

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. A. C. Feller

**Nachweis neuer B-Zellmarker
für die hämatopathologische Diagnostik**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Karen Kröger
aus Hamburg

Lübeck 2004

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hartmut Merz

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. Matthias Klinger

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2005

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 07.06.2005

gez. Prof. Dr. med. W. Jelkmann, Dekan der Universität zu Lübeck

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1. ALLGEMEINES	1
1.2. DIE WHO-KLASSIFIKATION	4
1.3. AUFBAU DES LYMPHKNOTENS.....	6
1.4. LYMPHADENITIS	8
1.5. NON-HODGKIN-LYMPHOME	9
1.6. M. HODGKIN UND GRENZFALL M. HODGKIN / ALCL	16
1.7. FRAGESTELLUNG UND ZIELE DER ARBEIT	19
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1. UNTERSUCHTE GEWEBEPROBEN.....	21
2.2. DIE ABC-METHODE.....	22
2.3. VERWENDETE ANTIKÖRPER.....	23
2.4. FÄRBEPROTOKOLL.....	27
2.5. KONTROLLEN	29
3. ERGEBNISSE	30
3.1. LYMPHADENITIS	30
3.2. NON-HODGKIN-LYMPHOME	33
3.3. M. HODGKIN.....	37
3.4. GRENZFALL M. HODGKIN / ALCL N=5	38
3.5. REAKTIVE, NICHT NEOPLASTISCHE ZELLKOMPONENTEN INNERHALB DER UNTERSUCHTEN LYMPHOMFÄLLE	38
4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	41
4.1. ETABLIERUNG IN DER IMMUNHISTOCHEMIE	42
4.2. B-ZELLSPEZIFITÄT.....	43
4.3. CHARAKTERISIERUNG EINZELNER LYMPHOMENTITÄTEN	44
4.4. UNTERSCHIEDUNG EINZELNER LYMPHADENITISFORMEN	48
4.5. LYMPHADENITIS VERSUS NEOPLASTISCHES ÄQUIVALENT	49
4.6. EXPRESSION IN ABHÄNGIGKEIT VOM DIFFERENZIERUNGSGRAD DER B-ZELLEN	50
4.7. BEDEUTUNG DER DYSREGULATION VON PAX-5- UND BOB-1-GENEN FÜR DIE LYMPHOMGENESE	53
4.8. ZWEIFELUNG DER MARGINALZONE.....	54
4.9. NACHWEIS DER B-ZELLABSTAMMUNG.....	55
4.10. VERGLEICH MIT ANDEREN STUDIEN	56
4.11. FAZIT UND AUSBLICK.....	56

5. ZUSAMMENFASSUNG.....	59
6. LITERATURVERZEICHNIS	61
7. ANHANG	71
7.1. ERGEBNISTABELLEN.....	71
7.2. ABBILDUNG	76
7.3. REAGENZIEN UND LÖSUNGEN.....	77
7.4. BEZUG DER VERWENDETEN MATERIALIEN	78
8. BILDANHANG	80
8.1. BILDТАFELVERZEICHNIS.....	80
8.2. BILDТАFELN	81
9. DANKSAGUNG	88
10. LEBENSLAUF	89

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AK	Antikörper
ALK	Anaplastic-Lymphoma-Kinase
APAAP	Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase
BZL	B-Zellenlymphom
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CD	Cluster of Differentiation
cHD	klassisches Hodgkinlymphom (classical Hodgkin´s Disease)
CS	Zitronensäure
CT	Computertomographie
dest.	destillata
Dt	Dampftopf
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FDZ	follikuläre dendritische Retikulumzellen
FM	Follikelmantel
g	Gramm
HPF	high power field
HRS	Hodgkin-Reed-Sternbergzellen
IF	Interfollikulärzone
Ig	Immunglobulin
KZ	Keimzentrum
l	Liter
M	molar
M.	Morbus
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mikrowelle
MZ	Mantelzone

µl	Mikroliter
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK	natürliche Killerzelle
NLPHD	noduläres lymphozytenprädominantes Hodgkinlymphom (Paragranulom)
PAP	Peroxydase-anti-Peroxydase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNS	Kaninchennormalserum
S.	Seite
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TF	Transkriptionsfaktor
v. a.	vor allem
w. z. B.	wie zum Beispiel
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
'	Minute /-n

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

Maligne Lymphome sind autonome Neoplasien lymphatischer Zellen in den lymphatischen Organen oder lymphatisch besiedelten Geweben. 80-85% davon sind B-Zell-Lymphome (BZL) und nur 15-20% T-Zell-Lymphome (TZL). Aus diesem Grunde beschäftigt sich diese Arbeit vorwiegend mit den BZL.

Die Inzidenz der BZL in Europa liegt derzeit bei ca. 5-7 Fällen pro 100000 Einwohner mit einer steigenden Zahl von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL), was deren intensive Erforschung zur Verbesserung der Diagnostik, Therapie und Prognose verständlich macht (67).

Der Verdacht auf das Vorliegen eines Lymphoms basiert zumeist auf klinischen Befunden (w. z. B. einer sogenannten B-Symptomatik mit Lymphadenopathie) und nicht selten auch auf Zufallsbefunden während eines stationären Aufenthalts (sogenannte indolente Lymphome). Bei Untersuchungen zur Klärung anderer Krankheiten werden dabei z. B. zufällig im Röntgenthoraxbild oder einer Sonographie des Abdomens lymphomverdächtige Befunde erhoben (28, 67).

Die Erhärtung des Verdachtes erfolgt anhand einer exakten Anamnese entsprechend der WHO-Graduierung oder dem Karnofsky-Index, der körperlichen Untersuchung, der bildgebenden Verfahren (z. B. konventionelles Röntgen, Sonographie, CT, MRT), laborparametrisch oder durch Organfunktionsprüfungen (21, 46).

Jedes dieser Verfahren kann den Verdacht lediglich erhärten. Die Sicherung der Diagnose ist bei lymphatischen Neoplasien fast immer an eine histologische Diagnostik gebunden. Dabei werden zur exakten Diagnose neben morphologischen Kriterien insbesondere immunhistochemische Expressionsprofile wie auch molekulargenetische Befunde herangezogen.

Für die Auswahl der Therapie und zur Abschätzung der Prognose sind unterschiedliche Aspekte von Bedeutung: Neben der Diagnose (gegebenenfalls mit Subtyp) spielt das Grading (hoch- und niedrigmaligne) sowie der Ursprung des Lymphoms eine Rolle. Drei

Beispiele dienen der Verdeutlichung:

1. In der WHO-Klassifikation (siehe unten) unterscheidet man das noduläre lymphozytenprädominante Hodgkinlymphom (NLPHD oder Paragranulom) von dem klassischen Hodgkinlymphom (classical Hodgkin's disease, cHD). Ersteres weist im Vergleich zu dem cHD eine langsamere Progredienz, eine geringere Rezidivrate und eine etwas bessere Therapieempfindlichkeit auf und sollte deshalb von dem cHD abgegrenzt werden. In einigen Fällen ist auch die Unterscheidung zwischen cHD und T-zellreichem großzelligem B-Zellenlymphom oder ALCL schwierig. Zum Teil tragen mediastinale B-Zellenlymphome Merkmale von Hodgkinlymphomen. Das Fehlen einer klaren Diagnose stellt ein Problem für die Auswahl des richtigen Therapieschemas dar (74).

2. Je nach Malignität weisen die Lymphome ein unterschiedliches Ansprechen auf Chemo-, Immun- bzw. Strahlentherapien auf. Besonders schwierig gestaltete sich diese Unterscheidung bisher bei den folliculären Lymphomen, die heute in drei verschiedene Grade eingeteilt werden. Die noch als niedrig maligne geltenden Grade 1 und 2 werden anders therapiert als die schon als hochmaligne beschriebenen folliculären Lymphome Grad 3 (nach WHO). Für eine optimale Therapiestratifizierung und gute Therapieerfolge sind die exakte Unterscheidung zwischen hoch- und niedrig malignen Lymphomen und das Staging (Ausdehnung) sehr wichtig.

3. Nicht nur eine exakte Diagnose, sondern auch das Wissen über die Entstehung der Neoplasien kann von großer Bedeutung für die Therapie und Prognose sein. Sekundär hochmaligne Lymphome, die erst aus niedrig malignen hervorgegangen sind, haben eine ungünstigere Prognose als solche, die primär hochmaligne sind. Hochmaligne B-Zellenlymphome, die sich aus Zellen des Keimzentrums ableiten, weisen fast immer eine bessere Prognose auf als solche, die sich von postgerminalen B-Zellen (memory B-Zellen) ableiten.

Anhand dieser Beispiele kann festgestellt werden, dass für die meisten Therapieoptionen und Prognosestellungen eine exakte Diagnosestellung, das Grading und die Herkunftsbestimmung der Lymphome sehr bedeutsam sind.

Allerdings gibt es trotz verbesserter diagnostischer Methoden noch Fälle, die sich morphologisch nicht sicher klassifizieren lassen.

Optimal wäre daher die Verwendung spezifischer Marker, die es erlauben, die Diagnose sicher und auch ein Risikoprofil des Tumors zu erstellen (10). So wäre es hilfreich, über Marker zu verfügen, die eine Vorhersage zum Ansprechen auf bestimmte Chemotherapien erlauben oder die eine Stratifizierung in „low und high risk“ zulassen.

Die morphologischen Nachweismethoden reichen für eine exakte Diagnose manchmal nicht aus.

In der Praxis nutzt man schon seit langem die Immunhistochemie, mit der eine Objektivierung der morphologischen Diagnostik möglich wird. Die derzeit bekannten und gebräuchlichen Antikörper lassen zwar eine für klinische Zwecke ausreichend gute und sichere Diagnostik der malignen Lymphome zu. Ziel muss es aber sein, nicht nur Lymphomgruppen zu definieren, sondern darüber hinaus diese auch histologisch zu verstehen und interindividuellen Besonderheiten jedes Tumors und Patienten gerecht zu werden. So ist man ständig auf der Suche nach weiteren spezifischen Antikörpern, um solche Probleme anzusprechen.

Besonders hilfreich und daher auch bedeutsam ist der Nachweis bestimmter Transkriptionsfaktoren (TF). TF sind Proteine, die an der Transkription und ihrer Regulierung beteiligt sind (73). Dazu binden sie an Promotor- und Enhancersequenzen. Ihre Aktivität und Spezifität kann durch Co-Faktoren / -Aktivatoren moduliert werden, die direkt mit den DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren interagieren (35).

TF stellen eine neue Kategorie von intrazellulären Leukozytenmarkern dar, die Hinweise über die Herkunft und Differenzierung geben könnten. Sie könnten als Marker bestimmter Lymphomsubtypen dienen und aufgrund ihrer hohen Sensitivität schon kleinste Mengen an Tumorgewebe nachweisen.

Unser besonderes Interesse gilt den Transkriptionsfaktoren Pax-5, Oct-1, Oct-2 und Bob-1. Die in unserer Arbeit verwendeten Transkriptionsfaktoren sind ausschließlich B-Zell-Marker. Alle vier sind bisher in der immunhistochemischen Routinediagnostik noch nicht vollständig etabliert. Es bestehen derzeit Widersprüche in der Literatur, unter anderem, weil diese AK noch nicht bei den bedeutenden Diagnostikfirmen erhältlich sind, und weil verschiedene monoklonale und polyklonale AK mit unterschiedlichen Ergebnissen verwendet wurden.

1.2. Die WHO-Klassifikation

Die WHO-Klassifikation, ein Gemeinschaftsprojekt der European Association of Haemathology und der US-Society for Haemathology, stellt die derzeit aktuellste anerkannte Klassifikation für Tumore des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes dar.

Sie wurde in enger Anlehnung an die REAL-Klassifikation entwickelt. In der WHO-Klassifikation gelang es, bisher bestehende amerikanische und europäische Klassifikationen zusammenzufassen (28).

Lymphatische Neoplasien können prinzipiell nach verschiedenen Kriterien unterschieden werden, w. z. B. nach morphologischen, immunhistochemischen, genetischen oder auch klinischen Kriterien. Der WHO ist es gelungen, die bestehenden Klassifikationen, die zum Teil erheblich voneinander abweichen, zusammenzufassen. Sie versuchte, neue Unterscheidungsmerkmale miteinzubeziehen und auf klinische Aspekte vermehrt einzugehen, um die praktische Anwendung im Alltag zu gewährleisten. Sie hält dieses System in einem überschaubaren Rahmen, um diese Klassifikation einer breiten Masse zugänglich zu machen (27). Somit stellt sie die erste weltweit einheitliche klinisch-pathologische Klassifikation für maligne hämatopoetische und lymphatische Erkrankungen dar.

Die WHO unterteilt primär nach Zellreihen (myeloische, lymphatische, histiozytische / dendritische und Mastzellreihe) und innerhalb dieser vier Kategorien, soweit möglich, nach Zelldifferenzierungs- und Malignitätsgrad (hoch- und niedrig maligne). Jeder Neoplasie wird, wenn möglich, eine Ursprungszelle zugeschrieben, von der sich der Tumor ableiten lässt. Dabei werden Morphologie, Immunphänotyp, Klinik und genetische Merkmale berücksichtigt. Im Bereich der lymphatischen Neoplasien ging man verstärkt auf den klinischen Faktor ein und gruppierte nach Ausbreitungsmuster (überwiegend disseminiert, leukämisch, primär nodal oder extranodal).

Die lymphatischen Neoplasien gliedern sich in drei Gruppen: T- und NK-Zell-Neoplasien, B-Zell-Neoplasien und Hodgkinlymphome. Innerhalb der B-Zell-Neoplasien unterscheidet man wiederum die drei Kategorien Neoplasien aus unreifen Vorläuferzellen (Lymphoblasten), reifzellige Neoplasien sowie die B-Zell-Proliferationen mit unklarem Malignitätspotential. Epidemiologische Parameter, die Ätiologie und ein bestimmtes

Verhalten im Rahmen der jeweils angewendeten Therapie wurden berücksichtigt (88).

Tabelle 1: B-Zellneoplasien

WHO-Klassifikation (2000)	KIEL-Klassifikation (1988)
Vorläufer B-Zellneoplasien	
Vorläufer B-lymphoblastische / s Leukämie / Lymphom	B-lymphoblastisch
Reifzellige B-Zellneoplasien	
B-CLL (chronische lymphatische Leukämie) / kleinzelliges lymphozytisches Lymphom	B-CLL, B-lymphozytisch, lymphoplasmazytoides Immunozytom
B-PLL (B-Zellprolymphozytenleukämie)	Prolymphozytenleukämie
lymphoplasmazytisches Lymphom (Makroglobulinämie Waldenström)	lymphoplasmozytisch /- zytoid (Immunozytom)
splenisches Marginalzonenlymphom	monozytoid, einschließlich Marginalzonen- NHL
Haarzellenleukämie	Haarzellenleukämie
Plasmazellneoplasien: - Plasmazellmyelom (multifokale Plasmazellneoplasie) - Plasmozytom (lokalisierte Plasmazellneoplasie) (solitär / extraossär)	plasmozytisch
Marginalzonen-B-Zellenlymphom: - extranodales Marginalzonenlymphom des mukosaassoziierten lymphatischen Gewebes (MALT-Lymphom) - nodales Marginalzonenlymphom	- monozytoid
folikuläres Lymphom	zentroblastisch-zentrozytisches Lymphom (cbcc)
Mantelzellenlymphom	zentrozytisch

WHO-Klassifikation (2000)	KIEL-Klassifikation (1988)
Reifzellige B-Zellneoplasien	
diffuses großzelliges B-Zellenlymphom: -zentroblastisch -anaplastisch -plasmoblastisch -immunoblastisch -T-zellreich und histiozytenreich -intravaskulär	zentroblastisch (monomorphe, polymorphe und multilobulierte Subtypen), B-immunoblastisch, B-Zell großzellig anaplastisch (ki-1 positiv)
mediastinales (thymisches) großzelliges B-Zellenlymphom	
primäres Lymphom in Ergüssen (effusion lymphoma)	
Burkitt-Lymphom / -Leukämie	Burkitt-Lymphom / -Leukämie
B-Zellproliferationen unbestimmten malignen Potentials	
lymphomatoide Granulomatose	
lymphoproliferative Störungen nach Transplantationen und primärer oder sekundärer Immunsuppression, polymorphe B-Zellproliferation	

1.3. Aufbau des Lymphknotens

1.3.1. Allgemein

Es gibt vier wesentliche Lymphknotenkompartimente: die Pulpa, den Parakortex (T-Zell-Zone), die Interfollikulärzone und die Lymphfollikel (B-Zell-Zone).

Je nachdem, ob ein Antigenkontakt stattgefunden hat oder nicht, liegen die Lymphfollikel aktiviert (Sekundärfollikel) oder inaktiviert (Primärfollikel) vor. Die Sekundärfollikel setzen sich aus der zentralen hellen Zone mit den Zentrozyten, der weiter außen liegenden dunklen Zonen mit den Zentroblasten und antigenpräsentierenden follikulären, dendritischen Zellen (FDZ) zusammen.

Sie werden von der Mantelzone, bestehend aus reifen, ruhenden B-Zellen, und der daran angrenzenden Marginalzone umgeben. Die in der Marginalzone lokalisierten monozytoiden B-Zellen und Marginalzonen-B-Zellen gehören überwiegend zu postgerminalen Memory-B-Zellen (reaktive B-Lymphozyten). Ihr folgt die aus T-Lymphozyten, einzelnen Plasmazellen und B-zellulären Blasten bestehende Interfollikulärzone.

In der T-Zone finden sich in erster Linie kleine T-Lymphozyten und einzelne interdigitierende, dendritische Zellen (IDZ).

In den Sinus bzw. sinusnah findet der erste Antigenkontakt statt.

1.3.2. Nicht neoplastische, reaktive Veränderungen des Lymphknotens

Bei der chronischen unspezifischen Lymphadenitis kann es zur Hyperplasie der einzelnen Lymphknotenkompartimente kommen.

1.3.2.1. Follikuläre Hyperplasie (B-Zonen-Hyperplasie)

Die Kompartimente sind erhalten. Lediglich im Kortextbereich kommt es durch die Vermehrung von Zentroblasten zu einer Vermehrung und Vergrößerung der Lymphfollikel. Die hellen Makrophagen erinnern an einen Sternenhimmel.

1.3.2.2. Hyperplasie der T-Zone (Parakortex)

Als Zeichen der primären T-Zell-Antwort kommt es zu einer Verbreiterung des Parakortex, bestehend aus T-Lymphozyten, IDZ und einzelnen Blasten.

1.3.2.3. Bunte Pulpahyperplasie

Durch Vermehrung von Lymphozyten und Blasten, v. a. Immunoblasten, kommt es zur Vergrößerung der Pulpa, möglicherweise mit Verdrängung des Parakortex.

1.3.2.4. Plasmazellhyperplasie

Es kommt zu einer Verbreiterung der Pulpa durch die Vermehrung reifer Plasmazellen.

1.3.2.5. Monozytoide B-Zell-Reaktion (sogenannte unreife Sinushistiozytose)

Bei Erhalt der Sinuswandungen kommt es im Bereich der Sinus zu einer Vermehrung von monozytoiden B-Zellen. Das sind reaktive polyklonale, überwiegend prägerminale B-Lymphozyten.

1.4. Lymphadenitis

1.4.1. Progressiv transformierte Keimzentren (PTG)

Hierbei wandern kleine Lymphozyten aus dem Follikelmantel in die Keimzentren ein, bis diese vollständig von einem Geflecht aus FDZ und Lymphozyten durchsetzt sind.

Differentialdiagnostisch sollte man an das Vorliegen eines Paragranuloms denken (siehe Kapitel 1.6.1.). Die Ätiologie der progressiv transformierten Keimzentren kann sehr unterschiedlich sein. Ein kleiner Teil der Patienten weist simultan oder subsequent ein NLPHD auf. Ein weiterer Teil zeigt Infektionen mit ungewöhnlichen Erregern, wieder andere eine immunologische / autoimmunologische Reaktion.

1.4.2. Piringer-Lymphadenitis

Die Piringer-Lymphadenitis kann man u. a. bei der Infektion mit *Toxoplasma gondii* beobachten. Bei erhaltener Lymphknotenarchitektur zeichnet sie sich durch eine kleinherdige, zum Teil inter- und intrafollikuläre Epithelioidzellreaktion ohne Verkäsung und durch eine monozytoide B-Zell-Reaktion (unreife Sinushistiozytose) aus. Neben einer B- und T-Zonenhyperplasie kommt es zu einer bunten Pulpahyperplasie. Die monozytoiden B-Zellen bilden eine eigene immunhistochemisch abgrenzbare B-Zell-Subpopulation, die meistens aus polyklonal transformierten B-Zellen hervorgeht. Die Zellen, die eine monozytoide B-Zell-Differenzierung aufweisen, sind in der Mehrheit der Fälle naive B-Zellen, seltener postgerminale nicht-antigen-selektierte Keimzentrums-B-Zellen. Sie sind nicht, wie früher angenommen, mit den Marginalzonen-B-Zellen verwandt (91). Bei den plasmazytoiden Monozyten (DC-2-Zellen) der Piringer-Lymphadenitis handelt es sich um spezialisierte lymphoide dendritische Zellen.

1.4.3. EBV-Lymphadenitis

Die Infektion mit Epstein-Barr-Viren kann zu einer Lymphadenitis führen. Charakteristisch sind eine große Anzahl EBV-positiver B-Blasten, die sich bei normaler Immunabwehr extrafollikulär, nicht aber in den Keimzentren befinden. Die Menge und die Lokalisation der EBV-positiven B-Blasten ist abhängig vom jeweiligen Immunstatus des Patienten (57). Bei schweren Immundefekten kommen die B-Blasten auch in den Keimzentren vor. Daneben werden kleine Lymphozyten beobachtet. Durch die EBV-Infektion kann es zu Transformationen kommen, die unter Umständen zur Bildung von

hodgkinähnlichen Zellen führen können (39, 87). Es kann zur Entwicklung von Burkittlymphomen kommen. EBV steht auch im Verdacht bei der Tumorentstehung anderer reifer B-Zellenlymphome, w. z. B. den diffusen großzelligen B-Zellenlymphomen, eine Rolle zu spielen.

1.4.4. M. Castleman (Synonym: angiofollikuläre Lymphknoten-Hyperplasie)

Der M. Castleman kann solitär oder multizentrisch vorliegen. Man unterscheidet zwei Formen:

- 1) Bei dem hyalin-vaskulären Typ erkennt man eine starke Hyalinisierung der Follikel (sogenannte "onionskin") und Gefäße.
- 2) Der plasmazellreiche Typ ist weniger stark hyalinisiert. Dafür kommt es zu einer starken, selten monoklonalen Plasmazellvermehrung in der Interfollikulärzone.

Der Typ 1 kommt meist lokalisiert, der Typ 2 nicht selten generalisiert vor. Der Typ 2 kann selten auch zu einem malignen Lymphom übergehen. Mischformen kommen häufig vor.

1.5. Non-Hodgkin-Lymphome

Die Non-Hodgkin-Lymphome entstehen meist aus arretierten Differenzierungsstufen der jeweiligen normalen Ausgangspopulation. Auch die reifen B-Zellneoplasien täuschen reife Differenzierungsstufen nur vor.

1.5.1. Chronische lymphatische Leukämie der B-Zellreihe (B-CLL)

Die B-CLL zeigt eine leukämische Ausbreitung mit Befall des Knochenmarks und der Lymphknoten. Die Tumorzellen leiten sich von Zellen der Primärfollikel oder der Follikelmantelzone ab. Sie bilden follikelähnliche Strukturen (Pseudofollikel, Proliferationszentren) aus kleinen, reifzelligen B-Lymphozyten mit dichtem Chromatin und schmalem Zytoplasmasaum. Sie sind nur wenig größer als normale Lymphozyten. Eingestreut findet man Prolymphozyten, Zellen mit aufgelockertem Chromatin und kleinen Nukleolen, und Paraimmunoblasten. Das sind mittelgroße bis große Zellen mit aufgelockertem Chromatin, rund-ovalen Kernen, eosinophilen Nukleolen und basophilem Zytoplasma. Im histologischen Bild heben sich die Proliferationszentren als helle Bezirke

auf dunklem, kleinzelligem Hintergrund ab.

Die oft chromosomal veränderten B-Lymphozyten (u. a. Trisomie 12,13q-Deletion) sind positiv für IgM, IgD, CD5, CD23, negativ für CD10.

Von der B-CLL abzugrenzen ist zudem eine bestimmte Variante, die sogenannte VCLL. Es handelt sich um ein lymphozytisches Lymphom, das entweder CD5-positiv oder CD23-positiv ist oder nur partiell diese Antigene exprimiert, niemals jedoch beide zusammen.

1.5.2. Morbus Waldenström (Synonyme: Makroglobulinämie Waldenström, lymphoplasmazytisches Lymphom (LPL), Immunozytom, lymphoplasmozytischer Typ (Kiel-Klassifikation))

Der M. Waldenström ist eine lymphatische Neoplasie, die vor allem das Knochenmark, die Milz und die Lymphknoten befällt. Es kommt zu einer Lymphozytose und Produktion monoklonaler IgM-Paraproteine, die meistens auch ausgeschleust werden und dann zu einer Hyperviskosität oder Kryoglobulinämie des Blutes führen können.

Morphologisch kann es zu Ähnlichkeiten mit folliculären Lymphomen, der B-CLL und Marginalzonenlymphomen kommen. Die Bezeichnung lymphoplasmazytisches Lymphom ist nur solchen Tumoren vorbehalten, die keine typischen Merkmale dieser anderen Lymphome aufweisen w. z. B. Proliferationszentren, Pseudofollikel, Marginalzonen oder monozytoide B-Zellen.

Durch die Proliferation von einheitlichen, kleinen lymphoiden Zellen und die diffuse Infiltration fast aller Lymphknotenstrukturen inklusive der Lymphknotenkapsel wird die Lymphknotenarchitektur zerstört. Das Infiltrat setzt sich v. a. aus hochdifferenzierten B-Zellen (kleinen B-Lymphozyten, Plasmazellen und plasmazytoiden Lymphozyten) sowie wenigen Immunoblasten, Mastzellen und reaktiven epithelioiden Histiozyten zusammen, die sich in einem retikulären Grundgerüst wiederfinden. Die Ursprungspopulation entstammt wahrscheinlich den Follikelmantelzellen.

Im weiteren Verlauf kann es zu einer Transformation in ein diffuses großzelliges B-Zellenlymphom vom immunoblastischen Typ kommen.

Plasmazytoide Lymphozyten sind eine Zwischenform von Lymphozyten und Plasmazellen. Sie haben einen größeren Kern als Lymphozyten, basophiles Zytoplasma und lymphozytenähnliche Nukleoli. Plasmazytoide Zellen und Plasmazellen haben oftmals PAS+ Einschlusskörperchen, die zytoplasmatisch liegenden "Russel"- und die nukleären

"Dutcher"-Körperchen.

Immunphänotypisch lassen sich oberflächliche und zytoplasmatische Immunglobuline und typische B-Zell-assoziierte Antigene (CD19, CD20, CD22, CD79a) und selten CD23 nachweisen. Die fehlende Expression von CD5 sowie ein starker zytoplasmatischer Immunglobulin-Nachweis sind hilfreich in der Abgrenzung zur B-CLL.

1.5.3. Marginalzonenlymphom

Neben dem extranodalen Marginalzonenlymphom vom mucosa-associated-lymphoid-tissue-type (MALT-Typ) gibt es zwei weitere Formen:

1.5.3.1. Primär splenisches Marginalzonenlymphom

In der Milz kommt es zu einer Proliferation von kleinen Lymphozyten in der Follikelmantelzone, die die Keimzentren in der weißen Pulpa umschließen und sie zum Teil auch vollständig ersetzen. In der Marginalzone hingegen liegen einzeln verstreute transformierte Blasten und mittelgroße Zellen mit hellem Zytoplasma und aufgelockertem Chromatin. Letztere ähneln den Marginalzonenzellen.

Die Rote Pulpa wird von beiden, den großen und kleinen Zellen, infiltriert. In den Zellhaufen findet man auch epitheloide Histiocyten und Plasmazellnester. Es kann zu einer plasmozytischen Differenzierung kommen.

Im Lymphknoten zeigt sich ein ähnliches Bild wie in der Milz. Auch hier kommt es zu einem Ersatz der Lymphfollikel durch Tumorzellen, allerdings lässt sich eine Marginalzone weniger gut abgrenzen, da sich große und kleine Zellen vermischen.

Außer der Milz und den Lymphknoten werden vor allem das Knochenmark und das Blut befallen.

Ursprungszelle ist die post-germinale B-Zelle der Marginalzone.

1.5.3.2. Nodales Marginalzonenlymphom (Synonyme: monozytoides B-Zellenlymphom (Kiel), parafollikuläres BZL (Lukes-Collins))

Das monozytoide B-Zellenlymphom stellt das nodale Äquivalent eines niedrig malignen B-Zellenlymphoms vom MALT-Typ dar. Es ähnelt den extranodalen (MALT) oder splenischen Marginalzonenlymphomen, ist im Gegensatz zu diesen aber primär nur auf den Lymphknoten beschränkt (9).

Es leitet sich von monozytoiden B-Zellen ab. Das sind reaktive B-Lymphozyten, die unter

anderem bei Lymphadenitiden (z. B. bei Toxoplasmose) und anderen Lymphomen vorkommen. Es darf nicht verwechselt werden mit einer Ansammlung monozytoider B-Zellen in den Sinus anderer niedrig maligner B-Zellenlymphome, wie es z. B. oft beim M. Waldenström beobachtet wird.

Neben diesen kleinen bis mittelgroßen Zellen mit breitem, blassem Zytoplasmasaum und einem monozytenähnlichen Zellkern beobachtet man zentrozytenähnliche Marginalzonen-B-Zellen und kleine B-Lymphozyten. Einzelne transformierte Zentroblasten, immunoblastenähnliche Zellen und Plasmazellen sind eingestreut. Das Infiltrat beschränkt sich anfangs auf die Sinus, Marginal- und Interfollikulärzone, infiltriert aber nach und nach diffus den ganzen Lymphknoten und separiert so die einzelnen Lymphfollikel voneinander. Wenn es zur Metastasierung in die Milz kommt, so wird bandartig die weiße Pulpa infiltriert. Es kann zu einer plasmazytischen Differenzierung kommen.

Das monozytoide B-Zellenlymphom ist CD5-, CD10- und CD23-negativ. An chromosomalen Veränderungen findet sich in der Hälfte der Fälle eine Trisomie 3. Gelegentlich geht es in ein hochmalignes Marginalzonenlymphom über.

1.5.4. Plasmozytom (Synonym: solitäres Myelom)

Das Plasmozytom ist mit dem Multiplen Myelom zytologisch und immunophänotypisch identisch. Im Gegensatz zum Multiplen Myelom zeigt das Plasmozytom aber kein multifokales, sondern ein lokalisiertes ossäres oder extraossäres Wachstumsmuster.

Dieses Lymphom entsteht durch die klonale Proliferation von Plasmazellen des Knochenmarks und produziert monoklonale Immunglobuline (M-Komponente) ohne Abwehrfunktion. Beim Plasmazellmyelom finden sich massenhaft Plasmazellen im Knochenmark, die die anderen Knochenmarkbestandteile verdrängen. Es zeigt sich ein vielgestaltiges Bild. Reife Plasmazellen zeigen einen perinukleären Hof um den exzentrisch gelegenen, radspeichenartigen Zellkern. Die unreifen Plasmazellen haben oftmals mehrere Kerne, aufgelockertes Chromatin, eine hohe Kern-Plasmarelation, prominente Nukleolen sowie verschiedene Einschlusskörperchen.

Die Plasmazellen produzieren zwar zytoplasmatisch Ig, v. a. IgG, zeigen aber einen Mangel an Oberflächen-Ig. Verschiedene genetische Veränderungen wurden beobachtet. Darunter eine veränderte Expression des Pax-5-Gens auf Chromosom 9, die

wahrscheinlich zu einem Verlust von CD19 führt.

1.5.5. Follikuläre Lymphome

1.5.5.1. Ehemals zentroblastisch-zentrozytisches B-Zellenlymphom (cbcc)

Dieses mit am häufigsten vorkommende NHL zeichnet sich durch die Proliferation von Zentrozyten und Zentroblasten und das Imitieren von Keimzentren aus. Zum Teil liegt ein diffuses Ausbreitungsmuster vor. Die Mantelzone ist wenig ausgeprägt.

Die kleinen bis mittelgroßen Zentrozyten besitzen einen eckigen und unregelmäßig gekerbten Zellkern und helles Zytoplasma. Die Blasten sind größer als die Zentrozyten. Ihr runder oder ovaler Zellkern enthält vesikuläres Chromatin, ein bis drei periphere Nukleoli und wird von einem basophilen, schmalen Zytoplasmasaum umgeben. Zusätzlich beobachtet man T-Lymphozyten und folliculäre dendritische Zellen. Zu 90% liegt eine Translokation t(14;18) vor, die zur Überexpression des bcl-2-Onkoproteins führt und mit dessen Hilfe man neoplastische von reaktiven Keimzentren immunhistochemisch unterscheiden kann. Das folliculäre Lymphom ist das einzige niedrig maligne B-Zellenlymphom, das im frühen Stadium durch Radiochemotherapie heilbar ist. Umso wichtiger ist der frühe und exakte Nachweis, z. B. durch die Immunhistochemie.

Man vermutet, dass der Anteil der Blasten mit dem Malignitätsgrad der Lymphome korreliert, so dass man sie in drei Grade einteilen kann (Grad 1, 2 und 3).

Wenn der Blastenanteil eines folliculären Lymphoms auf >16 / HPF (gemessen am Durchschnitt von 10 / HPF) ansteigt, spricht man von einem folliculären Lymphom Grad 3, wobei hier eine diffuse Blastenvermehrung (3a) von geschlossenen Blastengruppen (3b) unterschieden wird. Nur die folliculären Lymphome der Gruppe 3a und 3b werden heute als hochmaligne angesehen.

Das folliculäre zentroblastische Lymphom der Kiel-Klassifikation entspricht z. T. der Gruppe 3b (simultan sekundär hochmaligne), z. T. entsteht es auch de novo als primäres high grade Lymphom.

1.5.5.2. Ehemals zentroblastisches Lymphom (cb)

Das cb entsteht durch die diffuse Infiltration des Lymphknotens durch Zentroblasten des Keimzentrums, die aber auch zu knotigen, follicelartigen Strukturen führen kann. Der rundliche Kern der Blasten enthält helles Chromatin mit zwei bis drei randständigen

Nukleolen. Im Hintergrund sieht man wenige Immunoblasten und Zellen mit multilobulierten Kernen.

Das cb exprimiert CD10, CD20 und CD79a, manchmal CD23 und, in aller Regel, kein CD5.

1.5.6. Mantelzellenlymphom (Synonym: zentrozytisches Lymphom (Kiel))

Es kommt in einem Netzwerk aus FDZ zur Proliferation von aus der inneren Mantelzone stammenden zentrozytenähnlichen Zellen. Diese Zellen sind klein bis mittelgroß, zeigen einen unregelmäßigen gekerbten Kern, aufgelockertes Chromatin und einen sehr schmalen Zytoplasmasaum. Blasten kommen nicht vor. Bei der klinisch bedeutsamen blastoiden Variante kommen Zellen vor, die den Zentrozyten des Keimzentrums ähneln (43).

Das Ausbreitungsmuster kann die Mantelzone betonen, diffus oder vage nodulär sein. Im Hintergrund liegen verstreut einzelne epithelioide Histiocyten. Viele kleine Gefäße sind hyalinisiert (69).

Die Lymphome sind in der Regel CD5-positiv, CD23- und CD10-negativ. Es werden sehr selten neben CD5 auch CD10 und CD23 exprimiert. Typisch ist die Überexpression des Cyclin D1-Proteins, welches durch die Translokation t(11;14) hervorgerufen wird. Es zeigt die ungünstigste Prognose unter den sogenannten niedrig malignen BZL.

1.5.7. Diffuses großzelliges B-Zellenlymphom

Das diffuse großzellige B-Zellenlymphom ist ein sehr häufiges Lymphom, das 20% aller NHL ausmacht. Es kann spontan de novo als high grade Lymphom oder auch sekundär nodulär aus weniger malignen Lymphomen entstehen (w. z. B. dem Marginalzonenlymphom, follikulären Lymphomen, der B-CLL oder dem NLPHD).

Es vereint eine heterogene Gruppe von Tumoren, die sich durch folgendes auszeichnet:

Die Tumorzellen gehen aus peripheren B-Zellen, den Keimzentren oder späteren Entwicklungsstufen hervor. Sie breiten sich diffus in nodalen oder extranodalen Strukturen aus und bilden lokalisierte oder disseminierte Herde. Diese bestehen aus großen, transformierten lymphoiden Zellen (Zentroblasten und Immunoblasten) mit rund-ovalen, sehr großen Kernen und einer hohen Mitoserate im Vergleich zu den niedrig malignen Lymphomen. In einigen Fällen können die Kerne gelappt sein. Das Chromatin erscheint vesikulär, der Zytoplasmasaum ist breiter als bei den lymphozytischen Lymphomen. Die Zellen besitzen meistens zwei bis drei exzentrische Nukleoli, aber auch einzelne, zentral

liegende kommen vor (Immunoblasten).

Morphologisch unterscheidet man zwischen fünf Hauptvarianten, der zentroblastischen, immunoblastischen, plasmoblastischen, T-zell- / histiozyten-reichen und anaplastischen Variante. Die plasmoblastische Variante ist meist mit einer sehr ungünstigen Prognose verbunden.

1.5.8. Mediastinales (thymisches) großzelliges B-Zellenlymphom

Das mediastinale großzellige B-Zellenlymphom ist ein klinisch definierter Subtyp des diffusen großzelligen B-Zellenlymphoms.

Es geht wahrscheinlich von thymischen B-Zellen aus und findet sich vor allem im vorderen Mediastinum. Es zeigt eine starke Sklerosierungstendenz. Die Tumorzellen sind klein bis mittelgroß und ähneln z. T. Zentroblasten des Keimzentrums oder auch Hodgkinzellen. Der runde Kern wird von reichlich blassem Zytoplasma umgeben. Durch eingestreute Lymphozyten und eosinophile Granulozyten kann es Ähnlichkeiten zu einem Hodgkinlymphom aufweisen.

Es zeigt ein aggressives Wachstumsverhalten und breitet sich durch kontinuierliche Infiltration angrenzender Strukturen (Perikard, Lunge, Brustkorb) aus (69).

1.5.9. Burkitt-Lymphom

Das Burkitt-Lymphom ist ein sehr aggressives, oft extranodal vorkommendes Lymphom. Die Mitoserate ist sehr hoch.

Das monomorphe Infiltrat besteht aus mittelgroßen Blasten des Keimzentrums und phagozytierenden Makrophagen (sogenannte Sternenhimmelzellen). Die Blasten zeigen einen rundlichen Kern mit mehreren sehr kleinen, meist zentralen Nukleolen, sowie einen schmalen, Vakuolen enthaltenden, stark basophilen Zytoplasmasaum. Die diffus verteilten Makrophagen haben ein helles Zytoplasma, das zwischen den dunklen und dichten Zellverbänden der Blasten hervorsteht und an ein Sternenhimmelbild erinnert.

Neben dem klassischen Burkitt-Lymphom unterscheidet man das Burkitt-Lymphom mit plasmoblastischer Differenzierung und das atypische bzw. Burkitt-ähnliche Lymphom.

Neben der Expression von CD10 ist eine Produktion von Ig-Schwerketten (IgH) typisch. Es kommt oft zu der Translokation t(8;14) (Veränderung der Ig-Schwerketten-Expression), seltener zu t(2;8) oder t(8;22) (Ig-Leichtketten). Typischerweise ist dabei das c-myc-

Oncogen transloziert.

Hervorzuheben ist bei diesem Lymphom das endemische Vorkommen bei Kindern in Afrika, das in engem Zusammenhang mit EBV und dem Ausbreitungsgebiet der Malaria steht. In den USA oder Europa kommt das Burkitt-Lymphom vor allem sporadisch vor und scheint in weniger als 10% EBV-assoziiert zu sein.

1.5.10. großzelliges anaplastisches Lymphom (Synonym: anaplastic large cell lymphoma (ALCL))

Das ALCL stammt von aktivierten reifen zytotoxischen T-Zellen ab. Es zeigt eine große Bandbreite in seiner Morphologie. Es gibt neben der gewöhnlichen Form (70%) noch die lymphohistiozytäre, die sarkomatöse, die großzellige und die kleinzellige Variante. Charakteristisch und in den meisten Varianten vorkommend sind große lymphoide Zellen, die einen pleomorphen, oft pferdehufförmigen („horseshoe-shaped“) Zellkern aufweisen. Daneben existieren kleinere Zellen mit ähnlicher Morphologie. Einige Zellen weisen Invaginationen der Kernmembran auf, die wie Kerneinschlüsse wirken. Diese Zellen werden "doughnut"-Zellen genannt. Ist nur ein Teil des Lymphknotens betroffen, findet man solide Verbände großleibiger Zellen vor allem in den Sinus, während eine diffuse Durchsetzung des Parenchyms zur Zerstörung der gesamten Lymphknotenarchitektur führt. Beim ALCL unterscheidet man die primär kutane von der primär systemischen Form. Die Expression des ALK-Proteins geht mit einer signifikant besseren Prognose einher und sollte von der ALK-negativen Form unterschieden werden.

1.6. M. Hodgkin und Grenzfall M. Hodgkin / ALCL

1.6.1. M. Hodgkin (Synonyme: Lymphogranulomatose, Hodgkinlymphom)

In Europa stellt es die häufigste maligne Neoplasie bei Kindern und Jugendlichen dar und macht insgesamt ca. 30-50% aller Lymphome aus.

Die typische zelluläre Zusammensetzung und die unterschiedliche Klinik lassen das Hodgkinlymphom in der Regel sehr gut von den NHL abgrenzen.

Für das Hodgkinlymphom typisch ist ein entzündliches Infiltrat mit nur wenigen, monoklonalen lymphatischen Tumorzellen. Das sind zum einen große Blasten, sogenannte

Hodgkinzellen, einkernig und mit großen Nukleoli, zum anderen die mehrkernigen Riesenzellen, Sternberg-Reed-Zellen, mit basophilem Zytoplasma, einer prominenten Kernmembran, aufgelockertem Chromatin und mindestens zwei großen, eosinophilen Nukleoli in je einem Kernlappen. Die Tumorzellen leiten sich wahrscheinlich von Keimzentrums-B-Zellen ab, sehr selten einmal von Zellen der T-Zell-Reihe.

Oft sind die Tumorzellen rosettenartig von T-Lymphozyten umgeben. Sie befinden sich in einem Netzwerk aus inflammatorischen und akzessorischen Zellen (Eosinophile, Neutrophile, epithelioide Histiozyten, (Epithelioidzellen), Plasmazellen, Fibroblasten) und Kollagenfasern.

Man unterscheidet das cHD mit seinen vier Untergruppen (Typ der nodulären Sklerose, lymphozytenreicher Typ, Mischtyp, lymphozytenarmer Typ) von dem NLPHD. Während sich die vier Subtypen des cHD nur in Auftreten, Klinik, Wachstumsmuster und zellulärer Zusammensetzung unterscheiden, hebt sich das NLPHD zusätzlich epidemiologisch, prognostisch und immunphänotypisch von den anderen vier ab (2, 16, 50, 82).

Die Tumorzellen in den NLPHD ähneln mutierten und antigenselektierten Keimzentrumszellen, die Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen (HRS) präapoptotischen Keimzentrums-B-Zellen (41, 87). Die HRS-Zellen haben durch Mutationen ihre Fähigkeit zur Ig-Produktion verloren und sollten eigentlich durch Apoptose sterben. Man nimmt an, dass die HRS-Zellen der Apoptose durch transformierende Prozesse entgehen. Solche transformierenden Prozesse können unter anderem durch EBV-Infektionen ausgelöst werden (39, 71).

Bei dem **lymphozytenreichen Typ des cHD** beobachtet man eine hohe Anzahl kleiner Lymphozyten. Neutrophile und eosinophile Granulozyten kommen nur vereinzelt vor.

Der **Typ der nodulären Sklerose** zeichnet sich durch eine starke Sklerosierungstendenz mit Bindegewebssträngen, knotigen Infiltratherden und sogenannten Lakunarzellen aus.

Die Zusammensetzung des **Mischtyps** ähnelt der des nodulären Sklerose-Typs, zeigt aber allenfalls eine diskret interstitielle Fibrose. Typisch ist das Vorkommen von sogenannten „mummified cells“, HRS-Zellen mit kondensiertem Zytoplasma und pyknotischen Kernen.

Die **lymphozytenarme Form** ist gekennzeichnet durch eine besonders große Anzahl von HRS-Zellen im Vergleich zu den anderen Formen. Es besteht ein fließender Übergang zum großzelligen anaplastischen oder pleomorphen B-Zellenlymphom.

Das Wachstumsmuster des **NLPHD** ist nodulär. Die Mantelzone ist oft stark verbreitert. Die Keimzentren sind mottenfraßähnlich zersiedelt. In einem Netzwerk aus folliculären dendritischen Zellen mit kleinen Lymphozyten und epithelioiden Histiozyten findet man typische Riesenzellen, sogenannte L-(lymphozytäre) und H-(histiozytäre) Zellen, die zum Teil wegen ihrer multilobulierten Kerne auch Popkornzellen genannt werden. Neutrophile und eosinophile Granulozyten fehlen im Gegensatz zum cHD häufig.

Es besteht eine enge Beziehung zu den progressiv transformierten Keimzentren, die zum Teil gleichzeitig mit dem NLPHD in einem Lymphknoten vorkommen und deren Bedeutung als Vorläuferläsion zu diskutieren bleibt (53). Eine Abgrenzung zum T-zellreichen großzelligen B-Zellenlymphom ist in manchen Fällen nicht zweifelsfrei möglich. Ebenso bestehen manchmal Schwierigkeiten, ein lymphozytenreiches cHD vom NLPHD abzugrenzen.

Typisch für das cHD ist die relativ konstante Expression von CD30 und CD15, die beim NLPHD fehlt. Bei den HRS-Zellen fehlen meist typische B-Zellantigene wie zum Beispiel CD19 und CD20. HRS-Zellen haben häufig monoklonale Ig-Rearrangements.

1.6.2. Grenzfall zwischen M. Hodgkin und ALCL

Das Infiltrat des ALCL besteht aus entdifferenzierten, anaplastischen Zellen. Sie liegen meistens in dichten Zellhaufen beieinander und infiltrieren auch die Lymphknotensinus. Diese z. T. mehrkernigen, großen Zellen können auch bizarre Kerne mit großen, prominenten Nukleolen besitzen, wodurch es zur Assoziation mit HRS-Zellen des M. Hodgkin kommen kann. Das ALCL leitet sich meist von T-Zellen oder 0-Zellen (Zellen ohne Expression von T- oder B-Zellantigenen) ab. Selten gibt es auch anaplastische Varianten vom B-Zellen-Typ.

Von einem Grenzfall zwischen einem ALCL und M. Hodgkin spricht man, wenn man morphologische und / oder immunhistochemische Überschneidungen findet, so dass eine eindeutige Zuordnung der Lymphomentitäten nicht gelingt (12).

1.7. Fragestellung und Ziele der Arbeit

1.7.1. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Expression von Pax-5 (BSAP), Oct-1, Oct-2 und Bob-1 in lymphatischen Neoplasien und verschiedenen reaktiven Lymphknotengewebe. In der Literatur bestehen über die Validität der Ergebnisse derzeit Widersprüche. Wir wählten dazu die Immunhistochemie, weil es bisher nur einzelne immunhistochemische Untersuchungen dieser Transkriptionsfaktoren gibt. Die meisten Arbeiten befassen sich mit Zelllinien und nicht mit Gewebe. Es gibt zahlreiche Untersuchungen mit Western-Blot¹ oder In-Situ-Hybridisierung² (5, 24, 90). Die Western Blot Analyse und die In-Situ-Hybridisierung sind technisch zu aufwändig, um sie im Routinebetrieb durchzuführen und größere Patientenproben zu bearbeiten. Hier liegen die Vorteile der Immunhistochemie. Sie nimmt in der pathologischen Routinediagnostik im Vergleich zu den anderen Verfahren einen großen Stellenwert ein. Zudem erhoffen wir uns Einblicke über die Expression zellulärer Proteine, die in nur auf m-RNA-Ebene basierenden Studien nicht abgeleitet werden könnten (20).

1.7.2. Ziele der Arbeit

Die vorgelegte Arbeit soll zeigen, ob der Nachweis der untersuchten Transkriptionsfaktoren diagnostisch sinnvoll ist, und, ob ein solcher Nachweis auch zu einer Stratifizierung der Diagnostik führen kann.

Die Ergebnisse der Arbeit sollen dazu beitragen, mit Hilfe dieser relativ neuen B-Zellmarker bestimmte Lymphome oder Untergruppen voneinander abzugrenzen und Hinweise über deren Herkunft, Entwicklung oder Entstehung liefern. Unter Berücksichtigung exakter Diagnosen ließe sich unter Umständen ein Ansprechen auf Therapieschemata ableiten.

¹ Der Western Blot ist ein spezifischer immunologischer Nachweis für Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Fixierung auf Membranen. Durch chromogengekoppelte Antigen-Antikörperreaktionen können die Proteine sichtbar gemacht werden. Die nachgewiesenen Proteine sind ein Hinweis auf eine spezifische Genexpression.

² Die In-Situ-Hybridisierung ist ein in der Gentechnologie etabliertes Verfahren, das mittels Gensonden zum histologischen Nachweis und der Lokalisation von Genexpressionen dienen kann.

Ein weiteres Ziel ist es, eine diagnostische Basis für die genannten Antigene zu schaffen, um diese Antigene dann in größeren Patientenstudien zu überprüfen und deren Expression mit klinischen und prognostischen Markern zu korrelieren. Daraus ließen sich möglicherweise weitere Konsequenzen für die Diagnostik und Therapie ableiten.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchte Gewebeproben

Mit Hilfe der immunhistochemischen ABC-Methode wurden 76 NHL, 15 Hodgkinlymphome, 5 Grenzfälle zwischen Hodgkinlymphomen und ALCL und 12 Lymphadenitiden untersucht. Die Lymphadenitiden unterteilten sich in 3 Lymphadenitiden mit progressiv transformierten Keimzentren unklarer Ätiologie, 2 Piringer-Lymphadenitiden (Toxoplasmose), 2 EBV-Lymphadenitiden und 5 Fällen von M. Castleman (3 Fälle vom hyalin-vaskulären Typ, einem plasmazellreichen und einem Mischtyp).

Die Präparate entstammten dem Lymphknotenregister der Medizinischen Universität zu Lübeck. Die Diagnosen wurden von erfahrenen Pathologen gemäß der WHO-Klassifikation gestellt (27, 88).

Ein besonderes Augenmerk haben wir auf die Untersuchung der Lymphadenitiden gelegt, da es im Hinblick auf Oct-1, Oct-2, Bob-1 und Pax-5 unseres Wissens nach noch keine vergleichbaren immunhistochemischen Studien darüber gibt. Dabei stehen einige Lymphadenitisformen im Verdacht, Vorläufer bestimmter Lymphome zu sein. Lymphadenitiden mit progressiv transformierten Keimzentren können selten in NLPHD übergehen. EBV-Infektionen und damit auch EBV-Lymphadenitiden sind assoziiert mit Burkitt-Lymphomen und anderen EBV-Lymphoproliferationen bis hin zum Übergang in diffuse großzellige B-Zellenlymphome, im Besonderen bei immunsupprimierten Patienten.

In der vorliegenden Arbeit sollen definierte Antigene auf Zellen nachgewiesen werden. Eine hervorragende Methode stellt die Immunhistochemie dar, bei der mit Hilfe enzymmarkierter Antikörper Antigene sichtbar gemacht werden. Sie zeichnet sich durch exakte und reproduzierbare Ergebnisse, die leichte Erkennung der markierten Zellen für das menschliche Auge und somit durch eine schnelle Auswertung aus. Sie eignet sich auch dann, wenn nur eine geringe Anzahl von antigenträgenden Zellen vorhanden ist (14, 38, 42).

2.2. Die ABC-Methode

Die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) ist eine etablierte immunhistochemische, indirekte Methode zum Nachweis von zellulären Antigenen, die sich die hohe Affinität von Avidin zu Biotin zunutze macht (7).

Das gentechnisch hergestellte und reinere Korrelat zum Avidin, ein Glycoprotein mit vier Bindungsstellen für Biotin, stellt das Streptavidin dar. Für die ABC-Methode verwendet man nach dem Primärantikörper, der spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet ist, einen Sekundär- oder sogenannten Brückenantikörper, der mit Biotin markiert ist. Er ist meist gegen den Fc-Terminus des Primärantikörpers gerichtet. An die Biotinkomponente des Sekundärantikörpers bindet nun der ABC-Komplex (enzymmarkierter Streptavidin-Biotin-Complex). Dieser Komplex kann an drei von vier Bindungsstellen Biotin binden und ist entweder mit dem Enzym Peroxydase oder wie in unserem Fall mit alkalischer Phosphatase markiert. Das Enzym setzt ein Chromogen um, wodurch das Antigen sichtbar gemacht wird.

Diese immunhistologische Methode ist aufgrund der hohen Affinität des Streptavidins zum Biotin sensitiver als die meisten anderen indirekten Methoden (4 - 8-fach stärker als bei der PAP- und APAAP-Methode) (7, 42, 59).

2.2.1. Primärantikörper

Es wurden polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen bzw. im Falle von Pax-5 aus der Ziege verwendet. Diese richteten sich gegen Pax-5, Oct-1, Oct-2 und Bob-1.

Um die Hintergrundfärbung durch unspezifische Bindungsreaktionen mit dem Gewebe möglichst gering zu halten, wurde der Tris-Puffer im Verhältnis 1:5 mit dem Serum des Tieres verdünnt, aus welchem der Sekundärantikörper stammt (hier z. B. Mausserum). Der Primärantikörper wurde so weit mit dem Tris-Mausserum-Gemisch verdünnt, bis ein Optimum zwischen Farbintensität und möglichst geringer Hintergrundfärbung erreicht war. Im Falle von Bob-1 und Pax-5 wurde dieses durch eine Verdünnung von 1:100, bei Oct-1 1:40 und bei Oct-2 1:150 erreicht.

2.2.2. Sekundärantikörper

Es wurde ein biotinkoppelter, gegen Kaninchen- bzw. Ziegenantikörper gerichteter Antikörper aus der Maus verwendet. Die mouse-anti-rabbit-Immunglobuline wurden im

Verhältnis 1:300, die mouse-anti-goat-Immunglobuline im Verhältnis 1:500 mit Tris-Puffer verdünnt. Diesem Tris-Puffer wurde zuvor Humanserum in einem Verhältnis 1:10 hinzugegeben, um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an das Gewebe zu verhindern.

2.2.3. Tertiärreagenz

Das dritte Reagenz, ein mit **alkalischer Phosphatase** markierter **Streptavidin-Biotin-Komplex** (AB / AP-Complex), bindet an das Biotin des zweiten Antikörpers. Das dritte Reagenz setzt sich aus je 9 µl der Komponente A (Streptavidin) und 9 µl der Komponente B (biotingebundene Alkalische Phosphatase) pro 1000 µl Tris-Puffer zusammen, das zur Komplexbildung 30' ruhte.

2.3. Verwendete Antikörper

Die B-Zellentwicklung ist eine in mehreren Schritten ablaufende Differenzierung, die von hämatopoetischen Vorläuferzellen über reife B-Zellen bis hin zu antikörperproduzierenden Plasmazellen bzw. Gedächtniszellen reicht. Sie wird bestimmt von der Expression bestimmter proteincodierender Gene. Wichtige Faktoren für die B-Zellendifferenzierung stellen dabei die Transkriptionsfaktoren dar.

2.3.1. PAX-5 (Synonyme: NF-HB, S-αBP, NFS-µ-B1, LR1, EBB-1)

Pax-5 gehört der paired-box (Pax) – Genfamilie der Transkriptionsfaktoren an. Es codiert für ein B-Zell-spezifisches Aktivator-Protein, **BSAP**. BSAP ist ein Transkriptionsfaktor, der innerhalb des hämatopoetischen Systems nur in Entwicklungsstufen der B-Zellreihe vorkommt. Mit der Pax-5-Gen-Transkription wird in den Pro-B-Zellen begonnen (60). Sie lässt sich in allen weiteren B-Zellstufen, außer in reifen Plasmazellen, nachweisen (55). Außer in B-Zellen kommt Pax-5 während der embryonalen Entwicklung im Mesencephalon, im Rückenmark sowie im erwachsenen Hoden vor (62, 99). Es existieren von Pax-5 Isoformen, die in unterschiedlichen Entwicklungsstufen der B-Zellen vorkommen (100).

Pax-5 beeinflusst verschiedene B-Zellfunktionen w. z. B. die Expression von B-

Zellantigenen (22), die Expression von Immunglobulinen und den Ig-Klassenswitch. Es spielt eine vermittelnde Rolle bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen der B-Zellenvermehrung und der Ig-Ausschüttung und kontrolliert damit auch die B-Zellenentwicklung. Die einzelnen Funktionen von Pax-5 werden teilweise noch erforscht.

Pax-5 verstärkt die Expression von B-Zellantigenen. Es scheint ein Schlüsselprotein bei der Transkriptionsregulation des B-zellspezifischen Gens CD19 zu sein (55).

Pax-5-Bindungsregionen findet man in der Nähe und innerhalb von Ig-switch-Regionen. Pax-5 bindet an den 3'Enhancer der Ig-kappa-Leichtketten und spielt eine regulierende Rolle beim Ig-Klassenswitch. Unter anderem übt Pax-5 eine wichtige Repressorfunktion für die Ig-Schwerkettenexpression aus, indem es die Aktivität des 3'alpha-Schwerkettenenhancers supprimiert (49). Als Voraussetzung für eine hohe Ig-Produktion, wie sie z. B. in Plasmazellen stattfindet, müsste also ein niedriger Pax-5-Spiegel vorliegen. Genau dieses Phänomen spiegelt sich immunhistochemisch durch die geringe bis sogar fehlende Anfärbbarkeit der Plasmazellen und des Plasmozytoms wieder.

Pax-5 scheint ein wesentlicher Faktor für die Entwicklung der Vorläuferzellen in Richtung „B-lineage“ zu sein. Alternative Wege, d. h. Nicht-B-Zell-Entwicklungslinien (wie z. B. die myeloische Zelllinie, die T-Zellenlinie), werden von Pax-5 gehemmt (18, 60, 61, 63). Eine gezielte Hemmung des Pax-5-Gens führte in Mäusen zu einer Arretierung der B-Zellentwicklung im Stadium der Pro-B-Zellen. Pax-5 wird nicht nur zum Durchlaufen, sondern auch zur Aufrechterhaltung der B-Zell-Differenzierung benötigt. B-Zellen, die durch Mutationen kein Pax-5 mehr produzieren können, entdifferenzieren wieder bis hin zum Stadium pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen (8, 60, 61).

Vor kurzem wurde die regulierende Funktion von Pax-5 auch bei der Proliferation reifer B-Zellen gezeigt.

Durch künstlich gehemmte Pax-5-Expression und dementsprechend niedrige Pax-5-Spiegel fand in Milz-B-Zellkulturen nach Antigenkontakt nur eine stark verminderte proliferative Antwort statt. Umgekehrt war die B-Zellproliferation bei hohen Pax-5-Spiegeln verstärkt. Durch die wichtige Rolle von Pax-5 bei der B-Zellproliferation vermutet man, dass bei einer Dysregulation dieses Proteins neoplastische Transformationen entstehen können.

In diesem Zusammenhang werden zurzeit das diffuse großzellige B-Zellenlymphom, der M. Waldenström und das Marginalzonenlymphom untersucht. Bei letzteren beiden beobachtet man regelmäßig Translokationen, die zu einer erhöhten Pax-5-Expression führen können (32, 55). Die Bedeutung dieser genetischen Läsionen mit den daraus resultierenden erhöhten Pax-5-Spiegeln bei der Tumorentstehung wird diskutiert.

Der Nachweis von Pax-5 in B-Zellneoplasien könnte wichtige Hinweise in Bezug auf die Tumorentstehung liefern und somit zu optimierten Behandlungsstrategien führen (32).

2.3.2. Oct-1 (Synonyme: Octamer Binding Protein-1, NF3, OTF-1, OBP100)

Oct-1 ist ein ubiquitärer POU (Pit-Oct-Unc) - Domänen-Transkriptionsfaktor, der verschiedene Aufgaben bei der B-Zellreifung und –Differenzierung übernimmt (4, 65).

Oct-1 kann als aktivierender oder hemmender Regulator auf die Gen-Transkription und DNA-Replikation wirken (26). Durch Aktivierung des Ig-Promotors (Vkappa und VH) in Verbindung mit dem Co-Aktivator Bob-1 kann Oct-1 die Ig-Synthese in B-Zellen induzieren (54, 83).

Es sind gewebespezifische Isoformen von Oct-1 bekannt (47, 66), die bei unseren immunhistochemischen Untersuchungen nicht unterschieden wurden.

2.3.3. Oct-2 (Synonyme: Octamer Binding Protein-2)

Oct-2 ist ein B-zellspezifischer Transkriptionsfaktor der POU-Familie, der regulierend bei der Expression von B-Zellgenen wirkt. Außer in B-Zellen kommt Oct-2 nur noch in Makrophagen vor (17). Je nach Zelllinie und Enhancer kann Oct-2 transkriptions-repressorisch und / oder –aktivierend bei der B-Zellentwicklung und –differenzierung wirken (23).

Durch Interaktion mit dem 3'IgH-Enhancer übt Oct-2 eine wichtige Funktion bei der terminalen B-Zellreifung und der humoralen Immunantwort aus (54). Die frühe B-Zellreifung im Knochenmark ist Oct-2 unabhängig (31).

Durch die Aktivierung des Ig-Promotors (Vkappa und VH) in Verbindung mit dem Co-Aktivator Bob-1 reguliert Oct-2 die Ig-Synthese und -Sekretion in B-Zellen. So wurden bei Oct-2-negativen Mäusen selektive Ig-Isotyp-Expressionsdefekte beobachtet (83). Keimzentren wurden nicht ausgebildet (81). Die Anzahl reifer B-Zellen war stark reduziert (94). Es gab Unterschiede zwischen B1- und B2-Lymphozyten. B1-Zellen sind von peritonealen B-Zellen abgeleitete, CD5-positive und CD23-negative Zellen. Sie sind fähig,

multivalente, unspezifische Polysaccharide von Bakterien zu erkennen, ohne dass sie zuvor von antigenpräsentierenden Zellen vorbereitet wurden. Von ihnen leiten sich die Mantelzellenlymphome ab. Während peritoneale B1-Lymphozyten gar nicht entdeckt werden konnten, wurde die Reifung und die Funktion von B2-Lymphozyten lediglich gemindert (31).

Außer in B-Zellen kommt Oct-2 nur noch in neuronalen Zellen vor (44, 72).

2.3.4. Gemeinsame Eigenschaften von Oct-1 und Oct-2

Die Oct-1- und Oct-2-Gene enthalten am N- und C-terminalen Ende jeweils eine Transkriptionsaktivatorregion und in ihrem Zentrum eine DNA-Bindungsdomäne, die sogenannte POU-Domäne. Diese Region ist homolog zu den Proteinen Pit-1, Oct-2 und Unc-86 (POU) (44, 93).

Beide binden an Octamer-Elemente, die in diversen Regulatorsequenzen gefunden werden, w. z. B. dem Ig-Promotor und Ig-Enhancer. Sie regulieren deren Aktivität und spielen so eine wichtige Rolle bei der Transkription von Ig-Genen. Dazu interagieren sie mit Bob-1 durch ihre DNA-bindende POU-Domäne (4, 25, 77).

2.3.5. Bob-1 (Synonyme: B-cell Oct-binding protein-1, OCA-B, OBF-1)

Dieses Polypeptid ist ein B-zellspezifischer Transkriptions-Co-Aktivator von Oct-1 und Oct-2 (45, 79). Er bindet nicht direkt an die DNA, sondern interagiert mit Oct-1 und Oct-2, um seine verschiedenen Funktionen zu erfüllen (25, 34). Er spielt eine entscheidende Rolle im antigenabhängigen Stadium der B-Zellentwicklung sowie bei der humoralen Immunantwort und wird benötigt für die Integration von Signalen (w. z. B. Antigenrezeptoren) bei der Keimzellreifung (70, 81). Auf die frühe antigenunabhängige B-Zellreifung im Keimzentrum nimmt er keinen entscheidenden Einfluss (78), obwohl er in Zelllinienstudien in allen Phasen der B-Zellentwicklung nachgewiesen werden konnte (70, 79).

Außerdem aktiviert und verstärkt Bob-1 die Oct-1 und Oct-2 vermittelte Transkription von Ig-Genen und ist verantwortlich für die Produktion verschiedener Ig-Isotypen (81, 92).

Bei fehlender Bob-1-Expression wird die humorale Immunantwort stark beeinträchtigt. Die proliferative Antwort, d. h. die Anzahl der B-Zellen, ist stark reduziert, die Apoptose gesteigert und die Migration in die B-Zellkompartimente sowie in die Peripherie gehemmt.

Es kommt zu keiner Ausbildung von Keimzentren (29), und die Produktion sekundärer Ig-Isotypen (IgA, IgG) bleibt aus (11, 34, 80). B-Zellen reifen nur bis zu dem Stadium aus, in dem sie das Oberflächen-Immunglobulin IgM ausgebildet haben, und auch das IgM-Crosslinking ist vermindert (58, 81).

Die frühe antigenunabhängige B-Zellentwicklung im Knochenmark wird nicht von Bob-1 beeinflusst, ebenso wenig wie die Plasmazellreifung und die Entwicklung von Primärfollikeln (58).

Versuche mit Bob-1-negativen Mäusen zeigten, dass Bob-1 eine wesentliche Rolle bei der Expression des Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) - Rezeptors spielt. In der Literatur finden sich Widersprüche über den Einfluss von Bob-1 auf die Entwicklung der Marginalzone. Samardzik (76) konnte keine Marginalzonen-B-Zellen in Bob-1-negativen Mäusen nachweisen. Qin konnte keine Beeinträchtigung der Marginalzonen-B-Zellenentwicklung bei fehlender Bob-1-Expression feststellen (70).

2.4. Färbeprotokoll

Da Oct-1, Oct-2, Bob-1 und Pax-5 bisher nicht in der Immunhistochemie etabliert waren, musste das optimale immunhistochemische Färbeverfahren innerhalb der ABC-Methode erst ermittelt werden. Wir variierten die Gewebepreparation (Dampftopf mit Zitronensäure, Mikrowelle mit Zitronensäure, EDTA oder Harnstoff, Proteinase-K auf Heizplatte), die Inkubationszeiten der Antikörperreaktionen (von fünf bis zwanzig Minuten) und die Verdünnungen der Primärantikörper (von 1:25 bis 1:300). Als optimale Variante für die untersuchten Antikörper stellte sich ein Vorgehen wie in Tabelle Nr. 2 beschrieben heraus:

Tabelle 2: Färbeprotokoll

Antikörper	Gewebe	Vorbehandlung	1. Antikörper : (Mausserum / Tris-Puffer, 1:5)	2. Antikörper : (HS / Tris-Puffer, 1:10)
Bob-1	siehe Kapitel 2.1.	15´ Dampftopf	1:100	1:300 R
Oct-1	siehe Kapitel 2.1.	30´ MwCs	1:40	1:300 R
Oct-2	siehe Kapitel 2.1.	15´ MwCs	1:150	1:300 R
Pax-5	siehe Kapitel 2.1.	10´ Dampftopf	1:100	1:500 G

Legende zu Tabelle Nr. 2:

MwCs: Mikrowellenvorbehandlung in einer mit Zitronensäure (0,01molar; pH=6,0) gefüllten Küvette

HS: Humanserum

R: biotinylierte mouse-anti-rabbit-Immunglobuline

G: biotinylierte mouse-anti-goat-Immunglobuline

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Mit einem Schlittenmikrotom wurden aus formalinfixiertem, paraffingebettetem Gewebe 4-5 µm dünne Schnitte hergestellt, im Wasserbad bei 37°C entspannt, auf beschichtete Objektträger aufgezogen und bei 37°C für jeweils 12 Stunden im Brutschrank getrocknet (13).

Die Gewebeschnitte wurden mittels Xylol (3x10´) entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (Isopropylalkohol 2x 100%, Ethanol 96%, Ethanol 70%, jeweils 2´) und Aqua destillata (2x5´) rehydriert.

Zur Demaskierung der Antigene (13, 37) wurden die Schnitte mit Zitronensäure (pH=6,0; 0,01 molar) vorbehandelt. Diese Vorbehandlung erfolgte bei Oct-1 und Oct-2 in einem Mikrowellenofen (2´ bei 850 Watt, danach Oct-1 30´, Oct-2 15´ bei 150 Watt). BOB-1 wurde 15´, Pax-5 10´ in einem Dampftopf mit oben genannter Zitronensäure vorbehandelt. Die Vorbehandlung wurde durch 2x Spülen mit Tris-Puffer gestoppt.

Die Schnitte wurden nacheinander je 30´ mit den verdünnten polyklonalen Primärantikörpern (Oct-1 1:40, Oct-2 1:150, BOB-1 1:100, Pax-5 1:100), den

Sekundärantikörpern und dem Tertiärreagenz in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Bindungsreaktionen wurden jeweils durch zweimaliges Spülen mit Tris-Puffer beendet.

Das Enzym alkalische Phosphatase des AB-Komplexes setzt am Ort des gesuchten Antigens ein Chromogen um, wodurch das Antigen lokalisierbar wird. Dazu wurden die Gewebeschnitte 30´ mit der filtrierten Chromogenlösung auf dem Rüttler inkubiert, danach 5´ in kaltem, fließendem Wasser gespült, 5´ in Hämalaun nach Mayer gegengefärbt und dann 10´ in fließendem, lauwarmem Wasser gebläut.

Das Eindeckeln erfolgte mit Aquatex-Kleber.

2.5. Kontrollen

Um die Zuverlässigkeit der ABC-Färbetechnik und die Spezifität der Antikörper zu prüfen, benutzten wir bei jedem Färbevorgang Negativ- und Positivkontrollen.

Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse ließen wir bei Lymphknotenpräparaten je den Primär- und / oder den Sekundärantikörper weg.

Für die Positivkontrollen wurden Lymphknotenpräparate mit schon etablierten Primärantikörpern aus dem Kaninchen (NCL-IgMp, rabbit polyclonal anti human, Dako, batch: 404301) in der Konzentration 1:200 nach 15 Minuten Vorbehandlung in der Mikrowelle (Zitratpuffer) und mit Sekundärantikörpern aus der Maus (mouse anti rabbit, Jackson-Immunoresearch-Laboratories, Code-Nr. 211-065-109) in der Konzentration 1:300 gefärbt. Ebenso wurden ein etablierter Primärantikörper aus der Ziege (Anti-MNDA (C-19), sc-6051, Santa Cruz) sowie ein Sekundärantikörper (mouse anti goat, Jackson-Immunoresearch-Laboratories, Code-Nr. 205-065-108), der gegen diesen Ziegen-Antikörper gerichtet ist, verwendet.

3. Ergebnisse

Zum Auswerten der immunhistochemischen Färbungen bewerteten wir die Stärke der Expression der Tumorzellen, jeweils bezogen auf die umgebenden nicht neoplastischen Zellen bzw. Gesamtpopulation.

Alle Ergebnisse sind in den Tabellen Nr. 3 und 4 (siehe Anhang) zusammenfassend dargestellt.

3.1. Lymphadenitis

Wir untersuchten Lymphknoten mit progressiv transformierten Keimzentren, die Piringer-Lymphadenitis, die EBV-Lymphadenitis und den M. Castleman mit seinen drei verschiedenen Subtypen hyalin-vaskulär, plasmazellreich und Mischtyp, der aber auch sehr plasmazellreich war. Bei allen Lymphadenitisformen konnte man ein Keimzentrum, die Follikelmantelzone und die Interfollikulärzone durch unterschiedlich starke Expression der untersuchten Antikörper abgrenzen. Die Transkriptionsfaktoren wurden in Zellen der B-Zelllinie und in den B-Zellkompartimenten nachgewiesen.

Oct-1 und Oct-2 wurden stark in den Keimzentren, gering in der Mantelzone und mittelstark im Interfollikulärbereich exprimiert.

Bob-1 dagegen zeigte nicht nur in den Keimzentren sondern auch interfollikulär eine sehr starke Expression, während die Expression der Mantelzone bei Bob-1 im mittleren Bereich lag und damit etwas stärker ausfiel als für Oct-1 und Oct-2.

Pax-5 hingegen zeigte die stärkste Expression in der Follikelmantelzone, etwas geringer wurde Pax-5 im Keimzentrum exprimiert. Im Gegensatz zu Bob-1 wurde die Interfollikulärzone am schwächsten gefärbt.

3.1.1. Progressiv transformierte Keimzentren n=3

Mit Oct-2 ließen sich die Keimzentren trotz nur mittelstark positiven oder z. T. negativen Zentrozyten, dafür aber mäßig stark bis stark positiven Blasten, am stärksten anfärben. Daran schloss sich ein gemischter Follikelmantel an, deren Zellen mittelstark, wenig oder überhaupt kein Oct-2 exprimierten. In der Interfollikulärzone konnten alle färberischen

Qualitäten nebeneinander beobachtet werden, von negativen bis hin zu sehr stark Oct-2 exprimierenden Zellen. Plasma- und Epithelioidzellen waren gering positiv.

Bob-1 zeigte mit sehr stark positiven Keimzentrumszellen und mittel- bis gering positiven Follikelmantelzellen ein sehr ähnliches Färbeverhalten wie Oct-2. Die progressiv transformierten Keimzentren exprimierten Bob-1 etwas geringer als die nicht transformierten.

Oct-1 zeigte im Keimzentrum und in der Interfollikulärzone ein sehr inhomogenes Expressionsmuster. So konnte man negative Zellen neben allen Zwischenstufen gleichzeitig neben sehr stark positiven Zellen beobachten. Der Follikelmantel war überwiegend negativ mit nur einzelnen schwach positiven Zellen.

Im Gegensatz zu den anderen drei Transkriptionsfaktoren wurde Pax-5 am stärksten in der Mantelzone exprimiert, nur etwas geringer im Keimzentrum und gar nicht oder nur gering in der Interfollikulärzone.

3.1.2. Piringer-Lymphadenitis n=2

Auch hier zeigten Oct-2 und Bob-1 ein sehr ähnliches Färbeverhalten, nämlich ein sehr stark angefärbtes Keimzentrum und eine wenig bis mittelstark gefärbte Mantelzone. Die Interfollikulärzone zeigte ein unruhiges Bild durch die unterschiedliche Expression von Oct-1 und Oct-2. So konnte man negative Zellen neben stark positiven Zellen innerhalb eines Präparates beobachten.

Oct-1 wurde in den Keimzentren ausschließlich von den Blasten sehr stark exprimiert, von den Zentrozyten nur mäßig oder gar nicht. Ein ähnliches Verhalten zeigten die Epithelioidzellen. Sie exprimierten Oct-1 ebenfalls nur mäßig oder gar nicht. Nur einige wenige waren stärker positiv.

Auch bei der Piringer-Lymphadenitis zeigte Pax-5 ein genau umgekehrtes Färbeverhalten zu Bob-1. Nicht das Keimzentrum sondern der Follikelmantel zeigte die stärkste Expression, das Keimzentrum färbte sich etwas geringer.

3.1.3. EBV-Lymphadenitis n=2

Oct-2 wurde im Keimzentrum mittel- bis sehr stark exprimiert, in der Interfollikulärzone nur mittel bis wenig. Auch hier zeigten die Zellen der Interfollikulärzone keine gleichstarke Positivität. So gab es negative, wenig und auch mäßig positive Zellen nebeneinander.

Die Zellen im Keimzentrum exprimierten Oct-1 am stärksten, die Zellen der Interfollikulärzone gar nicht, mit Ausnahme einzelner mittel- bis stark positiver Zellen. Beide Transkriptionsfaktoren wurden in monozytoiden B-Zellen nukleär nicht oder nur gering nachgewiesen. In einem Fall wurde Oct-2 zytoplasmatisch gering exprimiert.

Bob-1 wurde im Keimzentrum und in der Interfollikulärzone ebenfalls sehr stark exprimiert, im Follikelmantel hingegen nur mäßig bis gering.

Pax-5 wurde in der Follikelmantelzone am stärksten exprimiert, im Keimzentrum etwas geringer und am wenigsten stark in der Interfollikulärzone. Dort fand man gering bis mäßig stark positive und auch negative Zellen. Plasmazellen exprimierten vereinzelt Pax-5, wohingegen in plasmazytoiden Monozyten keine Expression von Pax-5 gefunden werden konnte.

3.1.4. M. Castleman n=5

3.1.4.1. Mischtyp n=1

Oct-2 wurde in den Blasten des Keimzentrums mittelstark, in den Lymphozyten hingegen nur wenig exprimiert. Stark bis sehr stark wurde es in der Mantelzone exprimiert. Wie in den anderen Untergruppen des M. Castleman zeigten sich die Zellen der Interfollikulärzone wieder einmal uneinheitlich. In diesen wurde Oct-2 gar nicht, wenig oder mäßig exprimiert.

Oct-1 zeigte eine nicht so deutliche Unterscheidung zwischen Blasten und Lymphozyten. Im Keimzentrum wurde Oct-1 stark oder sehr stark exprimiert, in der Mantelzone aber nur gering oder gar nicht.

Bob-1 wurde wie schon bei der EBV-Lymphadenitis sehr stark im Keimzentrum und in der Interfollikulärzone, aber nur wenig oder mäßig im Follikelmantel exprimiert.

Bei Pax-5 wurde die Interfollikulärzone mit sehr starker Positivität am stärksten angefärbt, das Keimzentrum etwas geringer.

Die Plasmazellen färbten sich bei Oct-2 nicht oder nur wenig, bei Oct-1 entweder nicht oder mittelstark an. Während sich für Bob-1 eine meist sehr starke Positivität zeigte, wurde Pax-5 in den Plasmazellen überhaupt nicht exprimiert.

3.1.4.2. hyaliner-vaskulärer Typ n=3

In den typischerweise regressiv veränderten Keimzentren konnte kein Oct-2 nachgewiesen werden. Dort, wo die Keimzentren noch erhalten waren, wurde Oct-2 allerdings sehr stark

exprimiert. Nur mittelstark färbten sich die Zellen des Follikelmantels. In einem Fall zeigten sich negative, wenig und auch mäßig gefärbte Zellen nebeneinander. Stark oder sehr stark wurden Oct-1 und Bob-1 in der Interfollikulärzone exprimiert. Während die Mantelzone für Oct-1 negativ oder höchstens schwach positiv war, zeigten die Zellen bei Bob-1 eine geringe bis mittlere Positivität. Wie schon bei den anderen Lymphadenitisformen beschrieben, zeigte sich eine sehr hohe Expression von Pax-5 in der Mantelzone und eine etwas geringere in den Keimzentren.

In plasmazytoiden Monozyten konnten weder Oct-2 noch Pax-5 nachgewiesen werden. In den Granulozyten wurde Oct-2 schwach exprimiert, und in den Endothelzellen wurden weder Oct-2 noch Oct-1 exprimiert. Bei den antigenpräsentierenden folliculären dendritischen Zellen fiel auf, dass sie negativ für Oct-1, aber stark positiv für Bob-1 waren. Außerdem wurde Bob-1 sehr stark in der Marginalzone exprimiert.

3.1.4.3. plasmazellreicher Typ n=1

Das Färbemuster des plasmazellreichen Subtyps für Bob-1, Oct-1, Oct-2 und Pax-5 ähnelte sehr stark denen der anderen Subtypen. Hervorzuheben ist, dass einzelne Zellen des Follikelmantels Oct-2 sehr stark exprimierten, während es sich in den Plasmazellen nur zytoplasmatisch nachweisen ließ. Bob-1 konnte nukleär in den Plasmazellen sogar stark bis sehr stark nachgewiesen werden, Oct-1 nicht oder mittelstark. In der Marginalzone wurde Bob-1 wie schon bei dem hyalinen-vaskulären Typ sehr stark exprimiert.

3.2. Non-Hodgkin-Lymphome

3.2.1. Chronische lymphatische B-Zellen-Leukämie (B-CLL) n=10

In allen Fällen wurden bei der B-CLL Bob-1, Oct-1 und Oct-2 in den Blasten stärker exprimiert als in den Lymphozyten. Bob-1 wurde am stärksten exprimiert, was durch die sehr starke Anfärbung der Blasten und die mittlere Anfärbung der Lymphozyten demonstriert wurde. Oct-1 und Oct-2 wurden hingegen nur mäßig exprimiert. Die sogenannte Variante der B-CLL zeigte in der Mehrheit der Fälle keine Expression oder nur in einzelnen Zellen von Oct-1.

Pax-5 verhielt sich mit einer stärkeren Anfärbung der Lymphozyten im Vergleich zu den Blasten genau umgekehrt zu den vorherigen Antikörpern. In allen Fällen ließ sich eine

hohe bis sehr hohe Positivität der Lymphozyten und nur eine geringe oder mittlere Positivität der Blasten nachweisen.

3.2.2. M. Waldenström (lymphoplasmazytisches Lymphom) n=5

Auch hier konnte eine regelmäßig höhere Expression von Oct-2 und Bob-1 in den Blasten als in den Lymphozyten beobachtet werden. Für Oct-1 zeigten sich die Lymphozyten und Blasten des M. Waldenström negativ. Pax-5 ließ keine sichere Unterscheidung zwischen Lymphozyten und Blasten zu. Außer in einem Fall wurde Pax-5 immer sehr stark auf den Tumorzellen exprimiert.

In einigen Fällen ließen sich Oct-1 und Bob-1 auch zytoplasmatisch in unterschiedlicher Intensität auf den Tumorzellen nachweisen.

3.2.3. Marginalzonenlymphom n=11

3.2.3.1. Primär splenisches Marginalzonenlymphom n=6

Generell zeigten sich keine großen Expressionsunterschiede der neoplastischen B-Zellen zwischen den Lymphknoten- und den Milzpräparaten, allenfalls für Oct-2 und Pax-5, die in den Lymphknotenpräparaten stärker als in den Milzpräparaten exprimiert wurden. Oct-2 wurde in der Mehrzahl der Fälle mäßig stark exprimiert. Für Bob-1, Oct-1 und Oct-2 zeigte sich, dass sich die Blasten meist stärker als die Lymphozyten oder allenfalls gleich stark anfärben ließen. Die Lymphozyten waren meist nur schwach angefärbt. Für Pax-5 konnte man dieses Phänomen genau umgekehrt beobachten. Die Blasten färbten sich mit einer nur geringen oder mäßigen Positivität weniger intensiv als die stark bis sehr stark angefärbten Lymphozyten.

3.2.3.2. Nodales Marginalzonenlymphom (monozytoides B-Zellenlymphom) n=5

Bei den monozytoiden B-Zellenlymphomen zeigten sich für Bob-1, Oct-1 und Oct-2 das typische Muster: die Blasten waren regelmäßig stärker positiv als die Lymphozyten. Oct-1 ließ sich mit einer nur geringen bis mittleren Positivität der Blasten und der fehlenden oder geringen Positivität der Lymphozyten am schwächsten nachweisen, Bob-1 mit einer sehr starken Färbung der Blasten am meisten. Pax-5 wurde unterschiedlich stark exprimiert, von schwach bis sehr stark positiv.

3.2.4. Plasmozytom n=5

Nukleär konnte lediglich Bob-1 in den Tumorzellen nachgewiesen werden, und dieses dann auch sehr stark. Die anderen Antikörper waren nicht nukleär nachzuweisen. Oct-1 zeigte aber eine sehr starke zytoplasmatische Positivität der Tumorzellen.

3.2.5. Follikuläre Lymphome n=17

3.2.5.1. Follikuläres zentroblastisches Lymphom (cb) n=1

Da wir nur einen einzigen Fall untersucht haben, kann dieses Ergebnis nur mit Vorbehalt interpretiert werden. Bei dem cb fanden wir eine sehr starke Positivität für Oct-2, Bob-1 und Pax-5, jedoch nur eine geringe Anfärbbarkeit einzelner Zellen für Oct-1 vor. Somit weist das cb ein ähnliches Expressionsmuster wie das follikulärer Lymphome, ehemals cbcc, auf. Zusätzlich ließ sich eine schwache zytoplasmatische Positivität für Oct-1 nachweisen.

3.2.5.2. Follikuläres Lymphom (cbcc) Grad 1, 2, 3 n=6, 5, 5

Die Antikörper zeigten untereinander nur geringe Unterschiede in ihrem Färbeverhalten. Die Follikelzone exprimierte Oct-2 sehr stark im Gegensatz zur schwachen Ausprägung von Oct-2 in der Mantelzone. Die Mantelzone war nicht oder nur schwach positiv für Oct-1. Eine sehr starke Expression von Pax-5 beobachtete man bei nicht neoplastischen B-Lymphozyten der Interfollikulärzone und der Mantelzone.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Graden des cbcc ließ sich nicht ausmachen.

In den Blasten wurden Oct-2 und Bob-1 fast in allen untersuchten Fällen sehr stark exprimiert und damit stärker, als in den mittelstark bzw. gering angefärbten Zentrozyten. Mittels Oct-1 konnte nur schwer zwischen Blasten und Lymphozyten unterschieden werden. Obwohl die Ergebnisse nicht durchgehend reproduzierbar waren, zeigte sich tendenziell auch hier eine stärkere Expression in den Blasten. Im Gegensatz dazu färbten sich mit Pax-5 Blasten schwächer als die mittelstark bis stark gefärbten Zentrozyten.

3.2.6. Mantelzellenlymphom n=4

Alle Fälle des Mantelzellenlymphoms waren stark bis sehr stark positiv für Oct-2, Bob-1 und Pax-5. Bei Oct-1 beobachtete man eine etwas weniger intensive Färbung als für die anderen Antikörper, die hier nur im geringen bis mittelstarken Bereich lag. In einem Fall

wurde Oct-1 nur schwach exprimiert.

3.2.7. Diffuses großzelliges B-Zellenlymphom n=9

Bob-1 wurde immer, Oct-2 überwiegend sehr stark exprimiert. In zwei Fällen, die als B-zellreiche bzw. T-zellreiche Varianten beschrieben werden, konnte Oct-2 überwiegend nur schwach oder nur in einzelnen Zellen nachgewiesen werden. Oct-1 zeigte ein eher gemischtes Bild, das von gar keiner bis hin zu einer mittelstarken Expression reichte. In den meisten Fällen ließ sich Oct-1 nur in einzelnen Zellen gering bis mittelstark nachweisen. Pax-5 hingegen wurde in den meisten Fällen stark bis sehr stark exprimiert. In den beiden zuvor beschriebenen B- bzw. T-zellreichen Varianten konnte Pax-5 allerdings nur in einzelnen Zellen in unterschiedlicher Intensität, nämlich gering bis mittelstark, nachgewiesen werden.

3.2.7.1. Plasmoblastische Variante des diffusen großzelligen B-Zellenlymphoms n=5

Alle untersuchten plasmoblastischen Lymphome waren positiv für Bob-1, Oct-1, Oct-2 und Pax-5. Es gab lediglich eine einzige Ausnahme für Oct-1. Bob-1 wurde mit einer durchgehend sehr starken Positivität am stärksten exprimiert, Oct-2 und Pax-5 eher im mittleren bis starken, Oct-1 im geringen bis mittleren Bereich. Damit ähnelte das Verteilungsmuster der nachgewiesenen Antigene in den plasmoblastischen Lymphomen sehr stark dem der anderen diffusen großzelligen B-Zellenlymphome.

3.2.8. Mediastinales B-Zellenlymphom n=5

Das mediastinale B-Zellenlymphom wies eine durchgehend sehr starke Expression von Bob-1 und Pax-5 auf. Oct-2 wurde mittelstark bis stark exprimiert und damit etwas stärker als Oct-1.

3.2.9. Burkittlymphom n=5

Hier konnte eine durchgehend sehr starke Expression von Oct-2, Bob-1 und Pax-5 beobachtet werden. Oct-1 hingegen zeigte ein inhomogenes Muster, das von nur einzelnen einfach positiven Zellen bis hin zu gering oder mittelstark gefärbten Tumorzellen reichte.

3.2.10. ALCL n=5

In keinem dieser der T- oder 0-Zellreihe abstammenden Lymphome konnte eine Expression von Oct-2, Bob-1, Oct-1 oder Pax-5 nachgewiesen werden.

3.3. M. Hodgkin

3.3.1. Lymphozytenprädominantes Hodgkinlymphom (Paragranulom) n=5

Oct-2 wurde durchgehend sehr stark in den Tumorzellen exprimiert. Die anderen Antikörper waren uneinheitlich. So schwankte die Farbintensität für Bob-1 zwischen gering und sehr stark. Auch innerhalb eines Falles waren Unterschiede zu bemerken. So wurde in einem Fall das gleichzeitige Vorkommen negativer neben gering bis sogar stark positiver Zellen beobachtet. Ähnliches galt für Oct-1, bei dem man innerhalb eines Falles negative neben schwach positiven Zellen sehen konnte. Es gab aber auch Fälle mit durchgehend geringer bis mittelstarker Expression. Für Pax-5 gab es in der Mehrzahl der Fälle ebenfalls große Schwankungen innerhalb eines Falles, die von schwacher bis zu starker Expression reichten. Die negativen Tumorzellen waren jedoch in der Minderheit.

3.3.2. cHD, Mischtyp n=5, noduläre Sklerose n=5

Generell lässt sich kaum ein Unterschied der Expressionsmuster zwischen Fällen des M. Hodgkin vom Mischtyp und denen der nodulären Sklerose machen.

Die meisten Fälle exprimierten kein Oct-2, und wenn, dann nur mäßig stark oder schwach in einzelnen Zellen. Es konnten nur in zwei von zehn Fällen durchgehend deutlich positive Zellen nachgewiesen werden. Fälle der nodulären Sklerose exprimierten Bob-1 durchgehend stark bis sogar sehr stark, während bei dem Mischtyp bei drei von fünf Fällen zum Teil auch negative Zellen beobachtet wurden. Ungefähr die Hälfte der Fälle exprimierte überhaupt kein Oct-1, die andere Hälfte zeigte gering bis mittelstark positiv gefärbte Tumorzellen. In einem Fall konnte Oct-1 nur in einzelnen Zellen nachgewiesen werden. Pax-5 wurde überwiegend schwach, in einem Fall auch mittelstark nachgewiesen.

3.4. Grenzfall M. Hodgkin / ALCL n=5

In den Grenzfällen konnte keine Expression von Oct-2 nachgewiesen werden, und in nur einem einzigen Fall wurde Pax-5 exprimiert. Im Gegensatz dazu wurde Bob-1 meistens stark bis sehr stark exprimiert, zeigte jedoch innerhalb der einzelnen Fälle verschiedene Intensitäten. Für Oct-1 konnte man ungefähr in der Hälfte der Fälle gar keine und in der anderen Hälfte der Fälle eine schwache Expression nachweisen.

3.5. Reaktive, nicht neoplastische Zellkomponenten innerhalb der untersuchten Lymphomfälle

Die nicht neoplastischen Zellen der einzelnen Lymphknotenkompartimente zeigten ein spezifisches Färbeverhalten in Bezug auf den jeweiligen Antikörper. Meist sind sie in jedem Präparat unabhängig von der vorhandenen Lymphomart vorzufinden und werden hier zusammenfassend dargestellt.

Oct-2: Allgemein lässt sich für Oct-2 feststellen, dass sich die Keimzentren als Ort der Proliferation und Differenzierung am stärksten anfärben ließen. Nach aussen folgten dann ein sehr blasser oder z. T. negativer Mantel und eine wenig bis mäßig angefärbte Interfollikulärzone. Die Paragranulome allerdings zeigten in ihren Restkeimzentren nur eine sehr geringe Positivität. Es handelte sich dabei jedoch oft um progressiv transformierte Keimzentren. Die Interfollikulärzone konnte man bei ihnen als schwach oder mäßig stark positiv beschreiben. Die Mantelzone des follikulären Lymphoms Grad 1 wies neben stark oder nur wenig angefärbten Zellen auch gänzlich negative auf. Bei dem M. Waldenström wurde zusätzlich eine schwache Positivität von Granulozyten und Vorstufen der Granulopoese festgestellt.

Bob-1: Auch für Bob-1 zeigte sich das Keimzentrum als das Kompartiment mit der stärksten Färbung. Die Farbintensität war auch hier in der Mantelzone am schwächsten ausgeprägt, wobei sie bei den Mantelzonenlymphomen und den Paragranulomen mittelstark, bei den Marginalzonenlymphomen aber nur gering oder überhaupt nicht ausgeprägt war. Die Interfollikulärzone zeigte wiederum eine starke bis sehr starke Anfärbung und lag damit vom Intensitätsgrad der Färbung zwischen dem des

Keimzentrums und dem der Mantelzone. Plasmazytoide B-Zellen exprimierten regelmäßig Bob-1. Epithelioidzellen wiesen eine mittelstarke Färbung wie die plasmazytoiden B-Zellen auf, aber auch schwache bis sehr starke Positivitäten. Bei dem M. Waldenström konnte zusätzlich im Knochenmark eine schwache Positivität der Granulopoese und der Megakaryopoese bei fehlender Positivität der Erythropoese für Bob-1 beobachtet werden.

Oct-1: Die Expression von Oct-1 im Nicht-Tumorgewebe ähnelte stark der von Oct-2. So fand man auch hier in den Keimzentren als Ort der Proliferation und Differenzierung eine starke bis sehr starke Expression von Oct-1. Es folgte eine negative oder allenfalls schwach positive Mantelzone und eine wenig bis mäßig angefärbte Interfollikulärzone.

Die Marginalzone zeigte ebenfalls eine eher schwache Anfärbung. Bei den follikulären Lymphomen Grad 2 konnte in einigen wenigen Zellen sogar überhaupt kein Oct-1 nachgewiesen werden. Davon ab hob sich das Marginalzonenlymphom ab, das in seiner Marginalzone Oct-1 stark bis sehr stark exprimierte.

Bei den diffusen großzelligen B-Zellenlymphomen konnte man zwischen einer negativen inneren Marginalzone und einer zytoplasmatisch sehr stark positiven äußeren Marginalzone unterscheiden. Außerdem konnten zytoplasmatische Färbungen schwach in den Marginalzonenzellen des monozytoiden B-Zellenlymphoms und des zentroblastischen Lymphoms nachgewiesen werden sowie sehr stark in der Mantelzone des Marginalzonenlymphoms.

Die plasmazytoiden B-Zellen waren sehr kräftig bei dem M. Waldenström, aber schwach positiv bei der B-CLL gefärbt. Beim M. Waldenström zeigte sich bei ihnen auch zytoplasmatisch eine schwache Positivität für Oct-1.

In einem Fall der B-CLL zeigten die Zellen in den Sinus und Gefäßen nukleär eine mittlere Positivität und zytoplasmatisch in den Sinusinfiltraten eine mäßige Positivität für Oct-1. Zusätzlich zeigten die Ausführungsgänge der Speicheldrüsen, die Azini und zytoplasmatisch auch die Makrophagen eine geringe Reaktion bei den plasmoblastischen Lymphomen, die sich in den Tonsillen oder den großen Speicheldrüsen manifestierten.

Pax-5: Die meisten Zellen zeigten bei Pax-5 die stärkste Färbung im Bereich der Mantelzone. Die Keimzentren färbten sich etwas geringer. Bei der B-CLL konnte man in einigen Fällen auch eine starke Anfärbung von residuellen reaktiven Keimzentren beobachten.

Bei den Marginalzonenlymphomen und in der normalen Milz konnte man zusätzlich eine

nur schwach angefärbte innere und eine stark angefärbte äußere Marginalzone unterscheiden. Die Interfollikulärzone exprimierte Pax-5 etwa gleich stark wie die Keimzentren. Plasmazytoide B-Zellen waren positiv für Pax-5.

Eine sehr starke Expression von Pax-5 beobachtete man bei nicht neoplastischen B-Lymphozyten der Interfollikulärzone follikulärer Lymphome Grad 1, 2, und 3. Etwas geringer nur wurde Pax-5 in den interfollikulären monozytoiden B-Zellen des monozytoiden B-Zellenlymphoms exprimiert.

4. Diskussion der Ergebnisse

Die Verwendung spezifischer Antikörper in der Immunhistochemie stellt die Basis für die Diagnostik von Tumoren und die Feststellung von Rezidiven dar. Obwohl viele Patienten mit Lymphomen eine komplette Remission erreichen, kommt es oftmals zu Rückfällen. Werden dann oft nur kleine Gewebeproben entnommen (z. B. Stanzylinder), um an ihnen ein Rezidiv festzustellen, steht nur eine geringe Anzahl an Tumorzellen für diesen Nachweis zur Verfügung. Diese wenigen Zellen können bei histochemischen Färbeverfahren leicht einmal unerkannt bleiben. Man braucht spezifische Marker, die in der Lage sind, auch in wenig paraffingebettetem, formalinfixiertem Material Tumorzellen zu identifizieren.

Außerdem sollten Antikörper Hilfestellung bei schwierigen Diagnosen geben. Zu diesem Zwecke untersuchten wir die Expression der Transkriptionsfaktoren Oct-1, Oct-2, Bob-1 und Pax-5 in NHL, Hodgkinlymphomen und reaktivem Lymphknotengewebe.

Die wichtigsten Ergebnisse, die in den Kapiteln 4.1. – 4.10. näher beschrieben werden, sind folgende:

1) Alle der untersuchten Transkriptionsfaktoren eignen sich zur Detektion von B-Zellen und B-Zellneoplasien in der Immunhistochemie. Bisher waren die untersuchten Antigene auf DNA-Ebene mit der PCR¹, auf RNA-Ebene mit der RT-PCR und der In-Situ-Hybridisierung etabliert. Einige Antikörper können zum Nachweis dieser Antigene auch im Western Blot eingesetzt werden. Die immunhistochemische Analyse war bisher für die genannten Antigene nicht vollständig etabliert.

2) Die untersuchten TF sind bis auf Oct-1 in lymphatischem Gewebe B-Zell-spezifisch.

3) Bob-1, Oct-1, Oct-2 und Pax-5 charakterisieren unterschiedlich gut einzelne Lymphomentitäten:

3a) Oct-2 diskriminiert Paragranulome. Durch eine regelmäßige Expression in den Tumorzellen der Paragranulome und einer häufig fehlenden oder nur partiellen Expression in cHD und reaktiven Lymphadenitiden mit progressiv transformierten Keimzentren trägt Oct-2 zu deren Unterscheidung bei.

3b) Bob-1 ist der einzige Transkriptionsfaktor, der auf Plasmazellneoplasien nachgewiesen

¹ In der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden mittels DNA-Hybridisierung selektive DNA-Abschnitte amplifiziert. Sie kann dem Nachweis bestimmter Transkriptionsprodukte in Zelllinien dienen.

wird. Er kann zusammen mit Oct-2 zur Unterscheidung des NLPHD von dem cHD herangezogen werden. Es hilft auch bei der Unterscheidung zwischen Grenzfällen des M. Hodgkin / ALCL und M. Hodgkin von den ALCL. Dabei werden die ALCL vom T- und 0-Zellentyp nicht markiert.

3c) Oct-1 hilft bei der Unterscheidung des M. Waldenström versus B-CLL. In keinem der M. Waldenströmfälle konnte eine nukleäre Oct-1-Expression nachgewiesen werden, wohingegen sich alle B-CLL-Fälle positiv für Oct-1 zeigten.

3d) Mit Pax-5 wurde eine Zweiteilung der Marginalzone beobachtet. Zusätzlich diskriminiert Pax-5 Hodgkinlymphome von ALCL, da die Hodgkinlymphome fast immer Pax-5-positiv, und ALCL vom 0- und T-Zelltyp immer negativ sind.

4) Die Expressionsmuster der einzelnen Transkriptionsfaktoren variieren mit dem Stadium der B-Zelldifferenzierung.

5) Die untersuchten Antikörper nützen nicht für die Unterscheidung der einzelnen Lymphadenitisformen und stellen bei vielen der untersuchten Lymphomentitäten keine harten diskriminierenden Marker dar.

4.1. Etablierung in der Immunhistochemie

In dieser Studie untersuchten wir die Expression von Bob-1, Oct-1, Oct-2 und Pax-5 mittels der Immunhistochemie. Bisher waren diese AK nicht ausreichend in der Immunhistochemie etabliert. Die Immunhistochemie stellt aber eine relativ einfach durchzuführende Technik dar und bietet weitere Vorteile (s. u.). Bisherige Untersuchungen dieser AK in anderen Arbeiten beschränkten sich vor allem auf molekularbiologische Verfahren (wie z. B. der In-Situ-Hybridisierung, der PCR) oder dem Western Blot.

Die Ergebnisse der molekularbiologischen Techniken korrelieren zwar in einem hohen Prozentsatz mit der Immunhistochemie (15), können diese aber nicht vollständig ersetzen. Sie liefern nur begrenzt Informationen über die Verteilung im Gewebe und die subzelluläre Lokalisation von Proteinen (20). Ausserdem konnte eine geringere Protein-Expression in Zelllinien als in nativem Gewebe festgestellt werden (22, 38).

Aus diesem Grunde sollte man bei dem Vergleich immunhistochemischer Ergebnisse mit Ergebnissen anderer Verfahren sehr kritisch sein.

Nach Variation verschiedener Vorbehandlungsmethoden, Inkubationszeiten und Verdünnungen der Reagenzien optimierten wir schließlich das immunhistochemische

Färbeverfahren dahingehend, dass die verwendeten Antikörper gegen Bob-1, Oct-1, Oct-2 und Pax-5 qualitativ hochwertige Ergebnisse mit nur wenigen unspezifischen Hintergrundfärbungen lieferten. Alle untersuchten Transkriptionsfaktoren eignen sich zur Detektion von B-Zellen und B-Zellneoplasien in der Immunhistochemie.

Die Zuverlässigkeit unserer Ergebnisse wird durch die regelmäßige und erfolgreiche Verwendung dieser Antikörper in der Routinediagnostik der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, bestätigt.

4.2. B-Zellspezifität

Von den 16 untersuchten Hodgkin- und Non-Hodgkinlymphomentitäten wurden Bob-1, Oct-1, Oct-2 und Pax-5 nur in den B-Zellneoplasien, nicht aber in den ALCL vom T- oder 0-Zelltyp exprimiert. Die positiv gefärbten Zellen konnten morphologisch und topographisch eindeutig der B-Zelllinie zugeordnet werden. Weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppe belegten, dass T-Zellneoplasien negativ für die Antigene waren.

Eine Ausnahme bildete Oct-1. Eine Oct-1-Expression konnte in einem nodulären Marginalzonenlymphompräparat in den Ausführungsgängen von Speicheldrüsen nachgewiesen werden. In zwei Präparaten von Plasmazytomen war eine Oct-1-Expression in Zellen der Erythro- und Granulopoese fraglich positiv. Das als ubiquitär geltende Oct-1 wurde in unseren Untersuchungen aber nur in solchen Zellen exprimiert, die sowieso keinerlei Verwechslungsmöglichkeit mit B-Zellen zuließen (Azinuszellen von Speicheldrüsen, Zellen der Erythro- und Granulopoese). So kann Oct-1 trotzdem zur Unterscheidung von sich ähnelnden B- und T-Zellenlymphomen beitragen.

Man kann also feststellen, dass sich Oct-2, Bob-1 und Pax-5 sowie unter Vorbehalt auch Oct-1 hervorragend für den Nachweis von B-Zellen und B-Zellneoplasien eignen. Sie werden nur in Zellen der B-Zellreihe, nicht jedoch in Zellen der T-Zellreihe nachgewiesen.

4.3. Charakterisierung einzelner Lymphomentitäten

4.3.1. Oct-2: Diskriminierung von Paragranulomen, NLPHD versus cHD; Bob-1: Diskriminierung von Plasmozytomen, NLPHD und cHD versus ALCL

Diffuse Ausprägungsformen von NLPHD (sogenanntes diffuses Paragranulom) führen oft zu Schwierigkeiten bei der Diagnosestellung. Die häufigsten Fehldiagnosen stellen das T-zellreiche B-Zellenlymphom und das lymphozytenreiche cHD dar (89). L- und H-Zellen sind charakteristisch für das Paragranulom, können aber oft nur schwer erkannt werden. In der Immunhistochemie hebt Oct-2 spezifisch die L- und H-Zellen hervor. Die nicht neoplastischen B-Zellen werden wesentlich weniger stark gefärbt. Oct-2 kann als Marker für die L- und H-Zellen fungieren.

Die Arbeit von Marafioti (51) bestätigt unsere Ergebnisse: starke Positivität der Paragranulome für Oct-2, fehlende Positivität der cHD. Andere Arbeitsgruppen kommen zu anderen, teilweise gegenteiligen Ergebnissen. Bargou (5) weist Oct-2 auch in cHD nach, allerdings nur auf mRNA-Ebene und auch nur in Zelllinien. Daher lassen sich die Ergebnisse von Bargou nicht direkt mit unseren Ergebnissen vergleichen.

Die Abgrenzung zum cHD fällt leicht, da in keinem dieser Fälle Oct-2 durchgehend nukleär exprimiert wurde. Die zytoplasmatische Färbung, die in wenigen Fällen auftrat, scheint eine nicht reproduzierbare, unspezifische Hintergrundfärbung zu sein, denn sie konnte nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in Nicht-Tumorzellen beobachtet werden.

Die Ausnahme stellen zwei Fälle dar, in denen vereinzelt Zellen mit nukleären Färbungen entdeckt wurden. Dann kann zusätzlich durch die gleichzeitige Betrachtung mehrerer Antikörper Klarheit gewonnen werden. In der Immunhistochemie ist es seit langem Brauch, ein Panel verschiedener AK für die Diagnosestellung heranzuziehen. Oft wird erst durch die Verwendung und Auswertung verschiedener AK eine sichere Diagnosestellung möglich.

Zu diesem Zweck eignet sich Bob-1, der Co-Faktor von Oct-2. Eine gleichzeitige Expression von Oct-2 und Bob-1 konnte in keinem der Fälle durchgängig beobachtet werden. In den oben beschriebenen Fällen mit Oct-2-Positivität von Tumorzellen waren diese überwiegend negativ für Bob-1.

Neben der praktischen Bedeutung für die Diagnosestellung in der Pathologie liefern unsere Ergebnisse wichtige Hinweise für andere Fragestellungen. Zum Beispiel können sie der Aufklärung der fehlenden Oberflächen-Ig-Expression in cHD dienen. L- und H-Zellen unterscheiden sich von HRS-Zellen durch ihre meist vorhandene Ig-Expression, die den HRS-Zellen fehlt (72).

Bisher nahm man an, dass die fehlende Ig-Expression in cHD ihren Ursprung in Mutationen der Ig-Gene habe (40). Nach neueren Erkenntnissen scheinen die Ig-Gene intakt zu sein. Eine Beeinträchtigung der Transkription entsteht möglicherweise aufgrund einer verminderten Expression der Octamer-Transkriptionsfaktoren Oct-2 und / oder Bob-1 (7, 90). Oct-2 übt eine regulierende Funktion auf die Ig-Synthese und -Sekretion in B-Zellen aus. Bob-1 aktiviert und verstärkt die von Oct-1 und Oct-2 vermittelte Transkription von Ig-Genen.

In vorliegender Arbeit korreliert der hohe Oct-2-Spiegel in Paragranulomen mit einer intakten Ig-Produktion (95), umgekehrt die fehlende oder niedrige Oct-2-Expression in cHD mit einer fehlenden Ig-Produktion. Auch in den zwei Fällen, in denen HRS-Zellen Oct-2 exprimierten, kann keine Ig-Produktion stattfinden, da sie negativ für den obligaten Co-Aktivatoren Bob-1 waren (45, 96).

Interessant wäre eine immunhistochemische Doppelfärbung mit Anti-Ig- und Anti-Oct-2 bzw. Anti-Bob-1-Antikörpern, um den Zusammenhang zwischen der Ig-Produktion und der Oct-2- und / oder Bob-1-Expression noch deutlicher darzustellen. In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, ob das Fehlen von Oct-2 und / oder Bob-1 die alleinige Ursache der Ig-Gen-Deregulation darstellt und / oder, ob andere Mechanismen zum Tragen kommen.

Eine weitere wichtige Rolle besitzt Bob-1 bei der Diskriminierung von Plasmazytomen und plasmazytoid differenzierten B-Zellneoplasien. Während alle untersuchten Plasmazytome negativ für Oct-1, Oct-2 und Pax-5 waren, wurde Bob-1 immer nukleär exprimiert. In unserer Arbeit exprimierten, abgesehen von ALCL, fast alle Lymphome Bob-1. Betrachtet man zusätzlich Oct-1, Oct-2 und Pax-5, erhalten wir ein spezifisches Expressionsmuster, das einzig den Plasmazytomen eigen ist, nämlich positiv für Bob-1 und negativ für die anderen drei Transkriptionsfaktoren. Auf diese Weise trägt Bob-1 zur Diagnosefindung von Plasmazytomen bei.

Eine ebenfalls deutliche Unterscheidung von Paragranulomen und cHD gelang den

Arbeitsgruppen um Stein (90) und Marafioti (51) durch Bob-1. Sie wiesen eine starke Expression in den Paragranulomen und eine fehlende Expression in den cHD nach. Diese Ergebnisse entsprechen nicht denen der vorliegenden Studie. Unsere Studie beobachtete bei Paragranulomen und cHD eine überwiegende Positivität, durchweg aber recht gemischte Ergebnisse mit z. T. auch negativen Zellen. Eine Unterscheidung aufgrund der Bob-1-Expression fanden wir nicht.

Mit Hilfe von Oct-1 konnte keine eindeutige immunhistochemische Unterscheidung zwischen Paragranulomen und cHD, weder in der vorliegenden noch in Marafiotis Studie erfolgen. Das gleiche gilt für Pax-5.

4.3.2. Oct-1: M. Waldenström versus B-CLL

Verschiedene B-Zellenlymphome, w. z. B. das Marginalzonenlymphom, die folliculären Lymphome und die B-CLL, können durch eine plasmazytoide Differenzierung intrazytoplasmatische Immunglobuline aufweisen. Dadurch ähneln sie zum Teil dem M. Waldenström (6). In unseren Untersuchungen hebt sich der M. Waldenström von den anderen Lymphomen durch die fehlende Expression von Oct-1 ab, die bei den Marginalzonenlymphomen, den folliculären Lymphomen und der B-CLL jedoch vorhanden ist. Oct-1 kann somit hilfreich für die Unterscheidung M. Waldenström / B-CLL sein.

Wir beobachteten allerdings einen einzigen Fall einer B-CLL, der kein Oct-1 exprimierte. Diesen Fall ordneten wir einer Variante der B-CLL zu. Die Variante der B-CLL ist das sogenannte lymphoplasmazytoide Immunozytom der Kiel-Klassifikation, das in der WHO-Klassifikation zur B-CLL gezählt wird. Diese beiden Entitäten sind morphologisch nicht sicher zu unterscheiden. Klinisch kann eine Abgrenzung mittels Immunhistochemie aber von Bedeutung sein. Es bleibt in einer größeren Fallstudie zu untersuchen, ob Oct-1 zur Unterscheidung von B-CLL / Variante der B-CLL (VCLL) beitragen kann.

4.3.3. Pax-5: Hodgkinlymphome versus ALCL

In unserer Arbeit beschäftigten wir uns auch mit Grenzfällen zwischen ALCL und M. Hodgkin. Uns sind bisher keine immunhistologischen Untersuchungen von Pax-5 und Bob-1 bei solchen Grenzfällen aus der Literatur bekannt. Die meisten Studien beschränken sich auf die Untersuchung von Hodgkinlymphomen oder ALCL (20, 22, 36). ALCL leiten

sich meist von T- oder 0-Zellen (Zellen ohne Expression von B- oder T-Zellantigenen) und nur selten einmal von B-Zellen ab. Da Pax-5 ein B-Zellmarker ist, wurde er, abgesehen von einem einzigen Fall, weder in den Grenzfällen noch in den ALCL nachgewiesen. Im Gegensatz dazu entstammen die Hodgkinlymphome in der großen Mehrheit der Fälle der B-Zellreihe (41, 71) und exprimierten alle, wenn auch manchmal nur schwach, Pax-5.

Die Unterscheidung zwischen ALCL und M. Hodgkin ist deshalb wichtig, da sich abhängig von der Diagnose unterschiedliche Therapieschemata und Lebenserwartungen ableiten lassen (12, 19). Ob sich ein Grenzfall eher dem ALCL oder dem Hodgkinlymphom zuordnen lässt, ist bei den Grenzfällen somit von großer Wichtigkeit für das klinische Vorgehen (69). Meistens leiten sich die Grenzfälle vom 0- oder T-Zelltyp ab und werden dann eher dem ALCL zugeordnet als dem M. Hodgkin. Es gab in unseren Untersuchungen aber ein Grenzfallpräparat, in dem Pax-5 schwach exprimiert wurde. Dieses spricht für die Zuordnung zur B-Zellreihe. Die Expression von Pax-5 in solchen Grenzfällen führt in der angewandten Diagnostik zu einer Zuordnung zum Hodgkinlymphom oder zur ALCL vom B-Zellentyp. Neben den bisher verwendeten Unterscheidungsmarkern (wie z. B. ALK-Proteinen oder EBV-Molekülen) kann auch Pax-5 zur Unterscheidung zwischen cHD, Grenzfällen und ALCL beitragen.

Unsere Ergebnisse und die einer weiteren Arbeitsgruppe um Torlakovic (97) stehen im Gegensatz zu Ergebnissen von Hsu (30). Seine Arbeitsgruppe konnte kein BSAP (Pax-5) in HRS-Zellen nachweisen. Allerdings bediente er sich nicht der Immunhistochemie, sondern molekularbiologischer Verfahren mit Zelllinien, was die Diskrepanz zu unseren Ergebnissen erklären könnte. Aus weiter oben bereits genannten Gründen korrelieren Untersuchungen von Zelllinien nicht immer mit den Ergebnissen von Gewebe (22, 38). Derartige Ergebnisse lassen sich also nur mit Vorbehalt miteinander vergleichen.

Als Unterscheidungshilfe von M. Hodgkin und ALCL bietet sich neben Pax-5 auch Bob-1 an. Während keiner der ALCL-Fälle Bob-1 exprimierte, waren die Hodgkinlymphome mit nur zwei Ausnahmen positiv für Bob-1. Da auch die Grenzfälle Bob-1 exprimierten, kann dieser Antikörper nur in Zusammenhang mit weiteren Antikörpern eine Unterscheidungshilfe zwischen Grenzfall und M. Hodgkin ermöglichen.

4.3.4. Subtypen des klassischen M. Hodgkin

Die untersuchten Antikörper eignen sich nicht zur Differenzierung der Subtypen des cHD.

Es bestehen keine wesentlichen Unterschiede in den Expressionsmustern des Mischtyps und denen der Nodulären Sklerose. Das konnte auch in der Arbeit von Re bestätigt werden (72).

4.3.5. Subentitäten des diffusen großzelligen B-Zellenlymphoms

Die diffusen großzelligen B-Zellenlymphome repräsentieren eine heterogene Gruppe von Tumoren (1). Bei der Auswahl der histologischen Präparate haben wir darauf geachtet, dass innerhalb der diffusen großzelligen B-Zellenlymphome verschiedene Subtypen (wie zum Beispiel T-zellreicher und plasmoblastischer Typ) vertreten waren. Wir untersuchten, ob aufgrund unterschiedlicher Expressionsmuster diese Subentitäten zu differenzieren sind. Wir stellten fest, dass sich Bob-1, Oct-1, Oct-2 und Pax-5 nicht zur Differenzierung von Subentitäten eignen, da sich ihre Expressionsmuster zu sehr ähnelten und definierte Muster fehlten.

Das diffuse großzellige B-Zellenlymphom kann sekundär aus anderen Lymphomen, wie zum Beispiel dem Marginalzonenlymphom, den folliculären Lymphomen und der B-CLL, entstehen. Der jeweilige Ursprung hat prognostische Konsequenzen (85). Wir untersuchten, ob sich anhand der Expressionsmuster von Bob-1, Oct-1, Oct-2 und Pax-5 Rückschlüsse auf die Herkunft des diffusen großzelligen B-Zellenlymphoms (primär oder sekundär aus anderen Lymphomen entstanden) ziehen lassen. Wir fanden keinen signifikanten Unterschied der Bob-1-, Oct-1-, Oct-2- und Pax-5-Expressionsmuster zwischen den diffusen großzelligen B-Zellenlymphomen und der B-CLL, den Marginalzonen- und folliculären Lymphomen. Daher können diese Antikörper nicht für eine Entscheidungshilfe für die Ursprungsbestimmung herangezogen werden.

4.4. Unterscheidung einzelner Lymphadenitisformen

Die vorliegende Arbeit sollte unter anderem untersuchen, ob die bei uns verwendeten Transkriptionsfaktoren eine Hilfe bei der Unterscheidung der verschiedenen Lymphadenitisformen darstellen könnten. Bisher sind uns keine Untersuchungen von Bob-1, Oct-1, Oct-2 und Pax-5 bei Lymphadenitiden in der Literatur bekannt. Die Form einer Lymphadenitis lässt manchmal auf deren Ursache schließen. Die Abgrenzung einzelner

Entitäten voneinander kann in einigen Fällen schwierig sein. Die vier TF zeigten keine wesentlichen Unterschiede der Expressionsmuster zwischen den einzelnen Lymphadenitisarten. Auch innerhalb der Gruppe der Castleman-Lymphome ließen sich der hyalin-vaskuläre und der plasmazellreiche Typ nicht anhand von Expressionsunterschieden sicher voneinander abgrenzen. Wir zeigten mit unseren Untersuchungen, dass sich Bob-1, Oct-1, Oct-2 und Pax-5 nicht zur Diskriminierung der untersuchten Lymphadenitiden verwenden lassen.

4.5. Lymphadenitis versus neoplastisches Äquivalent

In einigen Fällen kann die Unterscheidung zwischen Lymphadenitis und Neoplasie schwierig sein. Lymphadenitiden mit progressiv transformierten Keimzentren können in lymphozytenprädominante Hodgkinlymphome übergehen. Bei progressiv transformierten Keimzentren sollte man immer auch an das Paragranulom als Differentialdiagnose denken. Im Gegensatz zum Paragranulom zeigten die progressiv transformierten Keimzentren nur sehr wenige große Zellen, die positiv für Oct-2 waren. Alle L- und H-Zellen des NLPHD waren dagegen immer stark positiv. Oct-2 bietet damit eine Entscheidungshilfe zur Abgrenzung Paragranulom / Lymphadenitis mit progressiv transformierten Keimzentren. Aus diesem Grund ist Oct-2 mittlerweile in der Diagnostik des NLPHD fest integriert (s. o).

Pax-5 wird in den Marginalzonen- und monozytoiden B-Zellenlymphomen stark exprimiert, während die monozytoiden B-Zellen, die ihr nicht neoplastisches Äquivalent darstellen, in den Piringer-Lymphadenitiden negativ waren. Pax-5 eignet sich somit möglicherweise auch zur Unterscheidung des Marginalzonen- bzw. monozytoiden B-Zellenlymphoms von der Piringer-Lymphadenitis.

In den anderen Fällen, z. B. bei der Abgrenzung Burkittlymphom / EBV-Lymphadenitis, erwiesen sich Bob-1, Oct-1, Oct-2 und Pax-5 als nicht geeignet.

Die erhöhte Expression einiger Transkriptionsfaktoren in den Lymphomen im Vergleich zu ihren nicht neoplastischen Korrelaten kann nicht nur zur Differenzierung Neoplasie / reaktives Gewebe beitragen, sondern kann auch Hinweise auf die Lymphomgenese liefern (siehe 4.6.).

4.6. Expression in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der B-Zellen

Die Stadien der B-Zellreifung sind im Einzelnen der Abbildung (Kap. 7.2.) zu entnehmen. Sie unterscheiden sich nicht nur morphologisch voneinander, sondern auch durch ihre charakteristische Antigenexpression. Auch Bob-1, Oct-1 (26), Oct-2 und Pax-5 werden in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad unterschiedlich stark in den B-Zellen exprimiert (siehe 7.2.).

4.6.1. Nicht neoplastische B-Zellen in den Lymphadenitiden

Die Blasten unterscheiden sich von den reiferen Lymphozyten durch ihre stärkere Expression von Oct-1, Oct-2 und Bob-1 sowie deren geringere Expression von Pax-5. Diese Expressionsunterschiede lassen sich besonders gut bei der B-CLL, dem M. Waldenström, dem Marginalzonen-, monozytoiden B-Zellen- und Mantelzellenlymphom beobachten. Neben anderen Kriterien kann man diese Phänomene zur Unterscheidungshilfe zwischen Blasten und Lymphozyten heranziehen, was beim Grading von Lymphomen von Bedeutung ist.

Die stärkste Expression von Bob-1, Oct-1 und Oct-2 konnte im Keimzentrum ermittelt werden. Die Follikelmantelzone wurde am schwächsten gefärbt. Die Interfollikulärzone lag im mittleren Bereich. Die Keimzentren stellen die Kompartimente der B-Zellreifung und -differenzierung dar. Da Oct-1 und Oct-2 als Transkriptionsfaktoren eine wichtige Funktion bei der B-Zellreifung und -differenzierung zukommt, ist deren starke Expression in den Keimzentren zu erklären.

In den Keimzentren finden sich aktivierte B-Zellen, während die B-Zellen in der Mantelzone reife, ruhende B-Zellen sind. In einer Arbeit von Qin (70) wird eine stärkere Expression von Bob-1 in aktivierten als in ruhenden B-Zellen beschrieben. Wir konnten diese Ergebnisse immunhistochemisch bestätigen.

Pax-5 hingegen wurde am stärksten in der Mantelzone, etwas geringer in den Keimzentren und am wenigsten stark in der Interfollikulärzone exprimiert. Zellen der Marginalzone zeigten eine geringe bis gar keine Positivität.

Pax-5 weist die stärksten Positivitäten in früheren Entwicklungsstufen (nämlich in Mantelzonen-B-Zellen) als die anderen drei TF (Zentroblasten und -zyten) auf. Dieses

Verteilungsmuster könnte sich durch die spezifischen Aufgaben, die Pax-5 bei der B-Zellreifung übernimmt, erklären. Pax-5 wird aufgrund seiner Eigenschaften vor allem in der frühen B-Zellreifung benötigt. So leitet es die Differenzierung der Vorläuferzellen in Richtung „B-lineage“ ein, indem es alternative Wege (w. z. B. die myeloische oder T-Zellreihe) hemmt. Es verstärkt die Expression und damit die Ausbildung von B-Zellantigenen und ist ein Repressor der Ig-Schwerkettenexpression. Diese sind Eigenschaften, die vor allem in frühen Stadien der B-Zellentwicklung benötigt werden. Zellen der frühen B-Zellentwicklung sind zumeist in der Mantelzone lokalisiert. Die starke Expression von Pax-5 in der Follikelmantelzone könnte auf das Vorhandensein von Pax-5-Zielgenen hinweisen. Erst nach Antigenkontakt formieren sich Keimzentren, und die B-Zellen differenzieren zu Zentroblasten und -zyten.

4.6.2. Neoplastische B-Zellen der Lymphome

Reife B-Zellneoplasien ahmen häufig eine normale B-Zelldifferenzierung nach. Neoplastische B-Zellen können somit normalen B-Zellen ähneln, worauf unter anderem die Nomenklatur und die Klassifikationen beruhen. Fast allen Lymphomen lässt sich anhand eines nicht-neoplastischen Äquivalents eine bestimmte Differenzierungsstufe zuweisen (siehe 7.2.).

Man kann zum Teil aufgrund des Expressionsmusters auf die Abstammung der jeweiligen Lymphome schließen. So unterstreicht die gleichzeitige starke Pax-5-Expression in B-Zellen der Mantelzone und Tumorzellen der Mantelzonenlymphome deren gemeinsamen Ursprung.

Oct-2 und Bob-1 zeigten eine starke Expression, vor allem in Lymphomen, die den Entwicklungsstufen des Keimzentrums nahe stehen. Darunter fallen die folliculären Lymphome, das diffuse großzellige B-Zellenlymphom und das Burkittlymphom. Mantel- und Marginalzonenlymphome, die von diesen Entwicklungsstufen etwas weiter entfernt sind, zeigten sich schwächer positiv.

Am Ende der B-Zellentwicklung stehen Plasmazellen. Von ihnen lassen sich die Plasmazytome ableiten. Während Bob-1 in Plasmazytomen sehr stark exprimiert wurde, erwiesen sie sich für Oct-2 negativ. Die Ergebnisse für Bob-1 entsprechen hiermit den Ergebnissen von Qin (70). Qin konnte in Zelllinienstudien eine Bob-1-Expression in allen Phasen der B-Zellentwicklung nachweisen.

Eine Erklärung für die Expression von Bob-1 in Plasmazytomen könnte in der Bedeutung von Bob-1 für die Produktion von Immunglobulinen liegen (29). Es werden in Plasmazytomen meist massiv Immunglobuline produziert.

Im Gegensatz zu den Plasmazellen haben die Plasmazytomzellen die Fähigkeit zur Oct-2-Expression verloren. Die Aufgaben von Oct-2 scheinen in malignen Plasmazellen keine Bedeutung mehr zu haben, da Oct-2 unter anderem für die Ausbildung von Ig-Isotypen verantwortlich ist (83, 84). In Plasmazytomen jedoch findet kein Isotypenswitch statt, da alle Immunglobuline von demselben differenzierten Zellklon abstammen.

Oct-1 wurde am stärksten in den folliculären Lymphomen exprimiert, in den angrenzenden Entwicklungsstufen weniger.

Die Differenzierungsstufen der B-Zellen variieren nicht nur zwischen den einzelnen Lymphomen, sondern zum Teil auch innerhalb einer Lymphomentität. Die diffusen großzelligen B-Zellenlymphome stammen von peripheren antigenstimulierten B-Zellen ab, von denen man annimmt, dass sie unterschiedliche Differenzierungsgrade aufweisen können. Oct-1 weist eine stark variierende Expression innerhalb der diffusen großzelligen B-Zellenlymphome auf. Während einige Fälle negativ für Oct-1 waren, wurde es in anderen Fällen stark exprimiert. Diese uneinheitlichen Expressionsmuster könnten für das Vorliegen unterschiedlicher Differenzierungsgrade innerhalb ein und derselben Lymphomentität sprechen.

Pax-5 wurde im Gegensatz zu den anderen Transkriptionsfaktoren, aber in Analogie zu den nicht neoplastischen Gegenstücken, stärker in den Lymphomen der prägerminalen Entwicklungsstufen exprimiert. In Mantelzonen-, Burkitt- und bestimmten diffusen großzelligen B-Zellenlymphomen fanden sich die stärksten Positivitäten für Pax-5. In den folliculären und Marginalzonenlymphomen fielen die Positivitäten schwächer aus. In den Plasmazellneoplasien wurde es nicht exprimiert. Die fehlende Pax-5-Expression in Plasmazellen gilt als Voraussetzung für die Immunglobulinproduktion, da Pax-5 auf diese repressorisch wirkt (18).

Aus diesen Funktionen wird deutlich, dass höhere Oct-1-, Oct-2- und Pax-5-Spiegel in den Lymphomen zu erwarten sind, die aus nicht plasmazytisch differenzierten Zellen stammen.

4.7. Bedeutung der Dysregulation von Pax-5- und Bob-1-Genen für die Lymphomgenese

Chromosomale Mutationen w. z. B. Translokationen oder Deletionen spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese maligner Erkrankungen. Veränderungen in den betroffenen Genen können sich durch eine veränderte Expression der von ihnen codierten Proteine äußern.

Pasqualucci (68) vertritt die Meinung, dass Hypermutationen im Bereich von Pax-5-Genen zur Lymphomgenese beitragen können, legen sich aber nicht fest, ob eine überdurchschnittlich hohe oder niedrige Pax-5-Expression dafür verantwortlich ist.

Es gibt Hinweise darauf, dass eine übernormal hohe Pax-5-Expression zur Tumorentstehung beitragen kann. Versuche mit B-Zellkulturen der Milz haben eine verstärkte B-Zellproliferation bei hohen Pax-5-Spiegeln nachgewiesen (36). Auch während der normalen B-Zell-Differenzierung wird Pax-5 sehr stark exprimiert, z. B. in den Mantelzellen. Ein hoher Pax-5-Spiegel an sich scheint nicht zur Tumorentstehung beizutragen. Man vermutet, dass eine Dysregulation der Expression mit "unnormale" hohen Pax-5-Spiegeln im Vergleich zur normalen Expression notwendig ist, um zur Entstehung neoplastischer Transformationen beitragen zu können (55, 64). Unter diesen Gesichtspunkten erscheinen in vorliegender Arbeit die Mantelzonen-, mediastinalen- und Burkittlymphome mit ihrer starken Positivität für Pax-5 besonders interessant für weitere Analysen zu sein.

Um einen "unnormale" hohen Pax-5-Spiegel zu erkennen, verglichen wir die Lymphome mit ihren nicht neoplastischen Äquivalenten in den Lymphadenitiden. Dem Mantelzonenlymphom würden dementsprechend Mantelzellen, dem mediastinalen B-Zellenlymphom Zentroblasten und dem Burkittlymphom prägerminale / germinale Blasten zugeordnet werden. Bei diesen drei Lymphomen konnten jedoch keine höheren Expressionen von Pax-5 als in den nicht neoplastischen Korrelaten nachgewiesen werden. Bei den Marginalzonen- und monozytoiden B-Zellenlymphomen konnte aber eine verstärkte Expression nachgewiesen werden. Beide leiten sich von monozytoiden B-Zellen ab, die unter anderem auch bei der Piringer-Lymphadenitis vorkommen. Beide Lymphomentitäten exprimierten Pax-5. Die monozytoiden B-Zellen der beiden Piringer-Lymphadenitisfälle waren dagegen negativ.

Da Pax-5 viele Stoffwechselwege der Zellen beeinflusst, könnten erhöhte Pax-5-Spiegel, wie sie in den Marginalzonen- und monozytoiden B-Zellenlymphomen, nicht aber in den

Lymphadenitisfällen zu finden sind, für die Tumorentstehung eine Rolle spielen (56).

Interessante Aspekte bietet auch das lymphoplasmazytische Lymphom. Eine typische Translokation, t(9;14)(p13;q32), die beim M. Waldenström gehäuft vorkommt, liegt direkt neben der Ig-Schwerketten-Region, die von Pax-5 beeinflusst wird (32). Durch diese örtliche Nähe kann es zur Pax-5-Dysregulation kommen. Ob man mit Hilfe erhöhter Pax-5-Spiegel den Verdacht über das Vorliegen einer solchen Translokation immunhistochemisch erhärten kann, ist bisher nicht geklärt (98). Der Nachweis dieser Translokation kann für die Prognose von Bedeutung sein (3).

Nicht nur eine Überexpression von Pax-5, sondern auch die von Bob-1 steht in dem Verdacht, die Entstehung von Lymphomen zu fördern. Greiner (24) schreibt einer Bob-1-Überexpression eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Keimzentrumslymphomen zu. Dazu zählen auch diffuse großzellige B-Zellenlymphome und die folliculären Lymphome. Die Bob-1-Überexpression sei zudem ein charakteristisches Merkmal der Keimzentrumslymphome, durch die man sie von prä- und postgerminalen Lymphomen unterscheiden könne.

In unserer Arbeit konnten wir mittels der Immunhistochemie eine solche Überexpression nicht nachweisen. Die Bob-1-Expression fiel in den folliculären Lymphomen nicht stärker aus als in ihrem nicht neoplastischen Korrelat. Von einer Überexpression kann also nicht gesprochen werden. Bob-1 wurde auch in den prä- und postfolliculären Lymphomen kräftig exprimiert. Die folliculären Lymphome heben sich also nicht von prä- und postgerminalen Lymphomen ab. Im Gegensatz zu Greiner können wir die Verwendung von Bob-1 als Marker für Keimzentrumslymphome zwar bestätigen, aber nicht die Hypothese, dass es solche diskriminiert. Die Ergebnisunterschiede beruhen möglicherweise darauf, dass Greiner molekularbiologische Methoden und Zelllinien im Unterschied zu uns verwendet hat.

4.8. Zweiteilung der Marginalzone

In den nodalen sowie in den splenischen Marginalzonenlymphomen konnte durch eine unterschiedlich starke Pax-5-Expression eine Zweiteilung der Marginalzone speziell in der Milz beobachtet werden. Diese Zweiteilung basiert auf dem Vorhandensein der inneren

und äußeren Marginalzone. Es gelingt selten, die Zweiteilung der Marginalzone so deutlich darzustellen, wie es uns mit Pax-5 gelegentlich gelungen ist.

4.9. Nachweis der B-Zellabstammung

Da wir davon ausgehen, dass Oct-2, Bob-1, Pax-5 und eingeschränkt auch Oct-1 zu den B-Zellmarkern gehören, kann man sie auch für den Nachweis der B-Zellabstammung einzelner Lymphome heranziehen. Bei einigen Neoplasien ist nämlich nicht immer deutlich, ob sie der T-, B- oder 0-Zellreihe entstammen. Diskutiert wird z. B. derzeit die Herkunft des Paragranuloms.

Da Oct-2 ausnahmslos in allen Paragranulomen stark exprimiert wurde, könnte das ein Hinweis auf die B-Zellabstammung der Paragranulome sein.

Auch die cHD werden außer in wenigen Ausnahmefällen der B-Zellreihe zugesprochen. Die cHD sind jedoch überwiegend negativ bzw. nicht durchgehend positiv für Oct-2. Oct-1 ist ca. in der Hälfte der Fälle, und Pax-5 immer positiv. Da alle untersuchten Transkriptionsfaktoren als B-Zellmarker gelten, wäre die Expression aller unserer B-Zellmarker zu erwarten gewesen, ist jedoch jeweils fast immer nur auf einen Teil der Zellen beschränkt. Zum Beweis der B-Zellherkunft scheint der Nachweis nur einiger, und nicht aller B-Zellmarker zu genügen. Das wird dadurch bestätigt, dass mindestens einer der untersuchten B-Zellmarker immer in den B-Zellenlymphomen exprimiert wurde. Es wurde nicht ein B-Zellenlymphom beobachtet, dass für alle vier Antikörper gleichzeitig negativ war, im Gegensatz zu den durchgehend negativen ALCL.

Morphologisch unterscheiden sich die Tumorzellen in den Paragranulomen von denen in cHD. Die Tumorzellen der Paragranulome ähneln mutierten und antigenselektierten Keimzentrumszellen, die Tumorzellen des cHD präapoptischen Keimzentrums-B-Zellen (41). Die unterschiedliche Genexpression der Tumorzellen der Paragranulome und der cHD könnte ein Hinweis auf das Vorhandensein unterschiedlicher Differenzierungsstufen dieser Tumorzellen sein.

4.10. Vergleich mit anderen Studien

Wir haben die Ergebnisse dieser Arbeit mit Ergebnissen anderer Arbeiten verglichen. Unsere Ergebnisse stimmen mit denen der Literatur nicht in allen Punkten überein. Aus diesem Grund stellt sich die Frage nach der Ursache solcher Diskrepanzen. Da alle Studien auf etablierten Verfahren (ABC-, APAAP-, LAB- / LSAB-Methode¹) basieren, scheinen technische Fehler weitgehend ausgeschlossen zu sein. Eine Quelle für unterschiedliche Ergebnisse kann der direkte Vergleich dieser zwar ähnlichen, aber doch unterschiedlichen Methoden miteinander darstellen. Die ABC-Methode steht in dem Ruf, sensitiver als die APAAP-Methode zu sein. Auswirkungen auf die Ergebnisse könnte vor allem die Verwendung unterschiedlicher Primärantikörper (mono- / polyklonal, unterschiedliche Hersteller etc.) haben. Zum Beispiel kann die Verwendung monoklonaler Antikörper, wie sie die Arbeitsgruppe um Foss (22) verwendete, als Nachteil eine zu geringe Sensitivität mit sich bringen. Das bedeutet im Extremfall negative Färbegergebnisse bei monoklonalen Antikörpern, die möglicherweise bei Verwendung von polyklonalen Antikörpern (unsere Untersuchungen) mit Spezifität für mehrere Epitope positiv ausgefallen wären.

4.11. Fazit und Ausblick

Durch die Untersuchung der Transkriptionsfaktoren Bob-1, Oct-1, Oct-2 und Pax-5 ist es uns gelungen, neue B-Zellmarker für die Routinediagnostik zu etablieren. Sie sind geeignet, B-Zellen und B-Zellneoplasien zu erkennen. Dabei sollte nicht vergessen werden, dass die von uns untersuchten Antikörper immer in Zusammenhang eines ganzen Panels weiterer anderer Antikörper betrachtet werden sollten und nicht für sich allein stehen. Weiterhin ist es nun möglich, diese vier Antikörper in der Immunhistochemie anzuwenden, wodurch aufwändigere Verfahren w. z. B. molekularbiologische Verfahren oder Western Blots entfallen können. Die verschiedenen immunhistochemischen Analysen für die Transkriptionsfaktoren wurden etabliert und in die Routinediagnostik der Universitätspathologie Lübeck überführt. So konnten die Ergebnisse dieser Arbeit, die sich nur auf eine kleine Stichprobe von Lymphomen und reaktiven Veränderungen beziehen, in

¹LAB- / LSAB-Methode: Labeled (Strept) Avidin-Biotin-Methode mit biotinyliertem Brückenantikörper und als Tertiärreagenz ein Streptavidin-Enzymkonjugat (alkalische Phosphatase oder Peroxydase)

einer größeren Anzahl von Fällen bestätigt werden.

Die Antikörper eignen sich zur Differenzierung und Diagnostik mancher Lymphomentitäten, wodurch deren Erkennung erleichtert und verbessert wurde. Da von einer richtigen Diagnosestellung wesentlich die eingesetzten Therapieschemata abhängen (75), entsteht durch die verbesserte Diagnostik auch eine erhöhte Sicherheit für die Klinik. Im Bereich der Lymphadenitiden konnten wir keinen Vorteil in der Anwendung der untersuchten Antikörper erkennen. Da in der Literatur nur wenige Untersuchungen zu immunhistochemischen Analysen bei reaktivem Gewebe veröffentlicht wurden und nur sehr wenige Marker für spezielle Lymphadenitiden bekannt sind, können in diesem Bereich weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Neben der Immunhistochemie werden derzeit zur Erforschung weiterer Lymphommarker und Prognosemarker auch andere Methoden herangezogen. Eine moderne Methode zum Erstellen von Genexpressionsprofilen stellt die Macro- und Microarray-Technik dar (33, 48). Sie beruht auf dem Prinzip der Basenpaarung. Aus Zellen (Lymphomzellen) wird die mRNA extrahiert, mittels Reverser Transkriptase DNA produziert, diese fluoreszierend markiert, auf ein DNA Macro- / Microarray (DNA-Chip) hybridisiert, gescannt und ausgewertet. Macro- und Microarray-Technik unterscheiden sich lediglich anhand der Größe der auf den Chip aufgetragenen Proben. Diese Technologie ermöglicht heute die gleichzeitige Untersuchung des gesamten Transkriptoms einer Zelle, Zellpopulation oder eines Tumors. Die bisher etablierten Methoden konnten meist nur ein Gen oder einige wenige Gene gleichzeitig untersuchen. Es bestehen bereits vielversprechende Untersuchungen an Lymphomen, die auf molekularer Ebene dazu beitragen können, Subtypen von Lymphomen zu klassifizieren, onkogenetische Mechanismen zu verstehen und Aussagen zur Prognose zu treffen, um damit verschiedene therapeutische Ansätze in ihrer Wirkung abzuschätzen und das klinische Outcome zu verbessern (1, 85, 86). Es gilt nun, eine Brücke zu schlagen zwischen den Genexpressionsprofilen und der konventionellen immunhistochemischen Diagnostik, um die Vorteile der neuen Technik für die leichter anwendbaren und kostengünstigeren konventionellen Techniken (wie z. B. der Immunhistochemie) nutzen zu können. Die neuen Techniken sollten in größeren prospektiven Studien und dann beispielsweise durch die Immunhistochemie verifiziert werden. Dazu müssten die Daten der molekularen Analyse auf Proteinebene übertragen und in einem größeren Panel sowie ausreichend großen Fallzahlen untersucht und

abgesichert werden.

Zelluläre Marker / Genexpressionsprofile sind bedeutsam, stellen aber eben nur einen diagnostischen Teilbereich bei der Erforschung und dem Verstehen von Lymphomen dar. Darüberhinaus sollte man nicht den Blick für die klinischen Befunde und individuellen Gegebenheiten des Patienten verlieren, um eine adäquate Behandlung des Tumorpatienten zu ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Die Diagnosesicherung lymphatischer Neoplasien erfolgt neben klinischen und bildgebenden Verfahren fast immer durch die histologische Diagnostik. Die Subtypisierung lymphatischer Neoplasien ist für die Planung der Therapieoptionen und die Prognose des Patienten von entscheidender Bedeutung. Es ergeben sich Probleme durch die zum Teil schwierige Abgrenzbarkeit einzelner Lymphomentitäten untereinander (sogenannte Grenzfälle).

Im Rahmen der pathologisch-histologischen Routinediagnostik stellt die Immunhistochemie ein weit verbreitetes, gut einsetzbares und zuverlässiges Verfahren zur Objektivierung der morphologischen Diagnose dar. Allerdings reichen die bislang etablierten zur Verfügung stehenden Antikörper bei einigen Fragestellungen nicht aus, um eine Klärung der Differentialdiagnose zu erreichen. Die Etablierung weiterer Marker ist anzustreben.

Dazu untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit die Expression der Transkriptionsfaktoren Pax-5 (BSAP), Oct-1, Oct-2 und Bob-1 in lymphatischen Neoplasien und verschiedenen reaktiven Lymphknotengeweben mittels Immunhistochemie (ABC-Methode). Diese Antikörper waren bislang in der Diagnostik nicht etabliert. Diesbezügliche Untersuchungen wurden lediglich an Zelllinien durchgeführt, und es bestanden Widersprüche über deren Expressionsprofile (5, 24, 90).

Wir konnten zeigen, dass sich Oct-1, Oct-2, Bob-1 und Pax-5 nicht nur wie bisher in molekularbiologischen Verfahren und dem Western Blot, sondern auch in der Immunhistochemie anwenden lassen. Es gelang damit diese vier Transkriptionsfaktoren mittlerweile in der pathologischen Routinediagnostik zu etablieren.

Wir fanden heraus, dass Oct-2, Bob-1 und Pax-5, eingeschränkt auch Oct-1, B-Zell-spezifisch sind. Sie eignen sich zur Detektion von B-Zellen und B-Zellneoplasien und helfen damit, diese von T-Zell- und myeloischen Neoplasien abzugrenzen.

Durch spezifische Expressionsmuster charakterisieren sie unterschiedlich gut verschiedene Lymphomentitäten.

Gemeinsam eignen sich Oct-2 und Bob-1 zur Abgrenzung des NLPHD vom cHD (Oct-2 positiv für NLPHD, negativ für cHD. Bob-1 positiv für beide. In den wenigen Fällen, in denen Oct-2 doch positiv für cHD ist, ist aber Bob-1 überwiegend negativ.).

Zusätzlich kann Bob-1 zur Unterscheidung von M. Hodgkin (positiv) und ALCL (negativ), sowie zur Diskriminierung von Plasmazytomen beitragen (Bob-1 als einziger untersuchter Transkriptionsfaktor positiv).

Oct-1 erleichtert die Unterscheidung zwischen B-CLL (positiv) und M. Waldenström (negativ).

Pax-5 diskriminiert cHD (positiv) und ALCL (negativ) voneinander.

Gelegentlich konnte bei Pax-5 eine Zweiteilung der Marginalzone beobachtet werden.

Zur Differenzierung anderer B-Zellenlymphome eignen sich diese vier Transkriptionsfaktoren nicht.

Wir stellten außerdem fest, dass die Expressionsmuster dieser vier Antikörper mit dem Stadium der B-Zelldifferenzierung variierte. Wie man heute weiss, wird Pax-5 schon in Zellen der frühen B-Zelldifferenzierung (ab Pro-B-Zelle) exprimiert und ist bis zur terminalen Differenzierung (nicht jedoch auf Plasmazytomzellen) nachweisbar. Bob-1 und Oct-2 markieren Keimzentrumszellen (Zentrozyten- und blasten) stark positiv, Pax-5 und Oct-1 dagegen schwächer.

Zusätzlich zu den B-Zellneoplasien untersuchten wir reaktives Lymphknotengewebe mit transformierten Keimzentren, Püringer-Lymphadenitiden, EBV-assoziierte Lymphadenitiden sowie drei Typen des M. Castleman (Mischtyp, plasmazellreich, hyalin-vaskulär). Eine Abgrenzung der einzelnen Lymphadenitiden oder Subtypen des M. Castleman konnte durch das Fehlen typischer bzw. unterschiedlicher Expressionsmuster nicht erfolgen.

Die Identifizierung neuer, z. B. lymphomspezifischer Tumormarker erfolgt derzeit vor allem durch das Erheben von Genexpressionsprofilen mittels der RNA-Microarray-Analyse bzw. mit „Lymphomchips“ (15, 86). Die dabei erzielten Resultate (z. B. lymphomspezifische Expressionsmuster oder sogenannte „predictory gene panels“) sollten mit Hilfe der histologischen / immunhistochemischen Diagnostik validiert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Alizadeh-A-A, Eisen-M-B, Davis-R-E, Ma-C, Lossos-I-S, Rosenwald-A, Boldrick-J-C, Sabet-H, Tran-T, Yu-X, Powell-J-I, Yang-L, Marti-G-E, Moore-T, Hudson-J-Jr, Lu-L, Lewis-D-B, Tibshirani-R, Sherlock-G, Chan-W-C, Greiner-T-C, Weisenburger-D-D, Armitage-J-O, Warnke-R, Levy-R, Wilson-W, Grever-M-R, Byrd-J-C, Botstein-D, Brown-P-O, Staudt-L-M: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 403(6769): 503-11 (2000)
2. Anagnostopoulos-I, Hansmann-M-L, Franssila-K, Harris-N-L, Jaffe-E-S, Han-J, van-Krieken-J-M, Poppema-S, Marafioti-T, Franklin-J, Sextro-M, Diehl-V, Stein-H: European Tasc Force on Lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with nodular growth pattern and abundant lymphocytes. *Blood*. 96(5): 1889-99 (2000)
3. Andrieux-J, Fert-Ferrer-S, Copin-M-C, Huyghe-P, Pocachard-P, Lespinasse-J, Bauters-F, Lai-J-L, Quesnel-B: Three new cases of non-Hodgkin lymphoma with t(9;14)(p13;q32). *Cancer-Genet-Cytogenet*. 145(1): 65-69 (2003)
4. Babb-R, Cleary-M-A, Herr-W: OCA-B is a functional analog of VP16 but targets a separate surface of the Oct-1 POU domain. *Mol-Cell-Biol*. 17(12): 7295-305 (1997)
5. Bargou-R-C, Leng-C, Krappmann-D, Emmerich-F, Mapara-M-Y, Bommert-K, Royer-H-D, Scheidereit-C, Dorken-B: high-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood*. 87(10): 4340-7 (1996)
6. Berger-F, Isaacson-P-G, Piris-M-A, Harris-N-L, Müller-Hermelink-H-K, Nathawani-B-N, Swerdlow-S-H: Lymphoplasmacytic lymphoma / Waldenström macroglobulinemia. In: Jaffe-E-S, Harris-N-L, Stein-H, Vardiman-J-W: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Kap. 6, 132-134, IARC Press, Lyon (2001)
7. Bourne-J-A: Handbuch 1 immunohistochemischer Färbemethoden. Immunochemistry Laboratory, Dako Corporation, Carpinteria, USA (1995)
8. Bruno-L, Schaniel-C, Rolink-A: Plasticity of Pax-5 (-/-) pre-B I cells. *Cells-*

- Tissues-Organs. 171(1): 38-43 (2002)
9. Campo-E, Miquel-R, Krenacs-L, Sorbara-L, Raffeld-M, Jaffe-E-S: Primary nodal marginal zone lymphomas of splenic and MALT type. *Am-J-Surg-Pathol.* 23(1): 59-68 (1999)
 10. Capello-D, Gaidano-G: Molecular pathophysiology of indolent lymphoma. *Haematologica.* 85(2): 113-4 (2000)
 11. Casellas-R, Jankovic-M, Meyer-G, Gazumyan-A, Luo-Y, Roeder-R, Nussenzweig-M: OcaB is required for normal transcription and V(D)J recombination of a subset of immunoglobulin kappa genes. *Cell.* 110(5): 575-85 (2002)
 12. Cazals-Hatem-D, Andre-M, Mounier-N, Copin-M-C, Divine-M, Berger-F, Bosly-A, Kerneis-Y, Briere-J, Quesnel-B, Diebold-J, Gaulard-P: Pathologic and clinical features of 77 Hodgkin's lymphoma patients treated in a lymphoma protocol (LNH87): a GELA study. *Am-J-Surg-Pathol.* 25(3): 297-306 (2001)
 13. Chaiwun-B, Shi-S-R, Cote-R-J, Taylor-C-R: Major Factors Influencing the Effectiveness of Antigen Retrieval Immunohistochemistry. In: Shi-S-R, Gu-J, Taylor-C-R: *Antigen Retrieval Techniques: Immunohistochemistry and Molecular Morphology.* Kap. 2, 41-53, 1. Aufl., Eaton Publishing, Natick, MA (2000)
 14. Cordell-J-L, Falini-B, Erber-W-N, Ghosh-A-K, Abdulaziz-Z, MacDonald-S, Pulford-K-A, Stein-H, Mason-D-Y: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J-Histochem-Cytochem.* 32(2): 219-29 (1984)
 15. Davis-R-E, Staudt-L-M: Molecular diagnosis of lymphoid malignancies by gene expression profiling. *Curr-Opin-Hematol.* 9(4): 333-8 (2002)
 16. Diehl-V, Sextro-M, Franklin-J, Hansmann-M-L, Harris-N, Jaffe-E, Poppema-S, Harris-M, Franssila-K, van-Krieken-J, Marafioti-T, Anagnostopoulos-I, Stein-H: Clinical presentation, course, and prognostic factors in lymphocyte-predominant Hodgkin's disease and lymphocyte-rich classical Hodgkin's disease: report from the European Task Force on Lymphoma Project on Lymphocyte-Predominant Hodgkin's Disease. *J-Clin-Oncol.* 17(3): 776-83 (1999)
 17. Dunn-T-L, Ross-I-L, Hume-D-A: Transcription factor Oct-2 is expressed in primary murine macrophages. *Blood.* 88(10): 4072 (1996)
 18. Enver-T: B-cell commitment: Pax5 is the deciding factor. *Curr-Biol.* 9(24): R933-5 (1999)

19. Falini-B, Pileri-S, Zinzani-P-L, Carbone-A, Zagonel-V, Wolf-Peeters-C, Verhoef-G, Menestrina-F, Todeschini-G, Paulli-M, Lazzarino-M, Giardini-R, Aiello-A, Foss-H-D, Araujo-I, Fizzotti-M, Pelicci-P-G, Flenghi-L, Martelli-M-F, Santucci-A: ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood*. 93: 2697-2706 (1999)
20. Falini-B, Mason-D-Y: Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. *Blood*. 99(2): 409-26 (2002)
21. Flatten-G: Sekundäre Prävention (Krebsfrüherkennung). In: Schmoll-H-J, Höffken-K, Possinger-K: *Kompandium Internistische Onkologie, Teil 1. Grundlagen, Richtlinien, Antineoplastische Substanzen, Toxizitäten, prophylaktische und supportive Therapie, Adressen*. 2. Auflage, Kap. 5.2., 160-164, Springer-Verlag, Heidelberg (1997)
22. Foss-H-D, Reusch-R, Demel-G, Lenz-G, Anagnostopoulos-I, Hummel-M, Stein-H: Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin. *Blood*. 94(9): 3108-13 (1999)
23. Friedl-E-M, Matthias-P: Mapping of the transcriptional repression domain of the lymphoid-specific transcription factor oct-2A. *J-Biol-Chem*. 271(24): 13927-30 (1996)
24. Greiner-A, Muller-K-B, Hess-J, Pfeffer-K, Muller-Hermelink-H-K, Wirth-T: Up-regulation of BOB.1/OBF.1 expression in normal germinal center B cells and germinal center-derived lymphomas. *Am-J-Pathol*. 156(2): 501-7 (2000)
25. Gstaiger-M, Georgiev-O, van-Leeuwen-H, van-der-Vliet-P, Schaffner-W: The B cell coactivator Bob1 shows DNA sequence-dependent complex formation with Oct-1/Oct-2 factors leading to differential promoter activation. *EMBO-J*. 15(11): 2781-90 (1996)
26. Hamada-T, Yonetani-N, Ueda-C, Maesako-Y, Akasaka-H, Akasaka-T, Ohno-H, Kawakami-K, Amakawa-R, Okuma-M: Expression of the PAX5/BSAP transcription factor in haematological tumor cells and further molecular characterization of the t(9;14)(p13;q32) translocation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Br-J-Haematol*. 102(3): 691-700 (1998)
27. Harris-N-L, Jaffe-E-S, Diebold-J, Flandrin-G, Muller-Hermelink-H-K, Vardiman-J-W: Lymphoma classification—from controversy to consensus: the R.E.A.L. and

- WHO Classification of lymphoid neoplasms. *Ann-Oncol.* 11 Suppl 13-10 (2000)
28. Harris-N-L, Jaffe-E-S, Vardiman-J-W, Stein-H, Diebold-J, Müller-Hermelink-H-K, Flandrin-G: Introduction. In: Jaffe-E-S, Harris-N-L, Stein-H, Vardiman-J-W: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 12-14, IARC Press, Lyon (2001)
 29. Hess-J, Nielsen-P-J, Fischer-K-D, Bujard-H, Wirth-T: The B lymphocyte-specific coactivator BOB.1/OBF.1 is required at multiple stages of B-cell development. *Mol-Cell-Biol.* 21(5): 1531-9 (2001)
 30. Hsu-P-L, Xie-S-S, Hsu-S-M: Absence of T-cell- and B-cell-specific transcription factors TCF-1, GATA-3, and BSAP in Hodgkin's Reed-Sternberg cells. *Lab-invest.* 74(2): 395-405 (1996)
 31. Humbert-P-O, Corcoran-L-M: oct-2 gene disruption eliminates the peritoneal B-1 lymphocyte lineage and attenuates B-2 cell maturation and function. *Immunity.* 10(5): 619-28 (1999)
 32. Iada-S, Rao-P-H, Ueda-R, Chaganti-R-S, Dalla-Favera-R: Chromosomal rearrangement of the PAX-5 locus in lymphoplasmacytic lymphoma with t(9;14) (p13;q32). *Leuk-Lymphoma.* 34(1-2): 25-33 (1999)
 33. Jenkins-R-E, Pennington-S-R: Arrays for protein expression profiling: towards a viable alternative to two-dimensional gel electrophoresis? *Proteomics.* 1(1): 13-29 (2001)
 34. Kim-U, Qin-X-F, Gong-S, Stevens-S, Luo-Y, Nussenzweig-M, Roeder-R-G: The B-cell-specific transcription coactivator OCA-B/OBF-1/Bob-1 is essential for normal production of immunoglobulin isotypes. *Nature.* 383(6600): 542-7 (1996)
 35. Knoepfel-L, Georgiev-O, Nielsen-P, Schaffner-W: Cloning and characterization of the murine B-cell specific transcriptional coactivator Bob-1. *Biol-Chem-Hoppe-Seyler.* 377(2): 139-45 (1996)
 36. Krenacs-L, Himmelmann-A-W, Quintanilla-M-L, Fest-T, Riva-A, Wellmann-A: Transcription factor B-cell-specific activator protein (BSAP) is differentially expressed in B cells and in subsets of B-cell lymphomas. *Blood.* 92(4): 1308-16 (1998)
 37. Krenacs-L, Krenacs-T, Raffeld-M: Antigen retrieval for immunohistochemical reactions in routinely processed paraffin sections. *Methods-Mol-Biol.* 115: 85-93 (1999)

38. Krenacs-T, Krenacs-L, Raffeld-M: Multiple antigen immunostaining procedures. *Methods-Mol-Biol.* 115: 223-33 (1999)
39. Küppers-R, Rajewsky-K: The origin of Hodgkin and Reed/ Sternberg cells in Hodgkin´s disease. *Annu-Rev-Immunol.* 16: 471-93 (1998)
40. Küppers-R, Klein-U, Hansmann-M-L, Rajewsky-K: Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N-Engl-J-Med.* 341: 1520-1529 (1999)
41. Küppers-R, Schwering-I, Brauninger-A, Rajewsky-K, Hansmann-M-L: Biology of Hodgkin´s lymphoma. *Ann-Oncol.* 13 Suppl 1:11-8 (2002)
42. Lan-H-Y, Nikolic-Paterson-D-J: Multiple Immunoenzyme Staining. In: Shi-S-R, Gu-J, Taylor-C-R: *Antigen Retrieval Techniques: Immunohistochemistry and Molecular Morphology.* Kap. 7, 129-138, 1. Aufl., Eaton Publishing, Natick, MA (2000)
43. Laszlo-T, Csernus-B, Krenacs-L, Kelenyi-G, Matolcsy-A: Pathologic diagnosis of mantle cell lymphoma based on histologic, cytologic, immunohistologic and genetic characteristics. *Orv-Hetil.* 140(52): 2907-12 (1999)
44. Latchman-D-S: The Oct-2 transcription factor. *Int-J-Biochem-Cell-Biol.* 28(10): 1081-3 (1996)
45. Laumen-H, Nielsen-P-J, Wirth-T: The BOB.1 /OBF.1 co-activator is essential for octamer-dependent transcription in B cells. *Eur-J-Immunol.* 30(2): 458-69 (2000)
46. Lesimple-T, Voigt-J-J, Bataillard-A, Coindre-J-M, Culine-S, Lortholary-A, Merrouche-Y, Ganem-G, Kaminsky-M-C, Negrier-S, Perol-M, Bedossa-P, Bertrand-G, Bugat-R, Fizazi-K: Clinical practice guidelines: Standards, Options and Recommendations for the diagnosis of carcinomas of unknown primary site. *Bull-Cancer.* 90(12): 1071-96 (2003)
47. Luchina-N-N, Krivega-I-V, Pankratova-E-V: Human Oct-1L isoform has tissue-specific expression pattern similar to Oct-2. *Immunol-Lett.* 85(3): 237-41 (2003)
48. MacBeath-G, Schreiber-S-L: Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination. *Science.* 289(5485): 1760-1763 (2000)
49. Maitra-S, Atchison-M: BSAP can repress enhancer activity by targeting PU.1 function. *Mol-Cell-Biol.* 20(6): 1911-22 (2000)
50. Marafioti-T, Hummel-M, Anagnostopoulos-I, Foss-H-D, Huhn-D, Stein-H: Classical Hodgkin´s disease and follicular lymphoma originating from the same germinal center B cell. *J-Clin-Oncol.* 17(12): 3804-9 (1999)
51. Marafioti-T, Roncador-G, Delsol-G, Mason-D-Y: Transcription factors: A new

- category of lineage and maturation-associated intracellular markers. In: Mason-D, André-P, Bensussan-A, Buckley-C, Civin-C, Clark-E, de-Haas-M, Goyert-S, Hadam-M, Hart-D, Ho-ej-í-V, Jones-Y, Meuer-S, Morrissey-J, Schwartz-Albiez-R, Shaw-S, Simmons-D, Turni-L, Ugucioni-M, van-der-Schoot-E, Vivier-E, Zola-H: *Leucocyte Typing VII*. 140-144, Oxford University Press, Oxford (2002)
52. Mason-D-Y, Leonard-R-C, Laurent-G, Gourdin-M-F: Immunoperoxidase staining of surface and intracellular immunoglobulin in human neoplastic lymphoid cells. *J-Clin-Pathol*. 33(7): 609-16 (1980)
 53. Mason-D-Y, Banks-P-M, Chan-J, Claery-M-L, Delsol-G, de-Wolf-Peters-C, Falini-B, Gatter-K, Grogan-T-M, Harris-N-L: Nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. A distinct clinicopathological entity. *Am-J-Surg-Pathol*. 18(5): 526-30 (1994)
 54. Matthias-P: Lymphoid-specific transcription mediated by the conserved octamer site: who is doing what? *Semin-Immunol*. 10(2): 155-63 (1998)
 55. Morrison-A-M, Nutt-S-L, Thevenin-C, Rolink-A, Busslinger-M: Loss- and gain-of-function mutations reveal an important role of BSAP (Pax-5) at the start and end of B cell differentiation. *Semin-Immunol*. 10(2): 133-42 (1998)
 56. Morrison-A-M, Jager-U, Chott-A, Schebesta-M, Haas-O-A, Busslinger-M: Deregulated PAX-5 transcription from a translocated IgH promoter in marginal zone lymphoma. *Blood*. 92(10): 3865-78 (1998)
 57. Niedobitek-G, Herbst-H, Young-L-S, Brooks-L, Masucci-M-G, Crocker-J, Rickinson-A-B, Stein-H: Patterns of Epstein-Barr virus infection in non-neoplastic lymphoid tissue. *Blood*. 79 (10): 2520-6 (1992)
 58. Nielsen-P-J, Georgiev-O, Lorenz-B, Schaffner-W: B lymphocytes are impaired in mice lacking the transcriptional co-activator Bob1/OCA-B/OBF1. *Eur-J-Immunol*. 26(12): 3214-8 (1996)
 59. Noll-S, Schaub-Kuhnen-S: *Praxis der Immunhistochemie*. 1. Aufl., 15-18, Urban und Fischer, München (2000)
 60. Nutt-S-L, Morrison-A-M, Dorfler-P, Rolink-A, Busslinger-M: Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *EMBO-J*. 17(8): 2319-33 (1998)
 61. Nutt-S-L, Heavey-B, Rolink-A-G, Busslinger-M: Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature*. 401(6753): 556-62 (1999)
 62. Nutt-S-L, Vambrie-S, Steinlein-P, Kozmik-Z, Rolink-A, Weith-A, Busslinger-M:

- Independent regulation of the two Pax5 alleles during B-cell development. *Nat-Genet.* 21(4): 390-5 (1999)
63. Nutt-S-L, Eberhard-D, Horcher-M, Rolink-A-G, Busslinger-M: Pax5 determines the identity of B cells from the beginning to the end of B-lymphopoiesis. *Int-Rev-Immunol.* 20(1): 65-82 (2001)
 64. Ohno-H, Ueda-C, Akasaka-T: The t (9;14) (p13;q32) translocation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk-Lymphoma.* 36(5-6): 435-45 (2000)
 65. O'Neill-E-A, Fletcher-C, Burrow-C-R, Heintz-N, Roeder-R-G, Kelly-T-J: Transcription factor OTF-1 is functionally identical to the DNA replication factor NF-III. *Science.* 241(4870): 1210-3 (1988)
 66. Pankratova-E-V, Deyev-I-E, Zhenilo-S-V, Polanovsky-O-L: Tissue-specific isoforms of the ubiquitous transcription factor Oct-1. *Mol-Genet-Genomics.* 266(2): 239-45 (2001)
 67. Parkin-D-M, Pisani-P, Ferlay-J: Global cancer statistics. *CA-Cancer-J-Clin.* 49: 33-64 (1999)
 68. Pasqualucci-L, Neumeister-P, Goossens-T, Nanjangud-G, Chaganti-R-S, Kuppers-R, Dalla-Favera-R: Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature.* 412(6844): 341-6 (2001)
 69. Porcu-P, Nichols-C-R: Evaluation and management of the „new“ lymphoma entities: mantle cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue, anaplastic large-cell lymphoma, and primary mediastinal B-cell lymphoma. *Curr-Probl-Cancer.* 22(5): 283-368 (1998)
 70. Qin-X-F, Reichlin-A, Luo-Y, Roeder-R-G, Nussenzweig-M-C: OCA-B integrates B cell antigen receptor-, CD40L- and IL 4-mediated signals for the germinal center pathway of B cell development. *EMBO-J.* 17(17): 5066-75 (1998)
 71. Rajewsky-K, Kanzler-H, Hansmann-M-L, Kuppers-R: Normal and malignant B-cell development with special reference to Hodgkin's disease. *Ann-Oncol.* 8 Suppl 279-81 (1997)
 72. Re-D, Muschen-M, Ahmadi-T, Wickenhauser-C, Staratschek-Jox-A, Holtick-U, Diehl-V, Wolf-J: Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer-Res.* 61(5): 2080-4 (2001)
 73. Reya-T, Großchedl-R: Transcriptional regulation of B-cell differentiation. *Curr-Opin-Immunol.* 10(2): 158-65 (1998)
 74. Rüdiger-T, Jaffe-E-S, Delsol-G, de-Wolf-Peeters-C, Gascoyne-R-D, Georgii-A,

- Harris-N-L, Kadin-M-E, MacLennan-K-A, Poppema-S, Stein-H, Weiss-L-E, Muller-Hermelink-H-K: Workshop report on Hodgkin's disease and related diseases („grey zone“ lymphoma). *Ann-Oncol.* 9 Suppl 5: 31-8 (1998)
75. Salles-G, Shipp-M-A, Coiffier-B: Chemotherapy of non-Hodgkin's aggressive lymphomas. *Semin-Hematol.* 31(1): 46-69 (1994)
 76. Samardzik-T, Marinkovic-D, Nielsen-P-J, Nitschke-L, Wirth-T: BOB.1/OBF.1 deficiency affects marginal-zone B-cell compartment. *Mol-Cell-Biol.* 22(23): 8320-31 (2002)
 77. Sauter-P, Matthias-P: Coactivator OBF-1 makes selective contacts with both the POU specific domain and the POU homeodomain and acts as a molecular clamp on DNA. *Mol-Cell-Biol.* 18(12): 7397-409 (1998)
 78. Schubart-D-B, Rolink-A, Kosco-Vilbois-M-H, Botterie-F, Matthias-P: B-cell-specific coactivator OBF-1/OCA-B/Bob1 required for immune response and germinal centre formation. *Nature* 383(6600): 538-42 (1996)
 79. Schubart-D-B, Sauter-P, Massa-S, Friedl-E-M, Schwarzenbach-H, Matthias-P: Gene structure and characterization of the murine homologue of the B cell-specific transcriptional coactivator OBF-1. *Nucleic-Acids-Res.* 24(12): 2462 (1996)
 80. Schubart-D-B, Rolink-A, Schubart-K, Matthias-P: Cutting edge: lack of peripheral B cells and severe agammaglobulinemia in mice simultaneously lacking Bruton's tyrosine kinase and the B cell-specific transcriptional coactivator OBF-1. *J-Immunol.* 164(1): 18-22 (2000)
 81. Schubart-K, Massa-S, Schubart-D, Corcoran-L-M, Rolink-A-G, Matthias-P: B cell development and immunoglobulin gene transcription in the absence of Oct-2 and OBF-1. *Nat-Immunol.* 2(1): 69-74 (2001)
 82. Sextro-M, Diehl-V, Franklin-J, Hansmann-M-L, Anagnostopoulos-I, Marafioti-T, Stein-H: Lymphocyte predominant Hodgkin's disease—a workshop report. European Task Force on Lymphoma. *Ann-Oncol.* 7 Suppl 461-5 (1996)
 83. Shah-P-C, Bertolino-E, Singh-H: Using altered specificity Oct-1 and Oct-2 mutants to analyze the regulation of immunoglobulin gene transcription. *EMBO-J.* 16(23): 7105-17 (1997)
 84. Sharif-M-N, Radomska-H-S, Miller-D-M, Eckhardt-L-A: Unique function for carboxyl-terminal domain of Oct-2 in Ig-secreting cells. *J-Immunol.* 167(8): 4421-9 (2001)
 85. Shipp-M-A, Ross-K-N, Tamayo-P, Weng-A-P, Kutok-J-L, Aguiar-R-C,

- Gaasenbeek-M, Angelo-M, Reich-M, Pinkus-G-S, Ray-T-S, Koval-M-A, Last-K-W, Norton-A, Lister-T-A, Mesirov-J, Neuberger-D-S, Lander-E-S, Aster-J-C, Golub-T-R: Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat-Med.* 8(1): 68-74 (2002)
86. Staudt-L-M: Gene expression profiling of lymphoid malignancies. *Annu-Rev-Med.* 53: 303-18 (2002)
87. Stein-H, Hummel-M, Marafioti-T, Anagnostopoulos-I, Foss-H-D: Molecular biology of Hodgkin's disease. *Cancer-Surv.* 30: 107-23 (1997)
88. Stein-H: Die neue WHO Klassifikation der malignen Lymphome. Nach „REAL“ ein weiterer Schritt auf dem Weg zu einem weltweiten Konsens. *Pathologe.* 21(2): 101-5 (2000)
89. Stein-H, Delsol-G, Pileri-S, Said-J, Mann-R, Poppema-S, Swerdlow-S-H, Jaffe-E-S: Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. In: Jaffe-E-S, Harris-N-L, Stein-H, Vardiman-J-W: *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* Kap. 8, 240-243, IARC Press, Lyon (2001)
90. Stein-H, Marafioti-T, Foss-H-D, Laumen-H, Hummel-M, Anagnostopoulos-I, Wirth-T: Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood.* 97(2): 496-501 (2001)
91. Stein-K, Hummel-M, Korbjuhn-P, Foss-H-D, Anagnostopoulos-I, Marafioti-T, Stein-H: Monocytoid B cells are distinct from splenic marginal zone cells and commonly derive from unmutated naive B cells and less frequently from post germinal center B cells by polyclonal transformation. *Blood.* (94)8: 2800-8 (1999)
92. Stevens-S, Ong-J, Kim-U, Eckhardt-L-A, Roeder-R-G: Role of OCA-B in 3'-IgH enhancer function. *J-Immunol.* 164(10): 5306-12 (2000)
93. Sturm-R-A, Das-G, Herr-W: The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. *Genes-Dev.* 2(12A): 1582-99 (1988)
94. Tang-H, Sharp-P-A: Transcriptional regulation of the murine 3' IgH enhancer by OCT-2. *Immunity.* 11(5): 517-26 (1999)
95. Taylor-C-R: An immunohistological study of follicular lymphoma, reticulum cell sarcoma and Hodgkin's disease. *Eur-J-Cancer.* 12: 61-75 (1976)
96. Theil-J, Laumen-H, Marafioti-T, Hummel-M, Lenz-G, Wirth-T, Stein-H: Defective

- octamer-dependent transcription is responsible for silenced immunoglobulin transcription in Reed-Sternberg cells. *Blood*. 97(10): 3191-6 (2001)
97. Torlakovic-E, Torlakovic-G, Nguyen-P-L, Brunning-R-D, Delabie-J: The value of anti-pax-5 immunostaining in routinely fixed and paraffin-embedded sections: a novel pan pre-B and B-cell marker. *Am-J-Surg-Pathol*. 26(10): 1343-50 (2002)
 98. Zhenilo-S, Deyev-I, Serov-S, Polanovsky-O: Regulation of oct-1 gene transcription is different in lymphoid and non-lymphoid cells. *Biochemie*. 85(7): 715-8 (2003)
 99. Zinyk-D-L, Mercer-E-H, Harris-E, Anderson-D-J, Joyner-A-L: Fate mapping of the mouse midbrain-hindbrain constriction using a site-specific recombination system. *Curr-Biol*. 8(11): 665-8 (1998)
 100. Zwollo-P, Arrieta-H, Ede-K, Molinder-K, Desiderio-S, Pollock-R: The Pax-5 gene is alternatively spliced during B-cell development. *J-Biol-Chem*. 272(15): 10160-8 (1997)

7. Anhang

7.1. Ergebnistabellen

Tabelle 3: Ergebnisse der Lymphome

Fall Nr:	Gewebe	BOB-1	Oct-1	Oct-2	Pax-5
1	B-CLL	B++ Z+	B++ Z 0/e+	B++ Z+	B+ Z+/++
2	B-CLL	B++ Z+	B+-+++ Z 0/e+	B++ Z+	B+ Z++
3	B-CLL	B+++ Z++	B++ Z+	B++ Z+	B++ Z+++
4	B-CLL	B+++ Z++	B+-+++ Z 0/e+	B++ Z+	B++ Z+++
5	B-CLL	B+++ Z++	0	B++ Z+	B++ Z+++
6	B-CLL	B+++ Z++	B++ Z+	B++ Z+	B++ Z+++
7	B-CLL	B+++ Z++	B++ Z+	B++ Z+	B++ Z+++
8	B-CLL	B+++ Z++	B++ Z+	B++ Z+	B++ Z+++
9	B-CLL	B+++ Z++	B++ Z+	B++ Z+	B++ Z+++
10	B-CLL	B+++ Z++	B++ Z+	B++ Z+	B++ Z+++
11	M. Waldenström	k.E.	0	B++ Z+	+++
12	M. Waldenström	B++ Z+	0	B++ Z+	+++
13	M. Waldenström	B++ Z+	k. E.	B++ Z+	+++
14	M. Waldenström	B++ Z 0-++	0	B++ Z+	+
15	M. Waldenström	B++ Z+	0	B++ Z+	+++
16	nodales Marg.	B+/+++ Z+	B++ Z+	+++	+++
17	nodales Marg.	B+/+++ Z+	B++ Z+	B++ Z+	+++
18	nodales Marg.	B+-++++ Z+	B+-+++ Z 0-+	B++ Z+	+
19	nodales Marg.	B+-++++ Z+	B+-+++ Z 0-+	B++ Z+	+++
20	nodales Marg.	B+-++++ Z+	k. E.	B++ Z+	+++
21	splen. Marg.	B+/+++ Z+	B++ Z++	++	B+ Z++
22	splen. Marg.	B+/+++ Z+	B++ Z++	+	B+ Z++
23	splen. Marg.	B+++ Z++	k. E.	++	B++ Z+++
24	splen. Marg.	B+++ Z++	e+	++	++
25	splen. Marg.	B+/+++ Z+	B++ Z+	++	++
26	splen. Marg.	B+/+++ Z+	B++ Z+	++	++
27	Plasmozytom	+++	0	0	0
28	Plasmozytom	+++	0	0	0
29	Plasmozytom	++	0	0	0
30	Plasmozytom	+++	0	0	0
31	Plasmozytom	+++	0	0	0

Fall Nr:	Gewebe	BOB-1	Oct-1	Oct-2	Pax-5
32	follik. L. (cb)	+++	e+	+++	+++
33	follik. L. (cbcc1)	B+++ Z++	B++ Z+	B++ Z+	B+ Z++
34	follik. L. (cbcc1)	B+++ Z++	+	B+++ Z++	B+ Z++
35	follik. L. (cbcc1)	B+++ Z++	++	B+++ Z++	B+ Z++
36	follik. L. (cbcc1)	B++ Z+	++	B+++ Z++	B+ Z++
37	follik. L. (cbcc1)	B+++ Z++	++	B+++ Z++	B+ Z++
38	follik. L. (cbcc1)	B+++ Z++	++	B+++ Z++	B+ Z++
39	follik. L. (cbcc2)	B+++ Z++	+	B+++ Z++	B+ Z++
40	follik. L. (cbcc2)	B+++ Z++	+	B+++ Z++	B+ Z++
41	follik. L. (cbcc2)	B++ Z+	++	B+++ Z++	B+ Z++
42	follik. L. (cbcc2)	B+++ Z++	++	B+++ Z++	B+ Z++
43	follik. L. (cbcc2)	B++ Z+	++	B+++ Z++	B+ Z++
44	follik. L. (cbcc3)	B++ Z+	++	B+++ Z++	B+ Z++
45	follik. L. (cbcc3)	B+++ Z++	+	B+++ Z++	B+ Z++
46	follik. L. (cbcc3)	B+++ Z++	k. E.	B+++ Z++	B+ Z++
47	follik. L. (cbcc3)	B+++ Z++	+	B+++ Z++	B+ Z++
48	follik. L. (cbcc3)	B+++ Z++	++	B+++ Z++	B++ Z+++
49	Mantelzellen-L.	B++ Z+	+	++	+++
50	Mantelzellen-L.	B++ Z+	++	++,e+	+++
51	Mantelzellen-L.	B++ Z+	+	+++	+++
52	Mantelzellen-L.	B++ Z+	+	+++	+++
53	diffuses großz. BZL	+++	e++	e+	e+/+++
54	diffuses großz. BZL	+++	e+	+++	+++
55	diffuses großz. BZL	+++	++	+++	+++
56	diffuses großz. BZL	+++	e+	+++	++
57	diffuses großz. BZL	+++	e+/+++	+	e 0/+ /+++
58	diffuses großz. BZL	+++	++	+++	+ /+++
59	diffuses großz. BZL	+++	++	+++	++
60	diffuses großz. BZL	+++	0	++	++
61	diffuses großz. BZL	+++	0	+++	+++
62	plasmoblastisches L.	+++	++	++	++
63	plasmoblastisches L.	+++	++	+++	++
64	plasmoblastisches L.	+++	++	+++	+++
65	plasmoblastisches L.	+++	+	+++	++
66	plasmoblastisches L.	+++	0	+++	+++
67	mediastinales BZL	+++	++	+++	+++
68	mediastinales BZL	+++	+	+++	+++
69	mediastinales BZL	k. E.	k. E.	k. E.	+++
70	mediastinales BZL	+++	++	++	+++
71	mediastinales BZL	+++	++	++	+++
72	Burkitt-Lymphom	+++	e+	+++	+++
73	Burkitt-Lymphom	+++	+	+++	+++
74	Burkitt-Lymphom	+++	++	+++	+++
75	Burkitt-Lymphom	+++	k. E.	+++	++
76	Burkitt-Lymphom	+++	++	+++	+++

Fall Nr:	Gewebe	BOB-1	Oct-1	Oct-2	Pax-5
77	Paragranulom	+++	0/+	+++	+
78	Paragranulom	0/+/>+++	0/+	+++	+, e0
79	Paragranulom	++/>+++	0/+	+++	+, e0
80	Paragranulom	+++	+	+++	+/+++
81	Paragranulom	+/+++	++	+++	0/>+/+++
82	M. Hodgkin M	0	0	+/+++	+
83	M. Hodgkin M	+/+++	0	0	+
84	M. Hodgkin M	0/>+/+++	++	0	+
85	M. Hodgkin M	0	+	+/+++	+
86	M. Hodgkin M	0/>+/+++	++	0,e+	+
87	M. Hodgkin NS	++	0	0	++
88	M. Hodgkin NS	+++	e+	0	+
89	M. Hodgkin NS	++	++	0,e+	+
90	M. Hodgkin NS	++	++	0	+
91	M. Hodgkin NS	+++	0	0	+
92	Grenzf. M.H./ALCL	+++	+	0	+
93	Grenzf. M.H./ALCL	++/>+++	+	0	0
94	Grenzf. M.H./ALCL	++/>+++	0	0	0
95	Grenzf. M.H./ALCL	+/+++/>+++	+	0	0
96	Grenzf. M.H./ALCL	+/+++/>+++	0	0	0
97	ALCL	0	0	0	0
98	ALCL	0	0	0	0
99	ALCL	0	0	0	0
100	ALCL	0	0	0	0
101	ALCL	0	0	0	0

Erläuterungen und Abkürzungen zur Tabelle Nr. 3:

Wir bewerteten die Stärke der Expression (Positivitäten) innerhalb der Tumorzellen jeweils bezogen auf die Gesamtheit der umgebenden Nicht-Tumorzellen bzw. Gesamtpopulation. Wir verwendeten zum Auswerten der immunhistochemischen Färbungen folgenden Schlüssel:

- 0 keine Expression
- + schwache, aber oberhalb der Hintergrundfärbung liegende Positivität
- ++ mittlere bis starke Positivität
- +++ sehr starke Positivität
- +/+++ es kommen schwache Positivitäten neben Zellen mit mittleren Positivitäten vor
- ++/>+++ es kommen mittelstarke Positivitäten neben Zellen mit sehr starken Positivitäten vor

ALCL anaplastisches, großzelliges Lymphom (anaplastic large cell lymphoma)

B Blasten

B-CLL chronische lymphatische Leukämie der B-Zellreihe

BZL	B-Zellenlymphom
cb	zentroblastisches Lymphom der Kiel-Klassifikation
cbcc	zentroblastisch-zentrozytisches Lymphom der Kiel-Klassifikation
diffuses großz. BZL	diffuses großzelliges B-Zellenlymphom
e	einzelne Zellen
follik. L.	follikuläres Lymphom
Grenzf. M.H./ALCL	Grenzfall zwischen M. Hodgkin und ALCL
k. E.	keine Ergebnisse
L.	Lymphom
M	M. Hodgkin vom Mischtyp
Mantelzellen-L.	Mantelzellenlymphom
M. H.	M. Hodgkin
nodales Marg.	nodales Marginalzonenlymphom (monozytoides B-Zellenlymphom)
NS	M. Hodgkin vom Typ der Nodulären Sklerose
splen. Marg.	splenisches Marginalzonenlymphom
Z	Zyten

Werden innerhalb der Tabelle Blasten und Zyten nicht gesondert hervorgehoben, liegt eine gleichstarke Expression der Antigene in ihnen vor.

Tabelle 4: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

	Bob-1	Oct-1	Oct-2	Pax-5
Paragranulom			+	
cHD	+ ¹		0 ³	+
Grenzfall				+ beim B-Zellentyp 0 beim T-Zellentyp
ALCL				0
B-CLL		+ ²		
M. Waldenström		0		
Plasmozytom	+	0	0	0

1 in denjenigen cHD-Fällen, in denen Oct-2 exprimiert wurde, waren die cHD negativ für Bob-1

2 ein Fall exprimierte kein Oct-1

3 zwei Fälle exprimierten Oct-2, in zwei Fällen fanden sich einzelne positive Zellen neben negativen Zellen

7.3. Reagenzien und Lösungen

AP-Puffer	8,7 g NaCl, 1,5 g Tris-HCL und 4,9 g Trizma-Base in 175 ml Aqua destillata lösen
Chromogenlösung	für ca. 1752 µl: -Lösung 1: 31 ml Propandiol und 50 mg Levamisole zum Blocken endogener alkalischer Phosphatase in 87 ml AP-Puffer lösen -Lösung 2: 225 mg Na-Nitrit in 625 µl Aqua bidestillata lösen, 250 µl Neufuchsin hinzufügen, 1' reagieren lassen, dann Lösung 2 in Lösung 1 geben. -Lösung 3: 62,5 mg Naphtol-AS-Bisphosphat in 750 µl Dimethylforamid lösen, dann Lösung 3 in Lösung (1+2) geben. pH-Abgleich auf 8,70-8,72 mit Natronlauge bzw. Salzsäure
Harnstoff	120 g Harnstoff in 1 l Aqua destillata lösen
Propandiol	21 g 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol in 1000 ml Aqua destillata lösen
Tris-Puffer (pH 7,4 - 7,6)	8,78 g NaCl, 68,5 g Trizma-Hydrochlorid und 9,0 g Trizma-Base in 10 l Aqua destillata lösen
Zitronensäure-Puffer (pH 6,0)	2 g Natriumcitrat-Monohydrat in 1 l Aqua destillata lösen (0,01 molar)

7.4. Bezug der verwendeten Materialien

Material / Reagenz	Vertreiber
AB / AP (AB-Complex) Code-Nr.: K0376	Dako, Kopenhagen, Dänemark
2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol	Merck, Darmstadt
Aquatex-Kleber	Merck, Darmstadt
biotinylierter mouse-anti-goat AK, Code-Nr.: 205-065-108	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Pennsylvania, USA
biotinylierter mouse-anti-rabbit AK, Code-Nr. 211-065-109	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Pennsylvania, USA
Bob-1, clone C-20:sc-955	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Dampftopf, Vitafit	Fissler
Dimethylforamid	Merck, Darmstadt
EDTA-Lösung (0,5 molar)	Klinikapotheke der Universität Lübeck
Hämalaun nach Mayer	Klinikapotheke der Universität Lübeck
Harnstoff	Sigma, Steinheim
Heizplatte	Digsitherm
Humanserum	Serologie der Universität Lübeck
Levamisole	Sigma, Steinheim
Mausserum	C. C. pro GmbH, Neustadt / W.
Mikrowelle, Supratronic M752	Miele, Stuttgart
Naphtol-AS-Bisphosphat	Sigma, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Neufuchsin	Klinikapotheke der Universität Lübeck

Material / Reagenz	Vertreiber
Objektträger (Suprafrost-plus)	Merck, Darmstadt
Oct-1, clone C-21:sc-232	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Oct-2, clone C-20:sc-233	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Pax-5, clone C-20:sc-1974	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Proteinase K	DAKO, Kopenhagen, Dänemark
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Schlittenmikrotom	Leica
Tris-HCL	Sigma, Steinheim
Trizma-Base	Sigma, Steinheim
Xylol	Klinikapotheke der Universität Lübeck

8. Bildanhang

8.1. Bildtafelverzeichnis

Abb. 1: Oct-1: B-CLL, Mantelzonenausbreitung

Abb. 2: Oct-1: B-CLL mit ausgeprägten Pseudofollikeln

Abb. 3: Bob-1: Yamshidi-Trepanat des Knochenmarks eines Plasmozytoms

Abb. 4: Bob-1: Mantelzellenlymphom

Abb. 5: Oct-2: NLPHD

Abb. 6: Oct-2: NLPHD. Ausschnitt aus Abb. 5.

Abb. 7: Oct-2: NLPHD. Ausschnitt aus Abb. 5.

Abb. 8: Oct-2: cHD

Abb. 9: Oct-2: cHD. Ausschnitt aus Abb.8.

Abb. 10: Oct-2: cHD

Abb. 11: Pax-5: normale Milz

Abb. 12: Pax-5: cHD

Abb. 13: Pax-5: cHD. Ausschnitt aus Abb. 12.

8.2. Bildtafeln

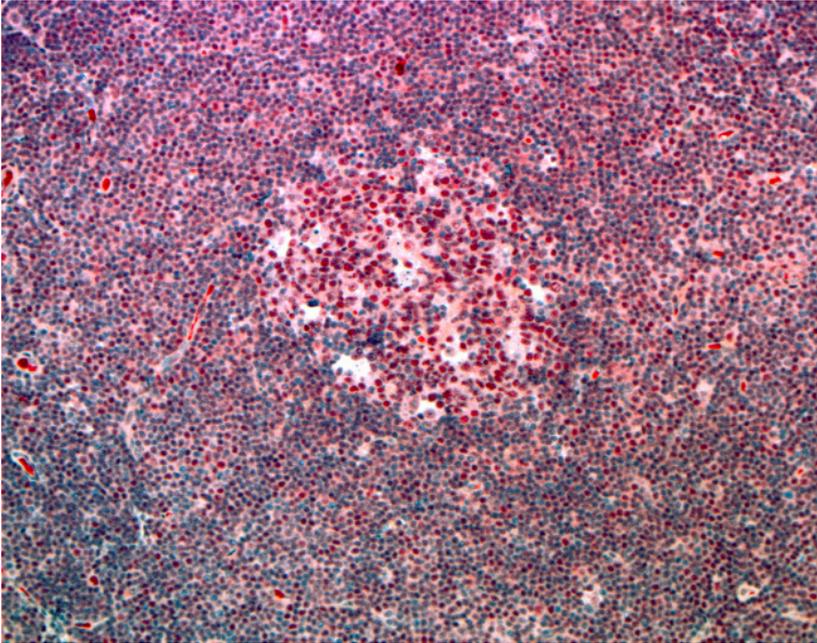


Abb. 1. Oct-1: B-CLL. Mantelzonenausbreitung. Keimzentrums-B-Zellen exprimieren stärker Oct-1 als neoplastische B-CLL-Zellen in der Mantel-, Marginal- und Interfollikulärzone (Vergrößerung 1:100).

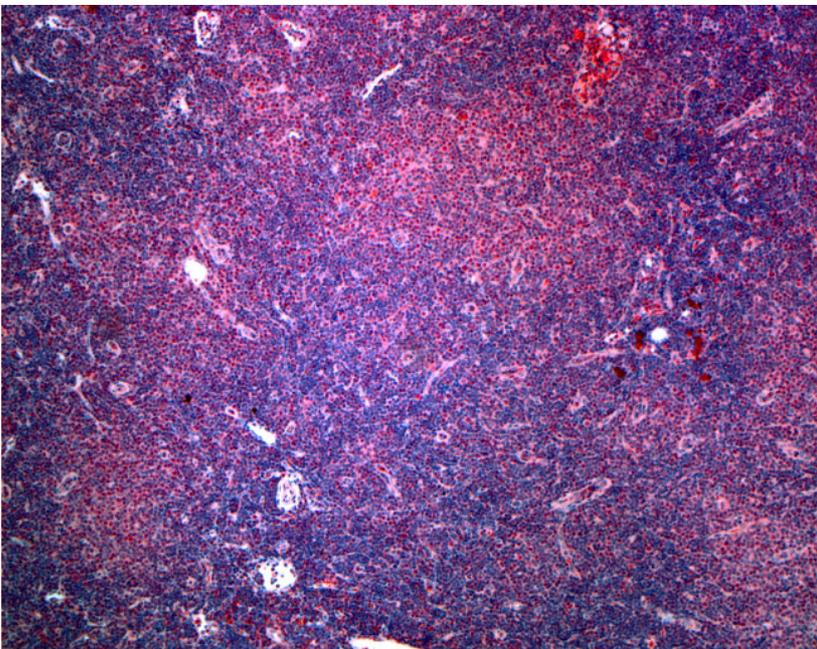


Abb. 2. Oct-1: B-CLL mit ausgeprägten Pseudofollikeln. Im Gegensatz zu den Tumorzellen des M. Waldenström wird Oct-1 in Tumorzellen der B-CLL exprimiert (Vergrößerung 1:100).

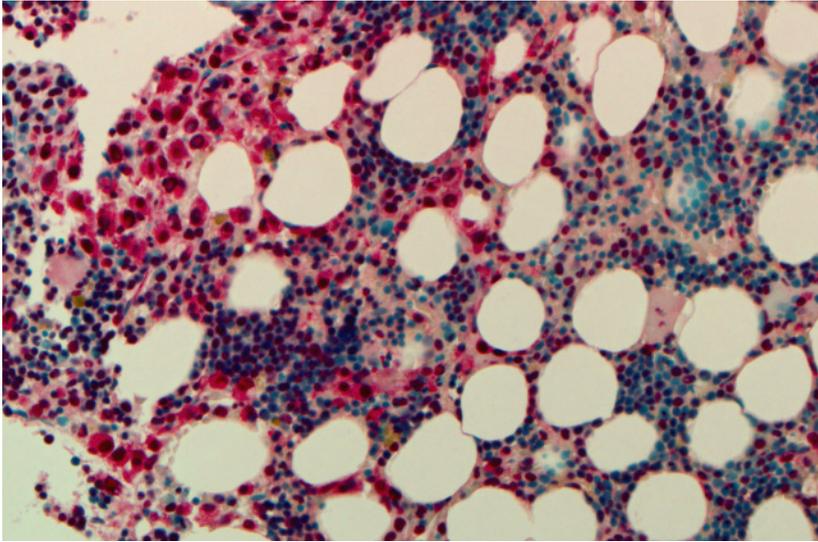


Abb. 3. Bob-1: Yamshidi-Trepanat des Knochenmarks eines Plasmozytoms. Man erkennt deutlich positive Plasmazellen für Bob-1. Oct-1, Oct-2 und Pax-5 werden nicht in neoplastischen Plasmazellen exprimiert (Vergrößerung 1:250).

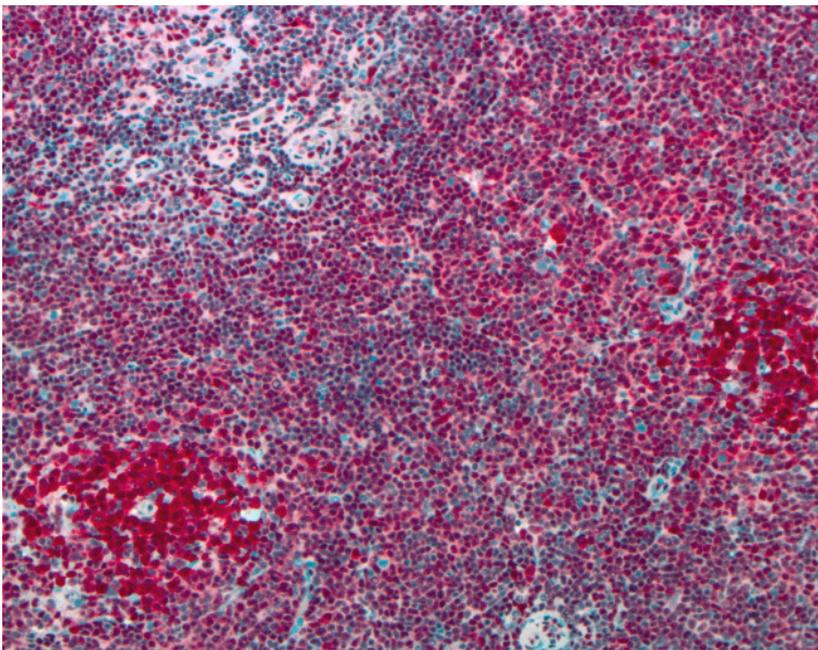


Abb. 4. Bob-1: Mantelzellenlymphom mit sogenannter Mantelzonenausbreitung. Keimzentrumsreste färben sich stärker positiv als neoplastische Mantelzellen in der Mantel- und Interfollikulärzone (Vergrößerung 1:200).

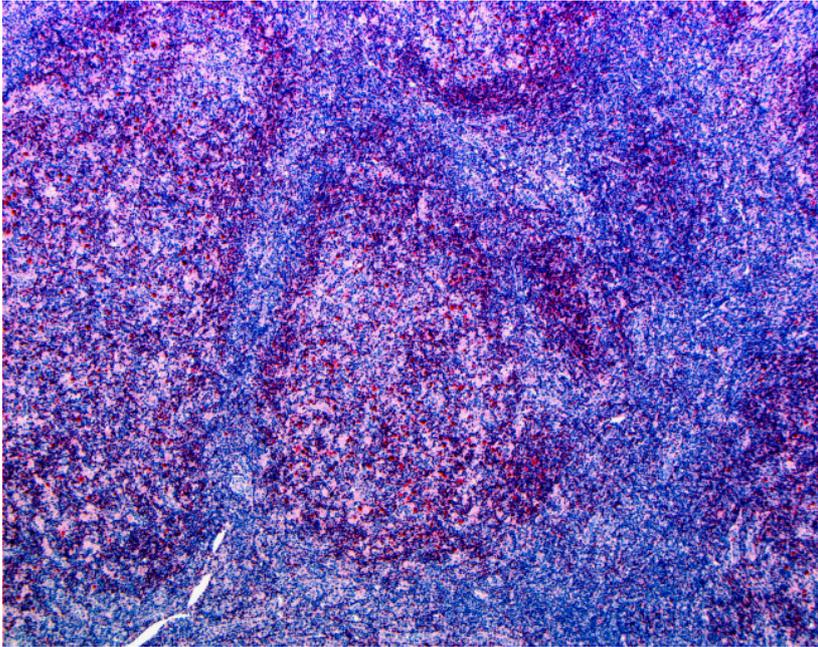


Abb. 5. Oct-2: NLPHD mit kräftiger Oct-2-Expression in den L- und H-Zellen. Das Keimzentrum weist eine, für das NLPHD typische Verbreiterung der Mantelzone auf (Vergrößerung 1:100).

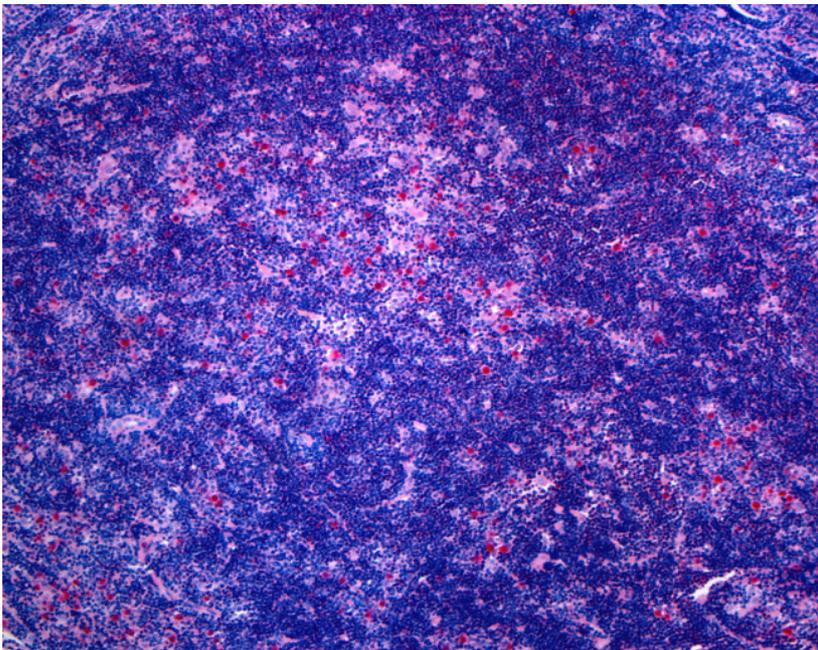


Abb. 6: Oct-2: NLPHD. Ausschnitt aus Abb. 5. Die Tumorzellen des NLPHD (L- und H-Zellen) exprimieren Oct-2 stark. Das mottenfraßähnlich zersiedelte Keimzentrum (progressiv transformiertes Keimzentrum) ist typisch für NLPHD. Die reaktiven, Oct-2 schwächer positiven Mantelzonen-B-Zellen kolonisieren von aussen die Keimzentren, die entsprechend zersiedelt werden (Vergrößerung 1: 100).

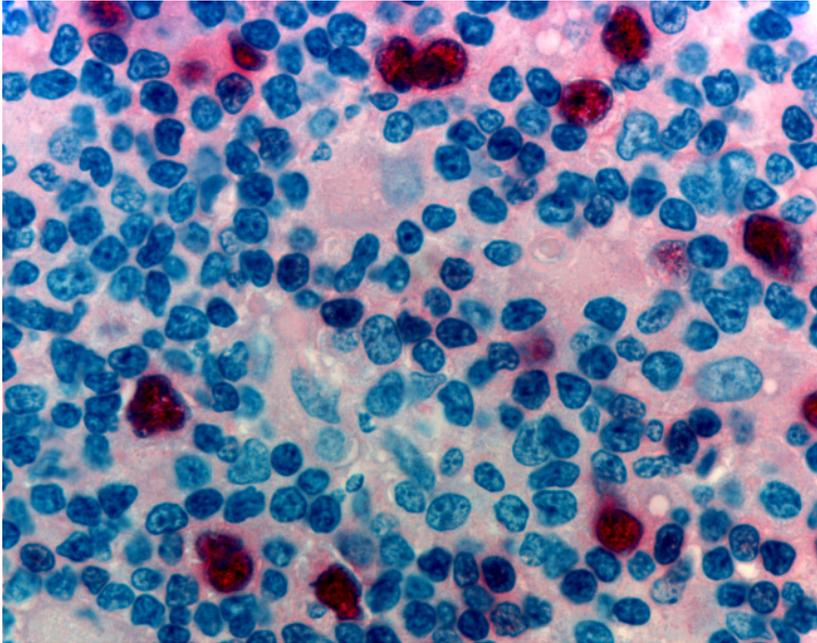


Abb. 7. Oct-2: NLPHD. Ausschnitt aus Abb 5. Man erkennt stark positive Tumorzellen, die sich gut von der Umgebung und den schwächer positiven Mantelzonen-B-Zellen abgrenzen lassen (Vergrößerung 1:600).

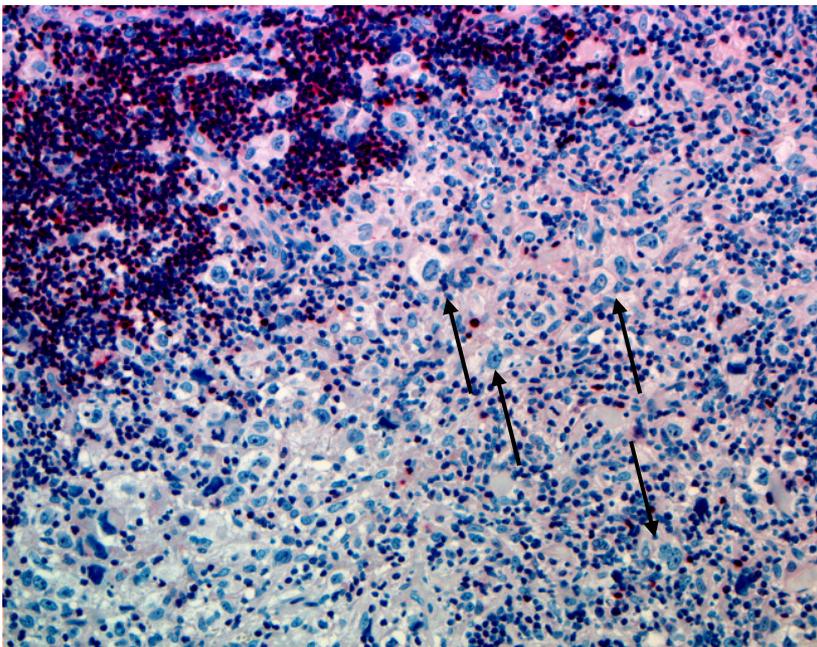


Abb. 8. Oct-2: cHD. Mehrere Hodgkinzellen sind mit Pfeilen markiert. Hodgkinzelle. Im Gegensatz zu NLPHD sind die Tumorzellen des cHD (Reed-Sternberg- und Hodgkinzellen) oft negativ für Oct-2 (Vergrößerung 1:200).

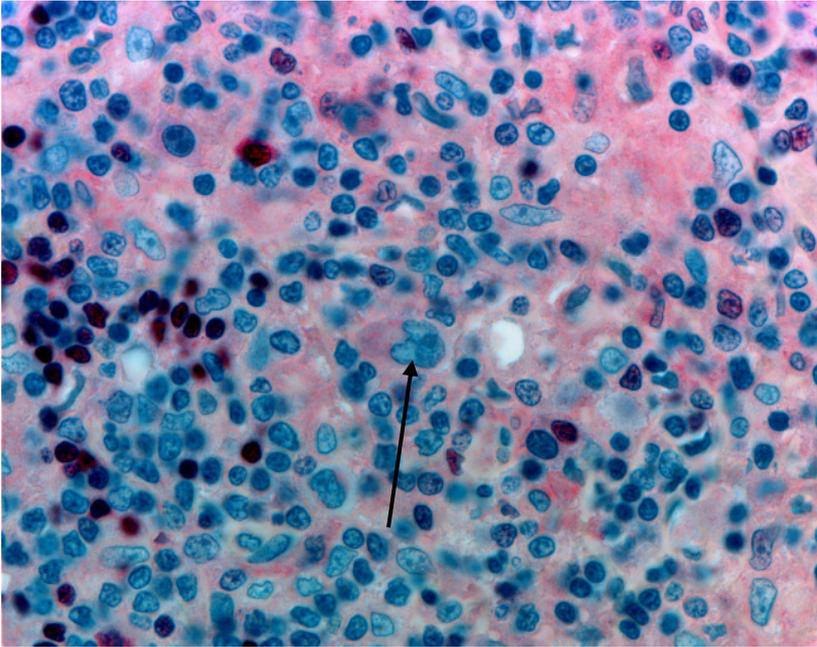


Abb. 9. Oct-2: Ausschnitt aus Abb. 8. Die in der Mitte des Bildes gut zu erkennende Reed-Sternberg-Zelle (Pfeil) exprimiert kein Oct-2 (Vergrößerung 1:630).

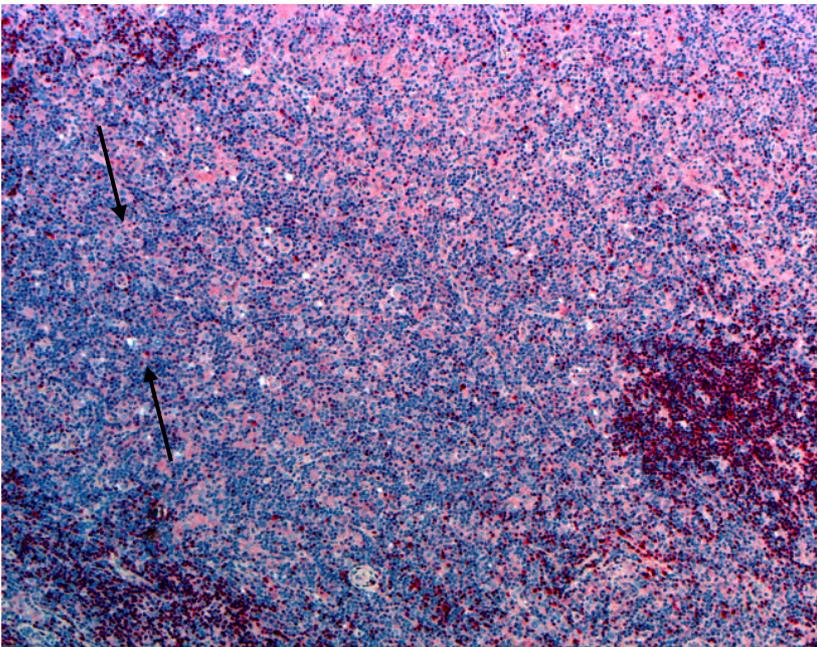


Abb. 10. Oct-2: cHD. Schon bei Vergrößerungen von 1:100 erkennt man Oct-2-negative Hodgkinzellen (Vergrößerung 1:100).

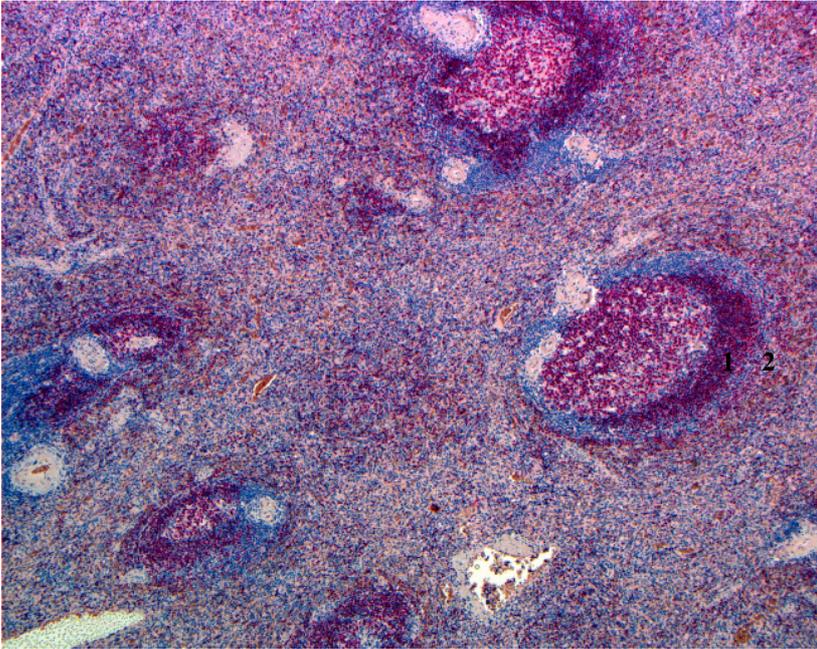


Abb. 11. Pax-5: normale Milz. Bei Färbungen mit Pax-5 erkennt man oftmals eine Zweiteilung der Mantel- und Marginalzone (Vergrößerung 1:100). 1: innere Zone stark, 2: äußere Zone schwach gefärbt

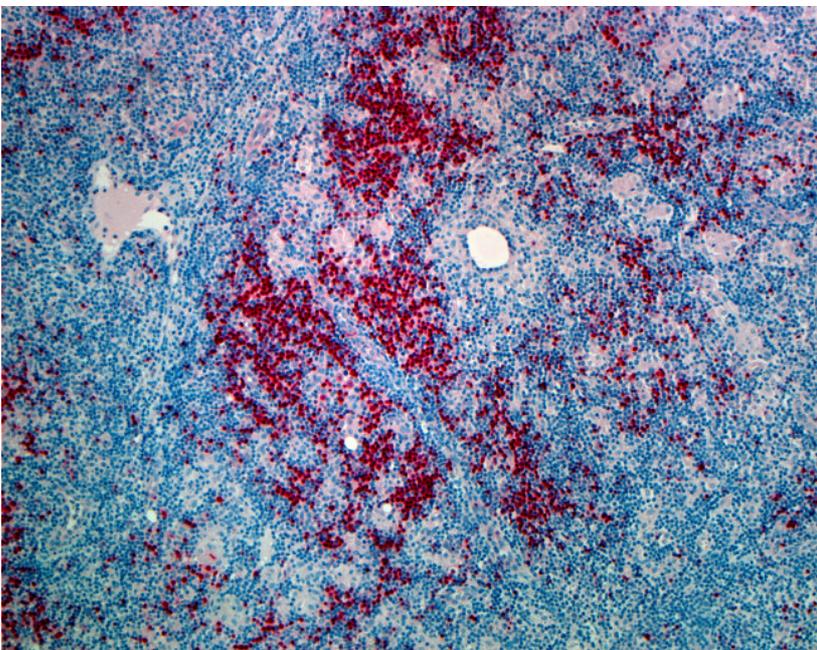


Abb. 12. Pax-5: cHD. Im Gegensatz zu den Tomorzellen des ALCL exprimieren die Tumorzellen des cHD regelmäßig Pax-5 (Vergrößerung 1:100).

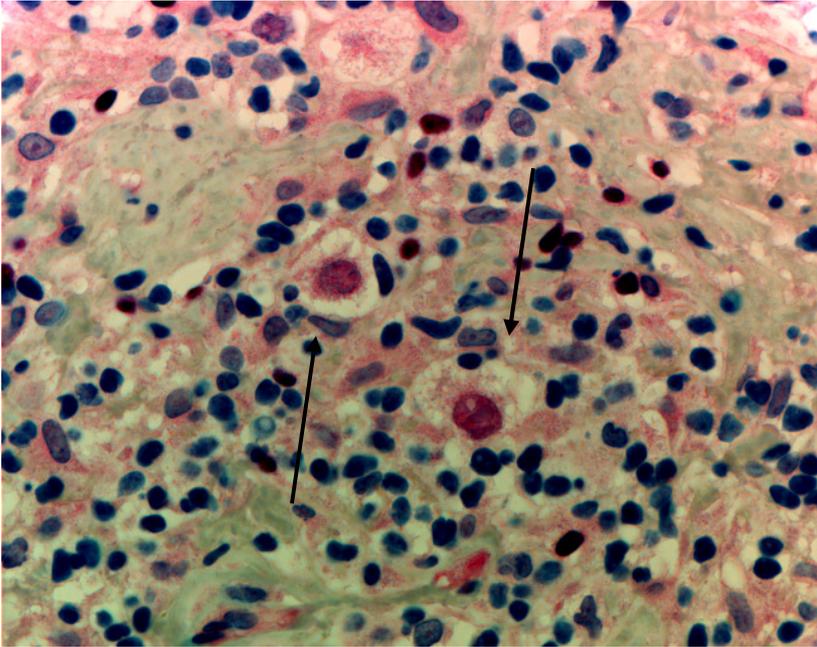


Abb. 13. Pax-5: cHD. Ausschnitt aus Abb. 12. Darstellung nukleär mittelstark positiver Hodgkinzellen (Pfeil) für Pax-5 (Vergrößerung 1:400).

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. H. Merz, für seine hilfreiche Unterstützung beim Erstellen des Doktorarbeitsthemas, für die gute Betreuung während der erfolgreichen Umsetzung der Arbeit sowie die zu jeder Zeit geduldige Beantwortung offener Fragen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. A. C. Feller für die Möglichkeit, am Institut für Pathologie der Universität Lübeck promoviert haben zu können sowie für das großzügige Bereitstellen von Arbeitsräumen und Materialien.

Ich bedanke mich bei den medizinisch-technischen Assistenten des Ecklabors für das Einarbeiten, das freundliche Beantworten jeder Frage und das Schneiden von Leerschnitten.

Ich danke dem Sekretariat und dem Schreibbüro des pathologischen Instituts für die gute Zusammenarbeit.

Ich danke meinem geliebten Mann, Anton Grechnykh, für den Rückhalt, die Motivation und die große Unterstützung während des Erstellens der Arbeit sowie für das Korrekturlesen und das Formatieren.

Meiner Familie danke ich, da erst sie mir durch ihre Unterstützung das Medizinstudium und die Dissertation ermöglichten.

Ich danke meinen Freunden, die mir während der gesamten Dissertation aufbauend zur Seite standen.

10. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Karen Kröger
Geburtsdatum / -ort: 28.09.1976, Hamburg
Anschrift: Farkenwisch 21a, 22397 Hamburg
Telefon: 0178 / 3599 751

Schulbildung

1983-1987 Grundschole Duvenstedter Markt, Hamburg
1987-1996 Gymnasium Ohlstedt, Hamburg
1996 Abitur, Note 1,9

Studium

10.1996 Humanmedizin, Universität Hamburg
09.1998 **Physikum**, Wechsel zur Universität zu Lübeck
09.2000 Erstes Staatsexamen
04.2002 Zweites Staatsexamen
11.2003 **Drittes Staatsexamen**, Gesamtnote 2,16 (gut)

Famulaturen

03.1999 – 04.1999 **Innere Medizin**, Amalie-Sieveling-Krankenhaus, Hamburg
06.1999 **Chirurgie**, Elim-Krankenhaus, Hamburg
09.1999 **Anästhesie**, Ealing-Hospital NHS Trust, London
01.2001 **Allgemeinarztpraxis** Dr. Brand, Lübeck
03.2001 – 04.2001 **Pathologie**, Universitätsklinikum Lübeck
08.2001 **Radiologie**, Universitätsklinikum Lübeck

Praktisches Jahr

08.2002 – 11.2002	Innere Medizin: Gastroenterologie, Kardiologie, Sana-Kliniken, Lübeck
11.2002 – 03.2003	Anästhesie, SRO Langenthal, Schweiz
03.2003 – 07.2003	Chirurgie, St. John's Hospital, Edinburgh, Schottland, Ninewells Hospital, Dundee, Schottland

Berufserfahrung

05.2004 – 09.2004	Ärztin im Praktikum, Innere Medizin, Sana-Kliniken, Lübeck
Seit 10.2004	Assistenzärztin, Innere Medizin, Sana-Kliniken, Lübeck

Promotion

Seit 10.2000	Arbeit am Institut für Pathologie, Universität zu Lübeck (Prof. Dr. med. A. C. Feller). Promotionsthema: „Nachweis neuer B-Zellmarker für die hämatopathologische Diagnostik“.
--------------	---

Zusatzqualifikationen

1998-2000	Extrawachen, Universitätsklinikum Lübeck
2000-2004	Akupunkturkurse bis Diplom A gemäß der Deutschen Ärztesgesellschaft für Akupunktur (DÄGfA)
2003	Dienste auf dem Notarzteinsatzfahrzeug (NEF), Universitätsklinikum Lübeck

Sprachkenntnisse

Englisch:	sehr gut
Französisch:	gut
Russisch:	einfache Konversation

Lübeck, 14.11.2004