





Aus dem Institut für Pathologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Prof. Dr. med. H. K. Müller-Hermelink

**Immunhistochemische Untersuchungen zu  
Differenzierungsstadien der B-Lymphozyten  
in EBV-assoziierten Lymphoproliferationen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Esther Klauss  
aus Neubeuern

Würzburg, Januar 2007

Referent: Prof. Dr. med. T. Rüdiger

Koreferent: Prof. Dr. med. H. K. Müller-Hermelink

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2007

Die Promovendin ist Ärztin

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
Das Immunsystem.....	1
B-Lymphozyten.....	1
Das Epstein-Barr Virus (EBV).....	5
EBV assoziierte Erkrankungen.....	8
Primäre Infektion: Akute infektiöse Mononukleose.....	8
Latente Infektionen: Morbus Hodgkin.....	8
Post-Transplantation-Lymphoproliferationen.....	11
Senile Lymphoproliferationen.....	12
<b>Problemstellung</b> .....	<b>14</b>
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
Fälle.....	16
Verwendete Antikörper.....	18
Immunhistochemie.....	20
Immunfluoreszenz.....	20
EBER in situ Hybridisierung.....	21
Auswertung.....	22
<b>Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
Zelltyp der infizierten Zelle.....	23
Differenzierungsstadium der infizierten Zelle.....	23
Differenzierungsweg der infizierten Zelle.....	26
Immunglobulinsynthese der infizierten Zelle.....	28
Bestimmung der latenten viralen Proteine.....	33
Multivariate Clusteranalyse.....	35
Vergleich EBV+ und EBV- Hodgkin Lymphome.....	36
<b>Diskussion</b> .....	<b>38</b>
Differenzierungsstadium und Immunglobulinsynthese der EBV-infizierten Zelle.....	38
Bestimmung der latenten viralen Proteine.....	41
Einordnung der senilen Lymphoproliferationen.....	42
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>45</b>
<b>Literatur</b> .....	<b>46</b>



## **Einleitung**

### **Das Immunsystem**

Das Immunsystem ist verantwortlich für den Schutz des Organismus und die Erhaltung seiner Integrität. Dazu sind komplexe Vorgänge notwendig, deren Fehlsteuerung zur Entstehung von Krankheiten führen kann. Man unterscheidet zwischen spezifischer und unspezifischer Immunabwehr, welche jedoch eng ineinander greifen. Die weniger differenzierte, unspezifische Immunantwort, hauptsächlich vermittelt durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten, ist für die schnelle, erste Verteidigung der Körpers verantwortlich. Um jedoch ein größeres Spektrum infektiöser Organismen bekämpfen zu können und dauerhaften Schutz vor erneuten Infektionen bieten zu können, bedarf es zusätzlich flexiblerer Abwehrmechanismen. Eine entscheidende Rolle haben dabei Lymphozyten, die in der Lage sind Pathogene spezifisch zu erkennen und gezielt zu bekämpfen.

Bei Lymphozyten unterscheidet man zwischen B- und T-Lymphozyten, die zwar von den gleichen, pluripotenten, lymphoiden Stammzellen des Knochenmarks abstammen, sich jedoch in Entwicklung und Funktion deutlich unterscheiden. T-Lymphozyten reifen im Thymus heran, bevor sie in Blutbahn und periphere Lymphorgane wandern, um dort die zellvermittelte Abwehr auszuüben. B-Lymphozyten, deren Reifung im Knochenmark erfolgt, leisten die spezifische humorale Abwehr des Körpers<sup>1</sup>.

Da sich die vorliegende Arbeit mit eben dieser Facette des Immunsystems, den B-Lymphozyten, befasst, sollen deren Entwicklung und Funktion genauer erklärt werden.

### **B-Lymphozyten**

Im Knochenmark reifen die lymphoiden Stammzellen antigenunabhängig heran. Lymphozyten der B-Zellreihe besitzen von Anfang an die Fähigkeit Immunglobuline zu synthetisieren. Immunglobuline setzen sich aus schweren (H=heavy) und leichten (L=light) Ketten zusammen, die jeweils aus einem konstanten (C) und einem variablen (V) Anteil aufgebaut sind. In Pro-B-Zellen findet zunächst eine somatische Rekombination von separaten Gensegmenten

der V-Region statt. Anschließend erfolgt eine zufällige Umordnung und Kombination von V-, D-(diversity) und J-(joining) Gensegmenten zu einem kompletten V-Region-Exon der Schwerketten. Mit Abschluss eines erfolgreichen VDJ<sub>H</sub>-Genrearrangement, kommt es zur Expression einer intakten  $\mu$ -Kette, wobei die Zelle in das Prä-B-Zellstadium übergeht. Sind danach auch die VJ<sub>L</sub>-Gensegmente umgeordnet und erscheint IgM auf der Zelloberfläche spricht man von einer unreifen B-Zelle. Hieraus resultiert die große Vielfalt des Repertoires an Immunglobulinen, welches bedeutet, dass der Antigenrezeptor (B-Zell-Rezeptor)  $10^{11}$  verschiedene Antikörpermoleküle beim Menschen codiert<sup>1</sup>.

Beim Verlassen des Knochenmarks bilden die B-Zellen auf der Zelloberfläche neben IgM auch IgD aus. Nach Eintritt in das periphere Lymphsystem findet ein „homing“, ein Einnisten der B-Lymphozyten im Lymphknoten in Form von Primärfollikeln statt. In reifen, naiven B-Zellen sind die Oberflächenmarker CD20 und CD79 $\alpha$  exprimiert. Die Funktion der CD20-Moleküle wird in der Bildung von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen vermutet. CD79 $\alpha$  ist, neben den Immunglobulinen, eine Komponente des Antigenrezeptors von B-Zellen, analog zu CD3 der T-Zellen<sup>1</sup>.

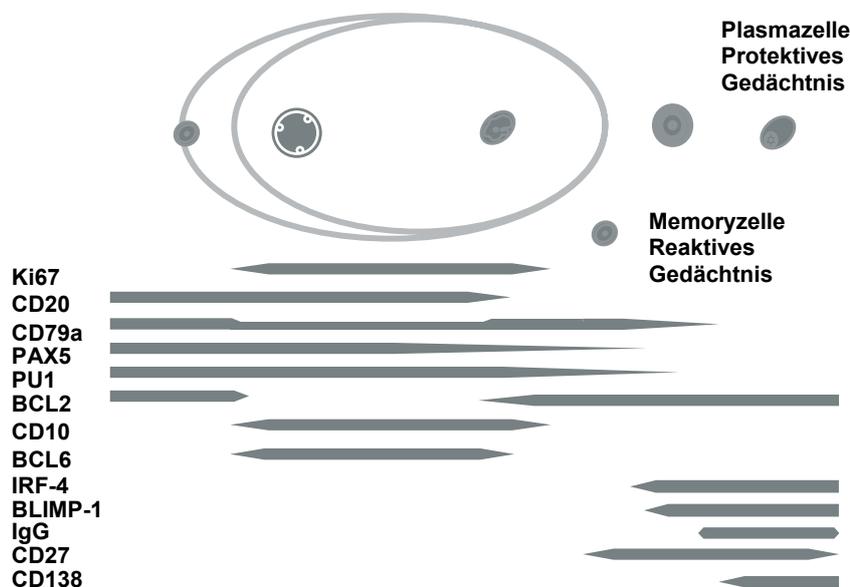


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Expression von Oberflächenmolekülen und Transkriptionsfaktoren während der Keimzentrumsentwicklung (adaptiert nach Brighenti et al.<sup>2</sup>).

Ruhende, naive B-Zellen können T-Zell-abhängig oder T-Zell-unabhängig durch unmittelbaren Antigenkontakt aktiviert werden. Durch die Stimulation kommt es zur Differenzierung der B-Zelle, die mit Veränderungen der Genexpression von Transkriptionsfaktoren, sowie Oberflächenmolekülen einhergeht (Siehe Abbildung 1) <sup>3</sup>. In dem nun als Sekundärfollikel bezeichneten Follikel entwickeln sich die B-Zellen zunächst in der dunklen Zone zu schnell proliferierenden Centroblasten. Wenn B-Zellen nach Antigen-Stimulation in das Keimzentrum eintreten, werden bcl-6 und CD10 in proliferierenden B-Zellen hochreguliert. Nach weiterer Reifung und unter Beendigung der Proliferation wandern die dann kleineren, als Centrozyten bezeichneten, Lymphozyten in die helle Zone des Follikels. Dort beginnt die Spezialisierung der Centrozyten zu immunglobulinsezernierenden Plasmazellen und ruhenden Memory-Zellen. Dabei kommt es unter anderem in der V-Region der Immunglobulingene zu einer somatischen Hypermutation. Dadurch wird die Vielzahl der vorhandenen Antikörper erweitert, von denen einige das Antigen mit erhöhter Affinität binden. Auf diese Weise kann die Affinität der Antikörperreaktion, und somit die Wirkung der Immunantwort, zunehmen. Des Weiteren findet ein Isotypen- oder Klassenwechsel der C<sub>H</sub>-Regionen der Immunglobuline statt, wodurch neben den zuerst synthetisierten Immunglobulinklassen IgM und IgD, nun auch IgG, IgA und IgE sezerniert werden. Dadurch ändert sich die Spezifität der sezernierten Antikörper kaum, die Effektorfunktion der jeweiligen Antikörperklassen variiert jedoch deutlich<sup>1</sup>.

Nach dem Verlassen des Keimzentrums verschwinden bcl-6 und CD10, CD27 hingegen wird zunehmend exprimiert. CD27, ein Mitglied der TNFR (Tumornekrosefaktor Rezeptor)-Familie, ist auf naiven B-Zellen negativ und findet sich gehäuft positiv auf Keimzentrums- und Memory-Zellen mit somatisch hypermutierten V-Region Genen<sup>4-6</sup>. Da dieser Prozess follikulär abläuft, eignet sich CD27 zum Nachweis von B-Zellen die eine Follikelpassage durchgemacht haben. Im Zellkern aktivierter Zellen ist der Transkriptionsfaktor Icsat (MUM-1/IRF-4) erst ab dem Centrozyten Stadium positiv, das heißt, die Expression von Icsat tritt als einer der letzten Schritte in der Entwicklung der B-Zelle auf und bleibt danach über die Entwicklung zur Plasmazelle hinaus bestehen <sup>7</sup>. Blimp-1, ein Marker der späten B-Zellentwicklung, induziert die terminale

Differenzierung zur Plasmazelle, unterdrückt die Proliferation, sowie die Keimzentrums- und B-Zellrezeptorfunktion der B-Zelle <sup>8</sup>.

Neben dem intrafollikulären Ablauf der B-Zellentwicklung ist auch ein Differenzierungsweg außerhalb des Follikels beschrieben. Brighenti et al zeigten bei der Untersuchung menschlicher Lymphknoten zwei Varianten extrafollikulärer B-Zellaktivierung. Die in den T-Zell-reichen Markzonen des Lymphknoten ablaufende Aktivierung des B-Lymphozyten wird als schnelle, innerhalb der ersten fünf Tage nach Antigenkontakt einsetzende, Antwort des Immunsystems verstanden<sup>9,10</sup>, bei der, anders als im Rahmen der follikulären Aktivierung, Proliferation und Immunglobulinproduktion simultan auftreten. Brighenti et al beschreiben zum einen naive, proliferierende, IgM positive, CD27 negative B-Zellen als primäre Immunreaktion (Siehe Abbildung 2), zum andern proliferierende IgG positive, CD27 positive, d.h. postfollikuläre Memoryzellen die über das Stadium des Plasmoblasten zu langlebigen Plasmazellen reaktiviert werden (siehe Abbildung 3)<sup>2</sup>.



Abbildung 2: Schematische Darstellung der Expression von Oberflächenmarkern und Transkriptionsfaktoren während der Primärantwort bei extrafollikulärer Aktivierung (adaptiert nach Brighenti et al.<sup>2</sup>).

Entgegen der Annahme, extrafollikulär differenzierte Lymphozyten seien kurzlebige, nicht ausdifferenzierte Zellen, konnte, wenn auch nur in seltenen Fällen, gezeigt werden, dass diese Zellen sehr wohl eine komplette Entwicklung zur Plasmazelle mit class-switch erreichen können. Allerdings findet nur eine geringe Somatische Hypermutation statt <sup>11</sup>.



Abbildung 3: Schematische Darstellung der Expression von Oberflächenmarkern und Transkriptionsfaktoren während der Memory-Zell Aktivierung bei extrafollikulärer Aktivierung (adaptiert nach Brighenti et al.<sup>2</sup>).

### Das Epstein-Barr Virus (EBV)

Denis Burkitt beschrieb 1962 in der Zeitschrift Nature ein kindliches Lymphom, das Burkitt-Lymphom, bei welchem er ein endemisches Auftreten in Äquatorialafrika beobachtete. Aufgrund der damals beobachteten klimatischen Begrenzung wurde der Verdacht geäußert, dass eine, durch Moskitos übertragene, Virusinfektion Ursache der Erkrankung sein könnte<sup>12</sup>. Tatsächlich entdeckten bald darauf Anthony M. Epstein und Yvonne M. Barr in Zellkulturen dieses Lymphoms herpesvirusartige Partikel und identifizierten damit das erste onkogene Virus, das Epstein-Barr-Virus<sup>13</sup>.

Bei EBV handelt es sich um ein DNA-Virus der Gammasubfamilie der Herpesviridae<sup>14</sup>. Es vermag eine Transformation der infizierten Zellen im Sinne einer Imortalisierung<sup>15</sup> und blastoiden Entartung zu bewirken. Tatsächlich ist das EBV nicht auf Äquatorialafrika begrenzt, sondern weltweit verbreitet. In Westeuropa sind über 95% der Menschen vor dem 30. Lebensjahr mit EBV infiziert, in Zentralafrika sind fast alle Kinder schon mit drei Jahren infiziert<sup>14</sup>. Die sehr frühe Infektion, häufige Mangelernährung und Immunschwäche können womöglich das, in gewissem Widerspruch zu der globalen Verbreitung des Virus stehende, endemische Auftreten der Burkitt-Lymphome in Afrika erklären.

EBV kann Zellen infizieren, die den Glykoproteinrezeptor CD21 tragen. Die höchste Dichte an CD21 besitzen ruhende B-Zellen. CD21 fungiert dort als eine Komponente des Corezeptorkomplexes der B-Zelle<sup>1,14,15</sup>. Daher sind zumeist B-Lymphozyten die Zielzellen des EBV, doch auch die Infektion von T-Zellen, NK-Zellen oder epithelialen Zellen ist beschrieben<sup>16</sup>.

Wie andere Herpesviren verfügt das EBV über zwei unterschiedliche Überlebenswege im menschlichen Organismus. Zum einen die lytische Phase, in der neue, infektiöse Virionen entstehen und die durch die Expression phasenspezifischer, viraler Proteine gekennzeichnet ist. Zum anderen die latente Phase, in der die Expression viraler Proteine stärker begrenzt ist und so ein Überleben im Wirtsorganismus ermöglicht wird.

Die Primärinfektion des Menschen erfolgt in der Regel durch die Übertragung von Speichel. Vor allem im Kindesalter kann die Infektion asymptomatisch verlaufen. Im Rahmen der akuten Erstinfektion kann es jedoch zum Eintritt in die lytische Phase mit produktiver Virusvermehrung, anschließender Zerstörung der Wirtszelle und Aktivierung der Immunantwort unter dem Bild der infektiösen Mononukleose kommen<sup>15</sup>.

Bei intaktem Immunsystem werden die meisten EBV-infizierten Zellen rasch zerstört. Eine geringe Restpopulation infizierter Zellen, in welchen das Virus in die latente Phase eingetreten ist, kann überleben und im peripheren Blut eine lebenslange Viruspersistenz verursachen<sup>14</sup>.

Bei Patienten mit Immundefekten wird diese latente Infektion mit dem Auftreten von Tumoren in Zusammenhang gebracht. Heute wird die EBV-Infektion neben dem Burkitt-Lymphom bei mehreren Tumoren als ätiologische Komponente verstanden<sup>17</sup>. So bringt man eine Reihe maligner Lymphome infolge mangelnder Immunosurveillance bei Immunsuppression nach Transplantation (Post-Transplantations-Lymphoproliferation), Autoimmunerkrankung, HIV-Infektion, oder durch hohes Alter der Patienten (senile Lymphoproliferation) mit der latenten EBV-Infektion in Zusammenhang. Besonders für das klassische Hodgkin Lymphom wird eine Assoziation mit EBV beobachtet. So sind in Westeuropa und USA etwa 50% der klassischen Hodgkin Lymphome EBV-assoziiert<sup>18</sup>. Darüber hinaus gelten einige T- und NK-Zell-Lymphome und das nasopharyngeale Karzinom als EBV assoziiert<sup>19</sup>.

Latente EBV-Infektionen werden anhand von in vitro Untersuchungen in mehrere Latenztypen unterteilt. EBV infizierte B-Lymphoblasten-Zellkulturen (LCL) exprimieren EBER (small nonpolyadenylated RNAs), BamHI A RNAs (deren Genprodukt noch nicht gefunden ist), sechs mRNAs, die für das virale nukleäre Antigen (EBNA 1,2,3A,3B,3C und –LP) codieren, sowie drei BamHI N RNAs, die für das latente Membran Protein (LMP1,2A,2B) codieren. Sind all diese Gene transkribiert handelt es sich um Latenztyp III. Ist die virale Antigenexpression auf EBER, LMP 1, 2A, 2B und EBNA1 beschränkt spricht man von Latenztyp II. Um Latenztyp I handelt es sich, wenn lediglich EBER und EBNA1 exprimiert werden<sup>17</sup>. Hierzu siehe auch Tabelle 1. Virale Proteine lassen sich dabei durch immunhistochemische Verfahren darstellen, EBER kann durch in-situ Hybridisierung nachgewiesen werden.

Latenz	<b>EBERS</b>	BamHI A RNAs	EBNA-1	<b>EBNA-2</b>	EBNA-3 A/B/C	EBNA-LP	<b>LMP-1</b>	LMP-2A/B	Vorkommen (in vivo)
0	+	(+)	-	-	-	-	-	-	Memory-Zellen im peripheren Blut
I	+	+	+	-	-	-	-	-	Burkitt Lymphom
II	+	+	+	-	-	-	+	+	Hodgkin Lymphom
III	+	+	+	+	+	+	+	+	PTLD

Tabelle 1: Latenzmodel EBV-infizierter Zellen (in vitro)<sup>17,20</sup>. Transkribierte, latente Gene des EBV sind mit + gekennzeichnet. Die fettgedruckten latenten Gene fanden in dieser Arbeit zur Unterscheidung der Latenzmuster der EBV-infizierten Zellen Verwendung.

Tatsächlich ist eine derart klare Trennung in vivo nicht zu finden. So sind auf Einzelzellebene verschiedene Latenzen in einem Lymphknoten zu sehen und auch latente und lytische Phasen kommen nebeneinander vor<sup>21,22</sup>. Doch ermöglicht das in vitro Model eine Unterteilung der EBV-assoziierten Krankheiten nach dem Überwiegen der jeweiligen Latenztypen.

Welche pathogenetische Bedeutung dem vorherrschenden Latenzmuster bei den unterschiedlichen Krankheitsgeschehen beizumessen ist, konnte noch nicht hinreichend geklärt werden.

Im Folgenden soll auf einige der genannten EBV-assoziierten Krankheiten, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, näher eingegangen werden.

## **EBV assoziierte Erkrankungen**

### **Primäre Infektion: Akute infektiöse Mononukleose**

Neben dem häufig inapparenten Verlauf tritt vor allem im Jugendalter die EBV-Infektion in Form einer Erkrankung auf, die als akute infektiöse Mononukleose, oder auch als Pfeiffersches Drüsenfieber bezeichnet wird. Die Symptomatik kann zwischen milden Verläufen mit leichtem Fieber, begleitet von Gliederschmerzen und schweren Verläufen mit typischerweise generalisierter Lymphknotenschwellung, Tonsillitis oder Pharyngitis, sowie gelegentlich Hepato-(Spleno-)megalie und Ikterus variieren<sup>23,24</sup>. Im Blutbild findet sich eine Lymphozytose mit atypischen, mononukleären Lymphoidzellen (Downey-Zellen)<sup>25</sup>.

Histologisch zeigen sich die meist extrafollikulär liegenden, infizierten Zellen blastär transformiert, mit großen Kernen, prominenten Nukleolen und basophilem Zytoplasma, die eine entfernte Ähnlichkeit zu Sternberg-Reedzellen des Hodgkin-Lymphoms aufweisen<sup>26</sup>. Die parakortikalen Regionen sind stark mit atypischen, proliferierenden Lymphozyten, vor allem CD8+ T-Zellen<sup>17</sup> infiltriert. Daneben findet sich auch eine geringe, follikuläre B-Zellreaktion. Trotz der intensiven Lymphoproliferation bleibt die Lymphknotenarchitektur mit orthotopen B- und T-Zellarealen weitgehend erhalten<sup>26</sup>. Bei subklinischen Verlaufsformen hingegen zeigt sich, trotz gelegentlich hoher Viruslast, nur eine geringe T-Zell Proliferation<sup>17</sup>.

Die Prognose ist meist gut. Jedoch können bei Patienten mit Immunschwäche Komplikationen, wie die chronisch-aktive EBV-Infektion<sup>15</sup>, Meningoencephalitis, Nephritis oder Milzruptur<sup>14</sup> auftreten.

### **Latente Infektionen:**

#### **Morbus Hodgkin**

Heute werden zwei Hauptgruppen des Hodgkin Lymphoms unterschieden: Zum Einen, das klassische Hodgkin Lymphom, welches die noduläre Sklerose, den lymphozytenarmen und den lymphozytenreichen Typ, sowie den Mischtyp umfasst. Zum Anderen das noduläre, lymphozytenprädominante Hodgkin Lymphom (NLPHL), welches vermutlich eine separate klinische Entität darstellt, welche fast nie EBV-assoziiert ist<sup>18</sup>.

Den Subtypen des Hodgkin Lymphoms ist das Auftreten maligner Zellpopulationen, sogenannter Hodgkin- und Sternberg-Reed Zellen in einem reaktiven Infiltrat, nicht maligner Zellen, welches bis zu über 98% der Tumormasse ausmachen kann, gemeinsam<sup>17</sup>. Hodgkinzellen sind große, einkernige Lymphozyten<sup>27</sup>. Sternberg-Reed Zellen sind meist vereinzelt oder in Gruppen gelegene, mehrkernige Riesenzellen, mit 2 bis 5 Kernen, die jeweils im Zentrum einen prominenten, eosinophilen Nukleolus aufweisen<sup>28</sup>. In den meisten Fällen des klassischen Hodgkin Lymphoms sind die Tumorzellen CD30 positiv. CD30, Mitglied der TNF-Familie, ist ein Membranprotein, welches abhängig von Zellart und Differenzierungsstatus, über verschiedene Signalwege Aktivierung, Proliferation, Differenzierung und Tod der Zelle bewirken kann. CD30 wird auf Memoryzellen, auf T-Zellen und auf den Sternberg-Reed-Zellen des Hodgkin-Lymphoms exprimiert. Außer beim anaplastischen, großzelligen Lymphom (ALCL) ist CD30 in Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zellreihe in der Regel nicht oder nur sehr schwach nachzuweisen<sup>29</sup> und dient dadurch als diagnostisches Unterscheidungskriterium. CD15, ein Trisaccharid der Zelloberfläche von Glykolipiden und Glykoproteinen, ist häufig positiv, ein Fehlen schließt die Diagnose Hodgkin Lymphom jedoch nicht aus. Hodgkin- und Sternberg-Reed Zellen zeigen oft nur geringe oder keine Expression der Pan-B-Zellmarker CD20 oder CD79 $\alpha$  und synthetisieren keine Oberflächenimmunglobuline<sup>18,26</sup>. Dennoch konnte in den Tumorzellen das Stattfinden von B-Zell-typischen somatischen Hypermutationen der V-Region-Gene nachgewiesen werden<sup>30</sup>. Aufgrund dieser Beobachtung wurde von Küppers et al. die präapoptotische Keimzentrums-B-Zelle als Ursprungszelle gesehen<sup>31,32</sup>, welche trotz fehlender Fähigkeit zur Immunglobulinsynthese nicht in Apoptose geht<sup>33</sup>. Entsprechend der CD30 Expression der Hodgkin Zelle beschreiben Brighenti et al. die CD27 positive, CD30 positive reaktivierte Memory-B-Zelle als korrespondierende Normalzelle<sup>2</sup>. Ursachen für die fehlende Antikörperproduktion können in der Integrität kodierender<sup>34,35</sup> und regulatorischer<sup>36</sup> Genabschnitte liegen. Auf Proteinebene wurden neben fehlenden Transkriptionsfaktoren (BOB1, Oct2 und Pu.1)<sup>37,38</sup> auch epigenetische „Silencing“-Mechanismen beschrieben, die durch Methylierung des Histons H3 die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Immunglobulinschwerkettengen-Promotor verhindern<sup>39</sup>.

Durch welche Mechanismen die Tumorzellen des Hodgkin Lymphoms der Apoptose entgehen ist bislang noch nicht geklärt. Bei EBV-assoziierten Hodgkin Lymphomen ist als antiapoptotischer Mechanismus die virale Transformation mit daraus resultierender Immortalisierung der infizierten Zellen wahrscheinlich. Hierfür werden virale Proteine wie unter anderem die bcl-2 Homologe BHRF1 und BALF1 verantwortlich gemacht. Es wurde gezeigt, dass ein Fehlen dieser Proteine zur Apoptosereaktion führt<sup>40</sup>, ein Vorhandensein dagegen die Apoptose zu verhindern vermag. So ist es möglich, dass diese durch das Virus transformierten, unvollständig aktivierten und zur Immunglobulinsynthese nicht befähigten Hodgkin Zellen als Tumorzellen überleben und proliferieren.

In seltenen Fällen wurden Hodgkin Lymphome beschrieben, bei welchen die Tumorzellen von T-Lymphozyten abstammen<sup>28,41</sup>.

Sowohl in Europa, als auch in den USA lässt sich ein altersabhängig gehäuftes Auftreten des Hodgkin Lymphoms beobachten. Besonders betroffen sind zum Einen Patienten im jungen Erwachsenenalter, zum Anderen Patienten im fortgeschrittenen Lebensalter<sup>42,43</sup>.

Die Assoziation mit dem Epstein-Barr Virus ist bei den einzelnen Subtypen und je nach Kontinent verschieden häufig. Insgesamt tragen 35 bis 50% aller Fälle des klassischen Hodgkin Lymphoms das EBV Genom. Es handelt sich dabei um eine latente Infektion entsprechend einem Latenztyp II<sup>18,26</sup>. Das EBV zeigt sich in diesen Fällen in klonaler, episomaler Form, was auf eine Infektion vor der neoplastischen Transformation der Zelle hinweist und vermuten lässt, dass das EBV eine pathogenetische Rolle spielt<sup>18</sup>. Welche Mechanismen dabei im Einzelnen an der Entstehung des Hodgkin Lymphoms teilhaben, ist nicht vollständig geklärt. Bemerkenswert ist, dass in EBV positiven und in EBV negativen Fällen die erkrankten B-Zellen morphologisch das gleiche Erscheinungsbild aufweisen<sup>17</sup>. Mittlerweile gilt das Hodgkin Lymphom als Erkrankung mit sehr guten Heilungsraten<sup>18,41,43</sup>.

## **Post-Transplantations-Lymphoproliferation (PTLD)**

Unter diesem Begriff werden mehrere Erkrankungen zusammengefasst, welche durch die nach Organ- oder Stammzelltransplantation notwendige Immunsuppression bedingt sind. Ein Zusammenhang zwischen Inzidenz der PTLD und Art oder Ausmaß der Immunsuppression konnte nicht bestätigt werden. Die Inzidenz scheint aber in engem Zusammenhang mit dem transplantierten Organ zu stehen. So fanden sich PTLD nach Nierentransplantation in nur 0,7% der Fälle, bei Herz- und Lungentransplantation in bis zu 10% und nach Dünndarm- oder Pankreastransplantationen in etwa einem Drittel der Fälle<sup>44</sup>. In etwa 80-90% aller Fälle liegt eine Assoziation mit dem Epstein-Barr Virus vor. Bei dem hier vorherrschenden Latenztyp III werden alle latenten Virusproteine exprimiert<sup>45</sup>. Man unterscheidet zwischen Patienten die durch das Transplantat mit EBV infiziert wurden, welche die Mehrheit bilden, und solchen, die bereits vor der Transplantation sero-positiv waren. Des Weiteren wird unterteilt nach nodaler oder extranodaler Manifestation, sowie, ob die proliferierenden Zellen von Spender oder Empfänger stammen<sup>46</sup>. Bei PTLD aus Spenderlymphozyten treten die Tumoren im Mittel fünf Monate nach Transplantation auf. PTLD durch Empfängerlymphozyten treten nach durchschnittlich 75 Monaten auf und haben eine schlechtere Prognose<sup>44</sup>. Die post-transplant Lymphoproliferationen werden histologisch unterteilt. Prognose und Verlauf der einzelnen Lymphoproliferationen variieren deutlich.

So wird einmal die Gruppe der „early lesions“ beschrieben, die als Plasmazell-Hyperplasien, atypische lymphoide Hyperplasien oder als Mononukleose ähnliche Läsionen innerhalb weniger Monate nach Transplantation auftreten. Die proliferierenden Zellen sind häufig polyklonale, differenzierte Plasmazellen und Lymphozyten des Empfängers, die nur geringe Atypien aufweisen und durch EBV des Empfängers infiziert wurden<sup>44</sup>. Auch die ursprüngliche Architektur des Organs ist weitgehend erhalten. Mit ca. 55% der PTLD stellen diese relativ gutartigen, bei Reduktion der Immunsuppression häufig rückläufigen, Lymphoproliferationen die Mehrheit dar.

Die zweite Gruppe sind mit 30% der PTLD die sogenannten polymorphen Proliferationen, die alle Stadien der B-Zellentwicklung zeigen. Im Gegensatz zu den „early lesions“ findet eine Zerstörung der Struktur des befallenen Organs

statt. Die Veränderungen sind meist monoklonal, haben jedoch zytogenetisch keine Chromosomenaberrationen<sup>44</sup>. Eine Reduktion der Immunsuppression kann auch bei diesen Proliferationen zu einer Besserung führen, doch in manchen Fällen bedarf es auch einer Chemotherapie, die in bis zu 70% der Fälle zu einer Remission führt<sup>44</sup>.

Die monomorphen Proliferationen bilden mit ca. 15% die dritte große Gruppe der PTLD<sup>17</sup>. Sie können als B- oder viel seltener als T-Zell Lymphome auftreten. Häufig sind Immunoblastische Lymphome mit transformierten, großen, blastischen Zellen mit prominentem Nukleolus und basophilem Zytoplasma beschrieben. Im Gegensatz zu den polymorphen Läsionen, wirken die Tumorzellen der monomorphen Proliferationen in einem Stadium der B-Zellentwicklung „eingefroren“. Meist zeigt sich ein infiltratives, destruierendes Wachstum mit einer schlechten Prognose<sup>47</sup>. Bei diesen Läsionen führt die Reduktion der Immunsuppression nur selten zu einer Remission, eine Chemotherapie ist daher erforderlich.

Als seltene Fälle von PTLD sind das Hodgkin-disease ähnliche B-Zell Lymphom, das Plasmozytom ähnliche Lymphom und das posttransplant Myelom zu nennen<sup>47,48</sup>.

### **Senile Lymphoproliferation**

Oyama et al. beschrieben 2003 B-Zell-Lymphome bei 22 japanischen Patienten, die älter als sechzig Jahre waren und unter keiner Immundefizienz litten. Alle Fälle waren EBV+, wobei 7 den Latenztyp III, die restlichen 15 den Latenztyp II zeigten<sup>49</sup>. Histologisch wurden 9 als großzellige monomorphe Lymphome und 13 als polymorphe Lymphoproliferationen diagnostiziert. Die Tumorzellen waren CD20 positiv, heterogen positiv für CD30 und CD15 negativ. Morphologisch zeigten sich transformierte, blastäre Zellen, Hodgkin-Zell-ähnliche Lymphozyten, in 15 Fällen auch mehrkernige, an Sternberg-Reed-Zellen erinnernde B-Lymphozyten vor reaktivem Hintergrund. Die Läsionen traten neben dem Lymphknotenbefall häufig extranodal auf und zeichneten sich durch exzessive Nekrosen, sowie angiozentrisches und destruktives Wachstum aus. All dies erschien den Autoren in vielerlei Hinsicht analog zu den B-Zell Lymphoproliferationen bei Immundefizienz. Da jedoch weder primäre Immundefekte, noch HIV-Infektionen, noch iatrogene Immunsuppressionen

nach Transplantationen oder bei rheumatischen Erkrankungen vorlagen, und somit eine Einordnung in keine, der von der WHO klassifizierten Immundefizienz assoziierten Lymphoproliferationen möglich war<sup>46</sup>, beschrieben sie die untersuchten Fälle als eigenständige, sporadische Läsionen und führten den Begriff der Senilen EBV-assoziierten Lymphoproliferation ein. Dabei bieten die Fähigkeit des EBV zur Transformation von B-Zellen<sup>20</sup> und eine im Alter verminderte Immunsurveillance<sup>50</sup> gewiss ätiologische Erklärungen für die Lymphomentstehung, aber es bleibt eine konzeptionelle Einteilung, eine gemeinsame pathogenetische Grundlage dieser uneinheitlichen Lymphomgruppe zu fordern. Dies ist, besonders auch im Hinblick auf ein therapeutisches Vorgehen von Bedeutung.

## **Problemstellung**

Wie erläutert reicht das Spektrum der EBV-assoziierten Erkrankungen von blanden, selbstlimitierenden Verläufen, hin zu malignen, schwer zu therapierenden Lymphomen. Dabei spielt neben anderen Faktoren wie beispielsweise der immunologischen Konstitution des Patienten, sicherlich der Phänotyp der infizierten Zelle, mit Aktivierungs- und Differenzierungsgrad eine wesentliche Rolle. Auch die Expression der viralen Proteine des Epstein-Barr Virus und deren Funktionen können Einfluss auf die Entwicklung der Wirtszelle nehmen und Anteil an Pathogenese und Verlauf der jeweiligen Erkrankung haben.

Die vorliegende Arbeit versucht eine immunphänotypischen Beschreibung und Unterscheidung der infizierten Zellen bei den EBV-assoziierten Krankheiten der infektiösen Mononukleose, des Hodgkin Lymphoms, des PTLD und der senilen Lymphoproliferation zu finden. Dabei wurde nach der Zugehörigkeit der infizierten Zellen zu den Lymphozytensubtypen, dem Differenzierungsstadium und dem Differenzierungsweg dieser Zellen gefragt. Zudem fand ein Vergleich der Expression viraler Antigene im Hinblick auf die Latenzmuster der Diagnosegruppen statt.

Da die derzeitige Einteilung der senilen EBV-assoziierten Lymphoproliferationen als eigenständige Lymphomgruppe, wie in der Einleitung geschildert, nicht befriedigend ist, soll hier, eine konzeptionelle Einordnung dieser Erkrankungen versucht werden. Dazu wurde überprüft, ob eine Einordnung entweder in die Gruppe der mit Immunsuppression assoziierten Lymphoproliferationen oder in die Gruppe der Hodgkin Lymphome möglich ist. Zur Kontrolle wurden Fälle der infektiösen Mononukleose mituntersucht. Das Ziel einer solchen Einteilung und somit diagnostischen Abgrenzung dieser Lymphoproliferationen kann für die Optimierung der Therapieentscheidung von Bedeutung sein.

Im Rahmen der Untersuchung stellten sich die Hodgkin Zellen als CD27 negativ und damit als widersprüchlich zu der CD27 positiven und CD30 positiven Memoryzelle dar, welche als zu den Tumorzellen korrespondierende Normalzelle postuliert wurde. Um festzustellen, ob es sich dabei um ein EBV-

spezifisches Phänomen handelt, wurden anschließend EBV-negative und EBV-positive Hodgkin Lymphome miteinander verglichen.

## **Material und Methoden**

### **Fälle**

Zum Vergleich der Phänotypen der infizierten Zellen bei verschiedenen EBV assoziierten Erkrankungen wurden 26 Fälle des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg aus den Jahren 1997 bis 2005 auf Grund ihrer Positivität für EBER des EBV und dem Vorhandensein ausreichenden Materials ausgewählt.

Bei sieben Fällen war die Diagnose der infektiösen Mononukleose gestellt worden. Bei Fall 1 handelte es sich um eine infektiöse Mononukleose, die in einem sehr frühen, noch symptomlosen Inkubationsstadium, als Zufallsbefund erkannt wurde. Hier zeigten sich in dem Lymphknoten keine Sekundärfollikel mit Keimzentren.

Bei den Fällen 8-17 lagen Post-Transplantations Lymphoproliferationen (PTLD) vor, hiervon waren drei mononukleose-like Lymphoproliferationen, fünf polymorphe und zwei monomorphe Lymphome. Die Lymphoproliferationen waren nach Transplantation von Knochenmark (KM), Herz, Lunge oder Niere aufgetreten.

Drei Fälle eines polymorphen Lymphoms (18-20) und zwei weitere eines Hodgkin-like Lymphoms (21, 22) zeigten als gemeinsames Kriterium das hohe Alter der Patienten ohne sonstige Immunsuppression und waren als senile Lymphoproliferationen beschrieben worden.

Bei vier Fällen war die Diagnose „Hodgkin Lymphom“ gestellt worden: Bei Fall 23-25 fand sich ein Hodgkin Lymphom vom Mischtyp, bei Fall 26 vom Lymphozyten depletierten Typ.

Bei allen Fällen handelte es sich um in Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Material aus Lymphknoten (LK), Tonsillen (TONS), Schleimhaut (SH), Mediastinum (Mediast.) oder Omentum majus (Omentum). Die Diagnosen wurden anhand der Routinefärbungen (HE,PAS,Giemsä) und immunhistochemischen Färbungen gestellt. In Tabelle 2 sind die Daten der verwendeten Fälle sowie Alter und Geschlecht der Patienten aufgeführt.

Nr.	Alter	m/w	Material	DX	Info
1	20	M	LK	Frühe Infektiöse Mononukleose	
2	12	M	LK	Infektiöse Mononukleose	
3	17	W	TONS	Infektiöse Mononukleose	
4	18	M	TONS	Infektiöse Mononukleose	
5	22	W	LK	Infektiöse Mononukleose	
6	24	M	TONS	Infektiöse Mononukleose	
7	16	W	TONS	Infektiöse Mononukleose	
8	9	M	SH	Mononukleose-like PTLD	KM
9	24	M	LK	Monomorphe PTLD	KM
10	32	M	LK	Monomorphe PTLD	KM
11	32	W	LK	Polymorphe PTLD	KM
12	19	M	LK	Polymorphe PTLD	KM
13	8	M	LK	Polymorphe PTLD	Herz
14	20	M	WG	Poly- / monomorphe PTLD	Niere
15	61	M	SH	Polymorphe PTLD	Lunge
16	51	M	TONS	Mononukleose-like PTLD	Niere
17	19	M	TONS	Mononukleose-like PTLD	Niere
18	86	W	SH	Polymorphes B-Zell-Lymphom	Senil
19	88	W	LK	Polymorphes B-Zell-Lymphom	Senil
20	80	W	Mediast.	Polymorphes B-Zell-Lymphom	Senil
21	86	W	LK	Hodgkin-like Lymphom	Senil
22	81	M	Omentum	Hodgkin-like Lymphom	Senil
23	43	M	LK	M.Hodgkin (Mischtyp)	
24	18	W	LK	M.Hodgkin (Mischtyp)	
25	61	W	LK	M.Hodgkin (Mischtyp)	
26	42	M	LK	M.Hodgkin (Lymphozyten-depl.)	

Tabelle 2: Falldaten für den Vergleich verschiedener EBV-assoziiertes Erkrankungen mit Materialart: Tonsille (TONS), Lymphknoten (LK), Schleimhaut (SH), Weichgewebe (WG), Mediastinum(Mediast.) und Omentum majus (Omentum); Bei posttransplant lymphoproliferative disease (PTLD): Status nach allogener Knochenmarktransplantation (KM) oder Transplantation solider Organe (Herz, Lunge, Niere); Fall 18-22 wurden als senile Lymphoproliferationen diagnostiziert (senil).

Für den Vergleich zwischen EBV-positiven und EBV-negativen Hodgkin-Lymphomen wurden neunzehn Fälle der Pathologie Würzburg aus dem Jahr 2006 verwendet. Neun Fälle entsprachen dem Mischtyp des Hodgkin-Lymphoms, sieben dem Bild der nodulären Sklerose, zwei zeigten den lymphozytenarmen und ein Fall den lymphozytenreichen Typ. Diese teilten sich in neun EBV-negative und zehn EBV-positive Hodgkin-Lymphome. Auch hier waren die Diagnosen anhand von Routine- und immunhistochemischen Färbungen gestellt worden. Tabelle 3 gibt die Daten der verwendeten Fälle wieder.

	Material	Alter	m/w	HL-Subtyp	EBV
1	LK	82	w	Mischtyp	+
2	LK	31	m	Noduläre Sklerose	+
3	LK	41	m	Mischtyp	+
4	LK	19	m	Noduläre Sklerose	+
5	LK	18	m	Noduläre Sklerose	+
6	LK	23	m	Mischtyp	+
7	LK	70	m	Mischtyp	+
8	LK	63	w	Lymphozytenarm	+
9	LK	33	w	Mischtyp	+
10	LK	66	w	Mischtyp	+
11	LK	38	m	Lymphozytenreich	-
12	LK	20	m	Noduläre Sklerose	-
13	LK	49	m	Mischtyp	-
14	LK	43	w	Mischtyp	-
15	LK	21	w	Noduläre Sklerose	-
16	LK	32	w	Lymphozytenarm	-
17	LK	31	w	Noduläre Sklerose	-
18	LK	57	m	Mischtyp	-
19	LK	28	w	Noduläre Sklerose	-

Tabelle 3: Falldaten für den Vergleich EBV-positiver (+) und EBV-negativer (-) Hodgkin-Lymphome (HL). In allen Fällen handelt es sich um Lymphknoten (LK).

### Verwendete Antikörper

Die Daten der zur immunhistochemischen Untersuchung eingesetzten Primärantikörper, mit den jeweilig verwendeten Sekundärantikörpern, finden sich in Tabelle 4. LMP-1 ließ sich mit dem Zenon-Kit 555 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) direkt konjugieren.

Um die Zugehörigkeit der Zielzelle des EBV zu T- oder B-Lymphozyten zu ermitteln, wurde für die T-Zellpopulation der T-Zellmarker CD3, für die B-Zellpopulation das Oberflächenantigen CD79 $\alpha$  eingesetzt.

CD27 und Icsat wurden zur Bestimmung des Differenzierungsstandes der untersuchten Zellen eingesetzt.

Zum Nachweis einer Immunglobulinsynthese der EBV infizierten Zellen wurden verschiedene Immunglobuline immunhistochemisch dargestellt. Um zunächst die Gesamtimmunglobulinexpression der B-Lymphozyten zu untersuchen wurden die Leichtketten  $\kappa$  und  $\lambda$  als Cocktail gefärbt. Daraufhin wurde IgM zum Nachweis naiver, bzw. primär aktivierter B-Zellen gefärbt, IgG und IgA wurden

ebenfalls als Cocktail gefärbt um post-class-switch Plasmazellen erfassen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Einteilung der EBV-infizierten Zellen in die verschiedenen Latenzgruppen auf die viralen Proteine EBER, EBNA-2 und LMP-1 zurückgegriffen, da diese an Paraffinmaterial anwendbar sind und sich anhand dieser drei Antigene bereits eine gute Unterscheidung der Latenztypen treffen lässt. So entspricht der Nachweis aller drei viralen Antigene Latenz III, werden nur EBER und LMP-1 exprimiert liegt Latenz II vor, kann dagegen nur EBER markiert werden, handelt es sich um Latenz I (Siehe Tabelle 1).

Antigen	Hersteller	Klon	Vorbehandlung	Verdünnung	Sekundärantikörper
LMP-1	DAKO	CS 1-4	Target pH 6,1 o. TRIS pH10,0	1:50	Konjugation mit Z 555 m***
EBNA-2	DAKO	PE2	Target pH 6,1 o. TRIS pH10,0	1:10	A 555 donkey $\alpha$ -mouse IgG***
CD3	Novocastra	PS 1	CS pH 5,5	1:20	A 555 donkey $\alpha$ -mouse IgG***
CD3	DAKO	Rabbit	CS pH 5,5	1:2	Donkey $\alpha$ -rabbit Cy5**
CD27	Novocastra	137B4	CS pH 5,5	1:20	A 555 donkey $\alpha$ -mouse IgG***
CD79	DAKO	JCB117	CS pH 5,5	1:50	A 555 donkey $\alpha$ -mouse IgG***
CD79	Neomarkers	Rabbit	CS pH 5,5	1:50	Donkey $\alpha$ -rabbit Cy5**
IRF-4(Icsat)	Santa Cruz	M-17	CS pH 5,5	1:200	Donkey $\alpha$ -goat Cy5**
$\kappa/\lambda$	DAKO	Rabbit	CS pH 5,5	1:10.000	Donkey $\alpha$ -rabbit Cy3**
IgM	DAKO	Rabbit	CS pH 5,5	1:10.000	Donkey $\alpha$ -rabbit Cy3**
IgG	DAKO	Rabbit	CS pH 5,5	1:10.000	Donkey $\alpha$ -rabbit Cy3**
Blimp-1	*	Ros195 G/G5	CS pH 5,5	1:2	-
Bcl-6	DAKO	PG-B6p	CS pH 5,5	1:5	-

Tabelle 4: Primär- und Sekundärantikörper: DAKO: Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland; Novocastra, Newcastle, UK; Santa Cruz, San Diego, CA, USA; Neomarkers Inc., Fremont, CA, USA; \* Hergestellt von A. Avramidou und H.-M. Jäck, Erlangen, Deutschland; \*\*Dianova, Hamburg, Deutschland; \*\*\*Molecular Probes, Leiden, Niederlande;

## Immunhistochemie

Die Eigenschaften der beobachteten Zellen wurden mit immunhistochemischen Methoden untersucht. Dazu wurden 4µm dicke Schnitte des Paraffinmaterials angefertigt, die auf zuvor silanisierte Objektträger (SuperFrost, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen wurden. Nach Entparaffinierung wurden die Schnitte je nach Antikörper beziehungsweise Antikörperkombination in verschiedenen Puffern (CS pH7,0; CS pH5,5; Target pH6,1; TRIS pH10,0) und bei verschiedenen Temperaturen vorbehandelt.

## Immunfluoreszenz

Es fanden sowohl Einfach-, als auch Mehrfachfärbungen mittels Immunfluoreszenz Anwendung. Die durchgeführten Kombinationen der Mehrfachfärbungen, einschließlich EBER-Mehrfachfärbungen, sind in Tabelle 5 aufgeführt. Tabelle 6 zeigt beispielhaft das Protokoll einer Mehrfachimmunfluoreszenzfärbung in Kombination mit einer EBER in situ Hybridisierung. Die Antikörper wurden in Antibodydiluent (ChemMate, DAKO Cytomation, Hamburg, Deutschland) respektive TRIS-Puffer (pH7,6), in den jeweilig geeigneten Verdünnungen angesetzt. Als Waschlösung wurde ebenfalls TRIS-Puffer verwendet. Nach dem Färbevorgang wurden die Schnitte eingedeckt (Fluormount G, Southern Biotechnology Associates) und im Dunklen bei 4° aufbewahrt.

1	2	3
EBER	CD79	CD3, CD27, IgG, IgM, κ/λ
	LMP-1	EBNA-2, BZLF-1
	Icsat	
LMP-1	CD79	CD3
	κ/λ	
	Icsat	

Tabelle 5: In der vorliegenden Arbeit wurden die Daten der hier aufgeführten Antikörperkombinationen verwendet.

## EBER in situ Hybridisierung

Zur Markierung EBV-infizierter Zellen wurde eine Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-konjugierte Peptidnucleinsäure (PNA)-Sonde (DAKO Cytomation, Hamburg, Deutschland) zur Detektion von EBER-RNA eingesetzt. Nach der Inkubation der Schnitte mit der EBER-Probe, wurde in weiteren Schritten mit verschiedenen Primärantikörpern doppelgefärbt um den Phänotyp der EBER-positiven Zellen beschreiben zu können (Tabelle 5).

Xylol	5x5 min
Alkohol 100%	2x3 min
Alkohol 96%	2x3 min
Aqua dest.	Kurz spülen
Kochen (in Mikrowelle):	
CS pH 5,5 Stufe 5	5 min
Target pH 6,1 Stufe 4/3	4 min
Kochen (122-126°C):	
CS pH 5,5	22 min
Target pH 6,1	15 min
Tris pH 10,0	13 min
Aqua dest.	2x3 min
Proteinkinase K (37C°)(DAKO)	3 min bzw. 0/1 min bei Kernfärbung
Aqua dest.	2x3 min
Alkohol 96%	10 sec
Trocknen	5 min
EBER-ISH (55C° in Feuchter Kammer; eindecken)	1,5 h
Adstringierende Waschlsg. (1ml+60ml; 55C°; Wasserbad mit Rüttler) (DAKO)	15 min+10 min (nach 15 min Deckgläschen vorsichtig abschütteln)
TRIS	3 min
Antibody Diluent	10min
CD79(rabbit);CD27(mouse); goat α-fitc	1 h
Donkey α-rabbit Cy5;donkey α-mouse A 555;donkey α-goat	1 h
Oder:	
EBNA-2(mouse);goat α-fitc	1 h
Donkey α-mouse Cy5; donkey α-goat	
Mausserum	1 h
LMP konjugiert mit Z 555*	1 h
Formalin	10 min

Tabelle 6: EBER-ISH mit anschließender Mehrfachfärbung der Zellmarker CD79/CD27 respektive LMP-1/EBNA-2

## **Auswertung**

Die Auswertung der Färbungen erfolgte mittels Laser Scanning Mikroskopie (Leica TCS2, Leica Bensheim, Deutschland) durch semiquantitative Unterteilung in 4 Gruppen. Waren 0-20% der EBV-infizierten Zellen positiv für einen Marker wurde dies als negativ, in Bezug auf die Expression dieses Markers und damit als 0 gewertet. Über 20% aber unter 50% positiv markierte Zellen wurden mit 1, bei deutlicher Positivität von mehr als 50% bis zu etwa 80% aller infizierten Zellen mit 2 gewertet. Mit 3 wurde gewertet wenn über 80% aller infizierten Zellen positiv für den jeweiligen Marker waren.

Die so erfassten Daten wurden unter Verwendung des Computerprogramms Statistica<sup>®</sup> für Windows auf zwei Arten weiterverarbeitet. Um zu überprüfen, ob sich die verschiedenen Erkrankungsgruppen signifikant in der Expression der einzelnen untersuchten Antigene unterscheiden wurde zunächst mittels Spearman-Rang-Korrelation der p-Wert berechnet. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde als  $\alpha=0,05$  festgelegt, das heißt, p-Werte  $\leq 0.05$  wurden als signifikant gewertet. Anschließend fand eine Clusteranalyse Anwendung. Dabei handelt es sich um ein Verfahren zur Gruppenbildung der untersuchten Fälle unabhängig von der Diagnose. Berücksichtigt wird nur das Expressionsmuster, das heißt die verschiedenen Eigenschaften eines Falles. Auf diese Weise werden Fälle die sich in ihren Eigenschaften gleichen, näher und solche mit abweichenden Eigenschaften weiter entfernt voneinander positioniert.

## **Ergebnisse**

### **Zelltyp der infizierten Zelle**

Durch eine Dreifachfärbung mit EBER/CD3/CD79 sollte die Zugehörigkeit der Zielzelle des EBV zu einer der beiden Lymphozytenpopulationen bestimmt werden. Dabei waren alle der 30 untersuchten Fälle EBER+/CD3-(diese Daten sind in Tabelle 7 nicht mit aufgeführt). CD79 dagegen fand sich bei allen Fällen, in mindestens 20% der EBER+ Zellen, ausgenommen Fall 21, 22 und 23, bei denen ein sicherer Nachweis von EBER+/CD79+ Zellen nicht möglich war. Die untersuchten Zellen zeigten jedoch morphologisch das typische Bild von Lymphozyten der B-Zellreihe. In Fall 1 waren, als einziger Fall, über 80% der EBER+ Zellen zugleich CD79+.

Zwischen den untersuchten Diagnosegruppen ließ sich in Bezug auf die Expression des CD79 kein signifikanter Unterschied zeigen.

### **Differenzierungsstadium der infizierten Zellen**

Um eine Aussage über die Aktivierungsstufe der infizierten Zellen machen zu können, wurden die untersuchten Fälle mit EBER und Icsat gefärbt. In Abbildung 4 findet sich die EBER/Icsat-Färbung der vier untersuchten Diagnosegruppen. In 3 Fällen der Mononukleose waren alle EBER positiven Zellen auch Icsat positiv in den restlichen 4 Fällen waren deutlich über 50% der EBER+ Zellen Icsat positiv.

Bei den Fällen der PTLD exprimierten in 4 Fällen alle EBV-infizierten Zellen zugleich Icsat. In 4 Fällen waren über und in 2 Fällen unter 50% der Zellen Icsat positiv.

Die Fälle des Hodgkin Lymphoms zeigten, bis auf einen Fall, in dem unter 50% der EBER positiven Zellen Icsat trugen, Icsat in allen EBV-infizierten Zellen.

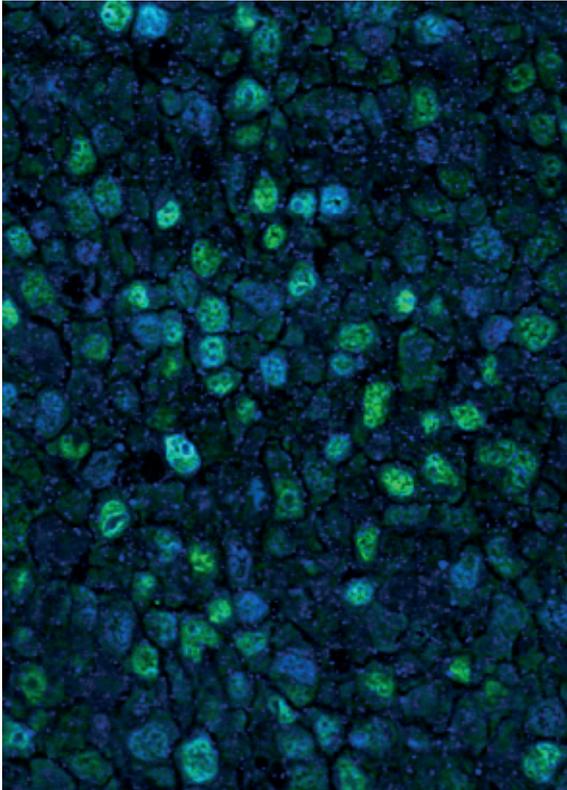
In den Fällen der senilen Lymphoproliferation stellten sich bei 2 Fällen alle EBER positiven Zellen auch als Icsat positiv dar. In 2 weiteren Fällen exprimierten über 50% und in einem Fall unter 50% der EBER positiven Zellen Icsat.

Mit Ausnahme der Fälle 8, 16, 19 und 23, in welchen Icsat in unter 50% der EBV-infizierten Zellen nachzuweisen war, wurde Icsat in den untersuchten Fällen in nahezu allen EBER positiven Zellen stark exprimiert.

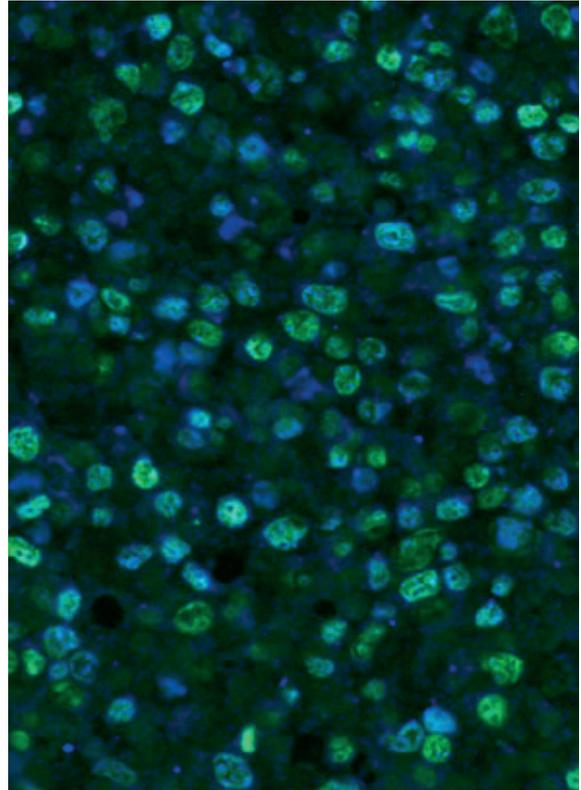
Die Spearman-Rang-Korrelation in Tabelle 8 zeigt keine signifikante Abweichung der Icsat-Färbung bei der Gegenüberstellung der verschiedenen Erkrankungen.

Nr.	Latenz	EBER CD79	CD79 EBER	EBER CD79 CD27	EBER Icsat	EBER CD79 IgM	EBER CD79 IgG/A	EBER CD79 κ/λ
1	-*	3	1	0	2	0	0	0/1**
2	-	1	1	1	2	1	1	1
3	-	1	2	1	3	1	1	1
4	-	2	1	0	3	1	2	2
5	-	1	1	0	2	1	1	2
6	-	1	1	1	3	1	1	1
7	-	1	1	1	2	1	2	1
8	3	2	1	0	1	0	1	1
9	3	2	2	1	2	1	1	2
10	3	2	3	1	3	2	0	2
11	3	1	2	0	2	1	0	1
12	2	1	2	0	2	2	0	2
13	3	2	1	0	2	0	2	1
14	3	1	1	0	3	0	2	1
15	3	1	1	0	3	0	0	0
16	2	1	1	0	1	1	1	2
17	1	2	1	1	3	1	3	3
18	2	1	1	1	2	0	0	0
19	2	1	1	0	1	1	0	1
20	2	2	2	1	2	0	0	0
21	2	0	0	0	3	0	0	0
22	2	0	0	0	3	0	0	0
23	2	0	0	0	1	0	0	0
24	2	1	1	1	3	0	0	0
25	2	2	1	0	3	0	0	0
26	2	1	1	0	3	0	0	0

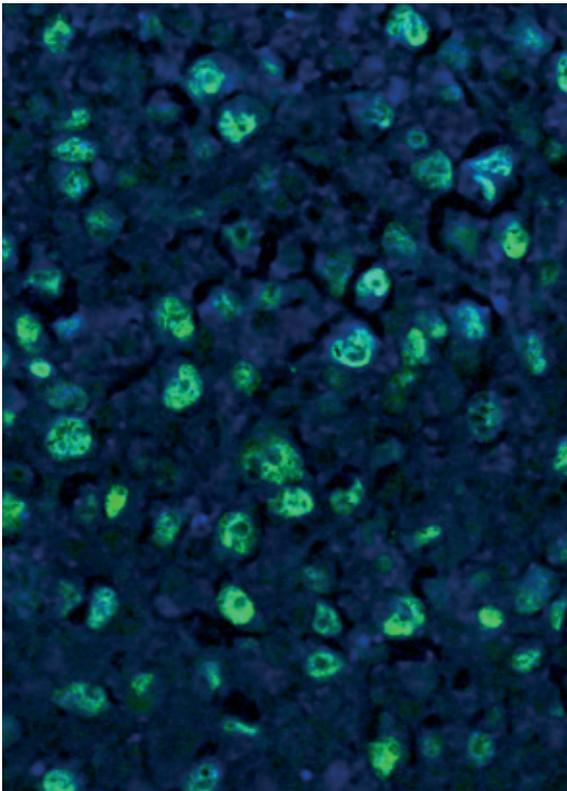
Tabelle 7: Ergebnisse der EBER-ISH und Immunfluoreszenz Mehrfachfärbungen. Die untersuchten Zellen zeigen den jeweiligen Phänotyp in: 0: weniger als 20% der Zellen; 1: zwischen 20 und 50%; 2: zwischen 50 und 80%; 3: in 100% der Zellen; \* Eine Latenzbestimmung ist für die infektiöse Mononukleose nicht sinnvoll. \*\*In diesem Fall wurden κ/λ getrennt gefärbt, wobei keine κ+ und nur sehr vereinzelte λ+ EBER+Zellen nachgewiesen werden konnten.



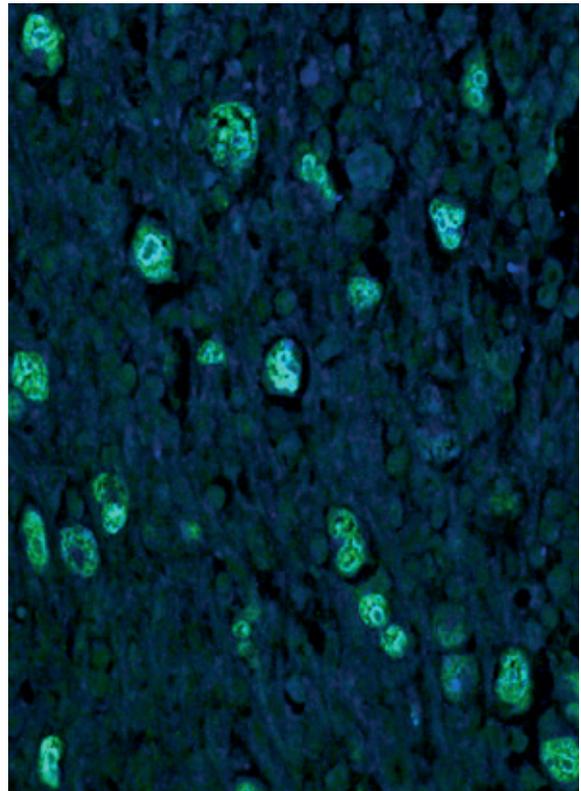
a



b



c



d

Abbildung 4: Die EBER+ Zellen (grün) bei den Fällen der infektiösen Mononukleose (a), der PTLD (b), dem Hodgkin Lymphom (c) und der senilen Lymphoproliferation (d) sind mehrheitlich deutlich positiv für Icsat (blau).

	IM	PTLD	HD	SL
IM	-	0,60780	0,64229	0,67295
PTLD	0,60780	-	0,46427	1,0000
HD	0,62249	0,46427	-	0,53468
SL	0,67295	1,0000	0,53468	-

Tabelle 8: Spearmanrang-Korrelation der Icsat Expression: Zwischen keiner der untersuchten Diagnosegruppen (IM:infektiöse Mononukleose, PTLD:Posttransplantaiton lymphoproliferative disease, HD: Morbus Hodgkin, SL: senile Lymphoproliferation) lies sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$  = signifikant) zeigen.

### Differenzierungsweg der infizierten Zelle

Zur Beschreibung des Differenzierungsweges der infizierten Zelle wurde eine Dreifachfärbung für EBER/CD79 mit dem Oberflächenmarker CD27 gewählt, deren Ergebnis beispielhaft in Abbildung 5 wiedergegeben ist.

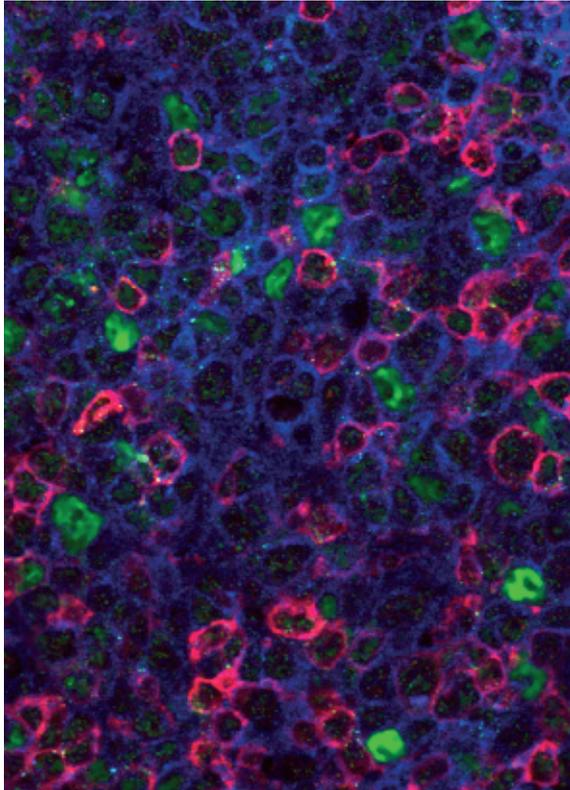
Bei der Mononukleose waren in vier Fällen deutlich unter 50% aller EBER und CD79 positiven Zellen auch CD27 positiv, in drei Fällen waren alle EBER positiven B-Zellen CD27 negativ.

Bei drei PTLD-Fällen war CD27 in weniger als der Hälfte der EBER und CD79 positiven Zellen nachweisbar, in sieben Fällen war der Phänotyp der Tumorzellen immer EBER und CD79 positiv und CD27 negativ.

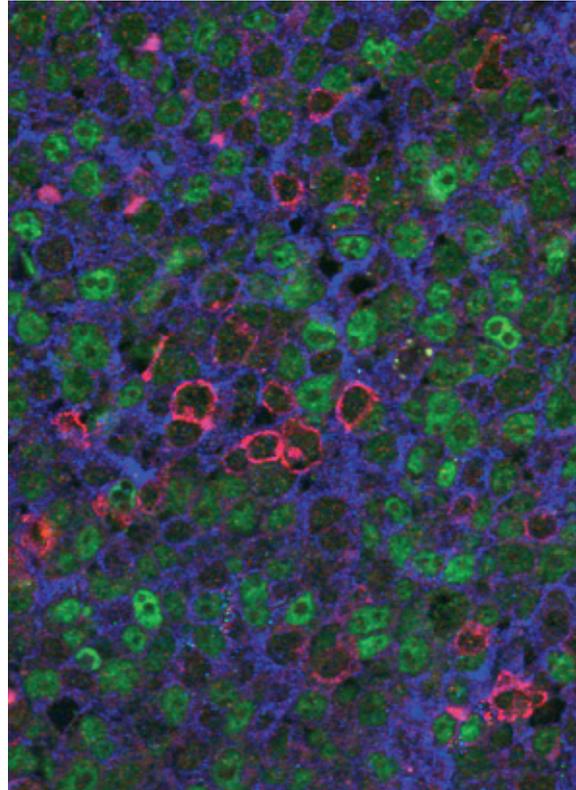
Auch beim Hodgkin Lymphom waren drei der Fälle CD27 negativ und ein Fall zeigte eine Färbung für CD27 in unter 50% der EBV-infizierten B-Zellen.

In einem Fall der senilen Lymphoproliferation war ein geringer Anteil der EBER und CD79 positiven Zellen auch CD27 positiv, in den restlichen drei Fällen dieser Krankheitsgruppe zeigten alle untersuchten Zellen den Phänotyp CD27 negativ.

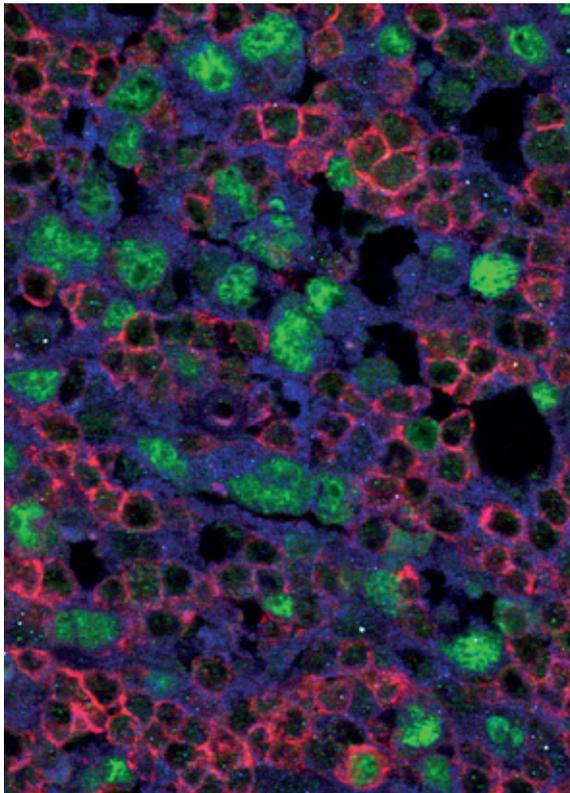
Die statistische Untersuchung zeigte zwischen den untersuchten Fällen kein signifikantes Ergebnis bei der Unterscheidung nach der CD27 Expression (Tabelle 9). Unabhängig von dem zugrundeliegenden Krankheitsbild war somit nur ein geringer Anteil der EBV-infizierten B-Zellen auch CD27 positiv. Der vorherrschende Phänotyp der EBV infizierten Zelle ließ sich als EBV-infizierte B-Zelle ohne CD27-Expression beschreiben.



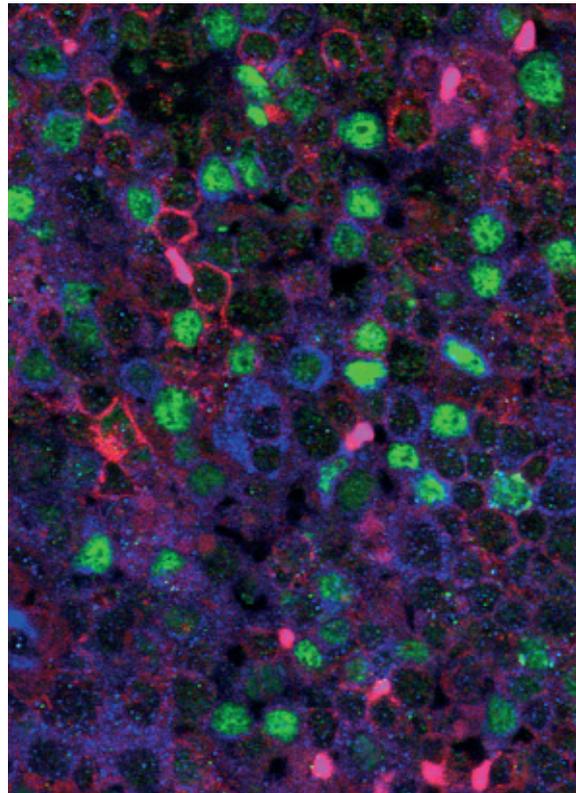
a



b



c



d

Abbildung 5: Die Dreifachfärbung für EBER (grün), CD79 (blau) und CD27 (rot) zeigt bei den Fällen der infektiösen Mononukleose (a), der PTLID (b), dem Hodgkin Lymphom (c) und der senilen Lymphoproliferation (d) fast ausschließlich den Phänotyp EBER+/CD79+/CD27-

	IM	PTLD	HD	SL
IM	-	0,29196	0,35268	0,59947
PTLD	0,29196	-	0,86521	0,72290
HD	0,35268	0,86521	-	0,68453
SL	0,59947	0,72290	0,68453	-

T

Tabelle 9: Spearman-Rang der CD27 Expression der EBER positive Zellen. Zwischen den verschiedenen Diagnosegruppen (IM: infektiöse Mononukleose, PTLD: post-transplantation disorder, HD: Morbus Hodgkin, SL: senile Lymphoproliferation) ließ sich in Bezug auf die CD27-Expression der EBV-infizierten Zellen kein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$  = signifikant) zeigen.

### **Immunglobulinsynthese der infizierten Zelle**

Für die Untersuchung der Immunglobulinproduktion fanden, wie in den Abbildungen 6-8 zu sehen ist, Dreifachfärbungen mit EBER, CD79 und kappa/lambda sowie anschließend mit IgM mit respektive IgG/A Verwendung.

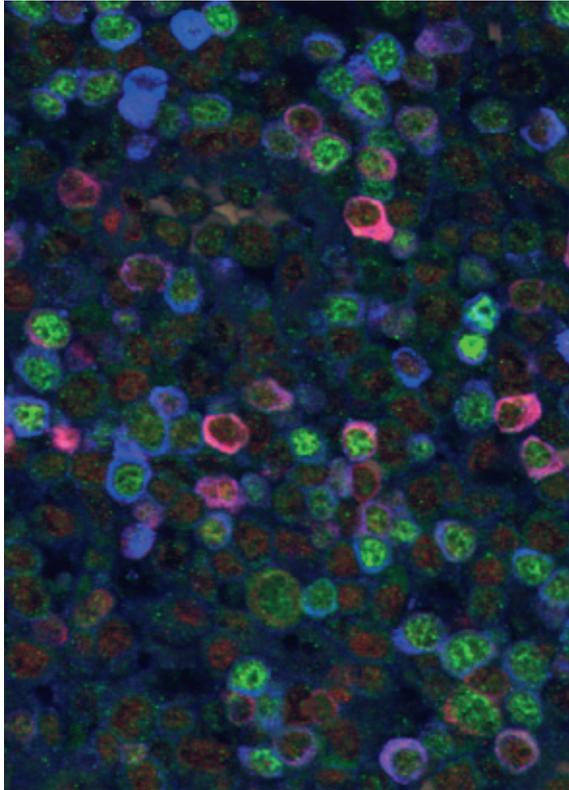
Eine Leichtkettensynthese wurde in zwei Fällen der Mononukleose von beinahe allen EBV-infizierten Zellen gezeigt, in vier Fällen von ca. 30% der EBER positiven Zellen, und bei einem Fall, Fall 1, ließ sich  $\kappa$  in den EBER positiven Zellen nicht, und  $\lambda$  nur in vereinzelt Zellen nachweisen.

Bis auf Fall 1, der kein IgM exprimierte, fand sich IgM in allen Fällen der Mononukleose in etwa einem Drittel der EBV-infizierten Zellen.

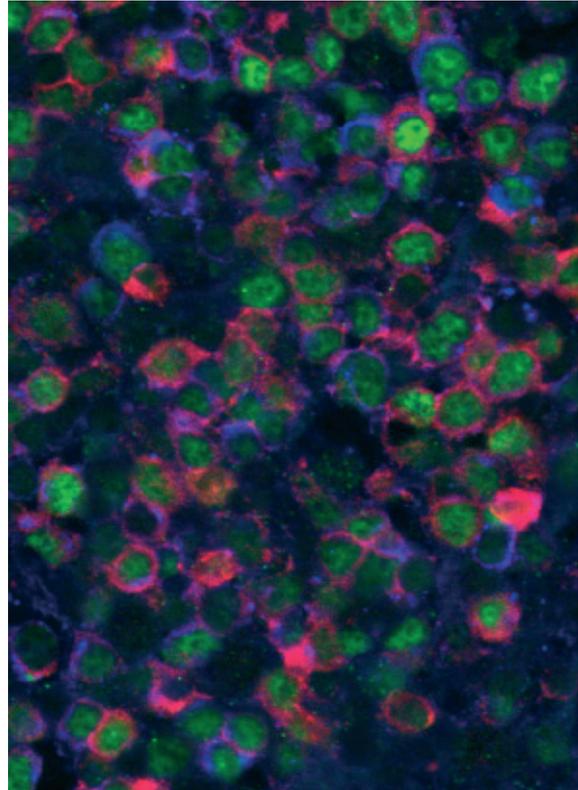
In zwei Fällen der infektiösen Mononukleose synthetisierte die Mehrzahl der EBER positiven Zellen IgG/A. In vier weiteren Fällen der Mononukleose zeigte sich IgG/A in 20-50% der EBV infizierten Zellen positiv. In Fall 1 konnten keine IgG/A produzierenden und zugleich EBER positiven Zellen gefunden werden.

Bei der PTLD ließ sich in allen untersuchten Fällen eine  $\kappa/\lambda$ -Synthese belegen. So war bei Fall 17 in allen EBV-infizierten Zellen Leichtkettensynthese zu finden, bei vier Fällen war dies in über 50% der EBV-infizierten Zellen möglich, in drei Fällen unter 50% der EBER positiven Zellen und nur in Fall 15 zeigt sich keine Färbung für  $\kappa/\lambda$ .

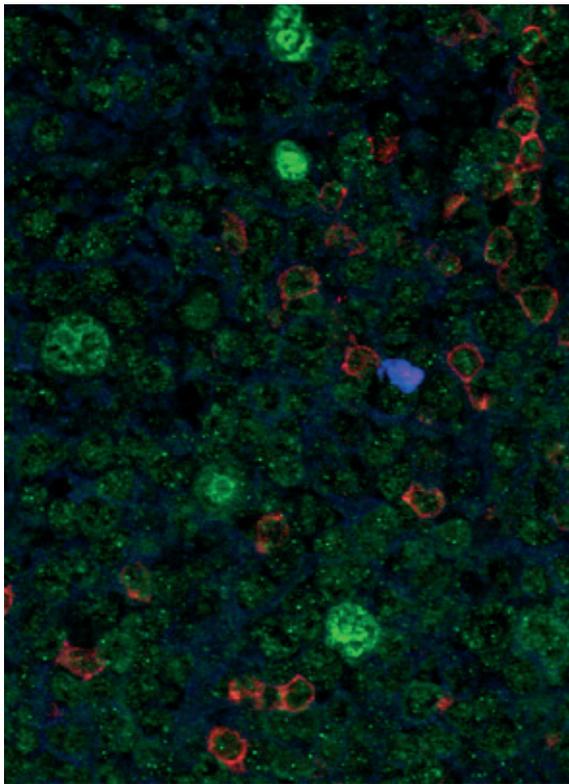
Eine IgM-Produktion ließ sich in vier Fällen der PTLD nicht dokumentieren, in vier Fällen zeigte sich IgM in weniger als 50% und bei zwei Fällen in deutlich über der Hälfte aller Tumorzellen positiv.



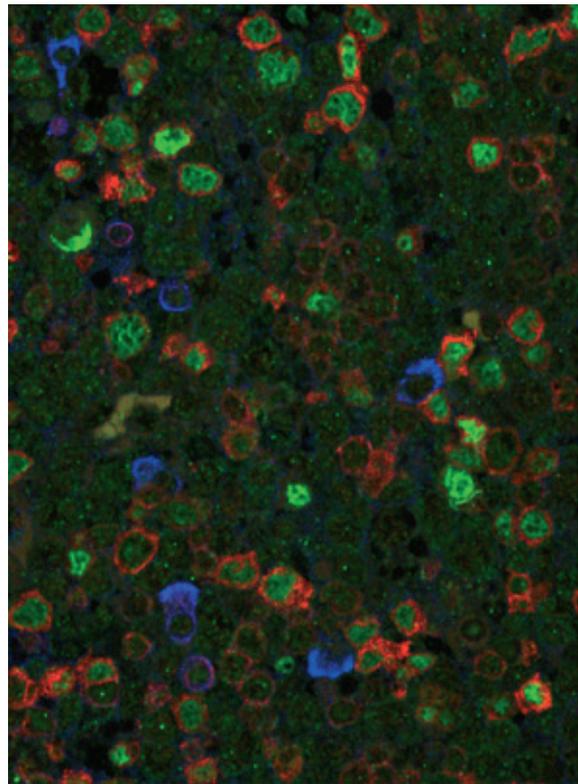
a



b

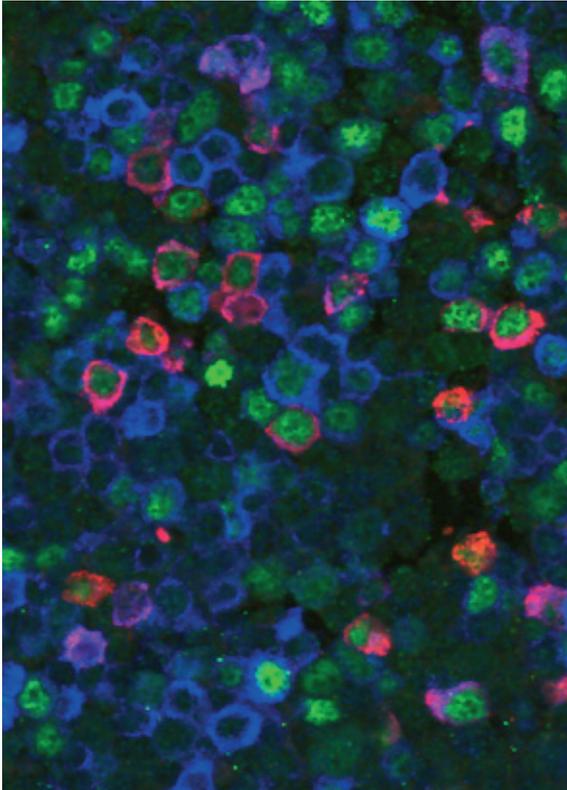


c

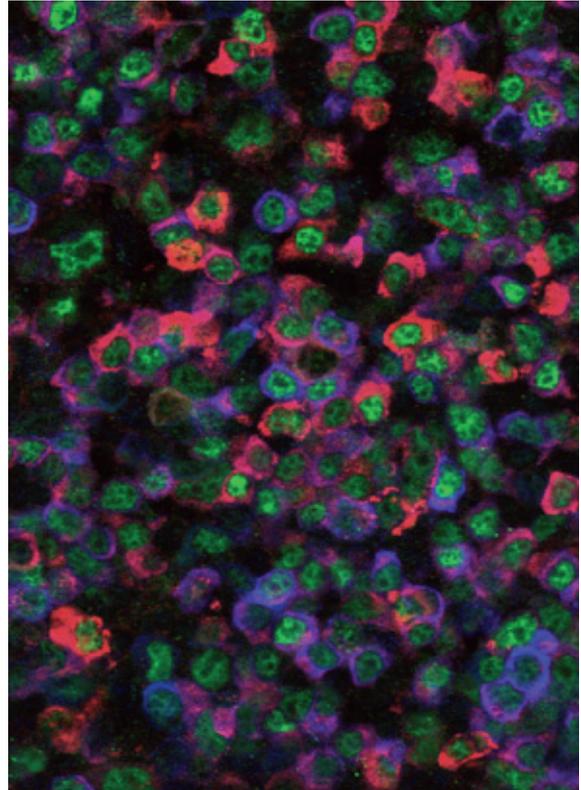


d

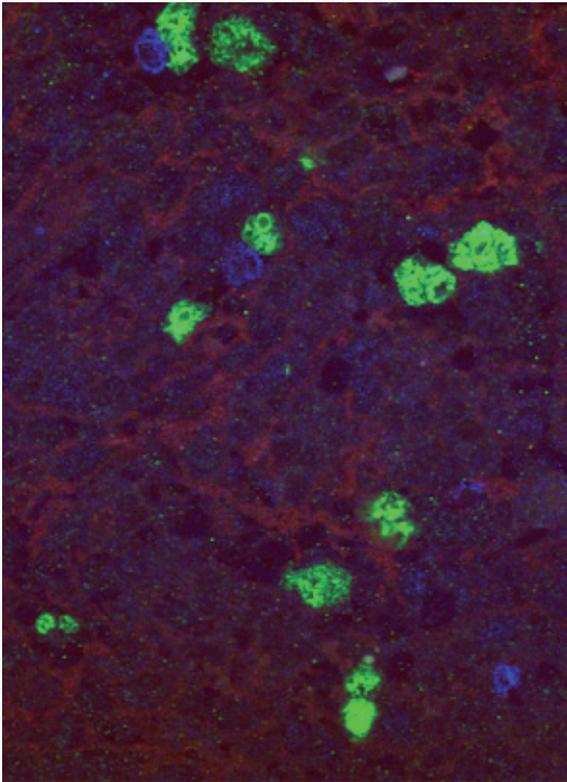
Abbildung 6: Die hier untersuchte Leichtkettensynthese zeigt in den Fällen der Mononukleose (a) und der PTLD (b) eine deutliche Expression von k/l (blau) in den EBER (grün) und CD79 (rot) positiven Zellen. In den Fällen des Hodgkin Lymphoms (c) und der senilen Lymphoproliferation (d) konnte keine Leichtkettensynthese der EBER+ Zellen nachgewiesen werden



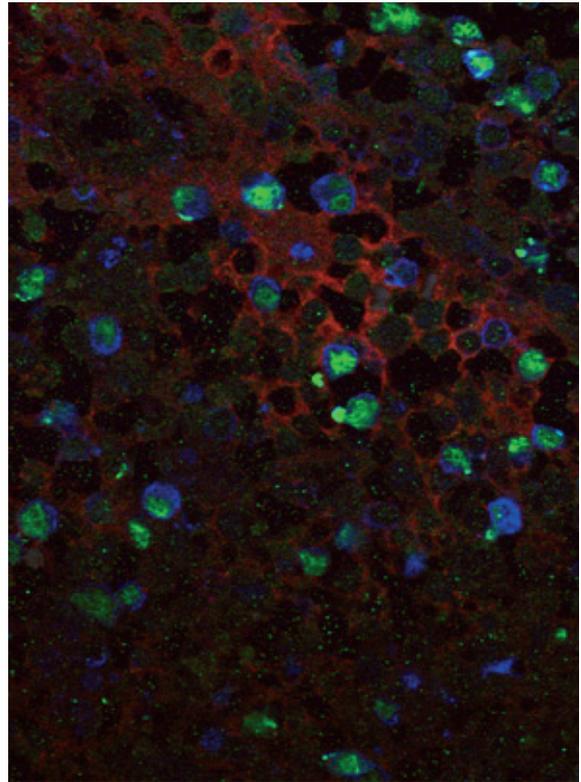
a



b



c



d

Abbildung 7: Der Nachweis von IgM (rot) in den EBER+ (grün) und CD79+ (blau) Zellen gelingt bei den Fällen der Mononukleose(a) und der PTLD(b). Beiden Fällen des Hodgkin Lymphoms(c) und der senilen Lymphoproliferation(d) hingegen liegt der Phänotyp EBER+/CD79+/IgM- vor.

Bei Fall 17 waren nahezu alle Tumorzellen IgG/A positiv. In zwei weiteren Fällen zeigte die Mehrheit der Zellen diesen Phänotyp, in drei anderen fand sich eine IgG/A-Synthese bei etwa einem Drittel der EBV-infizierten Zellen. In vier PTLD-Fällen ließ sich keine IgG/A-Produktion nachweisen.

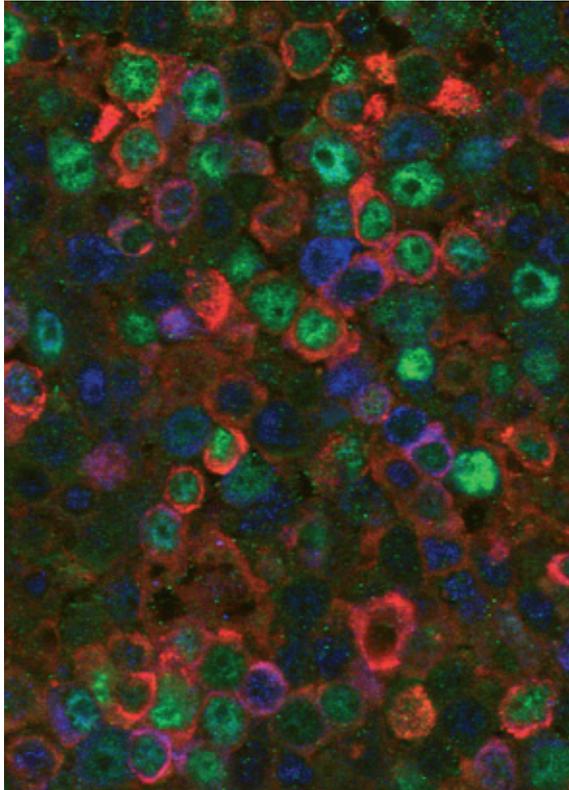
In den Fällen des Hodgkin Lymphoms, war in keinem der untersuchten Fälle eine Immunglobulinsynthese nachzuweisen.

Ähnlich verhielt es sich mit den Fällen der senilen Lymphoproliferation. Auch hier wurden von den Tumorzellen keine Immunglobuline synthetisiert. Eine Ausnahme bildete dabei Fall 19, bei dem in einem sehr geringen Umfang, ca. 20-50% der EBER positiven Zellen eine IgM und Leichtkettensynthese nachgewiesen wurde.

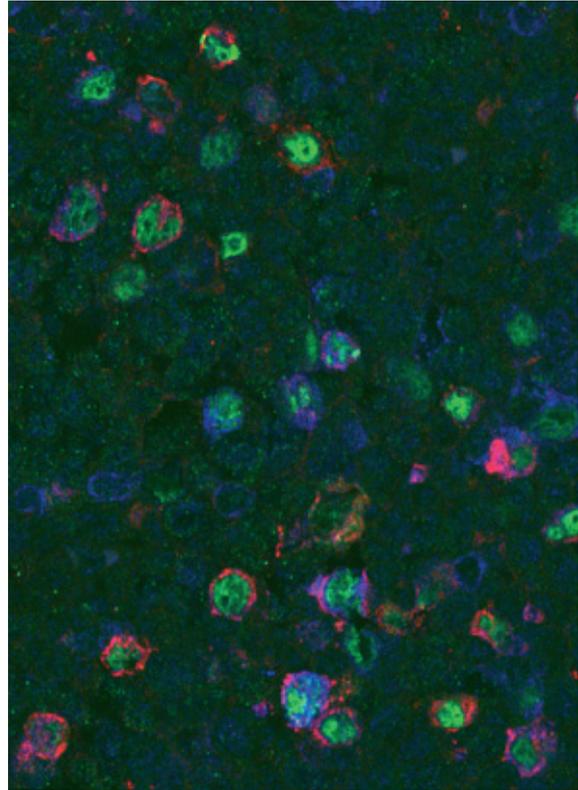
Bei der statistischen Auswertung der Daten für  $\kappa/\lambda$ , IgM und IgG/A zeigten sich signifikante Unterschiede innerhalb der untersuchten Gruppen (siehe Tabellen 10-12). Dabei konnte zwischen den Diagnosegruppen der infektiösen Mononukleose und der PTLD einerseits, sowie zwischen der Gruppe der Hodgkin Lymphome und den senilen Lymphoproliferationen andererseits, kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Eine deutliche Abweichung der Immunphänotypen fand sich bei dem Vergleich der infektiösen Mononukleose respektive der PTLD mit den Fällen von Hodgkin Lymphomen beziehungsweise Senilen Lymphomen.

	IM	PLTD	HD	SL
IM	-	0,38624	<b>0,00520</b>	<b>0,01919</b>
PTLD	0,38624	-	<b>0,00252</b>	<b>0,00475</b>
HD	<b>0,00520</b>	<b>0,00252</b>	-	0,40708
SL	<b>0,01919</b>	<b>0,00475</b>	0,40708	-

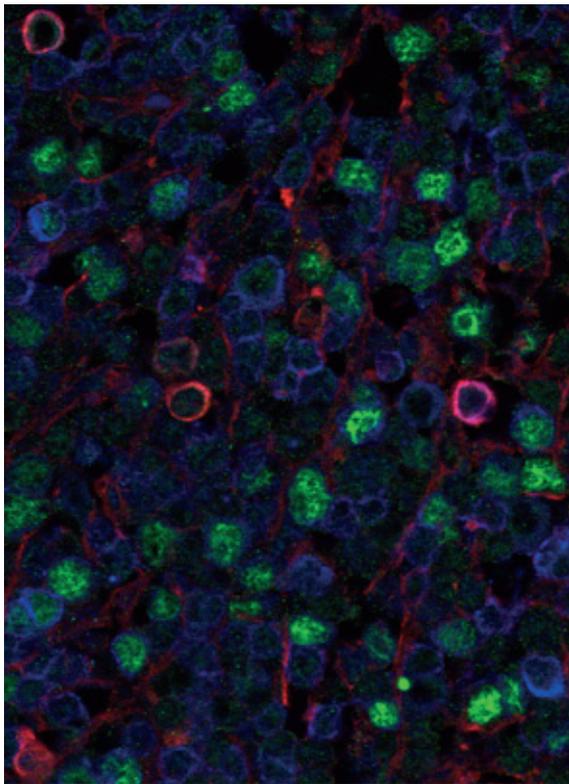
Tabelle 10: Bei der Spearman-Rang Korrelation der Leichtketten-Synthese fanden sich für die Fälle der infektiösen Mononukleose (IM) und des Posttransplantation lymphoproliferative Disease (PTLD) einerseits, im Vergleich zu den Diagnosegruppen des Hodgkin Lymphoms (HD) und der senilen lymphoproliferation (SL) andererseits signifikante Abweichungen (p-Werte  $\leq 0.05$  fett gedruckt).



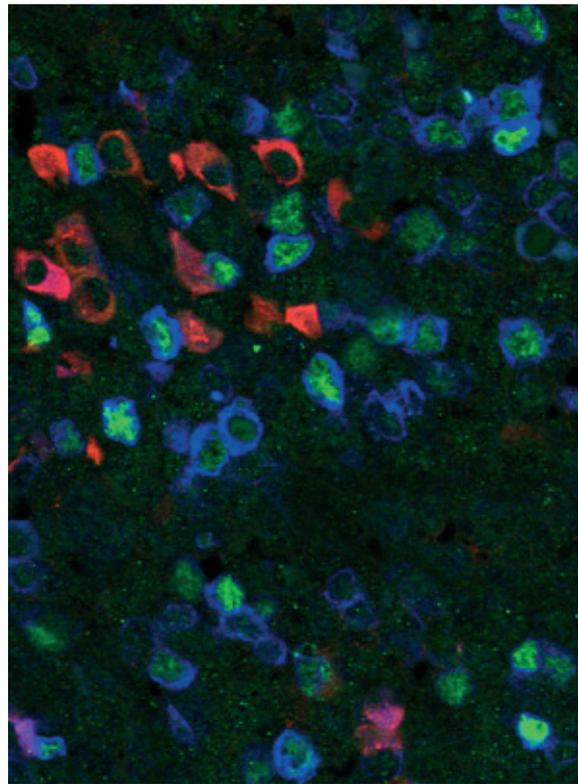
a



b



c



d

Abbildung 8: Bei der Dreifachfärbung mit EBER(grün), CD79 (blau) und IgG/A (rot) findet sich bei den Fällen der Mononukleose(a) sowie der PTLD(b) der Phänotyp EBER+/CD79+/IgG/A+, beim Hodgkin Lymphom(c) und der senilen Lymphoproliferation(d) konnte in den EBER+Zellen kein IgG gezeigt werden.

	IM	PLTD	HD	SL
IM	-	0,75060	<b>0,00164</b>	<b>0,02024</b>
PTLD	0,75060	-	0,05169	0,14019
HD	<b>0,00164</b>	0,05169	-	0,40708
SL	<b>0,02024</b>	0,14019	0,40708	-

Tabelle 11: Spearman-Rang der IgM-Synthese der infizierten Zellen. Signifikante Werte ( $p \leq 0.05$ ) sind fett gedruckt. Die IgM-Synthese bei infektiöser Mononukleose (IM) und Hodgkin Lymphom (HD) bzw. seniler lymphoproliferation (SL) ist signifikant verschieden. Für die Post-Transplantations Lymphoproliferationen (PTLD) zeigen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Diagnosegruppen.

	IM	PLTD	HD	SL
IM	-	0,62178	<b>0,00520</b>	<b>0,00171</b>
PTLD	0,62178	-	0,05401	<b>0,06392</b>
HD	<b>0,00520</b>	0,05401	-	n.b.*
SL	<b>0,00171</b>	<b>0,03098</b>	n.b.*	-

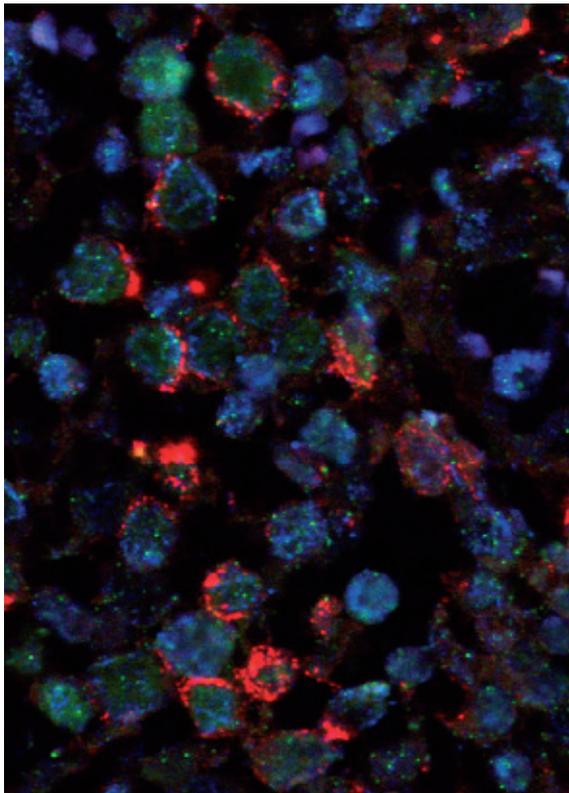
Tabelle 12: Spearman-Rang Korrelation der IgG/A-Synthese EBV-infizierter Zellen. Signifikante Werte ( $p \leq 0.05$ ) sind fett gedruckt. Die IgG/A-Synthese bei infektiöser Mononukleose (IM) und Hodgkin Lymphom (HD) bzw. seniler lymphoproliferation (SL) ist signifikant verschieden. Für die Post-Transplantationslymphoproliferationen (PTLD) zeigen sich auch hier keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Diagnosegruppen. \*n.b.: nicht berechenbar: Da die Werte beider Gruppen identisch waren, konnte mittels Statistikprogramm kein Wert errechnet werden.

### Bestimmung der viralen latenten Proteine

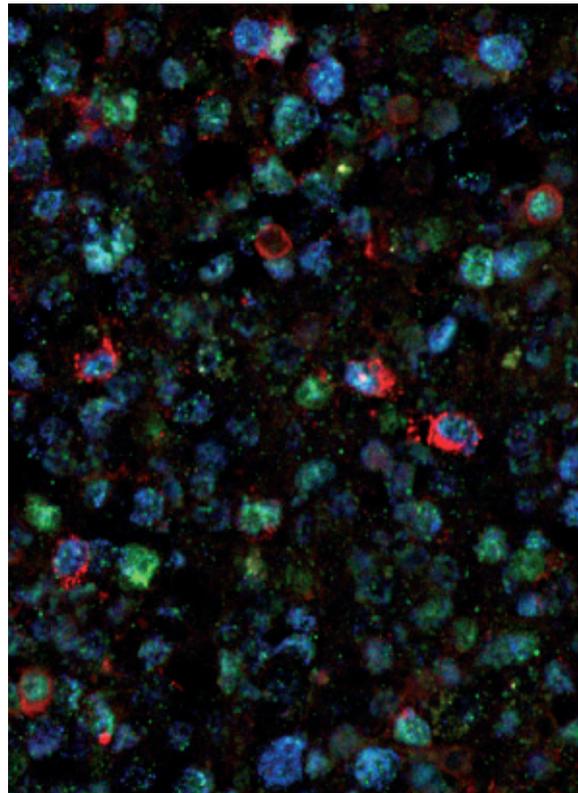
Eine Dreifachfärbung der EBV-infizierten Zellen mit LMP-1/EBNA-2/EBER wurde zur Bestimmung der jeweiligen, in den unterschiedlichen Krankheitsgruppen vorherrschenden Latenztypen durchgeführt. Abbildung 9 gibt die Färbung der vier Diagnosegruppen beispielhaft wieder.

In allen untersuchten Fällen fand sich eine Heterogenität auf Einzelzellniveau. So gab es, unabhängig von dem jeweiligen dominierenden Latenztyp, einige Zellen die ausschließlich EBER exprimierten. Darüber hinaus lagen in den EBNA-2 positiven Fällen einzelne Zellen vor, die nur EBER und LMP-1 beziehungsweise EBER und EBNA-2 ohne LMP-1 exprimierten.

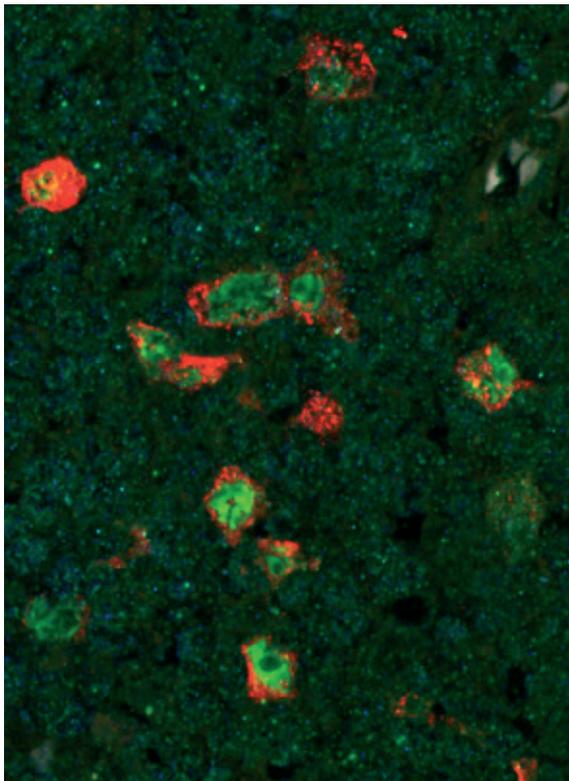
Da die infektiöse Mononukleose eine akute und vorwiegend lytische Infektion ist, erscheint es nicht sinnvoll, den Latenztyp dieser Erkrankung zu bestimmen.



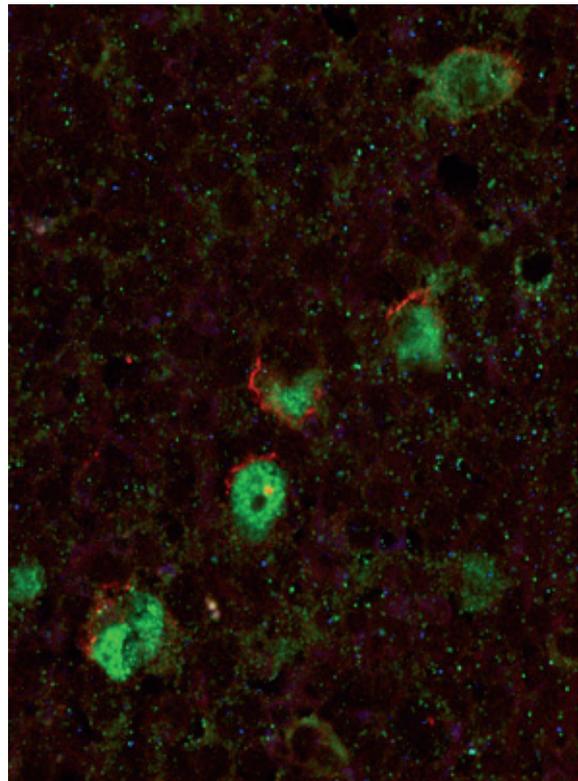
a



b



c



d

Abbildung 9: In den Fällen der Mononukleose (a) und der PTLD (b) stellt sich eine Co-Expression der viralen Antigene EBNA-2 (blau), LMP-1 (rot) und EBER (grün) dar. EBNA-2 wurde bei den Fällen des Hodgkin Lymphoms (c) und der senilen Lymphoproliferation (d) nicht exprimiert. Es ergibt sich daher für die Mononukleose und die PTLD das Latenzmuster III, während die Expression der Virusantigene bei Morbus Hodgkin und senilem Lymphom dem Latenzmuster II entspricht.

Sieben Fälle der PTLD zeigten den Phänotyp EBER, LMP-1 und EBNA-2 positiv. In den Fällen 12 und 16 konnten EBER und LMP-1, jedoch nicht EBNA-2 nachgewiesen werden. Ein weiterer Fall (Fall 17) präsentierte den Latenztyp I. Bei den Fällen der Hodgkin Lymphome, ebenso wie bei den Fällen seniler Lymphoproliferation lag ausschließlich EBER und LMP-1 positiv und EBNA-2 negativ vor, das heißt, es stellte sich hier eine Antigenexpression entsprechend eines Latenztyps II dar.

Die Spearman-Rang Korrelation erbrachte ein signifikantes Ergebnis in Bezug auf das in den unterschiedlichen Diagnosegruppen vorherrschende Latenzmuster. (Tabelle 13). So konnte zwischen den Latenztypen von PTLD und seniler Lymphoproliferation ein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

	IM	PLTD	HD	SL
IM	-	_*	_*	_*
PTLD	_*	-	0,05323	<b>0,03407</b>
HD	_*	0,05323	-	0,72160
SL	_*	<b>0,03407</b>	0,72160	-

Tabelle 13: Die statistische Auswertung der Latenztypen zeigt ein signifikantes Ergebnis (Werte  $\leq 0,05$  sind fett gedruckt) bei dem Vergleich von Post-Transplantations Lymphoproliferationen (PTLD) und seniler Lymphoproliferation. \*Bei der infektiösen Mononukleose (IM) ist eine Latenzbestimmung nicht sinnvoll.

### Multivariate Clusteranalyse

Die Ergebnisse der Clusteranalyse wurden in der Form eines Stammbaumes wiedergegeben, aus dem die berechnete Ähnlichkeit der einzelnen Fälle zueinander und ihre Gruppierung anhand der Verzweigungen und der sich daraus ergebenden Distanzen ablesbar sind. Trotz einer gewissen Heterogenität innerhalb der Gruppen war eine nachvollziehbare Unterteilung sichtbar. Die erste Verzweigung in zwei Hautgruppen trennte die Fälle des Hodgkin Lymphoms (23 - 26) von denen des PTLD und der infektiösen Mononukleose. Innerhalb der PTLD-Mononukleose-Gruppe gibt es eine relativ deutliche Kumulation mehrerer Mononukleosefälle (2, 3, 5, 6, 7) auf der rechten Seite und der meisten PTLD-Fälle (8-14, 16, 17) auf der linken Seite des Stammbaumastes.

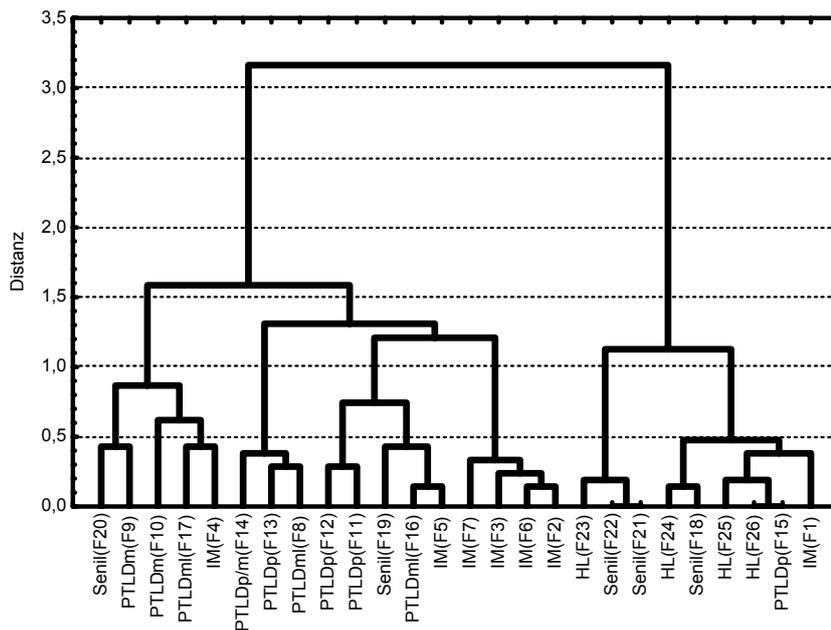


Abbildung 10: Die Clusteranalyse berücksichtigt die verschiedenen Eigenschaften der jeweiligen Fälle und gruppiert sie ihrer Ähnlichkeit entsprechend, unabhängig von der zuvor gestellten Diagnose, mit größerer beziehungsweise kleinerer Distanz. Bei der Post-Transplantations Lymphoproliferation (PTLD) wurde unterschieden zwischen polymorphen (p), monomorphen (m), und mononukleose-like (ml) Lymphomen. IM: infektiöse Mononukleose. HL: Hodgkin Lymphom. Senil: Senile Lymphoproliferation.

Die Fälle, die als senile Lymphoproliferation diagnostiziert waren, bildeten keine eigenständige Gruppe, sondern wurden auf die Hauptgruppen verteilt. Drei Fälle seniler Lymphoproliferation (18, 21, 22) lagen in der Gruppe der Hodgkin Lymphome, die zwei anderen (19, 20) im Bereich der PTLD-Gruppe. Fall 1 war an den ganz äußeren Rand der Hodgkin-Gruppe sortiert. Ein anderer Mononukleosefall (Fall 4) lag im Bereich der PTLD-Fälle. Ein PTLD-Fall (15) kam neben Fall 1 in der Hodgkin-Gruppe zu liegen.

### Vergleich EBV+ und EBV- Hodgkin Lymphome

In Einfachfärbungen zeigten die Tumorzellen in beiden der untersuchten Gruppen des Hodgkin Lymphoms fast ausschließlich den Phänotyp CD27 negativ. In Fall 19 präsentierte sich eine geringe Population CD27 positive Tumorzellen. Auch Blimp-1 war in einigen Fällen schwach positiv, ansonsten negativ in den Tumorzellen. Für bcl-6 ergab sich in einzelnen Fällen eine unter 50% liegende Expression in den Hodgkinzellen.

Signifikante Unterschiede zwischen den EBV positiven und den EBV negativen Lymphomen bestanden bei den untersuchten Fällen nicht.

	EBV	CD27	Blimp-1	Bcl-6
1	+	0	0	0
2	+	0	0	1
3	+	0	0	0
4	+	0	0	0
5	+	0	0	0
6	+	0	0	1
7	+	0	0	0
8	+	0	1	1
9	+	0	1	0
10	+	0	1	0
11	-	0	0	0
12	-	0	0	0
13	-	0	1	0
14	-	0	1	0
15	-	0	1	1
16	-	0	0	0
17	-	0	0	0
18	-	0	0	0
19	-	1	0	0

Tabelle 14: Ergebnisse der Einfachfärbungen von EBV+ und EBV- Hodgkin Lymphomen. Die untersuchten Zellen zeigen den jeweiligen Phänotyp in: 0: weniger als 20% der Zellen; 1: zwischen 20 und 50%; 2: zwischen 50 und 80%; 3: in 100% der Zellen.

## Diskussion

### Differenzierungsstadium und Immunglobulinsynthese der EBV-infizierten Zelle

Die Mehrzahl aller EBV-infizierten Zellen der hier untersuchten Fälle, unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung, sind Icsat positive und CD27 negative B-Zellen, wobei sich zwei Populationen in Bezug auf die Fähigkeit zur Immunglobulinsynthese unterscheiden. Da Icsat positiv ist, sind die EBV-infizierten Zellen aktiviert. Was das Fehlen einer CD27-Expression bedeutet, ist jedoch zu diskutieren und hat bei den unterschiedlichen Erkrankungen wahrscheinlich verschiedene Ursachen.

Bei der infektiösen Mononukleose geht man davon aus, dass eine Infektion von naiven, häufiger jedoch von Memoryzellen<sup>51</sup> stattfindet. Kurth et al. beschrieben bei Fällen infektiöser Mononukleose eine kleinere Population EBV-infizierter Zellen die nichtmutierte V-Regionene trugen und daher nicht das Follikel durchwandert haben, und eine zweite Population mit mutierten V-Regionenen. Beide Populationen fanden sich vornehmlich extrafollikulär<sup>52</sup>.

In diesem Zusammenhang ist Fall 1, die frühe Mononukleose, interessant, da hier eine starke Expression von CD79 $\alpha$  und eingeschränkter Immunglobulinsynthese hinweisend darauf ist, dass EBV hier naive B-Zellen ohne Immunglobulinsekretion infiziert, und erst durch virale Stimulation aktiviert. In den restlichen Fällen der infektiösen Mononukleose zeigen sich in etwa gleicher Verteilung IgM positive, wie IgG/A positive Populationen EBV-infizierter Zellen. Bei der CD27 negativen, IgM positiven Population könnte es sich entsprechend dem Konzept von Brighenti et al. um extrafollikulär primär aktivierte, prä-class-switch B-Zellen handeln<sup>2</sup>.

In den Fällen 4 und 5 dieser Arbeit waren CD27 negative EBV-infizierte Zellen mit IgG/A Synthese nachweisbar. Ein derartiger Phänotyp setzt einen Klassenwechsel bei extrafollikulärer Aktivierung voraus. Tatsächlich wurde für das LMP-1 des EBV die Fähigkeit zur Stimulation des Proteins AID(activation induced cytidine cesaminase), welches für den Klassenwechsel<sup>53,54</sup> und zur Einleitung eines Isotypenwechsels notwendig ist, in-vitro bereits gezeigt<sup>55</sup>.

Die CD27 positive, IgG/A produzierende Population infizierter B-Zellen repräsentiert möglicherweise den zweiten von Brighenti et al. beschriebenen

extrafollikulär aktivierten Zelltyp, die durch EBV reaktivierte Memoryzelle<sup>2</sup>. Eine andere Möglichkeit sind Zellen, die trotz EBV-Infektion regulär ein Keimzentrum durchlaufen haben und sich zu Memoryzellen weiterentwickeln konnten, was jedoch bei der infektiösen Mononukleose eine geringere Rolle zu spielen scheint<sup>52</sup>.

Bei der akuten infektiösen Mononukleose kann die fehlende CD27-Expression zusammenfassend durch die Fähigkeit des EBV, Zellen unter Umgehung des Keimzentrums zu aktivieren, erklärt werden.

In mehreren Studien zur Phänotypbestimmung der Tumorzellen bei EBV-assoziiertes PTLD wurden die Proteine MUM-1(Icsat), CD138 und bcl-6 zur Festlegung des Differenzierungsgrades der infizierten und transformierten Zellen herangezogen. CD138, ein Marker für ausdifferenzierte Plasmazellen, war bei den Studien nur in geringer Zahl der Fälle positiv. Bcl-6 war immer negativ. Da die Mehrheit der beobachteten Zellen MUM-1+/CD138- war, wurden diese als Keimzentrums- oder Post-Keimzentrumszellen, die noch keine komplette Differenzierung erfahren haben, beschrieben<sup>7,56-58</sup>.

Capello et al. beobachteten vor allem drei unterschiedliche Gruppen bei den EBV-assoziierten PTLD. Erstens fanden sich Tumorzellen die eine normale somatische Hypermutation durchlaufen haben. Derartige Tumorzellen konnten auch in der vorliegenden Arbeit als CD27 und IgG/A positiv beschrieben werden. Die zweite Gruppe umfasst Tumorzellen die eine fehlerhafte somatische Mutation durchlaufen haben und so prinzipiell in Apoptose hätten gehen müssen, dieser Mechanismus weist Ähnlichkeit zu der Immortalisierung der Hodgkin Zellen auf und ist vereinbar mit CD27 negativen, somatisch hypermutierten Zellen. Schließlich beschreiben Capello et al. eine dritte Gruppe von Tumorzellen, die genotypisch naiv waren, also keine somatische Hypermutation durchgemacht haben und lediglich phänotypisch Keimzentrumszellen glichen<sup>59</sup>. Dieser dritte Zelltyp entspricht den bereits für die infektiöse Mononukleose beschriebenen, durch EBV antigenunabhängig, extrafollikulär aktivierten B-Zellen. In diesen Fällen ist nur in Ausnahmen eine somatische Hypermutation beschrieben<sup>60</sup>.

Kahn et al. bestätigten die von Küppers und Rajewsky bereits 1998 formulierte Annahme, dass EBV-infizierte Hodgkin- und Sternberg-Reed Zellen von Keimzentrumszellen abstammten<sup>51,56,60</sup>. Ergänzend wurde von Brighenti et al. die reaktivierte Memoryzelle als korrespondierende Normalzelle bestimmt, da, wie eingangs erläutert eine CD30-Expression bei B-Zellen ausschließlich während der Memoryzellaktivierung nachgewiesen ist<sup>2</sup>.

Das Ausbleiben der CD27 Hochregulation auf den Tumorzellen der vorliegenden Arbeit steht dazu im Widerspruch. Der daraufhin durchgeführte Vergleich EBV-positiver und negativer Hodgkin Lymphome, um herauszufinden ob dies ein durch EBV bedingtes Phänomen sein könnte, erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Das Fehlen von CD27 ist somit nicht von einer EBV-Assoziation abhängig.

Der hier beobachtete Phänotyp kann als Bcl-6 negativ, Blimp-1 negativ, und CD27 negativ beschrieben werden. Entsprechend dem eingangs angeführten Model, handelt es sich bei den Tumorzellen um späte Keimzentrums- oder vielmehr um post-Keimzentrumszellen, in welchen Bcl-6 gerade herunterreguliert, Blimp-1 und CD27 aber noch nicht hochreguliert worden sind (Siehe Abbildung 11). Infolge einer pathologischen Follikelreaktion, die nicht normal zu Ende geführt wird, scheinen die Tumorzellen, die der Apoptose entgehen, an diesem Punkt der Differenzierung das Keimzentrum verlassen und als Memoryzellen überleben zu können. Entsprechend der aktuellen Forschung, nach welcher in Hodgkin- und Sternberg-Reed Zellen Rearrangement der Immunglobulingene, jedoch keine Transkription stattfindet<sup>32,61</sup> zeigte sich in den Tumorzellen des Hodgkin Lymphoms der hier untersuchten Fälle keine Immunglobulinsynthese.

Auch die hier untersuchten Fälle seniler Lymphoproliferation zeigen das Bild CD27 negativer, aktivierter B-Zellen, wobei die CD79 $\alpha$ -Expression zum Teil in weniger als 20% der Tumorzellen sicher positiv war. Bemerkenswert ist besonders das Fehlen einer Immunglobulinsynthese bei diesen Fällen. Eine Follikelpassage voraussetzend, spricht die Beobachtung, dass auch keine Leichtkettensynthese stattfindet für ein den Hodgkin Lymphomen ähnliches pathologisches Rearrangement der V-Regionene.

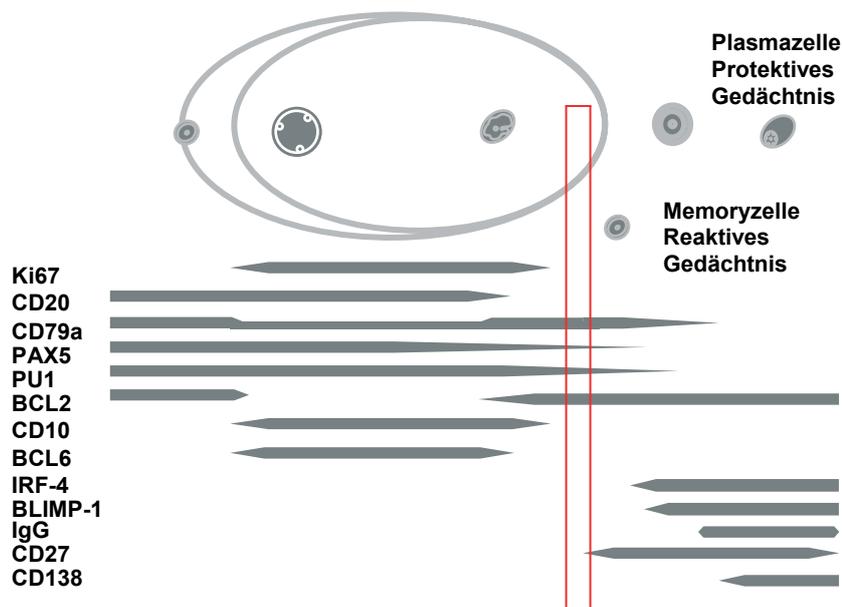


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Expression von Oberflächenmarkern und Transkriptionsfaktoren während der Keimzentrumsentwicklung von B-Zellen. Der rote Balken markiert den hier postulierten Differenzierungsstand der Tumorzelle des EBV-assoziierten, klassischen Hodgkin Lymphoms (adaptiert nach Brighenti et al.<sup>2</sup>).

Da bislang noch keine Analyse der V-Regionen Mutationen unternommen wurde, steht sicherer Nachweis einer Follikelpassage der Tumorzellen noch aus. In der vorliegenden Arbeit, als auch bei Oyama et al.<sup>49</sup> zeigten die Tumorzellen eine CD30-Expression und entsprechen damit dem Phänotyp der Hodgkin Zelle.

Das Epstein-Barr Virus verfügt demnach über verschiedene Mechanismen in den Differenzierungsweg der EBV-infizierten Zelle einzugreifen. So aktiviert das Virus bei der infektiösen Mononukleose naive B-Zellen oder Memoryzellen extrafollikulär. Bei Hodgkin Lymphom und seniler Lymphoproliferation dominiert die immortalisierende Wirkung auf defekte post-Keimzentrumszellen. Bei der PTLD kommen beide Mechanismen vor.

### Bestimmung der viralen latenten Proteine

In den untersuchten Fällen traten vornehmlich zwei der in-vitro beschriebenen Latenztypen (siehe Tabelle 1) auf. Diese entsprachen Latenztyp II und III. Es konnten aber auch Zellen beobachtet werden, deren virales Antigenmuster nicht mit einem Latenztyp erfasst werden konnte. Dieses Phänomen ist auch in

anderen Untersuchungen<sup>21,22</sup> beschrieben und ist vermutlich Ausdruck eines natürlich ablaufenden Prozesses ohne Synchronisation der Zellen. Insofern bleibt die Latenzbestimmung bei EBV-assoziierten Erkrankungen als ein theoretisches in-vitro Modell zu verstehen. Das heißt, in-vivo kommt selten ausschließlich nur eine Latenz in allen EBV tragenden Zellen vor. Somit handelt es sich mehr um eine Annäherung, um Gruppen bilden und Fälle nach Gemeinsamkeiten einordnen zu können.

Das Expressionsmuster EBER, LMP-1 und EBNA-2 positiv, welches Latenztyp III entspricht, trat in der Mehrzahl der Fälle von PTLD auf. Bei der senilen Lymphoproliferation und dem Hodgkin Lymphom dagegen fand sich in den untersuchten Fällen nur der Latenztyp II mit EBER und LMP-1 positiven, jedoch EBNA-2 negativen Zellen.

Diese Ergebnisse stimmen weitgehend überein mit der aktuellen Forschung. Bei der EBV-assoziierten PTLD wurde in mehreren Studien ein Vorherrschen von LMP-1 und EBNA-2 positiven Zellen, also Latenztyp III dokumentiert<sup>17</sup>.

Oyama et al. beschrieben bei der Untersuchung von 22 Fällen seniler Lymphoproliferation das Auftreten von Latenztyp III bei sieben Patienten. Latenztyp II dagegen fand sich in fünfzehn der beobachteten Fälle<sup>62</sup>. Wing Y Au et al. präsentierten den Fall einer 78 jährigen Patientin mit einem EBV-assoziierten, diffus großzelligen B-Zell Lymphom<sup>63</sup>, auch hier konnte keine EBNA-2-Expression nachgewiesen werden. Diese berichten weiter, dass, anders als bei Lymphomen die mit Immundefizienz assoziiert sind, bei senilen Lymphoproliferationen über 70% der Fälle dem Latenztyp II entsprechen.

Das beim Hodgkin Lymphom vorherrschende virale Expressionsmuster wird allgemein als Latenztyp II charakterisiert<sup>64</sup>.

### **Einordnung der senilen Lymphoproliferation**

Nachdem die Phänotypen der jeweiligen Erkrankungen dargestellt wurden, soll nun eine konzeptionelle Einordnung der senilen Lymphome unternommen werden.

Es fällt auf, dass sowohl beim Hodgkin Lymphom als auch bei der senilen Lymphoproliferation eine fehlende Immunglobulinsynthese und der Latenztyp II

vorliegen. Bei den Tumorzellen der PTLD findet dagegen eine Immunglobulinsynthese statt, und der dominierende Latenztyp ist III.

Zwischen den ersten beiden Diagnosegruppen gibt es über diese Gemeinsamkeiten hinaus auch histologisch viele Übereinstimmungen. In beiden Gruppen werden Hodgkin und Sternberg-Reed Zell ähnliche Tumorzellen beschrieben. Auch das Mikroenvironment, mit starker T-Zell-Infiltration ist beiderseits beschrieben<sup>49</sup>.

Drei der Fälle seniler Lymphoproliferationen gliederten sich bei der, in der vorliegenden Arbeit durchgeführten, Clusteranalyse in die Gruppe der Hodgkin-Lymphome ein. Fall 20, der in die PTLD-Gruppe gegliedert wurde, zeigt den untersuchten Hodgkin Lymphomen identische immunphänotypische Eigenschaften. Weshalb er nicht in der Hodgkin-Gruppe zu liegen kam, mag an der im Gegensatz zu den untersuchten Hodgkin Lymphomen geringgradig stärkeren CD79-Expression der EBER+Zellen liegen. Fall 19 der ebenfalls der PTLD-Gruppe zugeordnet wurde, zeigte als einziger Fall seniler Lymphome eine, wenn auch sehr geringe Immunglobulinsynthese und nimmt daher eine Sonderposition innerhalb der Latenzgruppe II ein.

Die für Hodgkin Lymphome typische Markerkombination CD30 positiv, CD15 positiv oder negativ und CD20 negativ bis schwach positiv<sup>18</sup> fand sich bei den untersuchten Fällen seniler Lymphome ebenfalls, wenn auch mit teilweise stärkerer Positivität für CD20 (Fall 20). Bei den PTLD Fällen dagegen lagen vornehmlich CD20 positive, CD30 und CD15 negative Tumorzellen vor.

Es ist außerdem zu bemerken, dass weder bei den von Shioyama et al. untersuchten 76 Patienten mit seniler Lymphoproliferation<sup>65</sup>, noch bei dem von Wing Y Au et al. vorgestellten Patientin, eine Immundefizienz vorlag. Auch bei Patienten die an einem Hodgkin Lymphom erkrankten, lag meistens ein intaktes, bis überaktives Immunsystem vor<sup>18</sup>. In diesem Punkt unterscheiden sich die beiden Erkrankungen erneut deutlich von der PLTD und anderen durch Immunsuppression hervorgerufenen Lymphoproliferationen.

Daher wird hier postuliert, dass die senile Lymphoproliferation kein eigenständiges Krankheitsbild darstellt, sondern dem zweiten Altersgipfel des Hodgkin Lyphoms zuzuordnen ist.

Diese Feststellung widerspricht der Einordnung von Oyama et al, welche die senile Lymphoproliferation als ein der PTLD ähnliches unabhängiges

Krankheitsgeschehen werten. Auch dort wurden in 15 Fällen Zellen mit großer Ähnlichkeit zu Sternberg-Reed Zellen beschrieben, die jedoch nicht die klassische Morphologie von Sternberg-Reed Zellen aufwiesen<sup>62</sup>. Ein von Shimoyama et al., Mitgliedern derselben Arbeitsgruppe, im März 2006 veröffentlichter Review, mit einem größeren Patientenkollektiv, räumt eine deutliche Ähnlichkeit zu den Hodgkin Lymphomen ein, wenn auch hier die Trennung der beiden Entitäten aufrechterhalten wird<sup>65</sup>.

Besonders in Bezug auf das anzustrebende Therapiekonzept könnte eine Einordnung der senilen Lymphome unter die Hodgkin Lymphome relevant sein. So kann heute durch Kombination aus Radio- und Chemotherapie beim Hodgkin Lymphom eine Heilungsrate von über 80% erreicht werden<sup>66</sup>. Diehl et al. berichten für das BEACOPP-Schema bei fortgeschrittenem Hodgkin Lymphom von Gesamtüberlebensraten bis zu 90% in sieben Jahren<sup>67</sup>. Von den bei Oyama et al. vorgestellten Patienten starben sechs der 15 Patienten mit Sternberg-Reed ähnlichen Zellen, während von den sieben Patienten ohne Sternberg-Reed ähnliche Zellen nur zwei verstarben. Eine Gesamtmortalität von 40% innerhalb der ersten 17 Monate nach Diagnosestellung<sup>62</sup> ist kein befriedigendes Ergebnis. Eine bessere Anpassung des Therapiekonzeptes könnte die Mortalität der senilen Lymphoproliferationen womöglich senken<sup>17</sup>.

## **Zusammenfassung**

Die vorliegende Arbeit hatte zur Aufgabe, die EBV-infizierte Zelle bei infektiöser Mononukleose, Hodgkin Lymphom, Post-Transplantations-Lymphoproliferation (PTLD) und seniler Lymphoproliferation zu beschreiben. Da die Einordnung der senilen Lymphoproliferation als eigenständige Entität unbefriedigend ist, sollte der Bezug zu PTLD oder Hodgkin Lymphom untersucht werden.

Sowohl bezüglich des Latenztyps des EBV, der Oberflächenantigen- und Transkriptionsfaktorenexpression als auch der fehlenden Immunglobulinsekretion entsprachen sich Hodgkin Lymphom und senile Lymphoproliferation. Zwischen seniler Lymphoproliferation und PTLD dagegen fanden sich diesbezüglich große Unterschiede. Daher sind die senilen Lymphoproliferationen im Ergebnis dieser Doktorarbeit als Hodgkin Lymphome des höheren Alters anzusehen.

Als Nebenbeobachtung stellten sich die hier untersuchten Hodgkin Zellen als CD27 negativ dar, die im Unterschied stehen, zur CD27 und CD30 positiven Memoryzelle, welche als korrespondierende Normalzelle postuliert wurde. Der Vergleich EBV-negativer und EBV-positiver Hodgkin Lymphome erbrachte in dieser Hinsicht jedoch keine Unterschiede. Die CD27-Negativität der Hodgkin Zelle ist somit nicht als EBV-spezifisches Phänomen zu verstehen und bedarf weiterer Klärung.

## Literatur

1. Janeway C, Travers, P. Immunologie. Heidelberg, Berlin,: Spektrum Acad.Verlag; 2002
2. Brighenti A, M. Andrulis, et al. Extrafollicular proliferation of B cells in the absence of follicular hyperplasia: a distinct reaction pattern in lymph nodes correlated with primary or recall type responses. *Histopathology* . 2005;47:90-100
3. Klein U, Tu Y, et al. Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Pro.Natl. Acad. Sci. USA*. 2003;100:2639-2644
4. Agematsu K, Hokibara, S. et al. CD27: a memory B-cell marker. *Trends Immunology Today*. 2000;21:204-206
5. Klein U, Rajewski, K. et al. Human immunoglobulin (Ig)M(+)IgD(+)peripheral blood cellsexpressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes:CD27 as a general marker for somatic mutated(memory) cells. *J Exp Med*. 1998;188:1679-1689
6. Jung J, Choe, J. et al. Regulation of CD27-expression in the course of germinal center B cell differentiation: th pivotal role of IL-10. *Eur. J. Immunol*. 2000;30:2437-2443
7. Novoa-Takara L, Perkins S.L, Qi D, Sidham V.B, VesoleD.H, Hariharan S, Luo Y, Ewton A, Chang C-C. Histogenetic phenotypes of the B cells in posttransplant lymphoproliferative disorder by immunohistochemical analysis correlate with transplant type. *Am J Clin Pathol*. 2005;123:104-112
8. Shaffer A, Lin, Kl., Kuo, TC., Yu, X., Hurt, EM., Rosenwald, A., Giltnane, JM., Zhao, H., Calame, K., Staudt, LM. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity*. 2002;17:51-62
9. Finke D, Baribaud, F, et al. Extrafollicular plasmablast B cells play a key role in carrying retroviral infection to peripheral organs. *The Journal of Immunology*. 2001;166:6266-6275
10. Cunningham A, Serre, K, et al. Loss of CD154 impairs the Th2 extrafollicular plasma cell response but not early T cellproliferation and interleukin-4 induction. *Immunology*. 2004;113:187-193

11. MacLennan I, Toellner, KM, et al. Extrafollicular antibody responses. *Immunological Reviews*. 2003;194:8-18
12. Burkitt D. A children's cancer dependent on climatic factors. *Nature*. 1962;194:232-234
13. Epstein M, Achong, B, Barr, Y. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*. 1964;1:702-703
14. Herold G. *Innere Medizin*. Köln; 2004
15. Classen M, Diehl, V, Kochsiek, K ed *Innere Medizin* (ed 4.Auflage). München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg; 1998
16. Hudnall SD, Ge Y, Wei L, Yang NP, Wang HQ, Chen T. Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-infected cells in human pharyngeal tonsils. *Mod Pathol*. 2005;18:519-527
17. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr Virus. In: Knipe DM, Howley P.M, ed. *Fields Virology*. Vol. 2. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2001:2575-2627
18. Harris N. The many faces of Hodgkin's disease around the world: What have we learned from its pathology? *Annals of oncology*. 1998;9; Supplement 5:45-56
19. Kanegane H, Nomura K, Miyawaki T, Tosato G. Biological aspects of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocytes in chronic active EBV infection and associated malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002;44:239-249
20. Küppers R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:801-812
21. Niedobitek G, Agathangelou, A, Herbst, H., Whitehead, L., Wright, DH., Young, LS. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: Viral latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol*. 1997;182:151-159
22. Kurth J, Hansmann, ML et al. Epstein-Barr virus-infected B cells expanding in germinal centers of infectious mononucleosis patients do not participate in the germinal center reaction. *PNAS*. 2003;100:4730-4735
23. Evans A, Niederman, J. Epstein-Barr virus. In: Evans A, ed. *Viral infections of human epidemiology and control*. New York: Plenum Publishing; 1989:265
24. Peter J, Ray, CG. Infectious mononucleosis. *Pediatr. Rev*. 1998;19:276

25. Hildebrandt H ed Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch (ed 258). Berlin: Walter de Gruyter; 1998
26. Cotran R, Kumar, V, Collins, T ed Robbins pathologic basis of disease (ed 6.Auflage). Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1999
27. Hildebrandt H. Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch. Berlin: Walter de Gruyter.; 1998
28. Riede U-N, Werner, M., Schäfer, H.-E. ed Allgemeine und spezielle Pathologie (ed 5). Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2004
29. Horie R, Watanabe, T. CD30: expression and function in health and disease. seminars in Immunology. 1998;10:457-470
30. Küppers R, Hansmann, ML., Rajewski, K. Clonality and germinal centre B-cell derivation of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. Ann Oncol. 1998;9, Suppl.5:17-20
31. Küppers R, Schwering, I., Brauninger, A., et al. Biology of hodgkin's lymphoma. Ann Oncol. 2002;13, Suppl.1:11-18
32. Küppers R, Rajewsky,K. The origin of Hodgkin and reed/Sternberg cells in Hodgkin disease. Annual Review of Immunology. 1998;16: 471-493
33. Kanzler H, Küppers, R. et al. Hodgkin and Sternberg-Reed cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) geminal center B cells. J of Exp. Med. 1996;184:1495-1505
34. Küppers R, Kanzler H, Hansmann ML, Rajewsky K. Single cell analysis of Hodgkin/Reed-Sternberg cells. Ann.Oncol. 1996;7 Suppl 4:27-30
35. Rajewsky K, Kanzler H, Hansmann ML, Küppers R. Normal and malignant B-cell development with special reference to Hodgkin's disease. Ann Oncol. 1997;8 Suppl 2:79-81
36. Jox A, Zander T, Kuppers R, Irsch J, Kanzler H, Kornacker M, Bohlen H, Diehl V, Wolf J. Somatic mutations within the untranslated regions of rearranged Ig genes in a case of classical Hodgkin's disease as a potential cause for the absence of Ig in the lymphoma cells. Blood. 1999;93:3964-3972
37. Stein H, Marafioti T, Foss HD, Laumen H, Hummel M, Anagnostopoulos I, Wirth T, Demel G, Falini B. 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. 2001;97:496-501

38. Jundt F, Kley K, Anagnostopoulos I, Schulze Probsting K, Greiner A, Mathas S, Scheidereit C, Wirth T, Stein H, Dorken B. Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease. *Blood*. 2002;99:3060-3062
39. Ushmorov A, Ritz O, Hummel M, Leithauser F, Moller P, Stein H, Wirth T. Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression. *Blood*. 2004;104:3326-3334
40. Altmann M, Hammerschmidt, W. Epstein-Barr virus provides a new paradigm: A requirement for the immediate inhibition of Apoptosis. *PLoS Biology*. 2005;3:2148-2157
41. Küppers R, Yahhalom, J., Josting A. Advances in biology, diagnostics, and treatment of Hodgkin's disease. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2006;12 (1 Suppl 1):66-76
42. Jarrett RF, Stark, G.L., White, J., et al. Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined patients with classical Hodgkin lymphoma: a population-based study. *Blood*. 2005;106:2444-2451
43. Glaser SL, Lin, R.J. Stewart, S.L. Epstein-Barr virus associated Hodgkin's disease: Epidemiologic characteristics in international data. *Int. J. Cancer*. 1997;70:375-382
44. Müller-Hermelink HK, Ott, G, Kneitz, B, Rüdiger, T. Das Spektrum lymphoproliferativer Erkrankungen und maligner Lymphome nach Organtransplantation. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 2004;88:63-68
45. Brink A, Dukers, D et al. Presence of Epstein-Barr virus latency type III at single cell level in post-transplantation lymphoproliferative disorders and AIDS related lymphomas. *J Clin Pathol*. 1997;50:911-918
46. Jaffe ES, Borisch, B., Raphael, M., Swerdlow, S.H. Chapter 9: Immunodeficiency associated lymphoproliferative disorders. In: Jaffe ES, Harris, N.L., Stein H., Vardiman, J.W., ed. *World Health Classification of Tumors: Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC Press; 2001

47. Harris N, Ferry, J., et al. Posttransplant lymphoproliferative Disorders: Summary of Society for Hematopathology Workshop. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 1997;14:8-14
48. Nalesik M, Jaffe, ES, et al. *Am J Pathol*. 1988;133: 173
49. Oyama T, Ichimura, K., et al. Senile EBV+ B-Cell Lymphoproliferative Disorders. *Am J Pathol*. 2003; 27:16-26
50. Fagnoni F, Vescovini, R., Passeri,G., et al. Shortage of circulating naive CD8+ T cells provides new insights on immunodeficiency in aging. *Blood*. 2000;95:2860-2868
51. Küppers R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:801-812
52. Kurth J, Spieker, T., Wustrow, J., Strickler,J., Hansmann, ML., Rajwski, K., Küppers, R. EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: Viral strategies for spreading in the b cell compartment and establishing latency. *Immunity*. 2000;13:485-495
53. Longerich S, Basu, U., et al. AID in somatic hypermutation and class switch recombination. *Curr. Op. in Immunol*. 2006;18:1-11
54. Oppezso P, Dighiero, G. What do somatic hypermutation and class switch recombination teach us about chronic lymphocytic leukaemia pathogenesis? *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;294:71-89
55. He B, Raab-Traub, N. et al. *J. Immunol*. 2003;171:5215-5224
56. Kahn G, Lake, A, et al. Phenotype and frequency of Epstein-Barrvirus-infected cells in pretreatment blood samples from patients with Hodgkin lymphoma. *British Journal of Haematology*. 2005;129:511-519
57. Abed N, Casper, JT, et al. Post tranplant lymphoproliferative disorder. Evaluation of histogenesis of B-lymphocytes in pediatric EBV-related post-transplant lymphoproliferativ disorders. *Bone Marrow Transplantation*. 2004;33:321-327
58. Capello D, Cerri, M, et, al. Molecular histogenesis of posttransplant lymphoproliferative disrdrs. *Blood*. 2003;102
59. Capello D, Cerri, M, et, al. Molecular histogenesis of posttransplant lymphoproliferative disrdrs. *Blood*. 2003;102
60. Küppers R, Rajewsky,K. The origin of Hodgkin and reed/Sternberg cells in Hodgkin disease. *Annual Review of Immunology*. 1998;16:471-493

61. Marafioti T, Hummel, M., et al. Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with funktionalimmunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood*. 2000;95:1443-1450
62. Oyama T, Ichimura, K., et al. Senile EBV+ B-Cell Lymphoproliferative Disorders. *Am J Pathol*. 2003;27:16-26
63. Au WY, Trendell-Smith, N, et al. Senile EBER positive diffuse large B cell lymphoma relapsing in the nasopharynx. *haematologica*. 2006;91(suppl.8):20
64. Depil S, Morales, O, Auriault, C. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. *Ann Biol Clin*. 2004;62:639-648
65. Shimoyama Y, Oyama, T., Asano, N., et al. Senile Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders: a mini review. *J. Clin. Exp. Hematol*. 2006;46:1-4
66. DeVita V. A selective history of the therapy of Hodgkin`s disease. *Br J Haematol*. 2003;122:718-727
67. Diehl V, Behringer, K. Could BEACOPP be the new standard for the treatment of advanced Hodgkin's lymphoma(HL)? *Cancer Invest*. 2006;24:713-717



## **Danksagung**

Herrn Professor Dr. Müller-Hermelink danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit im Institut für Pathologie anzufertigen. Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Rüdiger für die Überlassung dieses Themas und die großartige fachliche und menschliche Betreuung in allen Phasen dieser Arbeit. Weiterhin möchte ich mich sehr herzlich bei Sabine Roth bedanken, die mich, über hilfreiche Ratschläge während der Laborarbeit und das Korrekturlesen dieser Arbeit hinaus, stets wunderbar unterstützt hat. Petra Stempfle danke ich vielmals für die Hilfestellung bei den immunhistochemischen Färbungen und die freundschaftliche Zusammenarbeit. Irina Bonzheim gilt mein Dank für die Geduld bei allen Computerproblemen. Herrn Schmitt danke ich für seine Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen. Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre stete Unterstützung und die Selbstverständlichkeit bedanken, mit der sie meine Ausbildung ermöglicht haben.



## Tabellarischer Lebenslauf

<b>Name:</b>	Klauss
<b>Vornamen:</b>	<u>Esther</u> Katharina
<b>Geburtsdatum:</b>	23.07.1980
<b>Geburtsort:</b>	Gräfelfing bei München
<b>Staatsangehörigkeit:</b>	deutsch
<b>Familienstand:</b>	ledig
<b>Schulbildung:</b>	1986-1988 Grundschule Rott am Inn 1988-1990 Grundschule Neubeuern 1990-1999 Karolinen-Gymnasium Rosenheim 1999 Abitur
<b>Studium:</b>	2000-2006 Medizin an der Bayerischen Julius- Maximilians-Universität Würzburg 11/2006 Drittes Staatsexamen 16.11.2006 Approbation als Ärztin
<b>Beruf:</b>	01.12.2006 Assistenzärztin am Institut für Pathologie der bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg





