Martinotti S, Chen W, Fusco C, Ye BH, Knowles DM, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(26): 12520-12524.

- Milner J. Structures and functions of the tumor suppressor p53. *Pathol Biol* 1997; 45(10): 797-803.
- Muller-Hermelink HK, Zettl A, Pfeifer W, Ott G. Pathology of lymphoma progression. *Histopathology* 2001; 38: 285-306.
- Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; 262(4): 56-65.
- National Cancer Institute Division of Cancer Control (1987) Annual Cancer Statistics Review Including Cancer Trends: 1950-85. National Institutes of Health Publication, 88-2729: National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, 1987; 88-2729.
- Nieder C, Petersen S, Petersen C, Thames HD. The challenge of p53 as prognostic and predictive factor in Hodgkin's or non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol* 2001; 80: 2-8.
- Offit K, Wong G, Filippa DA, Tao Y, Chaganti RS. Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations. *Blood* 1991; 77(7): 1508-1515.
- Offit K, Lo Coco F, Louie DC, Parsa NZ, Leung D, Portlock C, Ye BH, Lista F, Filippa DA, Rosenbaum A, Ladanyi M, Jhanwar S, Dalla-Favera R, Chaganti RSK. Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1994; 331(2): 74-80.
- Onciu M, Berrak SG, Medeiros LJ, Katz RL, Huh YO. Discrepancies in the immunophenotype of lymphoma cells in samples obtained simultaneously from different anatomic sites. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 644-650.
- Papakonstantinou G, Verbeke C, Hastka J, Bohrer M, Hehlmann R. Bcl-2 expression in non-Hodgkin's lymphomas is not associated with bcl-2 gene rearrangements. *Br J Haematol* 2001; 113: 383-390.
- Pasqualucci L, Migliazza A, Fracchiolla N, William C, Neri A, Baldini L, Chaganti RS, Klein U, Kuppers R, Rajewsky K, Dalla-Favera R. BCL-6 mutations in normal germinal center B-cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(20): 11816-11821.
- Peng HZ, Du MQ, Koullis A, Aiello A, Dogan A, Pan LX, Isaacson PG. Nonimmunoglobulin gene hypermutation in germinal center B cells. *Blood* 1999; 93(7): 2167-2172.
- Pescarmona E, De Sanctis V, Pistilli A, Pacchiarotti A, Martelli M, Guglielmi C, Mandelli F, Baroni CD, Le Coco F. Pathogenetic and clinical implications of Bcl-6 and Bcl-2 gene configuration in nodal diffuse large B-cell lymphomas. *J Pathol* 1997; 183(3): 281-286.
- Pezzella F, Tse AG, Cordell JL, Pulford KA, Gatter KC, Mason DY. Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol* 1990; 137(2): 225-232.
- Picker LJ, Brenner MB, Michie S, Warnke RA. Expression of T cell receptor delta chains in benign and malignant lineage lymphoproliferations. *Am J Pathol* 1988; 132(3): 401-405.
- Piris MA, Pezzella F, Martinez-Montero JC, Orradre J, Villuendas R, Cuena R, Cruz MA, Martinez B. p53 and bcl-2 expression in high-grade B-cell lymphomas: correlation with survival time. *Br J Cancer* 1994; 69: 337-341.
- Purdy S, Neimann RS, Kim K. The incidence, pattern of involvement and cytology of diffuse large cell lymphoma in bone marrow: An ECOG study (Abstr). *Lab Invest* 1989; 60: 74.

- Raffeld M, Wright JJ, Lipford E, Cossman J, Longo DL, Bakhshi A, Korsmeyer SJ. Clonal evolution of t(14;18) follicular lymphomas demonstrated by immunoglobulin genes and the 18q21 major breakpoint region. *Cancer Res* 1987; 47: 2537-2542.
- Ramasamy I, Brisco M, Morley A. Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasms. *J Clin Pathol* 1992; 45(9): 770-775.
- Reis LAG, Miller BA, Hankey BF, Kosary CL, Harras A, Edwards BK; eds. (1997). SEER Cancer Statistics Review: 1973-1994. National Cancer Institute, NIH Publications 1997: 97-2789.
- Risdall R, Hoppe RT, Warnke R. Non-Hodgkin's lymphoma: a study of the evolution of the disease based upon 92 autopsied cases. *Cancer* 1979; 44: 529-542.
- Robertson LE, Redman JR, Butler JJ, Osborne BM, Velasquez WS, McLaughlin P, Swan F, Rodriguez MA, Hagemester FB, Fuller LM, Cabanillas F. Discordant bone marrow involvement in diffuse large-cell lymphoma: a distinct clinical-pathologic entity associated with a continuous risk of relapse. *J Clin Oncol* 1991; 9(2): 236-242.
- Roehrl MH, Becker KF, Becker I, Hofler H. Efficiency of single-cell polymerase chain reaction from stained histologic slides and integrity of DNA in archival tissue. *Diagn Mol Pathol* 1997; 6(5): 292-297.
- Rosenberg SA. Validity of the Ann Arbor staging classification for the non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Treat Rep* 1977; 31: 1860-1861.
- Rosenberg SA, Berard CW, Brown B, Burke Jr J, Dorfman RF, Glatstein E, Hoppe RT, Simon R. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas. Summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer* 1982; 49: 2112-2135.
- Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltneane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, Lopez-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Staudt LM. The use of molecular profiling to predict the survival after chemotherapy for diffuse-large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346: 1937-1947.
- Rudiger T, Ott G, Ott MM, Muller-Deubert SM, Muller-Hermelink HK. Differential diagnosis between classic Hodgkin's lymphoma, T-cell-rich B-cell lymphoma, and paragranuloma by paraffin immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 1998; 22(10): 1184-1191.
- Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood* 2003; 101(4): 1220-1235.
- Sanchez E, Chacon I, Plaza MM, Munoz E, Cruz MA, Martinez B, Lopez L, Martinez-Montero JC, Orradre JL, Saez AI, Garcia JF, Piris MA. Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. *J Clin Oncol* 1998; 16(5): 1931-1939.
- Sander CA, Yano T, Clark HM, Harris C, Longo DL, Jaffe ES, Raffeld M. p53 mutation is associated with progression in follicular lymphoma. *Blood* 1993; 82: 1994-2004.
- Schmid C, Pan L, Diss T, Isaacson PG. Expression of B-cell antigens by Hodgkin's and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol* 1991; 139(4): 701-707.

- Schwartz RS. Jumping genes and the immunoglobulin V gene system. *N Engl J Med* 1995; 333(1): 42-44.
- Schwartz RS. Diversity of the immune repertoire and immunoregulation. *N Engl J Med* 2003; 348(11): 1017-1026.
- Segal GH, Jorgensen T, Scott M, Braylan RC. Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: II. Follicular lymphomas. *Hum Pathol* 1994; 25(12): 1276-1282.
- Shen HM, Peters A, Baron B, Zhu X, Storb U. Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science* 1998 ; 280(5370): 1750-1752.
- Shipp MA et al. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993; 329: 987-994.
- Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC, Gaasenbeek M, Angelo M, Reich M, Pinkus GS, Ray TS, Koval MA, Norton A, Lister TA, Mesirov J, Neuberg DS, Lander ES, Aster KW, Golub TR. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002; 8(1): 68-74.
- Siegelman MH, Cleary ML, Warnke R, Sklar J. Frequent biclonality and Ig gene alterations among B cell lymphomas that show multiple histologic forms. *J Exp Med* 1985; 161(4): 850-863.
- Smith MR. Non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Probl Cancer* 1996; 20(1): 6-77.
- Stansfeld A, Diebold J, Kapanci Y, Kelenyi G, Lennert K, Mioduszevska O, Noel H, Rilke F, Sundstrom C, van Unnik J, Wright D. Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet* 1988; 1: 292-293.
- Statistisches Bundesamt. Statistisches Jahrbuch 2002 für die Bundesrepublik Deutschland. Metzler-Poeschel-Verlag, Stuttgart, 2002, S. 422-425.
- Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Cohen P, Cossman J. Detection of occult follicular lymphoma by specific DNA Amplification. *Blood* 1988; 72(5): 1822-1825.
- Tang SC, Visser L, Hepperle B, Hanson J, Poppema S. Clinical significance of bcl-2-MBR gene rearrangement and protein expression in diffuse large-cell non-Hodgkin's lymphoma: an analysis of 83 cases. *J Clin Oncol.* 1994; 12(1) :149-154.
- Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today* 1994; 15(9): 450-454.
- Thiele J. Die Differentialdiagnose „lymphoider Zellinfiltrate“ im Knochenmark. *Pathologe* 1995; 16: 106-119.
- Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302(5909): 575-581.
- Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985; 229(4720): 1390-1393.
- Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83(14): 5214-5218.

- Ueda C, Uchiyama T, Ohno H. Immunoglobulin (Ig)/Bcl-6 versus non-Ig/Bcl-6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma corresponds to high- versus low-level expression of Bcl-6 mRNA. *Blood* 2002; 99: 2624-2625.
- Vairo G, Innes KM, Adams JM. Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival. *Oncogene* 1996; 13(7): 1511-1519.
- Vanasse GJ, Concannon P, Willerford DM. Regulated genomic instability and Neoplasia in the Lymphoid Lineage. *Blood* 1999; 94(12): 3997-4010.
- Volpe G, Vitolo U, Carbone A, Pastore C, Bertini M, Botto B, Audisio E, Freilone R, Novero D, Cappia S, De Giuli P, Mazza U, Resegotti L, Palestro G, Saglio G, Gaidano G. Molecular heterogeneity of B-lineage diffuse large cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 16(1): 21-30.
- Wang J, Raffeld M, Medeiros LJ, Longo DL, Jaffe ES, Duffey P, Stetler-Stevenson M. Follicular center cell lymphoma with the t(14;18) translocation in which the rearranged BCL-2 gene is silent. *Leukemia* 1993; 7(11): 1834-1839.
- Wang T, Lasota J, Hanau CA, Miettinen M. Bcl-2 oncoprotein is widespread in lymphoid tissue and lymphomas but its differential expression in benign versus malignant follicles and monocytoid B-cell proliferations is of diagnostic value. *APMIS* 1995; 103 (9): 655-662.
- Weisenburger D. The International Lymphoma Study Group (I.L.S.G.) Classification of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): Clinical findings from a large multi-center study. *Mod Pathol* 1997; 10: 136A.
- Willis TG, Dyer MJS. The role of immunoglobulin translocation in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* 2000; 96(3): 808-822.
- Worley J, Lee S, Ma MS, Eisenberg A, Chen HY, Mansfield E. Fluorescence imaging in human identity testing. *Biotechniques* 1997; 23(1): 148-153.
- Wright BF, Asplund SL, McKenna RW, and Kroft SH. Large B-cell lymphoma with discordant marrow involvement: an immunophenotypic analysis of 11 cases. (Abstract) *Mod Pathol* 2002; 15: 270A.
- Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996; 88(2): 386-401.
- Yano T, Jaffe ES, Longo DL, Raffeld M. Myc rearrangements in histologically progressed follicular lymphoma. *Blood* 1992; 80: 758-767.
- Ye BH, Lista F, Lo Coco F, Knowles DM, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* 1993; 262(5134): 747-750.
- Ye BH, Chaganti S, Chang CC, Niu H, Corradini P, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Chromosomal translocations cause deregulated BCL6 expression by promoter substitution in B cell lymphoma. *EMBO J* 1995; 14(24): 6209-6217.
- Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, de Waard R, Leung C, Nouri-Shirazi M, Orazi A, Chaganti RS, Rothman P, Stall AM, Pandolfi PP, Dalla-Favera R. The BCL-6 protooncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet* 1997; 16(2): 161-170.

- Yunis JJ, Frizzera G, Oken MM, McKenna J, Theologides A, Arnesen M. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N Engl J Med*. 1987; 316(2): 79-84.
- Yunis JJ, Mayer MG, Arnesen MA, Aeppli DP, Oken MM, Frizzera G. bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1989; 320(16): 1047-1054.
- Zelenetz AD, Chen TT, Levy R. Histologic transformation of follicular lymphoma to diffuse lymphoma represents tumor progression by a single malignant cell. *J Exp Med* 1991; 73: 197-207.
- Zhou XG, Sandvej K, Gregersen N, Hamilton-Dutoit SJ. Detection of clonal B cells in microdissected reactive lymphoproliferations: possible diagnostic pitfalls in PCR analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement. *Mol Pathol* 1999; 52(2): 104-110.

## 8. Anhang

### 8.1 Die Ann-Arbor-Klassifikation

Tabelle VIII.1: Die Ann-Arbor-Klassifikation		
Stad.	Primär nodale Manifestation (70%)	Primär extranodale Manifestation (30%)
<b>I</b>	Befall <u>einer</u> Lymphknotenregion oder <u>einer</u> lymphatischen Struktur (z. B. Milz, Thymus)	Befall <u>eines</u> extralymphatischen Organs oder Gewebes (I <sub>E</sub> )
<b>II<sub>1</sub></b>	Befall von benachbarten Lymphknotenregionen auf <u>derselben Seite des Zwerchfells</u> (II <sub>1</sub> ) oder einer Lymphknotenregion mit lokalisiertem Übergang auf ein benachbartes Organ oder Gewebe (II <sub>1E</sub> )	Befall eines extralymphatischen Organs einschl. der regionalen Lymphknoten (II <sub>1</sub> ) oder eines weiteren benachbarten extralymphatischen Organs (II <sub>1E</sub> ) auf <u>derselben Seite des Zwerchfells</u>
<b>II<sub>2</sub></b>	Befall von zwei nicht benachbarten oder mehr als zwei benachbarten Lymphknotenregionen auf derselben Seite des Zwerchfells (II <sub>2</sub> ) einschließlich eines lokalisierten Befalls eines extralymphatischen Organs oder Gewebes (II <sub>2E</sub> )	Befall eines extralymphatischen Organs und Lymphknotenbefall, der über die regionalen Lymphknoten hinausgeht und auch einen weiteren lokalisierten Organbefall einschließen kann (II <sub>2E</sub> )
<b>III</b>	Befall von Lymphknoten oder lymphatischen Strukturen auf beiden Seiten des Zwerchfells einschließlich eines lokalisierten Befalls eines extralymphatischen Organs oder Gewebes (III <sub>SE</sub> ) oder der Milz (III <sub>S</sub> ) oder beides (III <sub>SE</sub> )	Befall von extralymphatischen Strukturen und Lymphknoten auf beiden Seiten des Zwerchfells einschließlich eines weiteren lokalisierten extralymphatischen Organs oder Gewebes (III <sub>E</sub> ) oder der Milz (III <sub>S</sub> ) oder beides (III <sub>SE</sub> )
<b>IV</b>	Lymphknotenbefall mit diffusem oder disseminiertem Befall extralymphatischer Organe und Gewebe; <u>jeglicher Befall des Knochenmarks</u> oder der Leber	Diffuser oder disseminierter Organbefall mit oder ohne Lymphknotenbefall; <u>jeglicher Befall des Knochenmarks</u> oder der Leber
<b>Zusätze:</b> A: Ohne Allgemeinsymptome B: Mit Fieber (> 38°C) und/oder Nachtschweiß und/oder Gewichtsverlust (> 10 %) in den letzten 6 Monaten		

### 8.2 Immunhistochemie – Puffer

#### Citratpuffer (pH = 6,0) für die Immunhistochemie

##### Stammlösungen

Stammlösung A      0,1 M Zitronensäure  
(19,2 g Zitronensäure in 1000 ml Aqua dest. gelöst)

Stammlösung B      0,1 M Natriumcitrat Dihydrat  
(24,4 g in 1000 ml Aqua dest. gelöst)

*Herstellung der Arbeitslösung für die Mikrowellen-Vorbehandlung von Paraffinschnitten*

Unabhängig von der Anzahl der zu untersuchenden Schnitte wurden immer 1,5 Liter Arbeitslösung für 2 volle Küvetten Objektträger hergestellt:

27 ml Stammlösung A und 123 ml Stammlösung B in 1,5 Liter destilliertem Wasser gelöst  
Langsame Zugabe von 1,5 ml TWEEN 20 (hohe Konsistenz)  
Gründliche Durchmischung des Ansatzes mit dem Magnetrührer

**TBS-Puffer für die Immunhistochemie**

<u>Stammlösung 1</u>	250 g NaCl in 3 Liter Aqua dest. lösen
<u>Stammlösung 2</u>	181,71 g Tris in 2400 ml Aqua dest. gelöst, mit HCl auf pH 7,6 eingestellt und auf 3 Liter mit Aqua dest. aufgefüllt
<u>Arbeitslösung</u>	300 ml Stammlösung 1 und 300 ml Stammlösung 2 (= 600 ml) mit destilliertem Wasser auf 3 Liter aufgefüllt

**8.3 PCR – Lösungen und Reagenzien**

PK-Puffer (Lyse-Puffer)	0,05 Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0 0,5% Tween20	TBE	54g Tris 27,5g Borsäure 29 ml 0,5 M EDTA ad 1 l (mit Aqua dest.)
----------------------------	--	-----	---

Agarose (SeaKam LE agarose)	BMA, Rockland, ME, USA
AmpliTaqGold	Applied Biosystems, Foster City, USA
Bromphenolblau-Xylene-cyanol Dye (PCR-Ladepuffer, 10xDyes)	Sigma, Deisenhofen (obiges Pulver wird in 5 ml Aqua dest. gelöst, 20 ml Formamid zugegeben und aliquotiert)
Ethidiumbromid (flüssig)	Eurobio, Cedex, Frankreich
MetaPhor	FMC Bio Products, Rockland, ME, USA
Molekulargewichtsmarker (IX und VIII)	Boehringer, Mannheim
Nukleotide	Pharmacia, Freiburg
PCR-Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Proteinase K, PCR Grade (20,6 mg/ml)	Roche AG, Basel, Schweiz
(Proteinase K: von der Stocklösung (=20,6 mg/ml) wurden pro 100 µl PK-Puffer 4 µl eingesetzt)	
Taq-Polymerase (5 units/µl)	Pharmacia, Freiburg
Tween 20	Merck, Darmstadt
NuSieve GTGagarose (=low melting temperature agarose)	Bio Whittaker, USA

## 8.4 Fragment-Längen-Analyse – Lösungen und Reagenzien

Ammoniumpersulfat (10% APS)	Sigma, Deisenhofen
Aqua-Spüllösung	Delta-Pharma, Pfullingen
Formamid (deionisiert)	Sigma, Deisenhofen
Genescan 500 TAMRA	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Harnstoff	Gibcol, Life Technologies, Carlsbad, USA
Hydrolink Long Ranger Gel Solution	BMA, Rockland, ME, USA
Ladepuffer (Blue Dextran)	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
TEMED	Bio-Rad, München
(N', N', N', N', - Tetramethylenethylendiamin)	
TBE-Puffer (10x)	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA

## 8.5 Sequenzierung – Lösungen und Reagenzien

QIAquick gel extraction KIT,	Qiagen, Hilden
QG-Puffer	Qiagen, Hilden, Bestandteil des Kits
PE Waschpuffer	Qiagen, Hilden, Bestandteil des Kits
Elutionspuffer	Qiagen, Hilden, Bestandteil des Kits
Natriumacetat	Sigma Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Premix (mit ddNTPs)	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
DMSO (Dimercaptomethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
Dye Ex Kit	Perkin Elmer, Weiterstetten
Gelzutaten siehe unter <b>8.4</b>	

## 8.6 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Bcl-2 bzw. Bcl-6	„B-cell lymphoma“ 2- bzw. 6-Protein
B-CLL	Chronische lymphatische Leukämie der B-Zellreihe
CD	cluster of differentiation (z. B. CD20)
DLBCL	diffuse large cell B-cell lymphoma (= diffus großzelliges B-Zell-Lymphom)
D <sub>H</sub>	„diversity“-Abschnitt des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gens
EN	Extranodales Gewebe

FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (= Durchflusszytometrie)
FR3 bzw. FR2	„framework“ 3 bzw. „framework“ 2 des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gens
HE	Hämatoxylin/Eosin Färbung
H-Kette	Schwere Kette des Immunglobulins
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen
IgL	Immunglobulin-Leichte-Ketten-Gen
J <sub>H</sub>	„joining“-Abschnitt des Immunglobulin- Schwere-Ketten-Gens
KM	Knochenmark
LCM	Laser Capture Mikrodissektion
l. g.	low grade (niedrigmaligne)
LK	Lymphknoten
L-Kette	leichte Kette des Immunglobulins
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
PAS	Periodsäure-Schiff Färbung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PK	Proteinase K
Tab.	Tabelle
verd.	verdünnt
V <sub>H</sub>	„variable“-Abschnitt des Immunglobulin- Schwere-Ketten-Gens
WHO	World Health Organization

Anmerkung: Hier sind nur Abkürzungen aufgeführt, die im laufenden Text verwendet wurden. Bei allen Tabellen findet sich einer Erläuterung der Abkürzungen in den zugehörigen Legenden.

## 8.7 Verzeichnis der Tabellen und Abkürzungen

<b>Tabelle</b>	<b>Seite</b>
II.1 Erreger, die mit der Entstehung von Lymphomen assoziiert sind	10
II.2 Beispiele für Krankheiten und Umweltfaktoren, die ein erhöhtes Risiko für Non-Hodgkin-Lymphome bedingen	10
II.3 B-Zell Neoplasien nach der aktualisierten R.E.A.L./WHO-Klassifikation und nach der aktualisierten Kiel-Klassifikation	15
IV.1 Verteilung der Befunde im Knochenmark	48
IV.2 Anzahl und Verteilung der Patienten mit konkordanten und diskordanten Lymphominfiltraten	49
IV.3 Klinische Daten	51
IV.4a Gruppe 1: Klonal verwandte Fälle: Molekulare, immunhistochemische und durchflusszytometrische Ergebnisse	56
IV.4b Gruppe 2: Klonal unverwandte Fälle: Molekulare, immunhistochemische und durchflusszytometrische Ergebnisse	58
IV.4c Gruppe 3: Technisch nicht verwertbare Fälle: Molekulare, immunhistochemische und durchflusszytometrische Ergebnisse	60
VIII.1 Die Ann-Arbor-Klassifikation	88
<b>Abbildung</b>	<b>Seite</b>
II.1a Diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom, Lymphknoten (HE; 400 fach)	18
II.1b Diskordante kleinzellige Infiltration im Knochenmark (HE; Übersicht)	18
II.1c Diskordante kleinzellige Infiltration im Knochenmark (HE; 400fach)	18
II.2 Schematische Darstellung des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen-Rearrangements	20
II.3 Nachweis eines mono- bzw. polyklonalen IgH-Rearrangements mittels PCR für FR3	22
II.4 Schematische Darstellung des Bcl-2/J <sub>H</sub> -Rearrangements	24
III.1a Prinzip der Laser Capture Mikrodissektion (a)	36
III.1b Prinzip der Laser Capture Mikrodissektion (b)	36
III.2a Präparat vor LCM	38
III.2b Präparat nach LCM	38
IV.1 Fall 2: Diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom mit diskordantem Befall des Knochenmarks (HE; 400fach)	52
IV.2 Fall 2: CD20-Färbung: Lymphknoten und Knochenmark (400fach)	53

IV.3	Fall 17: CD20-positive Blasten (200fach) mit prominentem kleinzelligen CD3-positiven Hintergrund (400fach)	54
IV.4	Fall 8: Diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom, Lymphknoten; p53-Immunhistochemie (400fach)	54
IV.5	Fall 7: Klonal verwandtes diskordantes Infiltrat des Knochenmarks (FR3)	57
IV.6	Fall 5: Klonal verwandtes diskordantes Knochenmarksinfiltrat (Bcl-2)	57
IV.7	Fall 10: Klonal unverwandtes diskordantes Knochenmarksinfiltrat (FR3)	59
IV.8	Fall 10: Bestätigung der unterschiedlichen Klonalität durch direkte Sequenzierung	59

## 8.8 Veröffentlichung

Der überwiegende Teil der Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit konnte vor einigen Monaten in folgendem Artikel veröffentlicht werden:

Kremer M, **Spitzer M**, Mandl-Weber S, Stecker K, Schmidt B, Hofler H, Quintanilla-Martinez L, Fend F.

**Discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma: comparative molecular analysis reveals a heterogeneous group of disorders.**

*Lab Invest* 2003 Jan; 83(1): 107-114.

## 9. Danksagung

An dieser Stelle sei all denjenigen gedankt, die diese Arbeit ermöglicht haben. Ich möchte mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Falko Fend für die Überlassung des Themas und sein weit überdurchschnittliches Engagement bei der Leitung dieses Projekts bedanken. Während der vergangenen drei Jahre stand er mir jederzeit mit seiner fachlichen und menschlichen Kompetenz hilfsbereit zur Seite.

Großer Dank gebührt auch Herrn Dr. Marcus Kremer für die ausdauernde und krisenfeste Betreuung des praktischen und theoretischen Teils der Arbeit.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Sonja Mandl-Weber bedanken ohne deren tatkräftige Hilfe und Anleitung hätte ich den molekularbiologischen Teil der Arbeit wohl kaum so erfolgreich und zügig abschließen können.

In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch Frau Christa Schott und Frau Birgit Geist, die mir mit so manchem praktischen Tipp weiterhalfen.

Weiterhin sei auch Frau PD Dr. Leticia Quintanilla-Martinez, Frau Jacqueline Müller, Frau Sandra Rath, Frau Eleonore Samson und Nadine Kink gedankt, die mich bei der Durchführung und Auswertung der Immunhistochemie maßgeblich unterstützten.

Schließlich möchte ich mich noch bei Herrn Prof. Dr. Heinz Höfler für die Schaffung guter Rahmenbedingungen für Doktoranden in seinem Institut bedanken.

# LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE DATEN

---

Martin Stephan Spitzer

Geburtsdatum: 25. Mai 1976

Geburtsort: Neustadt an der Waldnaab

Familienstand: ledig

## AUSBILDUNG

---

1982 - 1995 Grundschole und Gymnasium in Neustadt/WN

1995 Abitur

07/1995 - 07/1996 Zivildienst, Klinikum Weiden (Oberpfalz)

10/1996 - 09/1998 Studium der Medizin an der Universität Regensburg

09/1998 Physikum

ab 10/1998 Studium der Medizin an der Technischen Universität München

02/2000 USMLE Step 1

05/2003 3. Staatsexamen (Gesamtnote: 1,16)

## PRAKTISCHES JAHR

---

05 - 08/2002 PJ-Tertial in Innerer Medizin – im Rahmen eines offiziellen Programms der TUM – an der Cornell University, New York, USA (New York-Presbyterian Hospital, Memorial Sloan Kettering Cancer Center und Lincoln Hospital)

09 - 10/2002 PJ Augenheilkunde, Duke University, Durham, USA

11 - 12/2002 PJ Augenheilkunde, Baylor College of Medicine, Houston, USA

01 - 04/2003 PJ Chirurgie, Klinikum rechts der Isar der TUM, München

## SONSTIGES

---

04/1999 - 08/2003 Stipendiat des Cusanuswerks

01/1996 - 08/1997 Ausbildung zum Rettungssanitäter

03 - 04/2000 Famulatur in Augenheilkunde und Augenpathologie, Wilmer Eye Institute, Johns Hopkins University, Baltimore, USA

11/1999 - 10/2000 Studentenvertreter der Fachschaft im Fachbereichsrat der Medizinischen Fakultät der TUM

04/2001- 10/2001 Koordinator des „Medizinerkurses“ der gemeinsamen Ferienakademie der TUM und der Universität Erlangen-Nürnberg

Martin Stephan Spitzer