

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

**Epstein-Barr-Virus positive Lymphoproliferationen und Non-Hodgkin-Lymphome
der B-Zellreihe:
Eine immunhistochemische und zytogenetische Studie.**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Heike Naser
aus Fürth

Würzburg, September 2007

Referent: Prof. Dr. med. German Ott
Korreferent: Prof. Dr. med. Holger Höhn
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2008

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Das Epstein-Barr-Virus (EBV).....	1
1.2	Der Lebenszyklus des Epstein-Barr-Virus.....	1
1.3	Die virale Proteinexpression infizierter B-Zellen.....	2
1.4	Das Epstein-Barr-Virus: Infektiöse Mononukleose und maligne Tumoren	4
1.4.1	Nasopharynxkarzinom.....	4
1.5	Maligne Lymphome.....	5
1.5.1	Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL).....	6
1.6	Lymphome und Lymphoproliferationen bei Immundefizienz.....	7
1.7	Posttransplantations-assoziierte lymphoproliferative Erkrankungen (PTLD).....	8
1.8	Andere EBV-assoziierte Lymphoproliferationen/Lymphome.....	9
1.9	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	10
2.	Material und Methoden	11
2.1	Material.....	11
2.2	Einteilung des Untersuchungsmaterials.....	11
2.3	Histopathologische Klassifikation.....	12
2.4	Erstellung der Gewebearrays (tissue microarray).....	13
2.5	Immunhistochemie	13
2.5.1	Auswertung der Immunhistochemie.....	14
2.5.2	Erfassung der Immunhistochemie hinsichtlich des GCB-und non-GCB-Status	16
2.6	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH).....	17
2.6.1	Auswertung der FISH-Präparate.....	18
2.7	Klonalitätsanalysen.....	18
2.8	Statistik.....	19
3.	Ergebnisse	20
3.1.1	Übersicht über die ausgewerteten Fälle	20
3.2.1	Morphologische Diagnosen	22
3.2.2	Einteilung nach klinischer Grunderkrankung.....	23
3.2.3	Korrelation der Grundkrankheiten mit den morphologischen Diagnosen.....	23

3.3	Immunhistochemische Charakterisierung	25
3.3.1	EBV-Assoziation und Verteilung der Latenztypen.....	25
3.3.2	Expression von CD10, BCL-6 und MUM1.....	26
3.3.3	Korrelation der CD138-Reaktivität mit den Daten des Hans-Klassifikators.....	28
3.3.4	Sekretorische Differenzierung.....	29
3.3.5	Korrelation der sekretorischen Differenzierung mit der Einstufung nach dem Hans-Klassifikator und der CD138-Expression.....	29
3.3.6	Antiapoptosemarker, Aktivierungsmarker und Proliferationsmarker.....	30
3.4	Humanes Herpesvirus 8 (HHV8).....	31
3.5	Untersuchungen zur Klonalität.....	31
3.6	Nachweis chromosomaler Aberrationen in der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH).....	33
3.7	Daten zu einer nicht-EBV-assoziierten Kontrollgruppe.....	35
3.7.1	Immunhistochemie der Kontrollgruppe.....	35
3.7.2	Hans-Klassifikator.....	35
3.7.3	Weitere immunhistochemische Marker der Kontrollgruppe.....	36
3.7.4	Zytogenetische Daten der Kontrollgruppe.....	37
3.8	Korrelation der Morphologien untereinander und der Grunderkrankungen untereinander.....	38
3.8.1	Vergleich der immunhistochemischen Korrelationen bei DLBCL, Nicht-DLBCL und zur Kontrollgruppe.....	38
3.8.2	Vergleich der zytogenetischen Korrelationen bei DLBCL, Nicht-DLBCL und zur Kontrollgruppe.....	40
3.8.3	Vergleich der Nicht-DLBCL mit der Kontrollgruppe.....	41
3.8.4	Vergleich der Grunderkrankungen untereinander.....	42
4.	Diskussion.....	44
4.1	Patientenkollektiv, EBV-Assoziation und klinische Daten.....	44
4.2	Senile EBV-assoziierte Lymphoproliferationen.....	46
4.3	GCB- und non-GCB-Status.....	48
4.4	Expression von CD138, BCL-2 und BCL-6.....	50
4.5	Interphasenzytogenetische Untersuchungen.....	52

4.6	Humanes Herpesvirus 8.....	53
5.	Zusammenfassung	55
6.	Literatur	58

1. Einleitung

1.1 Das Epstein-Barr Virus (EBV)

Das Epstein-Barr Virus (humanes Herpesvirus 4 - HHV4 bzw. EBV) ist ein behülltes DNA-Virus der Familie Herpesviridae. Es besteht aus einer linearen Doppelstrang-DNA (184 kbp) mit einem ikosaedrischen Nukleokapsid und ist 150-250 nm groß. Es zählt zur Subfamilie der Gammaherpesvirinae, Gattung Lymphokryptovirus (1). Es wurde 1964 von Epstein und Barr bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von humanen B-Zelllinien, die aus afrikanischen Burkitt-Lymphomen isoliert worden waren, entdeckt (2). Der einzige Wirt des EBV ist der Mensch. Infiziert werden Epithelien und B-Lymphozyten.

Das Virus bindet mit einem Glycoprotein (gp 350) seiner Hülle an den CD 21-Rezeptor, der sich auf der Oberfläche von humanen B-Lymphozyten befindet. Ergänzend bindet es noch mit Hilfe eines zweiten Glycoproteins (gp 42) an den HLA-II-Rezeptor der Lymphozyten (3). In der infizierten Zelle liegt das virale Genom meist episomal vor (4).

1.2 Der Lebenszyklus des Epstein-Barr Virus

Das EBV wird von Wirt zu Wirt durch den Speichel übertragen. Man unterscheidet eine akute Phase (mit lytischer Replikation und ggf. Zerstörung der Wirtszelle) und eine Latenzphase, die lebenslang andauert. Primäre Infektionen haben ihren Ursprung wahrscheinlich im Epithel des Oropharynx, wo das Virus während der akuten Infektion in erster Linie repliziert (5,6). Der Speichel des infizierten Wirtes ist meist nur während der Primärinfektion infektiös, das Virus kann aber auch 3 bis 4 Jahre von infizierten Zellen des Oropharynx in den Speichel abgegeben werden (7). Nachfolgend infiziert es dort „vorbeiwandernde“ B-Lymphozyten (B-lymphotrop). Das EBV persistiert lebenslang latent in zirkulierenden ruhenden B-Gedächtniszellen (8, 9).

Das Virus hat *in vitro* die Fähigkeit zur Immortalisierung ruhender B-Lymphozyten, die zu kontinuierlich wachsenden lymphoblastoiden Zelllinien transformiert werden (10), da *in vitro* die CD8+-Immunantwort des infizierten Wirtes fehlt.

EBV-infizierte B-Zellen können prinzipiell jederzeit von der Latenzphase in den lytischen Zyklus übertreten. Dabei werden in der Wirtszelle Proteine exprimiert, die diese zur Proliferation anregen. Im gesunden, immunkompetenten Wirt löst die infizierte B-Zelle (über LMP1) eine Immunantwort von zytotoxischen CD8+ T-Zellen aus, welche die infizierten B-Zellen zerstören und damit die Erkrankung limitieren. Das EBV persistiert in ruhenden, zirkulierenden B-Gedächtniszellen mit einer Häufigkeit von 1:1000000 Zellen lebenslang (nur EBNA-1 wird exprimiert, welches keinen Angriffspunkt für die CD8+Zellen bietet) (4).

1.3 Die virale Proteinexpression infizierter B-Zellen

Die viralen Proteine des Epstein-Barr Virus interagieren mit verschiedenen antiapoptotischen Molekülen, um die Infektion zu verbreiten, Zellen zu immortalisieren oder zu transformieren (4,8,11,12). Im folgenden werden nur die Proteine der Latenz besprochen. Es handelt sich hierbei um EBV-encoded nuclear antigens (EBNAs), latente Membranproteine (LMPs) und EBV encoded RNAs (EBERs) (8,13-17).

Tabelle 1: Übersicht über die jeweiligen Proteine und ihre Funktion

Virales Protein	Funktion
EBNA 1	ursächlich für die B-Zell Immortalisierung, repliziert das EBV-Genom, trennt virale Episome bei der Mitose
EBNA 2	transskriptioneller Koaktivator, der die Expression von viralen und zellulären Genen (besonders <i>CMYC</i>) hochreguliert, essentiell für die B-Zell-Immortalisierung, eines der ersten Proteine, die bei EBV-Infektion exprimiert werden.
EBNA 3A EBNA 3B EBNA 3C	B-Zell-Immortalisierung genaue Funktion unbekannt B-Zell-Immortalisierung, fördert die Produktion von LMP1
EBNA-LP	B-Zell-Immortalisierung, interagiert mit EBNA 2, um p53 und RB zu inaktivieren

Virales Protein	Funktion
LMP 1	B-Zell-Immortalisierung, imitiert den CD 40 Rezeptor, erhöht das Level von BCL-2 und inhibiert so die Apoptose, wesentlicher aktiver Rezeptor, onkogen
LMP 2 A und B	führt das EBV in die Latenz
EBER 1 und 2	nicht kodierende RNAs von 167 und 172 Nukleotiden, werden in allen Latenzstadien exprimiert

Um onkogen zu wirken, muss das EBV sein virales Genom in der Wirtszelle erhalten, es vermeiden, die Zelle zu zerstören und seine Wirtszelle darf nicht vom Immunsystem als Schädling erkannt und eliminiert werden. Das Epstein-Barr Virus bildet in der Latenzphase aus seinem Genom ein ringförmiges Episom, das in vielen Kopien in der Zelle vorliegt oder integriert sein Genom in das Wirtsgenom. Normalerweise reagieren zytotoxische CD 8+ Zellen auf latente Membranproteine und eliminieren die befallene B-Zelle. In ruhenden B-Zellen ist nur EBNA 1 exprimiert, welches nicht immunogen wirkt, so dass diese Zellen nicht vom Immunsystem mittels der CD8+ Zellen eliminiert werden können. Man unterscheidet 3 verschiedene Latenzstadien bzw. -typen (4):

Tabelle 2 : Latenztypen des EBV

Latenztyp	exprimierte virale Proteine
I	EBNA1, EBERs
II	EBNA1, EBERs, LMP 1/2
III	EBNA1, EBERs, LMP1/2, EBNA2

1.4 Das Epstein-Barr Virus: Infektiöse Mononukleose und maligne Tumoren

Das Epstein-Barr Virus ist weltweit verbreitet und über 95% der Weltbevölkerung sind mit ihm infiziert. Es verursacht als Primärinfektion die infektiöse Mononukleose (IM), das Pfeiffer'sche Drüsenfieber. Vor dem 10. Lebensjahr verläuft die Infektion in der Regel asymptomatisch (18). Die infektiöse Mononukleose ist eine gutartige, selbstlimitierende lymphoproliferative Erkrankung, die nur sehr selten tödlich verläuft (1 von 3000 Fällen) (18).

Das Virus ist mit verschiedenen Tumoren assoziiert, wie dem Nasopharynxkarzinom, malignen Lymphomen, Leiomyosarkomen bei Immunsuppression und bestimmten Typen von Adenokarzinomen.

1.4.1 Nasopharynxkarzinom

Das Nasopharynxkarzinom ist ein in der westlichen Hemisphäre eher seltener Tumor, der mit gehäufte Prävalenz in der Provinz Canton in China, in Hongkong, Taiwan und bei den Inuit (Eskimos) in Alaska und Grönland auftritt (19-22). In Taiwan ist es der häufigste Tumor bei Männern und der dritthäufigste Tumor bei Frauen. Gründe dafür mögen bestimmte HLA-Antigenprofile sein und/oder verschiedene Umweltfaktoren (salziger Fisch, Umweltgifte, Nikotin) (23-27). Beim Nasopharynxkarzinom infiziert das Epstein-Barr Virus die Epithelzellen in der Rosenmüller-Grube des Waldeyer'schen Rachenrings im hinteren Nasopharynx (28).

Es existieren 2 Modelle, um die Infektion dieser Epithelzellen mit dem Virus zu erklären: Zum einen wurde ein Oberflächenprotein beschrieben, das dem CD21-Rezeptor der B-Zellen ähnlich ist und eventuell als Eintrittspforte benutzt werden könnte (4, 29). Alternativ könnte das Virus durch IgA-medierte Endozytose in die Epithelzellen des Nasopharynx gelangen (30). Die EBV-Genome, die man in den infizierten Epithelzellen fand, waren klonalen Ursprungs, auch sind die Zellen des umliegenden Gewebes, sowie einwandernde T-Zellen nicht infiziert (31, 32). Das EBV wurde in *in-situ* Nasopharynxkarzinomen nachgewiesen (33). Dies alles deutet darauf hin, dass die EBV-Infektion vor der Entstehung der Neoplasie aufgetreten ist und notwendig für das Fortschreiten des malignen Erscheinungsbildes war.

1.5 Maligne Lymphome

Maligne Lymphome sind Neoplasien, die von Lymphozyten bzw. deren Vorläuferzellen abstammen. Sie treten häufig als nodale Lymphome in Lymphknoten, aber auch extranodal in der Milz, den Tonsillen oder in extralymphatischem Gewebe wie z.B. im Magen, ZNS, Darm oder Knochenmark auf.

Die Einteilung erfolgt nach der WHO (World Health Organization)-Klassifikation maligner Lymphome von 2001 (34). Man unterscheidet B-Zell-Lymphome, T-Zell-Lymphome, Hodgkin-Lymphome, und lymphoproliferative Erkrankungen bei Immundefizienz. Entscheidend für die Zuordnung zur einzelnen Entität ist die postulierte Zelle, aus der die Neoplasie entstanden ist.

Non-Hodgkin Lymphome (NHL) der B-Zell Reihe umfassen im Westen etwa 85% aller Non-Hodgkin-Lymphome. Die häufigsten Typen sind das diffuse, großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) und das folliculäre Lymphom (FL). Sie machen zusammen etwa 50% aller Non-Hodgkin-Lymphome aus (34). Reife B-Zell-Neoplasien rekapitulieren verschiedene Stadien der normalen B-Zell Differenzierung, und können über ihre Morphologie und ihren Immunphänotyp der postulierten Ursprungszelle zugeordnet werden. Einige von Ihnen weisen auch spezifische zytogenetische Aberrationen auf, die häufig mittels einer Translokation ein zelluläres Proto-Onkogen unter den Einfluss des Immunglobulin-Promoters bringen (z.B. wird beim Burkitt-Lymphom eine $t(8;14)(q24;q32)$ beobachtet, die das *MYC* Gen in Chromosom 8 unter den Einfluss des Schwereketten-Promotors in der Bande q32 in Chromosom 14 bringt (35)). Die exakte Unterteilung der Lymphome in biologisch relevante Subtypen hat die Therapie teilweise schon sehr verbessern können (z.B. die Eradikation von *Helicobacter pylori* beim MALT-Lymphom (36-38) oder der Einsatz von CD20-Antikörpern bei CD20 positiven Lymphomen (34).

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die B-Zell Neoplasien der derzeit gültigen WHO-Klassifikation:

Tabelle 3: Die WHO-Klassifikation maligner B-Zell-Lymphome (34):

B-Zellneoplasien

Vorläufer B-Zell Neoplasien

- Akute B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom (B-ALL)

Reife B-Zell Neoplasien

- Chronische lymphatische Leukämie/kleinzelliges B-Zell-Lymphom (CLL)
- Prolymphozytenleukämie vom B-Zell-Typ
- Lymphoplasmozytisches Lymphom
- Mantelzell-Lymphom
- Haarzelleukämie
- Multiples Myelom
- Solitäres Plasmozytom des Knochens
- Extraossäres Plasmozytom
- Extranodales Marginalzonen B-Zell-Lymphom des Mukosa assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT Lymphom)
- Nodales Marginalzonen B-Zell-Lymphom
- Splenisches Marginalzonen B-Zell-Lymphom
- Folikuläres Lymphom
- Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom (DLBCL)
 - o Mediastinales (thymisches) großzelliges B-Zell-Lymphom
 - o Intravasales großzelliges B-Zell-Lymphom
 - o Primäres Effusions Lymphom
- Burkitt Lymphom

1.5.1 Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL)

DLBCL stellen 30-40% aller Non-Hodgkin-Lymphome von Erwachsenen in westlichen Ländern dar. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Erkrankung liegt bei 70 Jahren, jedoch können auch Jüngere und Kinder erkranken (39,40). Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen. 40% der DLBCL treten primär extranodal auf. DLBCL treten häufig *de novo* auf, manchmal aber auch als Transformation aus einem indolenten Lymphom.

Morphologisch werden nach dem vorherrschenden Zelltyp vier Varianten unterschieden: centroblastisch, immunoblastisch, T-Zell-/Histiozytenreich und anaplastisch. Die postulierte Ursprungszelle ist eine periphere B-Zelle vom Keimzentrumstyp oder vom Postkeimzentrumstyp. DLBCL können EBV-infizierte Tumorzellen aufweisen. Wenn ein Immundefekt besteht, sind diese EBV-assoziierten Tumorzellen häufiger als bei DLBCL ohne Immundefekt nachweisbar (34).

1.6 Lymphome und Lymphoproliferationen bei Immundefizienz

Nach der WHO-Klassifikation (34) gibt es vier Haupttypen von Immundefizienzen, die mit einer erhöhten Inzidenz eines Lymphoms oder einer Lymphoproliferation einhergehen:

1. primäre (angeborene) Immundefizienz-Syndrome und andere primäre Immunerkrankungen
2. Erworbenes Immundefekt-Syndrom (HIV-Infektion)
3. Iatrogene Immunsuppression aufgrund einer vorangegangenen Transplantation
4. Iatrogene Immunsuppression mit Methotrexat

Lymphome, die z.B. bei HIV-positiven Patienten auftreten, sind meist aggressive B-Zell-Lymphome. In 3-5% der Fälle sind sie die erste Manifestation des AIDS-Stadiums. Die Wahrscheinlichkeit, an einem Non-Hodgkin-Lymphom zu erkranken, ist bei HIV-positiven Patienten im Vergleich zum Nicht-Immunsupprimierten um das 60-200fache erhöht. Es handelt sich um Lymphome von wahrscheinlich heterogener Pathogenese mit unterschiedlichen Komponenten: chronische Antigenstimulation, genetische Aberrationen, Dysregulation der Zytokine und infektiöse Agentien (41). Die Tumoren sind meist monoklonal und zeigen oft Alterationen der *MYC* und *BCL6* Onkogene. Das EBV ist in 60% der Tumoren nachweisbar. Bei DLBCL vom immunoblastischen Subtyp ist das Epstein-Barr Virus zu 80%, beim HIV-assoziierten Burkitt-Lymphom zu 30-50% vorhanden (42). Die meisten Lymphome treten extranodal auf, nur etwa ein Drittel ist primär nodal (43,44).

Tabelle 4: Die Einteilung der WHO für HIV-assoziierte Lymphome:

1. Lymphome, die auch bei immunkompetenten Patienten auftreten:
 - Burkitt-Lymphom (klassisch, mit plasmazytoider Differenzierung, atypisch)
 - DLBCL (centroblastisch, immunoblastisch)
 - MALT-Typ Lymphom (selten)
 - peripheres T-Zell-Lymphom (selten)
 - Hodgkin-Lymphom (klassisch)

2. Lymphome, die besonders bei HIV-positiven Patienten vorkommen:

- primäres Effusionslymphom
- plasmoblastisches Lymphom der Mundhöhle

3. Lymphome, die auch bei anderen Immundefizienzen auftreten:

- polymorphes B-Zell-Lymphom (PTLD-ähnlich)

1.7 Posttransplantations-assoziierte lymphoproliferative Erkrankungen (PTLD)

PTLD (= post-transplant lymphoproliferative disorders) sind Lymphoproliferationen der Lymphome, die sich aufgrund der iatrogenen Immunsuppression in einem Patienten bilden, der eine Organ- oder Knochenmarktransplantation erhalten hat.

Das Risiko, an einer PTLD zu erkranken, korreliert mit der Organart, die transplantiert wurde. Bei einer Nierentransplantation beträgt es weniger als 1%, bei Herz- oder Lebertransplantationen 1-2% und bei einer Herz-Lungentransplantation 5%. Die meisten PTLD sind EBV assoziiert. Es handelt sich daher um EBV-induzierte monoklonale oder seltener um polyklonale B-Zell- (oder, deutlich seltener, T-Zell-) Lymphoproliferationen, die aufgrund einer iatrogen unterdrückten T-Zellantwort des Immunsystems entstehen (45-47). Ca. 20% der PTLD sind EBV-negativ. Diese treten in der Regel später (mehr als 5 Jahre nach der Transplantation) auf als EBV-positive PTLD. Die Ursache der EBV-negativen PTLD ist unbekannt. Die meisten EBV-positiven PTLD haben ihren Ursprung in EBV-positiven B-Zellen des Transplantatempfängers (mehr als 90% der Fälle) (48-50). Bei Patienten, die mit Azathioprin behandelt werden, treten sie zumeist extranodal auf, bei Behandlung mit Cyclosporinen/Tacrolimus sind häufig die Lymphknoten sowie der Gastrointestinaltrakt befallen (51).

Tabelle 5: Kategorien der PTLD nach WHO (34):

1. Frühe Läsionen („early lesion“)

- Reaktive plasmazelluläre Hyperplasie
- „Infektiöse Mononukleose“-ähnlich

2. polymorphe PTLD (B-Zell-Hyperplasie/Lymphom)

3. monomorphe PTLD

B-Zell-Neoplasien:

- DLBCL (immunoblastisch, centroblastisch, anaplastisch)
- Burkitt-Lymphom/ Burkitt-ähnlich
- Plasmozytom-ähnliche Läsion

T-Zell-Neoplasien:

- peripheres T-Zell-Lymphom, nicht weiter spezifiziert
- andere

4. Hodgkin-Lymphom und Hodgkin-ähnliche PTLD

Frühe Läsionen bilden sich durch Reduktion der Immunsuppression häufig erfolgreich zurück (52). Polymorphe PTLD (und seltener monomorphe PTLD) können sich ebenfalls mit Reduktion der Immunsuppression zurückbilden, allerdings deutlich seltener (53).

Polymorphe PTLD bestehen aus Immunoblasten, Plasmazellen und mittelgroßen Lymphozyten. Die normale Architektur des Lymphknotens ist aufgehoben. Man gewinnt den morphologischen Eindruck eines polymorphen Erscheinungsbildes. Es können auch Nekrosen sowie versprengte, bizarr geformte Zellen (atypische Immunoblasten) vorkommen. Solche polymorphen Lymphoproliferationen werden auch bei Patienten mit Immunsuppressionen durch HIV-Infektion oder nach Therapie mit Methotrexat gefunden (34). Sie sind ebenfalls zumeist EBV-positiv (34).

1.8 Andere EBV-assoziierte Lymphoproliferationen/Lymphome

Ein klassisches, in der WHO-Klassifikation als Subtyp des diffusen grosszelligen B-Zell Lymphoms geführtes EBV-assoziiertes Lymphom stellt die „lymphomatoide Granulomatose“ (LYG) bzw. das „LYG-ähnliche“ DLBCL dar (34).

EBV-assoziierte atypische Lymphoproliferationen/Lymphome können auch bei Patienten, bei denen keine wie auch immer geartete Immunsuppression bekannt ist, auftreten. Ein Beispiel sind „senile“ EBV-assoziierten Lymphoproliferationen (54), die bei älteren Patienten entstehen, die nachweislich keiner wie auch immer gearteten Immunsuppression unterliegen. Das durchschnittliche, mittlere Erkrankungsalter beträgt hierbei 75 Jahre. Diese „senilen“ Lymphoproliferationen treten meist extranodal auf

(82% der Fälle) (55). Die senilen B-LPDs bestehen aus Centroblasten, Immunoblasten, sowie Hodgkin- und Reed-Sternberg-ähnlichen Riesenzellen, kombiniert mit häufigen Nekrosen und einem angiozentrischen Wachstumsmuster. LMP1 des EBV wird meistens, EBNA 2 selten und EBER immer exprimiert (55). Der überwiegende Teil der senilen B-LPDs ist CD 10 negativ (55).

Bei T-Zell-Lymphomen verursacht die auf der Grundkrankheit basierende und/oder therapiebedingte Immunsuppression nicht selten das Auftreten einer EBV-gesteuerten B-LPD oder auch eines B-Zell-Lymphoms (56). Sie werden am häufigsten auf dem Boden eines angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphom (AILT), aber auch bei peripheren T-Zell-Lymphomen vom NOS-Typ (= not other specified) gefunden (57).

1.9 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ausgehend vom Archivmaterial des Referenzzentrums für Lymphknotenpathologie in Würzburg, eine Kategorisierung der EBV-assoziierten Lymphoproliferationen vorzunehmen. Dabei sollte insbesondere der Tatsache Rechnung getragen werden, dass bei Einsendung von Tumormaterial an das Referenzzentrum die Tatsache einer vorbestehenden Immunsuppression, einer Immunsuppressions-relevanten Vorerkrankung bzw. auch einer EBV-Assoziation häufig nicht bekannt ist oder mitgeteilt wird. Insofern fallen in diesen Zentren immer wieder EBV-assoziierte Tumoren oder tumorähnliche Läsionen auf, die – mangels anderer Informationen – als „senile“ oder „sporadische“ EBV-Assoziationen aufgefasst werden. Durch die Korrelation mit klinischen Daten sollten hier die möglichen relevanten Vorerkrankungen erfasst und mit den Typen der Lymphoproliferationen korreliert werden. Ein zweiter Punkt war die Erfassung der Immunhistochemie, insbesondere hinsichtlich des GCB- und des ABC-(non-GCB)Status. Schließlich sollten Unterschiede der genetischen Konstitution der verschiedenen Lymphoproliferationen und Lymphome durch Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) verdeutlicht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

In der Datenbank des pathologischen Instituts der Universität Würzburg befanden sich 223 Epstein-Barr-Virus positive Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) und/oder EBV-assoziierte Lymphoproliferationen der B-Zellreihe, von welchen aus Gründen der Diagnose oder der Materialbeschaffenheit 107 Fälle ausgeschlossen wurden, so dass letztlich 116 Epstein-Barr-Virus positive Non-Hodgkin-Lymphome/-Lymphoproliferationen untersucht werden konnten. Diese Fälle entstammten der Routinediagnostik des Referenzzentrums für Lymphknotenpathologie des Pathologischen Instituts der Julius-Maximilians-Universität Würzburg aus den Jahren 1990-2007.

2.2 Einteilung des Untersuchungsmaterials

Für eine primäre Einteilung des Untersuchungsgutes wurde zunächst gefragt, ob eine die EBV-Assoziation der Lymphoproliferation begünstigende Grunderkrankung, z.B. im Sinne einer Immunsuppression, bestanden hat. Hierzu wurden zunächst die Angaben der einsendenden Pathologen zu Vorerkrankungen wie z.B. vorangegangenen Tumoren, Chemotherapien, Zustand nach Transplantationen, Vorliegen einer HIV-Infektion u.ä. auf den Untersuchungsanträgen systematisch erfasst. Weiterhin wurden klinische Daten durch das Versenden eines standardisierten Fragebogens von den behandelnden Ärzten (und ggf. einsendenden Pathologen) erhoben. Von insgesamt 92/116 Fällen (79%) konnten klinische Daten erhalten werden; von 24/116 Fällen (21%) konnten auch nach mehrfachen Versuchen keine klinischen Daten erhoben werden.

Die Tabelle 6 zeigt die durch dieses Vorgehen primär erhaltenen Informationen:

Tabelle 6: Durch die einsendenden Pathologen bzw. die behandelnden Kliniker mitgeteilte Grunderkrankungen

Gruppe Nr.	Grunderkrankung	Anzahl der Fälle n =92
1	nach vorangegangener(therapierter)Tumor- erkrankung	34
2	ohne prädisponierende Grunderkrankung	20
3	Posttransplantations-assoziiert (PTLD)	16
4	HIV	15
5	bei Methotrexatbehandlung oder vergleichbarer medikamentöser Immunsuppression	7

In der Gruppe 1 (nach vorangegangener, therapierter Tumorerkrankung) handelte es sich bei den vorangegangenen Tumoren in 20 Fällen um T-Zell-Lymphome (AILT oder periphere, nicht näher spezifizierte T-Zell-Lymphome), 1 splenisches Marginalzonenlymphom, 1 Haarzelleukämie, 2 nicht näher klassifizierte NHL, 3 Hodgkin-Lymphome, 2 folliculäre Lymphome, 1 chronische lymphatische Leukämie, 2 akute lymphatische Leukämien, 1 Fall mit Myastenia gravis bei nicht näher spezifizierter Lymphomerkkrankung sowie um 1 Prostatakarzinom.

2.3 Histopathologische Klassifikation

Maßgebliche Grundlage für die morphologische Klassifikation der Lymphome und Lymphoproliferationen waren die Kriterien der WHO-Klassifikation der Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes (34), nach der die Lymphome und Lymphoproliferationen nach den vorliegenden Routinefärbungen (HE- und Giemsa bzw. PAS) nach morphologischen Gesichtspunkten und der immunhistochemischen Proteinexpression, sowie gegebenenfalls molekulargenetischen Zusatzuntersuchungen eingeteilt wurden.

Die B-NHL/Lymphoproliferationen wurden analog der Einteilung der Posttransplantations-lymphoproliferativen Erkrankungen (PTLD) der WHO-Klassifikation klassifiziert. In dieser Klassifikation sind sogenannte frühe Läsionen („early lesions“), polymorphe und monomorphe PTLD, sowie Hodgkin-Lymphome aufgeführt. Für die vorliegende Studie wurden monomorphe und polymorphe B-Zell Lymphome, und atypische (nicht weiter klassifizierbare) Lymphoproliferationen diagnostiziert. Als eine weitere Kategorie wurden EBV-assoziierte B-Zell-Lymphoproliferationen/-Lymphome nach/bei T-Zell-Lymphomen aufgenommen.

Polymorphe B-Zell-Lymphome weisen histologisch ein vielgestaltiges Erscheinungsbild auf. Man sieht Zellen aus unterschiedlichen Stadien der B-Zell Differenzierung nebeneinander. Die – etwas unscharf definierte Kategorie der polymorphen B-Zell-Hyperplasien/-Lymphome lässt dabei noch eine partiell erhaltene Grundstruktur nachweisen. Im Gegensatz dazu sieht man bei monomorphen B-Zell-Lymphomen, insbesondere bei DLBCL Blastenrasen, bei denen ein Zelltyp vorherrschend ist, nach welchem die einzelnen Subtypen benannt sind (z.B. centroblastisch, immunoblastisch). Dadurch ergibt sich optisch ein gleichförmiges Aussehen. B-Zell-Lymphoproliferationen/-Lymphome nach/bei T-Zell-Lymphomen

sind poly- oder monoklonale Proliferationen weniger oder zahlreicher EBV-assoziiertes B-Blasten, die während oder nach einem T-Zell-Lymphom auftreten können (56).

2.4 Erstellung der Gewebearrays (Tissue Microarray)

Mit Hilfe der HE-Färbung, des Proliferationsmarkers Ki-67 und der EBER (EBV-encoded RNAs) in situ Hybridisierung wurden an den Paraffinblöcken jeweils geeignete „Stanzareale“ bestimmt, die ausreichend Tumormaterial enthielten und gleichzeitig EBV-positiv waren. Hierbei wurden pro Fall mit einem Stanzgerät (Manual Tissue Puncher der Firma Beecher Instruments, Silver Spring, Maryland, USA) je 3 Stenzen aus dem jeweiligen Paraffinblock („Spenderblock“) entnommen und in einen „Empfängerblock“ (ebenfalls ein Paraffinblock) eingebracht. Der Durchmesser der Stenzen beträgt 0,6 mm. Sie wurden im Abstand von 1mm gestanzt (58,59).

Von den Arrayblöcken wurden mit einem herkömmlichen Mikrotom 1µm dicke Schnitte hergestellt, die anschließend auf silanisierte Objektträger aufgezogen wurden. Diese wurden dann 2 Tage bei Raumtemperatur getrocknet, um einem „Abschwimmen“ der Schnitte bei den nachfolgenden Färbeprozessen entgegenzuwirken.

2.5 Immunhistochemie

Vor den immunhistochemischen Färbungen wurde von jedem Arrayblock eine HE-Färbung erstellt, um zu prüfen, ob sich in den Stenzen genügend Tumormaterial für die Auswertung befindet. Es kam die indirekte Immunperoxidasetechnik zur Anwendung. Die Färbungen wurden mit Hilfe des Pipettierautomaten TECAN Genesis RSP erstellt.

Tabelle 7: Immunhistochemische Antikörper

Verwendete Antikörper:	Verdünnung:
CD 3 (Leu 4): Novocastra, Clone PS1	1 : 20
CD 4 (Leu 3a) : Novocastra, Clone 1F6	1 : 5
CD 5 (Leu 1): Novocastra, Clone 4C7	1 : 20
CD 8 (Okt. 8 od. Leu 2a): Dako, Clone C8/144B	1 : 20
CD 10 : Novocastra, Clone 56C6	1 : 40
CD 20y (L 26): Dako, Clone L26(1,4)	1 : 1000
CD 23 (KiB1): Novocastra, Clone 1B12	1 : 20

CD 79a: Dako, Clone JCB117	1: 100
CD 138 (Syndecan-1): Chemicon, Clone B-B4	1 : 50
Ig A : Dako, Code No. A262	1 : 10000
Ig D : Dako, Code No. A0093	1 : 400
Ig G : Dako, Code No. A0423	1 : 10000
Ig M : Dako, Code No. A0426	1 : 10000
Kappa Light Chains: Dako, Code No. A0191	1 : 5000
Lambda Light Chains: Dako, Code No. A193	1 : 5000
CD 15 (Leu M1): Dako, Clone C3D-1	1 : 30
KiM 1P (CD 68) : Kiel, Clone KiM 1P	1 : 80000
EBNA-2: Dako, Clone PE2	1 : 10
LMP-1: Novocastra, Clones CS1,CS2,CS3,CS4	1 : 100
MUM 1 (ICSAT): Dako, Clone MUM 1P	1 : 2000
Ki-67 (MIB-1): Dako, Clone MIB-1	1 : 200
ALK-1: Dako, Clone ALK-1	1 : 20
Cyclin D1: Novocastra, Clone P2D11F11	1 : 20
Bcl-2: Dako, Clone 124	1 : 80
Bcl-6: Dako, Clone PG-B6p	1 : 5
p53: Dako, Clone DO-7	1 : 20
p27(Kip1): BioSciences, Clone 57	1 : 100
p21: Dianova, Clone 3/40	1 : 20
RB: NeoMarkers, Clone XZ55	1 : 50
HLA-DR: Dako, Clone TAL.1B5	1 : 20
CD 30 (Ber H2): Dako, Clone Ber-H2	1 : 10
HHV 8: ABI, Clone LN53	1 : 1000

EBER in situ Hybridisierung:

EBER-Sonde Y5200: Dako

Kit PNA: ISH-K5201: Dako

2.5.1 Auswertung der Immunhistochemie:

Mit Hilfe von immunhistochemischen Markern kann man Proteinstrukturen von Zellen

sichtbar machen, die spezifisch für bestimmte Zelltypen sind. Die immunhistochemischen Antikörper sind in der Lage membranständige, zytoplasmatische oder nukleäre Proteine (Antigene) anzufärben.

Die Zahl der T-Zellen wurde mit den Antikörpern CD 3, CD 4, CD 8 in 10%-Schritten jeweils bezogen auf die Gesamtzellzahl bestimmt.

Der Makrophagengehalt wurde mit dem Antikörper für CD 68 ebenfalls in 10%-Schritten bezogen auf die Gesamtzellzahl bestimmt.

Die Zahl der B-Zellen wurde mit Antikörpern gegen CD 20, CD 79a und CD 138 in 10%-Schritten ausgewertet, mit Bezug auf den Tumorzellgehalt der jeweiligen Stanze.

Bei den Schwerketten IgM, IgG, IgD und IgA wurde die zytoplasmatische Expression in den Tumorzellen mit positiv oder negativ beurteilt.

Die Leichtketten kappa und lambda wurden jeweils positiv oder negativ gewertet und dienten zur Beurteilung der sekretorischen Differenzierung. Als sekretorisch differenziert wurde gewertet, wenn entweder kappa oder lambda eine monotypische, zytoplasmatische Reaktivität aufwiesen.

CD 15 wurde mit positiv/negativ bewertet bezogen auf den Tumorzellgehalt, ebenso wie der Keimzentrumsmarker CD 10.

Der Gehalt an Zellen mit einer Reaktivität für den Postkeimzentrumsmarker MUM 1, sowie BCL-2 und BCL-6 wurden in 10%-Schritten bezogen auf den Tumorzellgehalt bestimmt. Als positiv wurde ein Fall gewertet, wenn mindestens 30% erreicht wurden.

p53, p27 und p21 wurden mit positiv/negativ bewertet. Als positiv galt ein Fall ab 30% kräftiger Expression.

EBER wurde in 10%-Schritten bezogen auf die Gesamtzellzahl bestimmt. Ab einer positiven Zelle galt der Fall als positiv.

LMP 1 wurde positiv/negativ gewertet, wobei eine Zelle zum Nachweis der Positivität genügte.

EBNA 2 wurde in 10%-Schritten bezogen auf die Gesamtzellzahl bestimmt. Auch hier genügte eine einzelne positive Zelle zum Nachweis der Positivität.

Der Aktivierungsmarker CD 30 wurde in 10%-Schritten bezogen auf den Tumorzellgehalt bestimmt.

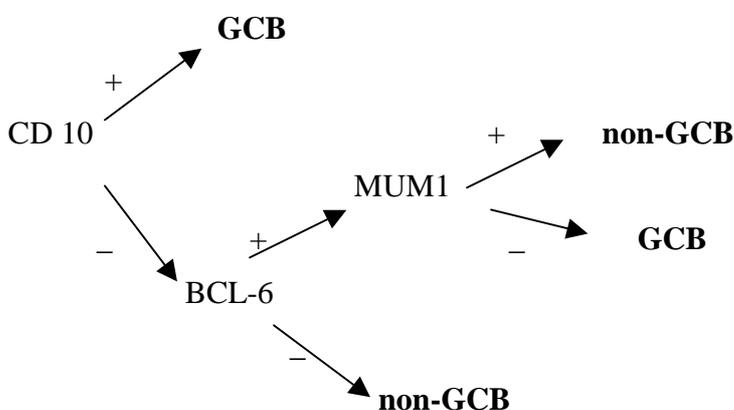
Der Proliferationsmarker Ki-67, das nukleäre Tumorsuppressorprotein RB und das membranständige HLA-DR wurden in 10-%Schritten bezogen auf den Tumorzellgehalt

bestimmt. Ki-67 diene als adjunkter Marker zur Reaktivitätskontrolle der Färbungen. Der Marker ALK-1 wurde mit positiv/negativ bezogen auf die Gesamtzellzahl der Stanze bestimmt, ebenso das nukleäre Cyclin D1. Der zytoplasmatische Aktivierungsmarker CD 23, der B-Zellen und auch folliculäre dendritische Zellen (FDC-Zellen) anfärbt, wurde in 10%-Schritten bezogen auf die Tumorzellen ausgewertet.

2.5.2 Erfassung der Immunhistochemie hinsichtlich des GCB- und non-GCB-Status

Für die DLBCL existiert eine Subgruppen-Klassifikation, die mit Hilfe einer immunhistochemischen Auswertung bestimmter Antigene definiert werden kann (60). Danach können DLBCL in prognostisch unterschiedliche Subgruppen unterteilt werden: in DLBCL vom Keimzentrumstyp (Germinal-Center-B-cell-like DLBCL = GCB) und in DLBCL vom Postkeimzentrumstyp (non-GCB). Die non-GCB sind mit einer schlechteren 5-Jahresüberlebensrate assoziiert (61,62). Die Zuordnung zu den einzelnen Subgruppen erfolgt am Paraffinschnitt mit Hilfe des HANS-Klassifikators (60):

Abbildung 1: Hans-Klassifikator



Der Cut-off für die Positivität liegt hierbei bei $\geq 30\%$ positiver Tumorzellen (60). Ein Fall wird als GCB gewertet, wenn von den Keimzentrumsmarkern CD 10 und BCL-6 entweder CD 10 allein positiv ist oder CD 10 und BCL-6 zugleich positiv sind. Wenn CD 10 und BCL-6 beide zugleich negativ sind, wird der Fall der non-GCB-Subgruppe zugeordnet. In den Fällen, in denen CD 10 negativ und BCL-6 zugleich positiv ist, bestimmt der Postkeimzentrumsmarker MUM1 die Subgruppe: Fälle, die für

MUM1 negativ sind, werden als GCB gewertet und Fälle, die für MUM1 positiv sind als non-GCB. Der HANS-Klassifikator wurde in der vorliegenden Studie nicht nur bei den DLBCL, sondern auch bei allen untersuchten Lymphoproliferationen angewendet.

2.6 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Hierbei wurde ebenfalls von jedem Arrayblock eine HE-Färbung zur Beurteilung des Tumorzellgehaltes erstellt.

Zur Anwendung kam die Interphase-FISH am Paraffinmaterial. Es handelt sich um eine 2-Farben-FISH mit Rot-Grün-Signalen. Es wurden sowohl Fusionssonden als auch „Break-Apart“ Sonden (BAP) sowie Centromersonden verwendet. Die Sonden waren jeweils direkt mit Fluorochromen markiert.

Tabelle 8: Verwendete FISH-Sonden

-Fusionssonden:

BCL2/IgH: Dako

-Break Apart Sonden:

BCL6: Vysis

IgH: Vysis

C-MYC: Vysis

-Centromersonden:

CEP3: Vysis

CEP18: Vysis

Technische Durchführung der FISH:

Vorbereitung und Denaturierung der DNA:

Nach der Entparaffinierung wurden die Objektträger (OT) für 30 min einem RNase-Verdau (10mg RNase/ 100ml 2x SSC) bei 37°C zugeführt, und 10 min in 2x SSC (pH 7,0) inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation für 15-20 min in einer 37°C Pepsin-Lsg. (5mg Pepsin/100 ml M HCL), ein Waschvorgang für 10 min bei Raumtemperatur in 1x PBS und eine Inkubation in der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) für je 5 min, anschließend Trocknen für 10 min bei 37°C.

Hybridisierung:

- OT auf dem Heizblock 2 min erwärmen
- 10µl der vorbereiteten Sondenlösung (7µl LSI Hybridisierungspuffer + 2µl H₂O + 1µl Sonde) auf die markierte Region des OT pipettieren, Deckglas auflegen und mit Fixo Gum rundherum abdichten
- OT über Nacht in einer feuchten, vorgewärmten Kammer bei 37°C inkubieren

Am nächsten Tag wird nicht gebundene Sonden-DNA mit Hilfe einer vorgewärmten (73°C) Waschlsg.(95 ml H₂O, 0,4x SSC, 300µl NP-40) entfernt und es erfolgt eine Gegenfärbung (1µl DAPI/1,5 ml Vectashield) der Schnitte und die erneute Abdeckung mit einem Deckgläschen. Die fertigen OT werden im Kühlschrank abgedunkelt aufbewahrt.

2.6.1 Auswertung der FISH-Präparate

Die Schnitte wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot; Firma ZEISS, Jena) ausgewertet. Fotos wurden mit Hilfe des ISIS Imaging Systems (MetaSystems, Altlusheim, Deutschland) erstellt. Für die FISH waren 53 Fälle auswertbar, da nur diese einen ausreichend hohen Tumorzellgehalt (von mindestens 30%) enthielten.

Bei der Auswertung sollten die analysierten Kerne klar voneinander abgrenzbar sein, ihre Morphologie musste erhalten sein und die innerhalb eines Kerns auszuwertenden Signale sollten die gleiche Größe und Intensität aufweisen. Abweichende, kleinere sowie schwächere Signale wurden nicht gewertet.

Außerdem mussten die Signale deutlich voneinander abzugrenzen sein. Sogenannte Doppelsignale (Split-Spots, Twin-Spots oder Signale in Tandem-Arrangement) wurden als ein Signal gewertet.

Der Cut-off der einzelnen Sonden, der jeweils an reaktivem Lymphknotengewebe bestimmt wurde, wurde bei 15% festgelegt, um alle falsch positiven Signale sicher auszuschließen.

2.7 Klonalitätsanalysen

Die Untersuchungen zum Rezeptor-Rearrangement von B- und T-Zellen wurden nach einem etablierten, modifizierten Protokoll von Trainor et al., 1991 (63) durchgeführt.

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Statistica® für Windows (Studentenversion) unter Verwendung des Chi-Square Tests und des Fisher's exact test.

3. Ergebnisse

3.1 Übersicht über die ausgewerteten Fälle

Aus der institutsinternen Datenbank des Lymphknoten-Referenzzentrums am Pathologischen Institut der Universität Würzburg wurden 223 Fälle aus den Jahren 1990 bis 2007 erhalten, die eine EBV-Assoziation aufwiesen und von denen Paraffinblöcke für weitere Untersuchungen vorhanden waren. Diese wurden einer kritischen Revision und Reklassifikation am Mikroskop unterzogen. Aus Gründen eines homogenen Datensatzes wurden Burkitt-Lymphome (n=4), folliculäre Lymphome (n=2), non-AILT-T-Zell-Lymphome (n=18), MALT-Lymphome (n=3), Hodgkin-Lymphome (n=8), Fälle einer lymphomatoiden Granulomatose (n=2), Plasmazytome (n=2) und Fälle, die lediglich ein reaktives Geschehen widerspiegelten (n=30), ausgeschlossen. Weiterhin wurden 38 Fälle (B-NHL/Lymphoproliferationen) ausgeschlossen, bei denen sich auf den Paraffinblöcken nicht mehr genügend Material fand.

Letztendlich konnten insgesamt 116 EBV-positive NHL bzw. Lymphoproliferationen zum Anfertigen von TMA-Blöcken verwendet werden. In den angefertigten TMA-Präparaten wurde zunächst der Tumorzellgehalt in der HE- und Giemsa-Färbung und in immunhistochemischen Färbungen mit CD20, CD79a, CD138, CD30, CD3 sowie EBER in-situ Hybridisierung bestimmt. Nachdem in den Stenzen der Tumorzellgehalt z.T. stark variierte, wurde für die Auswertung des FISH-Teils der Untersuchungen ein Infiltratanteil von mindestens 30% gefordert.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen konnten daher nur 69 Fälle (45 nodale und 24 extranodale) und in der FISH 53 Fälle ausgewertet werden.

In der Auswertung wurden die Lymphoproliferationen/Tumoren zunächst nach ihrer Morphologie und unter Berücksichtigung der Immunhistochemie in Anlehnung an die Klassifikation der Posttransplantations-Lymphoproliferativen Erkrankungen (PTLD) (34) unterteilt. Folgende Diagnosen wurden gestellt:

1. Diffuses, grosszelliges B-Zell Lymphom (DLBCL)
 - polymorph
 - monomorph

2. Polymorphe B-Zellhyperplasie/Lymphom
3. Blastäre EBV-assoziierte B-Zell Lymphoproliferationen/Lymphome bei oder nach T-Zell-Lymphom
4. B-Zell-Lymphoproliferationen
5. Atypische Lymphoproliferationen (in der Regel nicht klassifizierbare Lymphoproliferationen)

Als zweiter Schritt folgte eine Unterteilung der Fälle nach den relevanten Vor- bzw. Grunderkrankungen. Hierfür konnten letztlich von 53/69 (77%) Fällen klinische Daten erhalten werden. Die entsprechenden klinischen Daten konnten zum Teil bereits den Einsendeanträgen (n=26/69, 38%) der zuweisenden Pathologen entnommen werden, ergänzend und weiterführend wurden sie noch zusätzlich mit Hilfe eines Fragebogens erfasst, der insbesondere Fragen zu Vorerkrankungen, Immunsuppression, Medikation und bekannter EBV-Infektion der Patienten enthielt. Von 16 Fällen (23%) konnten keine klinischen Daten erhoben werden.

In der Einteilung nach der Grunderkrankung ergaben sich folgende Gruppen:

1. Zustand nach vorangegangener, therapierter (Tumor-)Erkrankung, (n=19)
2. Ohne (prädisponierende) Grunderkrankung, (n=9)
3. Zustand nach Organtransplantation (PTLD), (n=12)
4. Bekannte HIV-Infektion, (n=9)
5. Zustand nach/bei Methotrexat-Behandlung oder vergleichbarer medikamentöser Immunsuppression (z.B. Infliximab bei Rheuma), (n=4)
6. Keine Information erhältlich, (n=16)

In der Gruppe 1 nach vorangegangener Tumorerkrankung/Therapie handelte es sich in 5 Fällen um maligne non-T Zell Lymphome (2 Hodgkin-Lymphome, 1 splenisches Marginalzonen B-Zell Lymphom, ein nicht näher spezifiziertes malignes Lymphom, 1 akute lymphatische Leukämie der B-Zellreihe) und um 13 T-Zell-Lymphome (davon 2 periphere T-Zell-Lymphome vom NOS-Typ und 11 T-Zell-Lymphome vom AILT-Typ), sowie um einen Fall mit Myasthenia gravis und die Patienten erhielten alle eine Chemotherapie. Die vordiagnostizierten Lymphome waren in großem zeitlichen

Abstand (2 bis 7 Jahre) zu den Lymphomen dieser Untersuchung aufgetreten. Im Gegensatz zu den vordiagnostizierten Hodgkin-, splenischen Marginalzonen- und T-Zell-Lymphomen lagen bei den jetzt diagnostizierten Lymphomen ausschließlich diffuse, großzellige B-Zell-Lymphome vom monomorphen Typ vor. In der Gruppe nach Organtransplantation handelte es sich in 4 Fällen um eine Nierentransplantation, in einem Fall um eine Herz-Lungen-Transplantation, in einem weiteren Fall um eine Dünndarmtransplantation, sowie um 6 Knochenmarkstransplantationen.

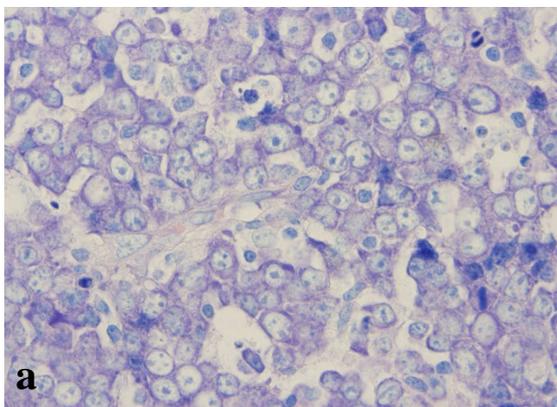
3.2.1 Morphologische Diagnosen

Die Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Diagnosen der 69 untersuchten Fälle:

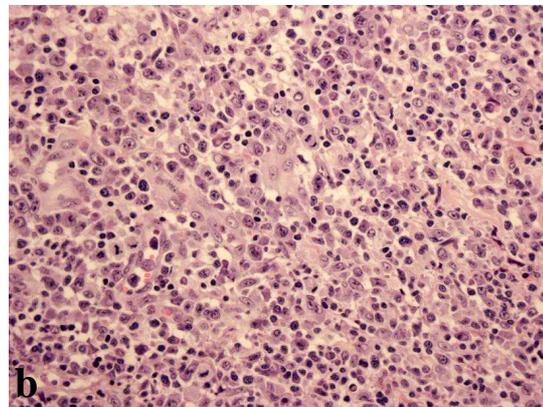
Tabelle 9: Diagnosen

Diagnose	Anzahl n=69
DLBCL, gesamt	50
- monomorphe DLBCL	35
- polymorphe DLBCL	15
Polymorphe B-Zellhyperplasie/ -Lymphom	8
B-LPD bei/nach T-Zell- Lymphom	6
B-LPD	2
atypische Lymphoproliferation	3

Abbildung 2: Beispiele verschiedener Morphologien



a: Beispiel eines monomorphen DLBCL, Giemsa-Färbung, Originalvergrößerung 1000x



b: Beispiel einer polymorphen B-Zellhyperplasie/-Lymphom, HE-Färbung, 400x

3.2.2 Einteilung nach klinischer Grunderkrankung

Die Tabelle 10 fasst die ermittelten klinischen Daten zusammen:

Tabelle 10: Ermittelte Grunderkrankungen

Nr.	Grunderkrankung:	Anzahl (n=69)
1	nach vorangegangenem Tumor (=Lymphom)	19
	davon bei/nach T-Zell-Lymphom	13
2	ohne prädisponierende Grunderkrankung	9
3	PTLD	12
4	HIV	9
5	Methotrexat (MTX) oder vergleichbares	4
6	ohne Information	16

3.2.3 Korrelation der Grundkrankheiten mit den morphologischen Diagnosen

In der Gruppe, in der ein EBV-assoziiertes Lymphom nach vorangegangenem Tumor (=Lymphom) beobachtet wurde, handelte es sich um 13/19 (68%) DLBCL, von denen 12 als monomorphe und eines als polymorphes DLBCL klassifiziert wurden. Diese 13 DLBCL waren in 7 Fällen nach/bei einem T-Zell-Lymphom, in 2 Fällen nach einem Hodgkin-Lymphom, in 3 Fällen nach einem B-NHL und in 1 Fall nach erfolgter Chemotherapie bei Myasthenia gravis, bei dem keine genaueren klinischen Daten bezüglich der Lymphomerkkrankung erhältlich waren, aufgetreten. In der Untergruppe mit T-Zell-Lymphom als vorangegangene Grunderkrankung gab es des weiteren 6 B-Zell-Lymphoproliferationen. In der Gruppe ohne (nachweisbare) prädisponierende Grunderkrankung traten 6/9 (66%) DLBCL auf, und nach Organtransplantation 7/12 (58%). Bei bekannter HIV-Infektion waren 7/9 (77%) der Fälle monomorphe DLBCL. In der Gruppe 5 (bei Methotrexat-Behandlung) kamen 3/4 (75%) DLBCL vor, wobei eines als monomorph und drei als polymorph diagnostiziert wurden. Die Patientengruppe ohne verfügbare Informationen zeigte einen hohen DLBCL-Anteil: 14/16 (88%) Tumoren (10 monomorph und 4 polymorph) wurden als DLBCL klassifiziert. Die übrigen Entitäten (B-LPD, polymorphe B-Zellhyperplasie/-Lymphom,

atypische Lymphoproliferation) waren ohne gruppenspezifische Häufungen in den verschiedenen Gruppen zu finden.

Tabelle 11: Korrelation Grundkrankheiten/Diagnosen

Nr.	Grunderkrankung:	Diagnosen	Anzahl
1	nach vorangegangenem Tumor (= Lymphom)	6 DLBCL, -5x monomorph -1x polymorph	19
	bei/nach T-Zell-Lymphom	6 B-LPD 7 DLBCL, monomorph	13
2	ohne prädisponierende Grunderkrankung	6 DLBCL - 5x polymorph -1x monomorph 1 B-LPD, „senil“ 1 atypische LPD 1 polymorphe B-Zellhyperplasie/ -Lymphom	9
3	PTLD	7 DLBCL - 4x monomorph - 3x polymorph 4 polymorphe B-Zellhyper- plasien/-Lymphome 1 B-LPD	12
4	HIV	7 DLBCL, monomorph 1 polymorphe B-Zellhyperplasie/ -Lymphom 1 atypische LPD	9
5	Methotrexat (MTX)	3 DLBCL -1x monomorph - 2x polymorph 1 atypische LPD	4
6	ohne Information	14 DLBCL - 10x monomorph - 4x polymorph 2 polymorphe B-Zellhyper- plasien/-Lymphome	16

Legende: polym. B-Zell-H/L = polymorphe B-Zellhyperplasie/-Lymphom, B-LPD/T = B-LPD bei/nach T-Zell-Lymphom, B-LPD=B-Zell-Lymphoproliferation, DLBCL = diffuses, großzelliges B-Zell-Lymphom, LPD = Lymphoproliferation

In der Gruppe 2 (ohne prädisponierende Grunderkrankung) lag das Alter der Patienten

zwischen 60 und 83 Jahren, der Mittelwert beträgt 72,7 Jahre und der Median 75 Jahre. Die male-female-ratio war 5:4. Das Durchschnittsalter der Patienten in der Gruppe 3 (nach PTLD) und in der Gruppe 4 (bekannte HIV-Infektion) war im Gegensatz dazu wesentlich jünger, es lag bei 35,1 Jahren und 47,0 Jahren (Mittelwerte). In der Gruppe nach vorangegangener Lymphomerkkrankung und in der Gruppe ohne klinische Informationen war das Alter mit gemittelten 62,9 Jahren und 68,5 Jahren hingegen wieder höher.

3.3 Immunhistochemische Charakterisierung

CD 20 war in 100% der Fälle einer atypischen Lymphoproliferationen (3/3), einer B-LPD (2/2), und einer polymorphen B-Zellhyperplasie/-Lymphom (6/6) positiv. Unter den DLBCL lag die Positivität bei 78% (36/46).

Für CD79a lag die Positivität bei allen Entitäten zwischen 50%-69%.

Bei der Subunterteilung der DLBCL in polymorphe und monomorphe Subgruppen gab es für diese Marker keinen signifikanten Unterschied.

3.3.1 EBV-Assoziation und Verteilung der Latenztypen

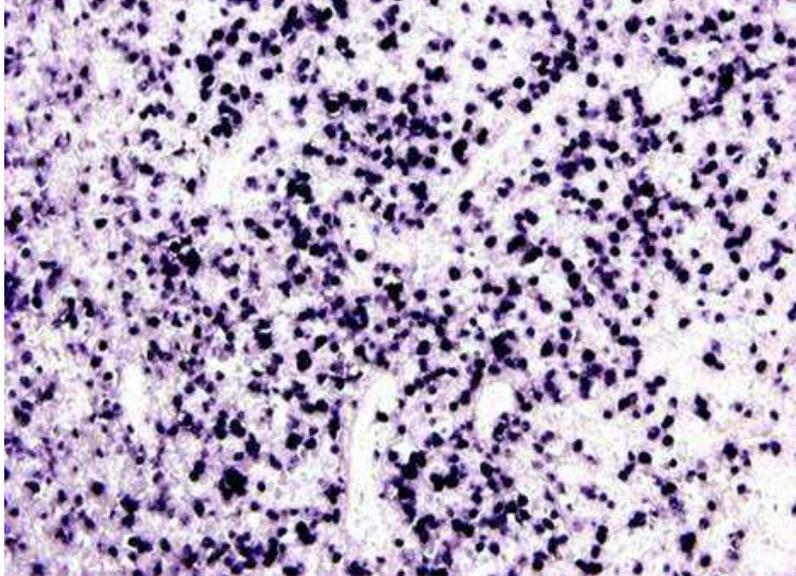
Alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fälle zeigten in der EBER in-situ Hybridisierung positive Kernsignale für die „EBV-encoded RNAs“ (n=69, 100%; Abb. 3). Für das latente Membranprotein des Epstein-Barr Virus (LMP1) waren 45/68 (66%) der Fälle positiv, und für EBNA2 12/68 (18%). Die Latenztypen des EBV waren dementsprechend wie folgt verteilt:

Tabelle 12: Latenztypen des EBV nach Diagnosen

Latenz- typ	DLBCL n=50 gesamt	DLBCL n=35 monom.	DLBCL n=15 polym.	polymorphe B-Zell-H/L n=8	B- LPD/T n=6	B- LPD n=2	atypische Lymphopro- liferation n=3
I Eber +	12/48 25%	11/48 23%	1/48 2%	3/8 38%	1/2 50%	1/2 50%	0/3 0%
II Eber+,LMP1+	24/48 50%	17/48 35%	7/48 15%	4/8 50%	1/2 50%	1/2 50%	2/3 67%
III Eber+,LMP1+,EBNA+	12/48 25%	5/48 10%	7/48 15%	1/8 12%	0/2 0%	0/2 0%	1/3 33%

Legende zur Tabelle12: polym. B-Zell-H/L = polymorphe B-Zellhyperplasie/-Lymphom, B-LPD/T = B-LPD bei/nach T-Zell-Lymphom, B-LPD=B-Zell-Lymphoproliferation, DLBCL=diffuses,großzelliges B-Zell-Lymphom, monom.=monomorph, polym.=polymorph

Abbildung 3: Beispiel einer EBER in situ Hybridisierung in einem DLBCL



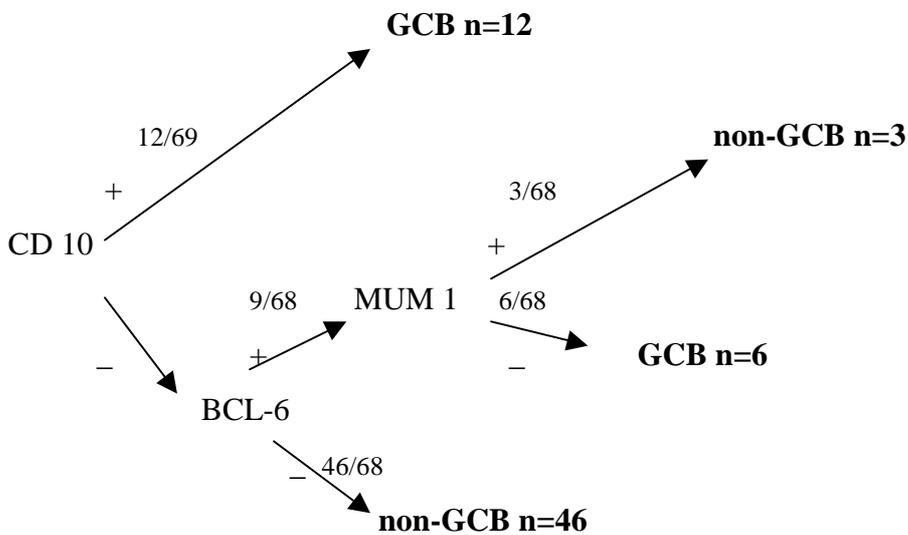
In nahezu allen Zellen ist eine deutliche nukleäre Positivität in der EBER in situ-Hybridisierung zu erkennen (Originalvergrößerung 400x)

3.3.2 Expression von CD10, BCL-6 und MUM1

Für CD10 waren nur 12/69 (17%) aller Fälle positiv. Auch für BCL-6 wiesen lediglich 10/63 (16%) der Fälle eine Reaktivität auf. Bemerkenswerterweise war jedoch nur 1 Fall für CD10 und BCL-6 zugleich positiv. Die übrigen 11/12 (92%) CD10 positiven Fälle waren alle für BCL-6 negativ. Von diesen 11 letztgenannten CD10+/BCL-6-Fällen zeigten 4 Fälle das Expressionsmuster CD10+/BCL-6-/MUM1-/CD138-, weitere 4 Fälle den Immunphänotyp CD10+/BCL-6-/MUM1+/CD138+ und 3 Fälle das Muster CD10+/BCL-6-/MUM1+/CD138-. Hingegen zeigten für den „Postkeimzentrumsmarker“ MUM1 mehr als die Hälfte der Tumoren (34/65; 52%) eine Positivität (in $\geq 30\%$ der Tumorzellen).

In der Anwendung des HANS-Klassifikators (Hans et al., 2004 (60)) waren dementsprechend 49/67 (73%) der Fälle den non-GCB und lediglich 18/67 (27%) den GCB zuzuordnen. Der HANS-Klassifikator wurde dabei auf alle Lymphoproliferationen angewendet, nicht nur ausschließlich auf die Entität der DLBCL. Die folgende Abbildung verdeutlicht die Verteilung der Fälle:

Abbildung 4: Verteilung der Fälle im Hans-Klassifikator



Die 12 CD10-positiven, nach dem HANS-Klassifikator also den GCB zuzuordnenden B-Zell-Lymphoproliferationen/-Lymphome bestanden aus 9 DLBCL (8 monomorphe und ein polymorphes DLBCL) und einer B-LPD nach T-Zell-Lymphom, einer B-LPD und einer polymorphen B-Zellhyperplasie/-Lymphom. Von den CD10 positiven Lymphomen war eines gleichzeitig für BCL-6 positiv, die restlichen 11 CD10 positiven Lymphome waren für BCL-6 negativ. Die weiteren 6 - CD10 negativen - (BCL-6 positiven und gleichzeitig MUM1 negativen) als GCB klassifizierten Fälle bestanden aus 5 DLBCL (2 monomorph und 3 polymorph) und einer B-LPD nach T-Zell-Lymphom. Zwei atypische Lymphoproliferationen, 12 DLBCL, 4 polymorphe B-Zellhyperplasien/-Lymphome und 2 B-LPD/T waren CD10-/BCL-6-/MUM1-. Bei 4 DLBCL konnte MUM1 in 3 Fällen und BCL-6 in 1 Fall nicht ausgewertet werden. Diese Fälle konnten jedoch trotzdem der Gruppe der non-GCBs zugeordnet werden. Die Sequenz CD10-/BCL-6-/MUM1+ wiesen 16 DLBCL, je 2 polymorphe B-Zellhyperplasien/-Lymphome und B-LPD/T, sowie je eine B-LPD und eine atypische Lymphoproliferation auf.

Unter den non-GCB waren die Entitäten insgesamt wie folgt verteilt:

- 34 DLBCL (23 monomorph und 11 polymorph)
- 7 polymorphe B-Zellhyperplasien/-Lymphome

- 4 B-LPD bei/nach T-Zell-Lymphom
- 3 atypische Lymphoproliferationen
- 1 B-LPD

Tabelle 13: Verteilung des Hans-Klassifikators auf die einzelnen Diagnosen

	Hans-Klassifikator non-GCB		Hans-Klassifikator GCB	
	DLBCL	34/48	71%	14/48
monomorph	23/48	48%	11/48	23%
polymorph	11/48	23%	3/48	6%
polym. B-Zell-H/L	7/8	87%	1/8	13%
B-LPD/T	4/6	67%	2/6	33%
atypische LPD	3/3	100%	0/3	0%
B-LPD	1/2	50%	1/2	50%

Legende: polym. B-Zell-H/L = polymorphe B-Zellhyperplasie/-Lymphom, B-LPD/T= B-LPD bei/nach T-Zell-Lymphom, B-LPD = B-Zell-Lymphoproliferation, DLBCL = diffuses, großzelliges B-Zell-Lymphom

3.3.3 Korrelation der CD138-Reaktivität mit den Daten des HANS-Klassifikators

Eine Expression von CD138 (80-90%) lag in insgesamt 8 Fällen vor; in 4 non-GCB und 4 GCB. Bemerkenswerterweise lag auch unter den insgesamt 12 CD10-positiven Fällen in vier Tumoren eine zusätzliche CD138-Reaktivität vor, mit einer Reaktivität in bis zu 80-90% der Zellen. Keiner der CD10+/CD 138+ Fälle war für BCL-6 positiv. Alle NHL/polymorphen B-Zell-H/L, die positiv für CD138 waren, waren auch für MUM1 positiv.

Tabelle 14: Korrelation von CD138 mit dem GCB-/non-GCB-Status:

Hans-Klassifikator	Diagnose	Summe
non-GCB CD138+	- 3 DLBCL - 1 polym.-B-Zell-H/L	4
GCB CD 138+	- 4 DLBCL	4

3.3.4 Sekretorische Differenzierung

Eine sekretorische Differenzierung (monotypische cytoplasmatische Immunglobulin-expression) war in 1/3 atypischen Lymphoproliferationen (kappa), in 2/6 (33%) B-LPD bei/nach T-Zell-Lymphom (kappa), bei 12/39 (31%) DLBCL (7 kappa, 5 lambda) und bei 2/6 (33%) polymorphen B-Zellhyperplasien/-Lymphomen (je einmal kappa und lambda) nachweisbar.

Tabelle 15: Sekretorische Differenzierung

	DLBCL n=39		Polym.-B- Zell-H/L n=6		B-LPD/T n=6		B-LPD n=2		atypische LPD n=3	
CIg gesamt	12/39	31%	2/6	33%	2/6	33%	0/2	0%	1/2	50%
CIg kappa	7/39	18%	1/6	17%	2/6	33%	0/2	0%	1/2	50%
CIg lambda	5/39	13%	1/6	17%	0/6	0%	0/2	0%	0/2	0%

Legende: polym. B-Zell-H/L = polymorphe B-Zellhyperplasie/-Lymphom, B-LPD/T= B-LPD bei/nach T-Zell-Lymphom, B-LPD = B-Zell-Lymphoproliferation, DLBCL=diffuses, großzelliges B-Zell-Lymphom, CIg = sekretorische Differenzierung

3.3.5 Korrelation der sekretorischen Differenzierung mit der Einstufung nach dem HANS-Klassifikator und der CD138-Expression

Von 17 Fällen mit einer nachweisbaren sekretorischen Differenzierung waren 12/17 (71%) der Kategorie der non-GCB und 5/17 (29%) den GCB zuzuordnen. Von den CIg+ DLBCL waren 8/12 (67%) non-GCB und 4/12 (33%) GCB. Von den polymorphen B-Zellhyperplasien/-Lymphomen waren 2/2 (100%) non-GCB, von zwei B-LPDs nach T-Zelllymphom war ein Fall ein GCB und ein Fall ein non-GCB. Eine sekretorisch differenzierte atypische Lymphoproliferation war nach dem HANS-Klassifikator ein non-GCB, da in diesem Fall CD10, BCL-6 und MUM1 jeweils negativ waren.

Nur 4/17 (24%) der sekretorisch differenzierten Fälle wiesen eine Koexpression für CD138 auf; diese waren alle DLBCL (CD 138 war hier zu 80-90% positiv.) Von den CD138 positiven Fällen waren 4/8 (50%) zugleich sekretorisch differenziert.

3.3.6 Antiapoptosemarker, Aktivierungsmarker und Proliferationsmarker

Für BCL-2 waren 3/3 (100%) der atypischen Lymphoproliferationen, 1/2 (50%) der B-LPD, 1/6 (17%) der B-LPD nach/bei T-Zell-Lymphom, 19/47 (40%) der DLBCL und 4/8 (50%) der polymorphen B-Zell-Hyperplasien/-Lymphome positiv.

Cyclin D1 war in allen Fällen negativ.

Den Aktivierungsmarker CD30 exprimierten 1/3 (33%) der atypischen Lymphoproliferationen, 1/2 (50%) der B-LPD, 5/6 (83%) der B-LPD nach/bei T-Zell-Lymphom, 26/49 (53%) der DLBCL und 5/8 (63%) der B-Zellhyperplasien/-Lymphome.

3/3 (100%) der atypischen Lymphoproliferationen, 26/33 (79%) der DLBCL, sowie je 50% der B-LPD (1/2), B-LPD/T (3/6) und polymorphen B-Zell-H/L (3/6) zeigten eine Positivität für pRB.

Ki-67 wies bei den B-LPD/T (6/6) eine Reaktivität von 10 bis 90% der Zellen auf, in den übrigen Entitäten lag die Expression in allen untersuchten Fällen über 50%.

Für HLA-DR waren 4/35 DLBCL (11%) negativ, in den übrigen Entitäten lag eine Positivität von 100% vor.

Tabelle 16 : Antiapoptosemarker, Aktivierungsmarker und Proliferationsmarker

	DLBCL n=50		Polym.-B- Zell-H/L n=8		B-LPD/T n=6		B-LPD n=2		Atypische LPD n=3	
	Positiv	Prozent	Positiv	Prozent	Positiv	Prozent	Positiv	Prozent	Positiv	Prozent
BCL-2	19/47	40%	4/8	50%	1/6	17%	1/2	50%	3/3	100%
p53	13/49	27%	0/8	0%	0/6	0%	0/2	0%	0/3	0%
CD 30	26/49	53%	5/8	63%	5/6	83%	1/2	50%	1/3	33%
pRB	26/33	79%	3/6	50%	3/6	50%	1/2	50%	3/3	100%
Ki-67	27/36	75%	3/6	50%	2/6	33%	1/2	50%	2/3	66%
HLA-DR	31/35	89%	5/5	100%	6/6	100%	1/1	100%	2/2	100%

Legende: polym. B-Zell-H/L = polymorphe B-Zellhyperplasie/-Lymphom, B-LPD/T= B-LPD bei/nach T-Zell-Lymphom, B-LPD=B-Zell-Lymphoproliferation, DLBCL=diffuses, großzelliges B-Zell-Lymphom

Eine Unterteilung der DLBCL in polymorphe und monomorphe Subtypen ergab hier keine signifikanten Unterschiede bei der Expression der einzelnen Marker.

Eine Überexpression für p53 lag in 13/49 (27%) der untersuchten Fälle vor, wobei in keinem Fall gleichzeitig eine Hochregulierung für p21 nachweisbar war. Für diesen Marker konnten insgesamt sieben NHL/LPD aus technischen Gründen nicht ausgewertet werden.

Es handelte sich bei den p53-positiven Fällen ausschließlich um DLBCL. Die Sequenz p53-/p21+ trat in 2/33 (6%) der Fälle auf (ein DLBCL und eine B-LPD nach/bei T-Zell-Lymphom).

p27 war in 2/30 (6%) der Fälle exprimiert, beide Fälle (2 DLBCL) waren sowohl für p53 als auch für p21 negativ.

Für Cyclin D1 war kein Fall (0/69, 0%) positiv.

3.4 Humanes Herpesvirus 8 (HHV8)

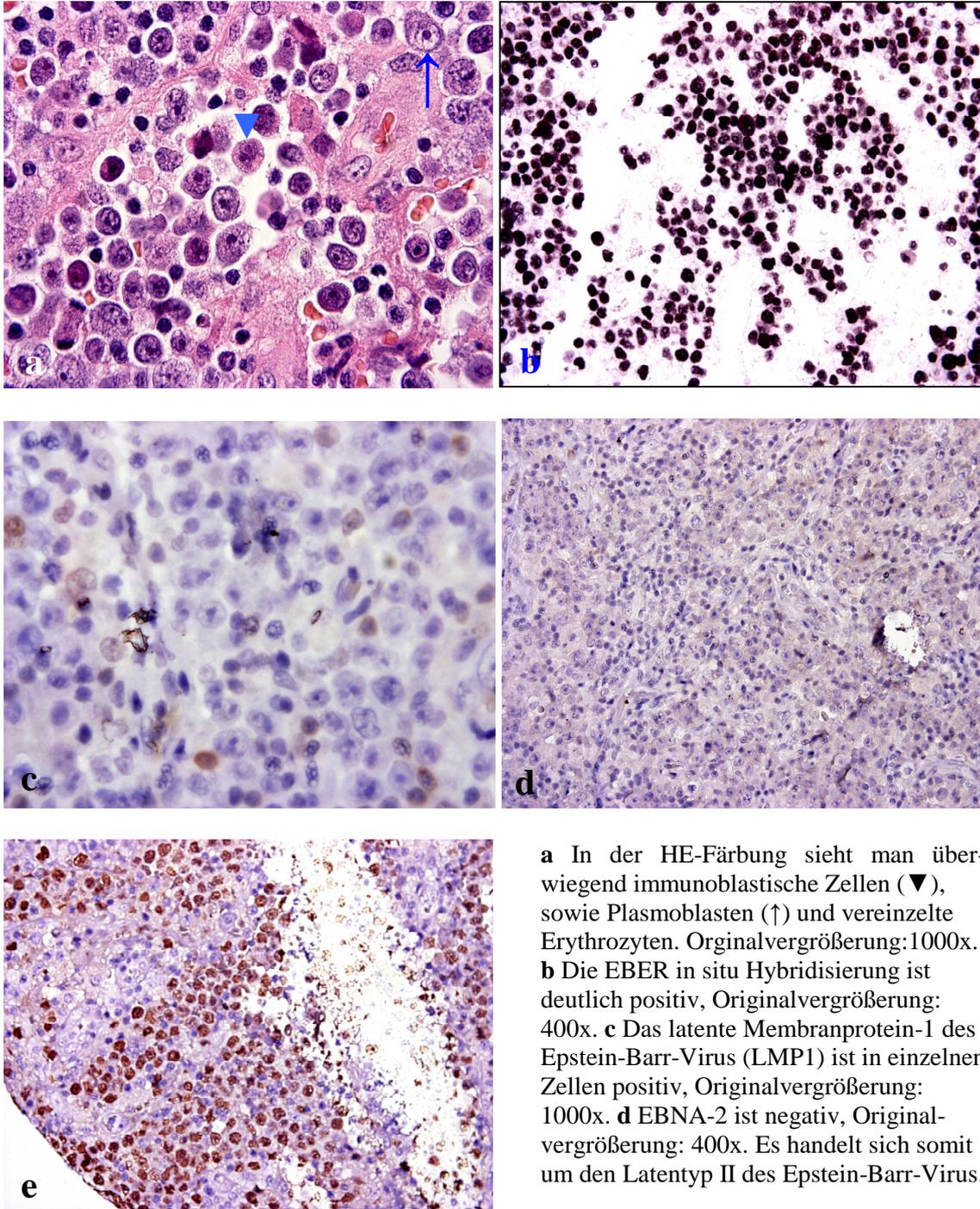
In der Färbung für HHV 8 war lediglich ein Fall von 69 (1%) Fällen positiv. Es handelte sich hierbei um ein HIV-assoziiertes monomorphes DLBCL, das in einem cervicalen Lymphknoten eines 23-jährigen HIV-positiven jungen Mannes diagnostiziert worden war, der lymphomunabhängig verstorben ist. Bei allen anderen EBV-assoziierten Fällen liess sich eine Koinfektion für HHV-8 nicht nachweisen (Abbildung 5).

3.5 Untersuchungen zur Klonalität

Daten über eine klonale Expansion von B- oder T-Zellen lagen für insgesamt 40 Fälle vor, davon für 26 DLBCL. Für den B-Zellrezeptor lag in 23/40 (58%) ein monoklonales Amplifikat vor, für den T-Zellrezeptor war eine klonale Expansion von T-Zellen in 6/22 (27%) NHL/LPD nachweisbar.

Im Einzelnen zeigten 3/5 (60%) B-LPD/T, 16/26 (62%) DLBCL und 4/6 (66%) der polymorphen B-Zell-H/L ein monoklonales Amplifikat für JH (Immunglobulinschwerkettengen); in 2/2 (100%) B-LPD, 2/5 (40%) B-LPD/T, 10/26 (38%) DLBCL und 2/6 (33%) polymorpher B-Zell-H/L und 1/1 (100%) der atypischen

Abbildung 5: HHV8-positives, nodales (immunoblastisch-plasmoblastisches) DLBCL



a In der HE-Färbung sieht man überwiegend immunoblastische Zellen (▼), sowie Plasmoblasten (↑) und vereinzelte Erythrozyten. Originalvergrößerung:1000x.
b Die EBV in situ Hybridisierung ist deutlich positiv, Originalvergrößerung: 400x.
c Das latente Membranprotein-1 des Epstein-Barr-Virus (LMP1) ist in einzelnen Zellen positiv, Originalvergrößerung: 1000x.
d EBNA-2 ist negativ, Originalvergrößerung: 400x. Es handelt sich somit um den Latentyp II des Epstein-Barr-Virus.

e HHV-8 ist deutlich exprimiert, Originalvergrößerung: 400x

Lymphoproliferationen konnte lediglich ein polyklonales Amplifikat nachgewiesen werden. 10/15 (67%) der monomorphen DLBCL und 5/10 (50%) der polymorphen DLBCL zeigten ein monoklonales Amplifikat für den B-Zellrezeptor des

Immunglobulinschwerkettengens. 3/8 (38%) der monomorphen DLBCL nach/bei T-Zell-Lymphom und 3/5 (60%) der B-LPD/T liessen ein monoklonales Amplifikat für den T-Zellrezeptor nachweisen.

Ein klonales Amplifikat für den T-Zellrezeptor (gamma-Kette) wiesen 3/11 (27%) der untersuchten DLBCL, die keinen Bezug zu einem T-Zell-Lymphom hatten, auf. In 2/5 (40%) B-LPD/T und 8/11 (72%) DLBCL war ein polyklonales Amplifikat nachzuweisen. In den übrigen untersuchten Fällen/Entitäten (atypische Lymphoproliferationen (n=1), B-LPDs (n=1), polymorphe B-Zell-H/L (n=4)) war ausschließlich ein polyklonales Amplifikat für den T-Zellrezeptor zu ermitteln.

3.6 Nachweis chromosomaler Aberrationen in der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)

Bei insgesamt 53 Fällen konnte die FISH mit guter Hybridisierungseffizienz ausgewertet werden, wobei Proben für *CMYC*, *BCL6*, *BCL2*, *IGH*, *CEP3* und *CEP18* zum Einsatz kamen. Für die untersuchten Sonden ließen sich lediglich in der diagnostischen Kategorie des DLBCL Signalkonstellationen nachweisen, die auf ein Bruchereignis (eine Translokation) im jeweiligen Gen hinwiesen. 5/39 (13%) der DLBCL zeigten ein Bruchereignis im *BCL6* –Gen. Eine Signalkonstellation, die auf ein Bruchereignis in *CMYC* hinweist, lag bei 9/36 (25%) DLBCL vor. Von diesen 9 DLBCL waren 4 für CD10 positiv, nur 2 auch zugleich für BCL-2 positiv (nur 1 Fall war zugleich für CD10 und BCL-2 positiv) und der Proliferationsindex Ki-67 war in 7 Fällen <90%. 7/38 (18%) DLBCL zeigten ein Bruchereignis für *IGH*.

Für *CMYC* und gleichzeitig für *IGH* waren 5 Fälle positiv und für *BCL6* und zugleich für *IGH* waren 2 Fälle positiv. Es handelte sich bei den letztgenannten 7 Fällen mit Bruchereignissen für *IGH* ausschließlich um monomorphe DLBCL.

Für *BCL2* lag in keinem der Fälle ein Split der erzielten Signale vor.

In den Gruppen der atypischen Lymphoproliferationen, B-LPD, B-LPD/T und polymorphen B-Zell-H/L waren alle Fälle für *BCL6*, *BCL2*, *IGH* und *MYC* negativ.

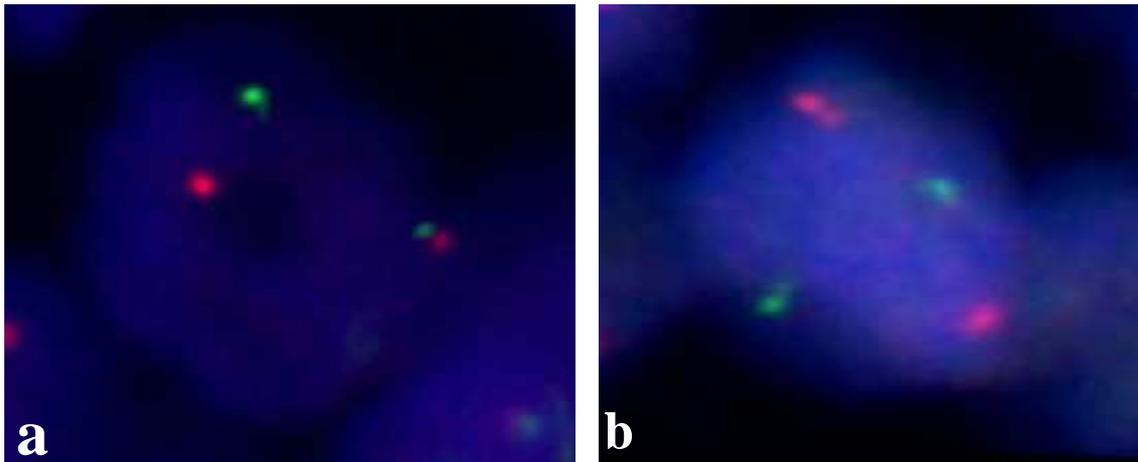
Tabelle 17: Chromosomale Aberrationen nach Diagnosen:

Diagnosen n = 53	<i>BCL6</i>		<i>CMYC</i>		<i>BCL2/IgH</i>		<i>IGH</i>	
DLBCL n = 44	5/39	13%	9/36	25%	0/39	0%	7/38	18%
monomorph n=31	2/39	5%	6/36	17%	0/39	0%	7/38	18%
polymorph n=12	3/39	8%	3/36	8%	0/39	0%	0/38	0%
polymorphe B-Zell-H/L n=5	0/5	0%	0/5	0%	0/5	0%	0/4	0%
B-LPD n=2	0/2	0%	0/2	0%	0/2	0%	0/2	0%
atypische Lymphoproliferation n=2	0/2	0%	0/2	0%	0/2	0%	0/2	0%

Zusätzliche Signale (>2), die eine numerische Aberration des Genlocus (Trisomie) belegen, konnten für *MYC* in 2/52 (4%) Fällen (1 DLBCL monomorph; 1 polymorphe B-Zellhyperplasie/-Lymphom) nachgewiesen werden. Für *BCL6* waren in 3/52 (6%) Fällen Zugewinne (2 DLBCL, monomorph und polymorph, sowie 1 B-LPD nach/bei T-Zell-Lymphom) und für *BCL2* in 1/52 (2%) Fällen (1 DLBCL polymorph) Zugewinne zu verzeichnen. In allen Fällen, die Amplifikationen aufwiesen, lagen keine chromosomalen Translokationen vor.

Chromosomale Imbalancen im Sinne eines Zugewinns für die Centromerregionen zeigten für das Chromosom 3 4/39 (10%) der Fälle (2 monomorphe DLBCL, 1 polymorphe B-Zell-H/L, 1 B-LPD/T) und für das Chromosom 18 6/26 (23%) der Fälle (4 monomorphe DLBCL, 1 polymorphes DLBCL, 1 polymorphe B-Zell-H/L, 1 atypische LPD).

Abbildung 6: Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) am Paraffinmaterial



a: *BCL6*, Break-Apart-Sonde, positives Signal

b: *BCL2/IgH*, Fusionssonde, negatives Signal

3.7 Daten zu einer nicht-EBV-assoziierten Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe wurden EBV-negative DLBCL, die *de novo* (ohne bekannte vorherige Immunsuppression) entstanden waren, analysiert. Sie stammten ebenfalls aus der Routinediagnostik des pathologischen Instituts der Julius-Maximilians-Universität Würzburg aus den Jahren 1985 bis 2003. Die Fälle umfassten insgesamt 153 DLBCL, davon waren 123 Fälle nodalen und 30 Fälle extranodalen Ursprungs. Sie wurden analog zu den EBV-positiven DLBCL immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet, die Untersuchungen zu chromosomalen Aberrationen wurden mit Hilfe der klassischen Zytogenetik erstellt.

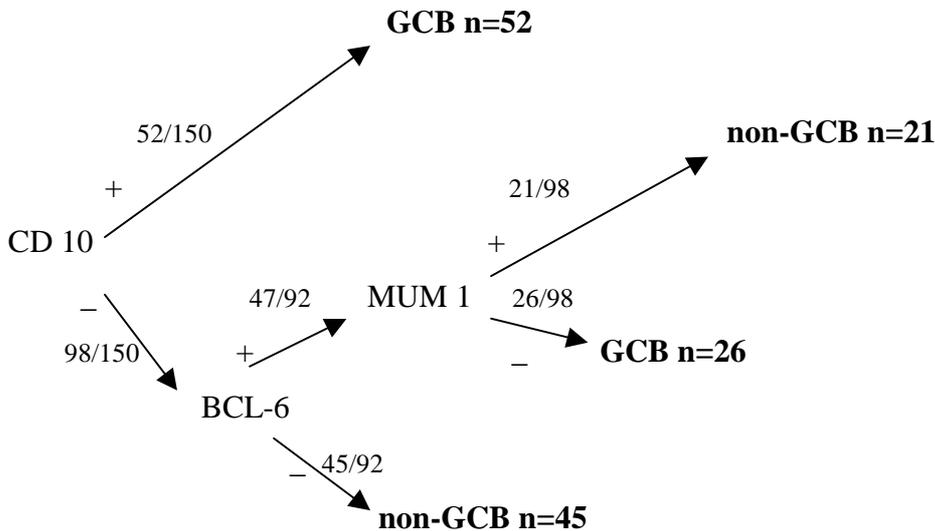
3.7.1 Immunhistochemie der Kontrollgruppe

3.7.2 Hans-Klassifikator

Für CD10 waren 52/150 (35%) der DLBCL positiv. Von den CD 10 positiven DLBCL waren 49/50 (98%) zugleich positiv für BCL-6, nur ein DLBCL (1/50, 2%) war zugleich negativ für BCL-6. Insgesamt waren 94/139 (68%) der DLBCL positiv für BCL-6 und 65/147 (44%) positiv für MUM1. Den GCB waren 78/144 (54%) und den Non-GCB 66/144 (46%) der Fälle zuzuordnen.

Die folgende Abbildung zeigt die Verteilung der DLBCL der Kontrollgruppe im Hans-Klassifikator:

Abbildung 7: Verteilung der EBV-negativen DLBCL im Hans-Klassifikator



3.7.3 Weitere immunhistochemische Marker in der Kontrollgruppe

Für CD 138 waren in der Kontrollgruppe lediglich 2/72 (3%) der DLBCL positiv. Diese waren zugleich negativ für CD10 und BCL-6, sowie positiv für MUM1 und konnten somit den non-GCB zugeordnet werden. Beide Fälle der CD138 positiven DLBCL waren sekretorisch differenziert.

Insgesamt wiesen 54/133 (41%) der EBV-negativen DLBCL eine sekretorische Differenzierung auf. Hiervon waren 17/133 (13%) der Fälle dem GCB-Subtyp und 37/133 (28%) der Fälle dem Non-GCB-Subtyp der DLBCL zuzuordnen.

p53 zeigte in 30/134 (22%) der DLBCL eine deutliche Überexpression. p21 und p27 wurden in der Kontrollgruppe nicht untersucht.

BCL-2 war in 97/147 (66%) der Fälle positiv. Cyclin D1 wurde ebenfalls nicht untersucht.

HLA-DR war bei 110/129 (85%) der DLBCL der Kontrollgruppe exprimiert.

Für den Aktivierungsmarker CD30 waren 18/90 (20%) der Fälle positiv.

Tabelle 18: Auswertung der Kontrollgruppe in der Immunhistochemie

	CD10		BCL-6		MUM1		non-GCB		GCB	
DLBCL	52/150	35%	94/139	68%	65/147	44%	66/144	46%	78/144	54%

	BCL-2		CD138		CIg		HLA-DR		p53	
DLBCL	97/147	66%	2/72	3%	54/133	41%	110/129	85%	30/134	22%

	CD30	
DLBCL	18/90	20%

3.7.4 Zytogenetische Daten der Kontrollgruppe

Von 91 DLBCL der Kontrollgruppe lagen klassische zytogenetische Analysen nach Kurzzeitkultur vor. Ein Rearrangement in der Bande 8q24 (*CMYC*) lag bei 8/91 (9%) Fällen vor, in 3q27 (*BCL6*) für 6/91 (7%) der Fälle. 8 Tumoren ließen eine t(8;14) nachweisen. Eine t(3;14) konnte in 6 Fällen erkannt werden. Insgesamt lag bei 36/91 (40%) der Fälle ein Bruchereignis in 14q32 (*IGH*) vor. Eine t(14;18) (*BCL2*) trat in 8/91 (9%) der DLBCL der Kontrollgruppe auf.

Zugewinne waren auf Chromosom 3 in 16/91 (18%) und auf Chromosom 18 in 9/91 (10%) der Fälle zu verzeichnen.

Tabelle 19: Auswertung der Zytogenetik der Kontrollgruppe

	<i>CMYC</i>		<i>BCL6</i>		<i>IgH</i>		<i>BCL2</i>		+3		+18	
DLBCL n=91	8/91	9%	6/91	7%	36/91	40%	8/91	9%	16/91	18%	9/91	10%

3.8 Korrelation der Morphologien untereinander und der Grunderkrankungen untereinander

3.8.1 Vergleich der immunhistochemischen Korrelationen bei DLBCL, Nicht-DLBCL und zur Kontrollgruppe

Für den morphologischen/immunologischen Vergleich wurde zwischen DLBCL und Nicht-DLBCL unterschieden. Unter Nicht-DLBCL (n=19) wurden alle B-Zell-Lymphoproliferationen (n=2), atypischen Lymphoproliferationen (n=3), B-Zell-Lymphoproliferationen bei oder nach T-Zell-Lymphom (n=6) und polymorphen B-Zellhyperplasien/Lymphome (n=8) zusammengefasst.

Tabelle 20: Vergleich der Markerexpression

	DLBCL n=50		Nicht-DLBCL n=19		Kontrollgruppe „sporadische DLBCL“ n=144	
Non-GCB	34/48	71%	15/19	79%	66/144	46%
GCB	14/48	29%	4/19	21%	78/144	54%
CD10	9/50	18%	3/19	16%	52/150	35%
BCL-6	7/47	15%	2/19	11%	94/139	68%
MUM1	26/46	57%	8/19	42%	65/147	44%
CD30	26/49	53%	12/19	63%	18/90	20%
CD138	8/50	16%	1/19	5%	2/72	3%
CIg	12/39	31%	5/16	31%	54/133	41%
p53	13/49	27%	0/19	0%	30/134	22%
BCL-2	19/47	40%	9/19	47%	97/147	66%
RB	26/33	79%	10/17	59%	ND	ND
HLA-DR	31/35	89%	14/14	100%	110/129	85%
LMP1	34/48	71%	12/19	63%	ND	ND
EBNA2	12/48	25%	2/19	11%	ND	ND

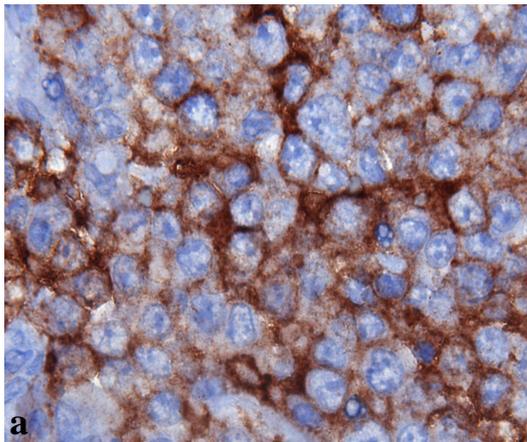
Zwischen den DLBCL und Nicht-DLBCL traten in der Immunhistochemie keine signifikanten Unterschiede auf. Beim Vergleich der EBV-positiven DLBCL mit den EBV-negativen DLBCL der Kontrollgruppe zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der Auswertung des HANS-Klassifikators, bzw. der BCL-6-, BCL-2-, CD138- und CD30 - Expression.

Bei den EBV-positiven DLBCL traten signifikant mehr DLBCL vom non-GCB-Subtyp auf ($p=0,0027$, Chi-Quadrat-Test) als bei den DLBCL der Kontrollgruppe.

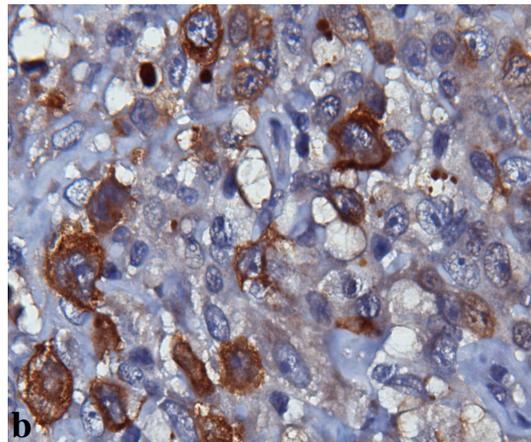
Ebenso war bei den EBV-positiven DLBCL die Expression des B-Zellmarkers CD138 signifikant höher ($p=0,0152$; Fisher's exact Test). Die CD138-positiven Fälle der EBV-positiven Gruppe waren zu 50% non-GCB und zu 50% GCB. Die 4/8 (50%) CD138-positiven GCB-Fälle hatten alle den Immunphänotyp CD10+/BCL6-/MUM1+/CD138+, so dass sie lediglich aufgrund der Expression von CD10 der GCB-Gruppe zugeordnet wurden (Hans et al., 2004 (60)). CD10 war bei den EBV-positiven DLBCL signifikant weniger exprimiert als in der Kontrollgruppe ($p=0,0266$). Die Proteinexpression von BCL-2 war bei den EBV-positiven DLBCL insgesamt sehr signifikant niedriger als in der EBV-negativen Kontrollgruppe ($p= 0,0019$). Auch BCL-6 war bei den EBV-positiven DLBCL höchst signifikant geringer exprimiert ($p < 0,001$) als bei den DLBCL der Kontrollgruppe.

Der Aktivierungsmarker CD30 war bei den EBV-positiven DLBCL höchst signifikant mehr exprimiert als bei den EBV-negativen DLBCL der Kontrollgruppe ($p=0,0001$). CD30 wurde bei den EBV-positiven DLBCL häufig nur von einzelnen, blastären, unreifen Zellformen, die morphologisch Hodgkin- oder Reed-Sternberg-Zellen ähnelten exprimiert. Diese Zellen wiesen jedoch keine Koexpression für CD15 auf. In der EBV-negativen Kontrollgruppe war CD30 deutlich seltener exprimiert und es gab auch einen Unterschied in der Morphologie der Zellen. Die Zellen waren vergleichsweise etwas kleiner in der Morphologie und homogener im Aussehen.

Abbildung 8: CD30-Expression der EBV-positiven- und EBV-negativen DLBCL



a EBV-negatives DLBCL (Original 1000x):
homogene CD30 -Expression



b EBV-positives DLBCL, polymorph:
große, Hodgkin-ähnliche Zellen zeigen eine
deutliche Expression für CD30 (Original 1000x)

3.8.2 Vergleich der zytogenetischen Korrelationen bei DLBCL, Nicht-DLBCL und zur Kontrollgruppe

Tabelle 21: Vergleich der genetischen Aberrationen

	DLBCL n=50		Nicht-DLBCL n=19		Kontrollgruppe „sporadische DLBCL“ n=91	
<i>CMYC</i>	9/36	25%	0/8	0%	8/91	9%
<i>BCL6</i>	5/39	13%	0/8	0%	6/91	7%
<i>IGH</i>	7/38	18%	0/7	0%	36/91	40%
<i>BCL2</i>	0/39	0%	0/9	0%	8/91	9%
<i>CEP3/+3</i>	2/31	6%	2/7	29%	16/91	18%
<i>CEP18/+18</i>	4/20	20%	2/5	40%	9/91	10%

Zwischen den DLBCL und den Nicht-DLBCL gab es auch in zytogenetischer Hinsicht keine signifikanten Unterschiede.

In der Zytogenetik war *CMYC* bei den EBV-positiven DLBCL signifikant häufiger rearrangiert als in der EBV-negativen Kontrollgruppe ($p=0,0156$). Die Bruchereignisse für den 14q32 (*IGH*)-Locus der EBV-positiven DLBCL stimmten bis auf 1 Fall mit den Bruchereignissen für *CMYC* und *BCL6* überein. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe ergeben sich jedoch für *IGH*-Rearrangements signifikant weniger Bruchkonstellationen ($p=0,0203$) für die EBV-positiven DLBCL.

In den zytogenetischen Analysen war auffällig, dass Bruchereignisse für *MYC*, *BCL6* und *IGH* lediglich bei den als DLBCL klassifizierten Fällen nachzuweisen waren. Numerische Aberrationen liessen sich sowohl bei DLBCL wie auch bei den Nicht-DLBCL nachweisen. Bei den EBV-positiven DLBCL mit Bruchereignissen für *MYC* waren 5/9 (56%) Fälle vom non-GCB-Subtyp und 4/9 (44%) vom GCB-Subtyp. Die 4/9 GCB-Fälle waren positiv für CD10 und zugleich alle negativ für BCL-6 (für MUM1 waren 3/4 Fällen positiv und für CD138 waren 2 Fälle positiv). Bei den 7 Fällen mit einem Rearrangement für IgH in der EBV-positiven Gruppe waren 3/7 (43%) den non-GCB und 4/7 (57%) den GCB zuzuordnen. Von diesen 4 GCB-Fällen waren alle positiv für CD10, jedoch nur 1 Fall auch gleichzeitig für BCL-6, alle 4 Fälle exprimierten MUM1 und 1 Fall zusätzlich CD138. Im Gegensatz hierzu gab es bei den EBV-negativen DLBCL der Kontrollgruppe mit *MYC*-Rearrangements 1/8 (12%) non-GCB und 7/8 (88%) GCB. Diese 7/8 GCB waren alle CD10+/BCL-6+, und nur 1 Fall exprimierte zusätzlich MUM1. In der Kontrollgruppe gab es 36 Fälle mit einem Rearrangement für *IgH*, davon waren 17/36 (47%) non-GCB und 19/36 (53%) GCB. Von diesen 19 GCB der Kontrollgruppe hatten 15 den Immunphänotyp CD10+/BCL-6+ und 4 Fälle den Immunphänotyp CD10-/BCL-6+/MUM1-.

3.8.3 Vergleich der Nicht-DLBCL mit der Kontrollgruppe

Bei den Nicht-DLBCL ergaben sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe Unterschiede in der Immunhistochemie hinsichtlich des HANS-Klassifikators, der BCL-6- und der CD30-Expression.

Es traten in der Gruppe der Nicht-DLBCL signifikant mehr Non-GCB auf als in der Kontrollgruppe ($p=0,0067$). CD30 war ebenfalls sehr signifikant höher exprimiert als in der Kontrollgruppe ($p=0,0001$) und die Expression von BCL-6 war bei den Nicht-DLBCL höchst signifikant geringer vorhanden ($p<0,001$).

In der Zytogenetik traten bei den Nicht-DLBCL keinerlei Bruchereignisse für *CMYC*, *BCL6*, *BCL2* und *IGH* auf. Auf Chromosom 3 lagen in 2/7 (29%) und auf Chromosom 18 in 2/5 (40%) der Fälle Zugewinne vor.

3.8.4 Vergleich der Grunderkrankungen untereinander

Tabelle 22: Vergleich der immunhistochemischen Befunde in Abhängigkeit von der Grunderkrankung

	HIV		PTLD		nach T-Zell Lymphom		nach B-Zell Lymphom		ohne GE	
Non-GCB	6/9	67%	6/12	50%	9/12	75%	4/6	67%	8/9	89%
GCB	3/9	33%	6/12	50%	3/12	25%	2/6	33%	1/9	11%
CD10	3/9	33%	4/12	33%	2/13	15%	0/6	0%	0/9	0%
BCL6	0/9	0%	3/12	25%	1/12	8%	3/5	60%	1/9	11%
MUM1	6/8	75%	7/12	58%	4/12	33%	3/6	50%	2/8	25%
CD30	2/9	22%	7/12	58%	7/13	54%	1/6	17%	6/9	67%
CD138	2/9	22%	2/12	17%	0/13	0%	0/6	0%	1/9	11%
CIg	0/5	0%	2/7	29%	2/10	20%	1/4	25%	2/7	29%
p53	3/9	33%	3/12	25%	1/13	8%	1/6	17%	2/9	22%
BCL2	2/8	25%	8/12	67%	1/13	8%	4/5	80%	6/9	67%
RB	6/6	100%	5/7	71%	6/12	50%	2/4	50%	2/7	29%
HLA-DR	7/7	100%	7/7	100%	12/12	100%	4/4	100%	6/9	67%
LMP1	4/9	44%	8/12	67%	8/13	62%	5/5	100%	7/9	78%
EBNA2	1/9	11%	4/12	33%	1/13	8%	0/5	0%	2/9	22%

Legende: HIV =HIV-assoziierte Lymphome, PTLD = Lymphome nach einer Transplantation, nach T-Zell= Lymphom bei oder auf T-Zell-Lymphom, nach B-Zell-Lymphom = Lymphom nach einer therapierten Lymphomerkkrankung, ohne GE= ohne Grunderkrankung

Tabelle 23: Vergleich zytogenetischen Befunde in Abhängigkeit von der Grunderkrankung

	HIV		PTLD		nach T-Zell Lymphom		nach B-Zell Lymphom		ohne GE	
CMYC	6/9	67%	1/9	11%	1/4	25%	0/6	0%	1/5	20%
BCL6	3/7	43%	1/7	14%	1/6	17%	0/6	0%	1/5	20%
IGH	3/8	38%	2/8	25%	0/7	0%	0/5	0%	0/5	0%
CEP3	1/6	17%	2/5	40%	1/7	14%	0/5	0%	1/6	17%
CEP18	1/6	17%	2/4	50%	3/5	60%	0/2	0%	1/2	50%

Legende: HIV =HIV-assoziierte Lymphome, PTLD = Lymphome nach einer Transplantation, nach T-Zell= Lymphom bei oder auf T-Zell-Lymphom, Nach B-Zell-Lymphom = Lymphom nach einer therapierten Lymphomerkkrankung, ohne GE= ohne Grunderkrankung

Aus den Tabellen lässt sich ersehen, dass Unterschiede in der Markerexpression und der Zytogenetik insbesondere für CD10, CD30, BCL-2 sowie *MYC* und *BCL6* vorlagen.

Rearrangements für *MYC* und *BCL6* waren vermehrt in der Gruppe der HIV-assoziierten DLBCL zu finden, wohingegen numerische Zugewinne auf Chromosom 18 in den Gruppen bei PTLD, nach T-Zell-Lymphom und in der Gruppe ohne vorangegangene Grunderkrankung häufiger waren. Für BCL-2 lag eine Expression in 8/12 (67%) der Fälle nach PTLD, 4/5 (80%) der Fälle nach vorangegangenem B-Zell-Lymphom und 6/9 (67%) der Fälle in der Gruppe ohne vorangegangene Grunderkrankung vor. Der Aktivierungsmarker CD30 war in der Gruppe der HIV-assoziierten Lymphome deutlich weniger exprimiert als in allen übrigen Gruppen. CD10 wurde in den Gruppen nach B-Zell-Lymphom und ohne vorangegangene Grunderkrankung nicht exprimiert. Die Gruppe ohne vorangegangene Grunderkrankung hatte mit 8/9 (89%) die höchste non-GCB-Rate aufzuweisen.

4. Diskussion

4.1 Patientenkollektiv, EBV-Assoziation und klinische Daten

In der vorliegenden Studie wurden der immunhistochemische Phänotyp und zytogenetische Aberrationen in Epstein-Barr-Virus-positiven Lymphoproliferationen und malignen Lymphomen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von EBV-negativen DLBCL aus der Datenbank des Pathologischen Institutes in Würzburg untersucht.

Aus der institutsinternen Datenbank konnten letztlich 69 EBV-assoziierte Fälle untersucht werden, die in einen TMA-Block eingebracht werden konnten; als Kontrollgruppe standen Daten von insgesamt 153 EBV-negativen DLBCL zur Verfügung.

Die Identifikation der EBV-positiven Lymphoproliferationen/Lymphome war bereits in der Routine- bzw. Referenz-Diagnostik erfolgt; im Zuge dieser routinediagnostischen Untersuchungen lagen in 43/69 (62%) Fällen keine klinischen Angaben bezüglich einer EBV-Assoziation bzw. einer entsprechenden Risikoerkrankung vor. Durch eine Versendung von Fragebögen zu den klinischen Daten und insbesondere zu den Vorerkrankungen konnten Informationen zu weiteren 27 Fällen erhalten werden; in 9 von diesen Tumoren ergab sich kein Hinweis auf eine mögliche vorangegangene Immunsuppression, so dass diese Fälle als „sporadische“ EBV-assoziierte Lymphoproliferationen gewertet werden können. In weiteren 18 Fällen ließen sich eine zunächst nicht mitgeteilte vorangegangene Lymphomerkrankung, ein nicht bekanntes T-Zell-Lymphom, oder eine vorangegangene immunsuppressive Medikation (Methotrexat) verifizieren. Trotz aller Bemühungen ließen sich von 16 (23%) weiteren Fällen klinische Daten bezüglich einer relevanten Vorerkrankung nicht erhalten.

Retrospektiv gesehen war für die Identifikation von malignen Lymphomen bzw. Lymphoproliferationen – neben entsprechenden klinischen Angaben, die anfangs nur in 26 von 69 der untersuchten Fälle (38%) vorlagen - insbesondere die Expression des Aktivierungsmarkers CD30 von Bedeutung. Eine Reaktivität für CD30 war in insgesamt 38 der untersuchten 68 Fälle (56%) nachweisbar. Damit ergab sich hier ein deutlicher und höchst signifikanter Unterschied zu der Kontrollgruppe der EBV-

negativen DLBCL, in denen eine CD30-Expression lediglich in 18 von 90 (20%) untersuchten Fällen vorlag ($p < 0,001$). Durch die anschließend in der Routinediagnostik in der Regel eingesetzten Marker LMP1 (latentes Membranprotein des EBV-1) ließ sich eine EBV-Assoziation in 56 der untersuchten 69 Fälle definitiv belegen (81%); in 13 Fällen konnte eine EBV-Assoziation also lediglich in der Anwendung der in-situ-Hybridisierung (EBER) verifiziert werden. Die Daten über eine Expression von CD30 bei *de novo* entstandenen DLBCL sind in guter Übereinstimmung mit der Literatur. Zinzani et al. (64) wiesen eine Frequenz von 18% (12 von 68 untersuchten DLBCL) nach. In dieser Serie waren alle CD30-positiven Fälle dem Non-GCB-Subtyp zuzuordnen. Kuze et al. (65) erzielten in einer Serie EBV-positiver und EBV-negativer DLBCL ähnliche Ergebnisse wie die in der vorliegenden Studie erhaltenen. In dieser Serie waren 100% (6/6) der EBV-positiven DLBCL auch CD30-positiv, während eine entsprechende Reaktivität lediglich in 15 von 85 (18%) der EBV-negativen Kontrollgruppe ($p = 0,0017$) vorlag.

Nach der konventionellen Morphologie und unter Berücksichtigung vorliegender klinischer Daten handelte es sich bei den EBV-assoziierten Lymphoproliferationen in der Mehrzahl der Fälle (50/69) (72%) um diffuse großzellige B-Zell-Lymphome, die überwiegend dem monomorphen Typ eines DLBCL ($n = 35$), in geringerem Umfang einem polymorphen DLBCL ($n = 15$) zuzuordnen waren. In Anlehnung an die Klassifikation der Immundefizienz-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen nach den Kriterien der WHO wurden 8 Fälle als polymorphe B-Zell-Hyperplasien/Lymphom klassifiziert, und 5 Fälle als nicht weiter klassifizierbare Lymphoproliferationen („atypische“ Lymphoproliferationen) angesehen. In 6 Fällen lag, bei bekanntem und vordiagnostiziertem bzw. gleichzeitig aufgetretenem peripherem T-Zell-Lymphom, eine EBV-assoziierte Lymphoproliferation vor, wie sie in der Literatur bereits mehrfach beschrieben worden war (56).

Bezüglich der ermittelten Grunderkrankungen der Patienten war ein Zustand nach Organtransplantation (PTLD) die häufigste, für eine EBV-Assoziation offenbar relevante Kondition, ein erworbenes Immundefekt-Syndrom lag in 9 Fällen vor. In 4 Fällen konnte eine immunsuppressive Medikation (zumeist mit Methotrexat) ermittelt

werden. Bemerkenswert ist, dass bei insgesamt 19 der eingeschlossenen Patienten eine (in einem großen Teil der an das Referenzzentrum übersandten Fälle primär nicht mitgeteilte) neoplastische und therapierte Vorerkrankung, in der Regel ein malignes Lymphom vorausgegangen war. Unter insgesamt 19 vorangegangenen malignen Lymphomen waren 13 T-Zell-Lymphome vertreten (insbesondere Fälle eines angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphoms und eines peripheren T-Zell-Lymphoms vom nicht weiter spezifizierten Typ). In insgesamt 16 Fällen (23%) konnten keine klinischen Informationen erhalten werden.

4.2 „Senile“ EBV-assoziierte Lymphoproliferationen

In der vorliegenden Untersuchung wurden aufgrund der Erhebung von klinischen Daten 9 Patienten mit EBV-positiven Lymphoproliferationen identifiziert, deren lymphoproliferative Erkrankungen ohne erkennbare prädisponierende Grunderkrankung bzw. vorliegenden Immundefekt aufgetreten waren. Es handelte sich hierbei ausschließlich um ältere Patienten im Alter von 60 bis 83 Jahren, der Mittelwert lag bei 72,2 Jahren und der Median bei 75 Jahren. Das Verhältnis von Männern zu Frauen war 5: 4.

Diese 9 Fälle zeigten Ähnlichkeiten zu den sogenannten „senilen“ Lymphoproliferationen, einer Entität, die von Oyama und Mitarbeitern (55) erstmals postuliert wurde und in dieser Form noch keine Berücksichtigung in der WHO-Klassifikation von 2001 (34) gefunden hat. Bereits 1992 berichteten Hamilton-Dutoit et al. (66) innerhalb einer größeren Studie über 2 Fälle von EBV-positiven, sporadischen, immunoblastischen DLBCL (beide nodalen Ursprungs und eines von deutlich polymorphem Erscheinungsbild), die bei männlichen Patienten im Alter von 55 und 76 Jahren bei nachweislich keinerlei Immunsuppression und HIV-Negativität aufgetreten waren.

„Senile“ Lymphoproliferationen wurden als Epstein-Barr-Virus positive Lymphoproliferationen beschrieben, welche bei Patienten auftreten, die älter als 60 Jahre sind und die keiner wie auch immer gearteten Immundefizienz unterliegen. Die Autoren (55) nahmen an, dass in diesen Fällen das Immunsystem durch den natürlichen Alterungsprozess nicht mehr in der Lage ist, die latente EBV-Infektion, die ja bei mehr als 90% der Bevölkerung vorhanden ist, zu kontrollieren. Histologisch zeichneten sich

diese Lymphoproliferationen durch ein oft polymorphes Erscheinungsbild mit häufigem Nachweis von Reed-Sternberg- und Hodgkin-ähnlichen Zellen aus, die meist positiv für CD30 und zugleich negativ für CD15 waren. Zudem liessen sich in der Regel Nekrosen, Histiocyten und andere inflammatorische Zellen, sowie ein angiozentrisches Wachstumsmuster feststellen. Oyama et al. (55) und Shimoyama et al. (54) unterschieden 2 Subtypen, einen polymorphen Subtyp und einen monomorphen DLBCL-Subtyp. Die Fälle waren für EBER, LMP1 und/oder EBNA2 positiv. Auch Au et al. (67) berichteten aus Hongkong von einem Fall einer EBER-positiven „senilen“ Lymphoproliferation einer 78-jährigen Frau, die als DLBCL im Nasopharynx aufgetreten war. Shimoyama und Kollegen (54) beschrieben 76 Patienten aus Japan mit einem Alter von 50 bis 92 Jahren (Median bei 71 Jahren), wobei die Ergebnisse dieser Studie zu denen von Oyama et al. (55) bis auf den Ursprungsort des Materials (nodal/extranodal) weitgehend identisch sind. Im Vergleich zu den Daten von Oyama und Mitarbeitern ergab sich bei den 9 „senilen“ Lymphoproliferationen der vorliegenden Studie lediglich hinsichtlich des nodalen oder extranodalen Ursprungsortes ein signifikanter Unterschied ($p=0,02$). In der Serie von Oyama (55) traten deutlich mehr extranodale Lymphoproliferationen auf (18/22; (82%)).

Tabelle 24: Vergleich der ermittelten Daten mit den Daten von Oyama et al. (55)

	Oyama et al. (55), Japan	Vorliegende Studie
Fallzahl	n=22	n=9
Alter (Median)	75,5	72,7
Männer : Frauen	12:10	5:4
CD30	11/22 (50%)	6/9 (67%)
Latenztyp I	0/22 (0%)	1/9 (11%)
Latenztyp II	15/22 (68%)	6/9 (67%)
Latenztyp III	7/22 (32%)	2/9 (22%)
nodal	4/22 (18%)	6/9 (67%)
extranodal	18/22 (82%)	3/9 (33%)

Anhand bislang vorliegender Daten ist noch nicht abschliessend zu beurteilen, ob die „senilen Lymphoproliferationen“ einer eigenständigen Entität zuzurechnen sind. Klauss (68) postulierte, dass die senilen Lymphoproliferationen keine eigenständigen Entität darstellen. Sie untersuchte senile B-Zell-Lymphoproliferationen (n=5, 3 polymorphe B-Zell-Lymphome und 2 B-Zell-Lymphome vom Subtyp hodgkin-like) immunhistochemisch und mit Hilfe einer Clusteranalyse daraufhin, ob sie sich in die Gruppe der Lymphome mit Immunsuppression (PTLD) oder in die Gruppe der Hodgkin-Lymphome einordnen lassen. Sie kam zu dem Ergebnis, dass die senilen Lymphoproliferationen sich aufgrund ihrer Histologie (Reed-Sternberg-Zellen, Hodgkin-Zellen, starkes T-Zell-Infiltrat) und ihres Immunphänotyps (CD30+, CD15+/-, CD20+, Latenztyp II des EBV) in die Gruppe der Hodgkin-Lymphome einordnen lassen. Shimoyama et al. (54) beschreibt in seiner Studie morphologische Überlappungen zwischen EBV-positiven senilen Lymphoproliferationen und dem EBV-positiven klassischen Hodgkin-Lymphom (CD30-Positivität der Tumorzellen, insbesondere der Reed-Sternberg- und Hodgkin Zellen). Zur diagnostischen Abgrenzung zwischen den beiden Entitäten weist er auf die vermehrte Positivität von CD20/79a bei den EBV-positiven B-Zelllymphoproliferationen hin. Er hält es für spekulativ, das EBV-positive klassische Hodgkin-Lymphom und die senile Lymphoproliferation als eine gemeinsame Subentität in der Grauzone des Überlappungsbereiches zwischen B-NHL und Hodgkin-Lymphomen aufzufassen. Gegen die Definition als Hodgkin-Subtyp spricht sicher, dass die Reed-Sternberg-ähnlichen Zellen in der vorliegenden Studie unserer Studie und bei Oyama et al. (55) zwar für CD 30 positiv waren, jedoch alle Fälle zugleich für CD15 negativ waren. In der vorliegenden Studie waren unter den 9 untersuchten senilen Lymphoproliferationen zudem 6 diffuse, grosszellige B-Zell-Lymphome, die folglich auf keinen Fall als Hodgkin-Lymphom klassifiziert werden können. Abgesehen von diesen 6 DLBCL traten noch 1 atypische Lymphoproliferation, eine B-Zell-Lymphoproliferation und eine B-Zellhyperplasie/-Lymphom auf.

4.3 GCB- und non-GCB-Status

Bezüglich der Einteilung der Fälle nach dem HANS-Klassifikator in Germinal Center B-cell like (GCB) und non-GCB ergab sich zwischen den untersuchten EBV-positiven

DLBCL und der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied. In der EBV-positiven Gruppe traten signifikant mehr DLBCL vom non-GCB-Subtyp auf als in der EBV-negativen Kontrollgruppe (EBV+DLBCL:34/48, Kontrollgruppe: 66/144; $p=0,0027$)

Colomo et al. (69) untersuchten 128 *de novo* aufgetretene DLBCL. Von diesen DLBCL waren 65/128 (51%) dem non-GCB-Subtyp und 54/128 (42%) dem GCB-Subtyp zugeordnet worden; 9/128 (7%) konnten bezüglich des Subtyps nicht klassifiziert werden. Diese Zahlen entsprechen etwa denen der vorliegenden Studie (in der Kontrollgruppe) und sind im Vergleich zu den EBV-positiven DLBCL ebenfalls signifikant unterschiedlich. Die *de novo* DLBCL von Colomo et al. (69) wiesen signifikant weniger non-GCB als die EBV-positiven DLBCL der vorliegenden Studie auf (65/128 vs. 34/48; $p=0,0169$). Auch in der Gruppe ohne prädisponierende Grunderkrankung (8 von 9 Fällen) findet sich im Vergleich zu den Fällen in der Studie von Colomo (69) (65/114 Fällen) ein signifikant höheres Vorkommen des non-GCB-Subtyps ($p=0,04$).

Carbone et al. (70) fanden in ihrer Arbeit über 87 HIV-assoziierte Non-Hodgkin-Lymphome hinsichtlich des Keimzentrums- und Postkeimzentrumstyps mit Hilfe von BCL-6, MUM1, CD138 und teilweise auch CD10 eine ähnliche Tendenz. In ihrer Serie wurden 17/19 (89%) EBV-positive DLBCL den non-GCB und 2/19 (11%) den GCB zugeordnet. In dieser Studie waren 5/15 (33%) EBV-negative DLBCL non-GCB und 10/15 (67%) GCB. Damit bestand in dieser Studie ein hochsignifikanter Unterschied ($p=0,0011$) zwischen EBV-positiven und EBV-negativen DLBCL hinsichtlich des non-GCB-Status. HIV-assoziierte EBV-positive DLBCL zeigten demnach sehr viel häufiger einen non-GCB-Subtyp, diese Befunde passen sehr gut zu den Daten der vorliegenden Studie: hier wurden die 6/69 untersuchten HIV-assoziierten EBV-positiven Lymphoproliferationen zu 67% dem non-GCB-Typ zugeordnet.

Johnson et al. (71) untersuchten 30 monomorphe PTLD vom B-Zelltyp (20 waren EBV-positiv und 10 PTLD waren EBV-negativ) und kamen auch für diese zu ähnlichen Ergebnissen. Bei den EBV-positiven PTLD waren 17/20 (85%) non-GCB und 3/20 (15%) GCB. Auch hier fanden sich bei den EBV-positiven Lymphomen sehr signifikant mehr non-GCB ($p=0,0016$) als bei den EBV-negativen PTLD (4/10 (40%) waren hier non-GCB und 6/10 (60%) waren GCB).

EBV-assoziierte Lymphoproliferationen zeigen also – unabhängig von der Assoziation zur Grunderkrankung – signifikant häufiger den Phänotyp einer Postkeimzentrums-B-Zelle. Hieraus ergibt sich die Frage, ob das Epstein-Barr-Virus primär Postkeimzentrums-B-Zellen infiziert, oder ob die Tumovorläufer vielleicht auch schon in einem früheren Differenzierungsstadium das Virus beherbergen, es aber erst nach der Keimzentrums Passage zu einer malignen Entartung eines sich formierenden Tumorklons kommt und durch welche Mechanismen diese getriggert wird.

Nach Hans et al. (60) sind DLBCL vom non-GCB-Typ mit einem deutlich schlechteren Gesamtüberleben assoziiert. Dies zeigte sich auch ansatzweise in dieser Studie. Von 26 Fällen lagen klinische Daten zum Overall-survival vor. Hierbei gab es 12 Todesfälle. Von diesen entsprachen 7/11 (64%) dem non-GCB-Subtyp und 4/11 (36%) dem GCB-Subtyp der DLBCL.

Ein höchst auffälliger Befund in der hier untersuchten Serie betrifft allerdings den häufigen Nachweis des CD10-Antigens ohne gleichzeitige Koexpression von BCL-6. Beide Moleküle werden im reaktiven Keimzentrum und bei follikulären NHL in der Regel gemeinsam exprimiert. Bei follikulären Lymphomen gibt es gelegentlich Tumoren, die CD10-negativ sind, aber dann (immer) BCL-6 nukleär exprimieren (Ott, persönliche Mitteilung). Insofern ist die Beobachtung, dass von den 12 CD10-positiven Lymphoproliferationen/DLBCL in dieser Serie nur ein Fall gleichzeitig BCL-6 positiv war, bemerkenswert. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Tumoren gar nicht um eine Keimzentrumsdifferenzierung, sondern um eine reine „Präapoptotische“ Hochregulierung von CD10, wie dies auch für die CD10-positiven T-Zellen des angioimmunoblastischen T-Zell Lymphoms postuliert wurde (Attygalle et al., 2002 (72)). Zu dieser Vermutung passt auch, dass in einem Teil der CD10-positiven Tumoren (7/11, 64%) auch gleichzeitig MUM1 exprimiert wurde. Demnach wäre bei den EBV-assoziierten DLBCL die Zahl der GCB sogar noch niedriger.

4.4 Expression von CD138, BCL-2 und BCL-6

Auch für die Expression von CD138 lagen interessante Befunde vor. In der Gruppe der EBV-positiven DLBCL lagen deutlich mehr CD138-positive Tumoren vor als in der

Kontrollgruppe (8/50 vs. 2/72, $p=0,0152$). Alle Tumoren, die CD138 (>30%) exprimierten, waren zugleich positiv für MUM1. Nach der Literatur (Jaffe et al., 2001 (34)) ist eine CD138-Expression bei diffusen, großzelligen B-Zell-Lymphomen nur in wenigen Fällen zu erwarten. In der Studie von Colomo (69) lag eine CD138-Expression bei de novo DLBCL nur in 2/127 (2%) der Fälle vor. Carbone und Mitarbeiter (70) geben in ihrer Studie die Frequenz der CD138-Reaktivität für EBV-positive DLBCL mit 8/19 (42%) im Gegensatz zu EBV-negativen DLBCL mit 2/16 (13%) an. Dies stimmt auch mit den Daten aus der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kontrollgruppe überein. Johnson et al. (71) fand in einer Untersuchung über monomorphe PTLID sogar, dass alle monomorphen PTLID, die CD138 exprimierten (4/20, 20%) positiv für das Epstein-Barr Virus waren.

Nach Lossos et al. (73) exprimieren 47-58% der DLBCL das BCL-2-Protein. Eine BCL-2-Überexpression verhindert, dass die maligne entarteten B-Zellen durch Apoptose eliminiert werden können, indem es den programmierten Zelltod inhibiert. Eine BCL-2-Überexpression kann durch eine t(14;18) oder eine Amplifikation des *BCL2*-Gens oder andere Mechanismen verursacht werden. Die Proteinexpression von BCL-2 war bei den EBV-positiven DLBCL (19/47) der vorliegenden Serie insgesamt niedriger als in der EBV-negativen Vergleichsgruppe (97/147) ($p=0,0019$).

Hinsichtlich des non-GCB+/BCL-2+ Phänotyps gab es zwischen den beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Nach Iqbal et al., 2006 (74) ist eine hohe BCL-2 Proteinexpression beim non-GCB-DLBCL mit einem deutlich schlechteren Overall-survival korreliert; damit ist eine hohe BCL-2 Expression in der non-GCB-Subgruppe ein Biomarker für eine aggressivere Variante des DLBCL.

In einer früheren Studie hatten Iqbal et al. (75) bereits die Frequenz der t(14;18) bei DLBCL untersucht, wobei interessanterweise keines der DLBCL vom ABC-Subtyp (0/41) diese Translokation aufwies. Unter den EBV-positiven DLBCL der aktuellen Studie war die t(14;18) in der FISH sowohl für die non-GCB als auch für die GCB negativ. Dies lässt sich als Hinweis darauf deuten, dass die niedrigere, aber vorhandene BCL-2 Proteinexpression über andere Mechanismen hochreguliert wird. In der EBV-negativen Vergleichsgruppe der DLBCL war in der aktuellen Studie nur in einem von 49 (2%) Fällen eine t(14;18) bei non-GCB DLBCL nachweisbar, im Gegensatz zu 7/40 (18%) beim GCB-Subtyp.

BCL-6 war bei den EBV-positiven DLBCL in einem deutlich geringeren Prozentsatz ($p < 0,001$) als unter den EBV-negativen DLBCL exprimiert. Dies fügt sich homogen in das Bild der höheren CD138-Expression und des überwiegenden non-GCB-Status der EBV-positiven DLBCL ein. Colomo et al. (69) geben für de novo DLBCL die Expression für BCL-6 mit 91/127 (72%) an. Im Vergleich zu den EBV-positiven DLBCL der vorliegenden Studie besteht hier ebenfalls ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$). Carbone et al. (70) zeigen in ihrer Untersuchung zu HIV-assoziierten Lymphomen ebenfalls eine geringere Expression von BCL-6 bei EBV-positiven DLBCL im Gegensatz zu EBV-negativen DLBCL ($p = 0,0113$). Auch bei Kuze et al. (65) exprimieren die EBV-positiven DLBCL BCL-6 in deutlich geringerem Umfang als die EBV-negativen DLBCL (4/13 vs. 55/70; $p = 0,0013$). Anhand dieser Proteinexpression lässt sich ein überwiegendes Post-keimzentrum-Differenzierungsstadium der B-Zellen (Klauss, 2007 Diss. (68)) bei EBV-positiven DLBCL im Gegensatz zu EBV-negativen DLBCL postulieren.

4.5 Interphasenzytogenetische Untersuchungen

In den interphasenzytogenetischen Untersuchungen war *CMYC* bei EBV-positiven DLBCL signifikant häufiger rearrangiert als in der EBV-negativen Kontrollgruppe (9/36 vs. 8/91, $p = 0,0156$). Bei sporadisch auftretenden DLBCL liegt die Frequenz von Bruchereignissen in 8q24 bei etwa 5-10% (34). Ott et al. (76) zeigten für extranodale DLBCL des Gastrointestinaltraktes eine höhere Frequenz (25%) auf. Die EBV-negativen Fälle der Kontrollgruppe wiesen in 8/91 (9%) der DLBCL ein *CMYC*-Rearrangement auf, davon waren 5/91 (5%) extranodale und 3/91 (3%) nodale DLBCL. Kramer et al. (77) fanden bei diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen in 31/103 Fällen (30%) ein Rearrangement von *BCL6* und für *CMYC* in 9/134 (7%). Im Vergleich mit den EBV-positiven DLBCL der vorliegenden Studie traten hier bei den EBV-positiven DLBCL signifikant weniger *BCL6*-Rearrangements (5/39 vs. 31/103; $p = 0,0347$) und sehr signifikant häufiger *CMYC*-Rearrangements auf ($p = 0,0016$). Nach Schlegelberger et al. (78) finden sich bei HIV-assoziierten EBV-positiven DLBCL Rearrangements von *MYC* in 25% der Fälle und von *BCL6* in 20% der Fälle, sowie oft Zugewinne für die Chromosomen 3 und 18. Dies stimmt mit den Daten über die EBV-positiven DLBCL der vorliegenden Untersuchung im Wesentlichen überein.

Bruchereignisse für *MYC*, *BCL6* und *IgH* traten nur bei (EBV-positiven) DLBCL auf, nicht jedoch in der Gruppe der Nicht-DLBCL. Djokic (79) hat in seiner Studie über PTLD in der Gruppe der polymorphen PTLD im Gegensatz zur Gruppe der monomorphen PTLD sowohl bei EBV-positiven als auch bei den EBV-negativen polymorphen PTLD keine Rearrangements für *MYC* und *BCL6* finden können.

Vitolo et al. (80) wiesen bei *de novo* entstandenen DLBCL ein Rearrangement für *BCL6* in 11/71 (15%) der Fälle, für *BCL2* in 12/71 (17%) der Fälle und für *MYC* in 4/71 (6%) der Fälle nach. Auch im Vergleich zu dieser Serie liegt für EBV-positive DLBCL eine signifikant höhere Frequenz von Rearrangements für *MYC* (9/36 vs. 4/71; $p=0,0059$) und eine niedrigere Frequenz von *BCL2*-Rearrangements (0/39 vs. 12/71; $p=0,0303$) vor.

Die Bruchereignisse für den 14q32 (*IgH*)-Locus der EBV-positiven DLBCL lagen bis auf einen Tumor in denselben Fällen mit Bruchereignissen auch für *CMYC* und *BCL6* vor. Im Vergleich zu den EBV-negativen Vergleichsfällen ergaben sich jedoch signifikant weniger *IgH*-Rearrangements (EBV+: 7/38 vs. EBV-: 36/91; $p=0,0203$) für EBV-assoziierte DLBCL. Wang et al., 2006 (81) geben die positive Rate für *IgH*-Rearrangements bei sporadischen DLBCL mit 40,1% und Horsman, 2006 (82) mit 50% an.

4.6 Humanes Herpesvirus 8

Lediglich ein Fall der vorliegenden Studie war gleichzeitig positiv für das humane Herpesvirus 8 (HHV8/KSHV) und für das Epstein-Barr-Virus. Nach Jaffe et al., 2001 (34) und Loddenkemper et al., 2007 (83) sind Lymphome, die in charakteristischer Weise mit einer HHV8-Infektion assoziiert sind, das primäre Ergusslymphom (PEL), die multizentrische Castleman-Erkrankung (MCD) und das MCD-assoziierte plasmoblastische Lymphom.

Im Gegensatz hierzu handelte es sich bei dem HHV8-positiven Fall dieser Serie um ein *nodales* DLBCL der Halsregion vom immunoblastisch-plasmoblastischen Subtyp bei einem 23-jährigen HIV-positiven Patienten, der lymphomunabhängig verstorben war. Immunhistochemisch war der Tumor positiv für CD20 (20%), CD138 (80%) und negativ für den Aktivierungsmarker CD30. Er zeigte den Latenztyp II des Epstein-Barr-Virus und war dem non-GBC-Subtyp der DLBCL zuzuordnen. In der Literatur wird

hingegen in erster Linie über primär *extranodale* Lymphome berichtet: Cioc et al. (84) beschrieben 2004 vier extranodale plasmoblastische DLBCL der Mundhöhle bei HIV-positiven Patienten, die sowohl für EBV als auch für HHV8 positiv waren. Costes und Kollegen (85) schilderten 2002 den Fall eines immunoblastisch-plasmoblastischen DLBCL des Zäkums, welches ebenfalls für HHV8 und gleichzeitig für EBV positiv war und ohne ein primäres Ergusslymphom (PEL) bei einem HIV-positiven Patienten aufgetreten war.

Als „Rarität unter den Raritäten“ war der HHV8-positive Fall dieser Arbeit im Gegensatz zu den genannten Beispielen aus der Literatur jedoch *nodalen* Ursprungs.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Lymphoproliferationen und maligne Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zellreihe, die eine Infektion der Tumorzellen mit dem Epstein-Barr Virus aufwiesen, hinsichtlich ihres Immunphänotyps und ihrer zytogenetischen Aberrationen durch Fluoreszenz in-situ Hybridisierung charakterisiert. Von besonderer Bedeutung war es, durch eine detaillierte Analyse der klinischen Daten Vorerkrankungen/Zweiterkrankungen mit einer möglichen Immunsuppression zu identifizieren. Die erhaltenen Daten wurden mit denen EBV-negativer diffuser grosszelliger B-Zell Lymphome verglichen.

In der Gewebe-Array-Technik konnten letztlich 69 Fälle detailliert charakterisiert werden. Von 53/69 (77%) dieser Lymphoproliferationen, die sämtlich eine EBV-Assoziation aufwiesen, konnten klinische Daten erhalten werden. Die detaillierte Analyse dieser Daten zeigte, dass in der grossen Mehrzahl der Fälle eine für eine EBV-Infektion prädisponierende Vor- bzw. Grunderkrankung vorlag (44/69 Fälle, 64%). Dabei handelte es sich in 9 Fällen um eine HIV-Infektion, in 12 Fällen um eine Post-Transplantations lymphoproliferative Erkrankung, in 19 Fällen um einen Zustand nach vorangegangener, therapierter Lymphomerkrankung und in vier Fällen um einen Zustand bei Methotrexatbehandlung oder vergleichbarer medikamentöser Immunsuppression. In neun Fällen war nachweislich keine zu einer möglichen Immunsuppression führende Grunderkrankung eruierbar; diese Tumoren, die bei Patienten mit einem Durchschnittsalter von 72,7 Jahren auftraten, entsprechen wahrscheinlich den in der Literatur beschriebenen „senilen“ EBV-assoziierten Lymphoproliferationen, bei denen eine durch das fortgeschrittenen Lebensalter bedingt reduzierte Fähigkeit des Immunsystems zu einer adäquaten Viruskontrolle diskutiert wird. Klinische Angaben, die auf eine mögliche Immunsuppression und damit auf eine mögliche EBV-Assoziation hindeuten, lagen zum Zeitpunkt der Vorstellung des Falles im Referenzzentrum bemerkenswerterweise nur in 26/69 Fällen (38%) vor.

EBV-assoziierte Lymphoproliferationen und Lymphome gehören signifikant häufiger dem (immunhistochemisch definierten) non-GCB-Subtyp als dem GCB-Subtyp der DLBCL an (73% versus 37%; $p < 0,0001$). Hier lag ein zusätzlicher interessanter Aspekt

vor: EBV-assoziierte Lymphoproliferationen, die aufgrund ihrer Reaktivität der Tumorzellen für CD10 dem GCB-Typ zugeordnet worden waren, exprimierten nur in einer Minderzahl der Fälle (1 von 12; 8%) gleichzeitig auch BCL-6, ein Befund, der bei sporadischen, EBV-negativen DLBCL nur äußerst selten zu finden war (1 von 50; 2%). Weitere immunhistochemische Unterschiede zwischen EBV-assoziierten und EBV-negativen DLBCL lagen für die Expression des Aktivierungsmarkers CD30, der bei EBV-negativen DLBCL eher selten exprimiert wird, aber bei EBV-positiven DLBCL/-Lymphoproliferationen signifikant häufiger positiv ist, und auch für CD138 vor. Auch dieser Marker einer plasmazellulären Differenzierung war bei EBV-positiven DLBCL häufiger exprimiert, wohingegen die Expression von BCL-2 und BCL-6 in den Tumorzellen EBV-assoziiierter LPD seltener war. Der häufigere non-GCB-Status, die vermehrte Expression von CD138 und die geringere Reaktivität für BCL-6 legen nahe, dass EBV-assoziierte DLBCL/Lymphoproliferationen offensichtlich aus B-Zellen bestehen oder hervorgegangen sind, die die Keimzentrumsreaktion bereits durchlaufen hatten.

Die Analyse der interphasenzytogenetischen Daten und ihr Vergleich zu klassischen zytogenetischen Daten einer Kontrollgruppe von sporadischen DLBCL zeigte, dass chromosomale Bruchereignisse und auch eine *TP53* Mutation (ausgewiesen durch die immunhistochemisch nachgewiesene Überexpression des Gens) nur bei denjenigen Fällen auftrat, die konventionell-morphologisch als DLBCL charakterisiert worden waren. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde eine signifikant häufigere Rearrangierung von *CMYC* in EBV-assoziierten DLBCL gefunden; im Gegensatz hierzu waren Bruchereignisse im *BCL2*- und im *BCL6*-Locus ohne signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

Als „Nebenbefund“ konnte in dieser Studie eine Infektion eines – offenbar primär nodalen – DLBCL vom immunoblastisch-plasmoblastischen Subtyp bei einem HIV-positiven Patienten durch das humane Herpesvirus 8 (HHV8) nachgewiesen werden. Diese Konstellation stellt insofern eine Rarität dar, da HHV8-positive DLBCL zumeist extranodal, z.B. in Form des sogenannten „Primären Effusions-Lymphoms“ (PEL) oder

in Assoziation zu einer multizentrischen Castleman-Erkrankung bei HIV-positiven Patienten auftreten.

Literatur:

1. Hof H, Dörries R. Medizinische Mikrobiologie, Thieme 2005, 3. Auflage
2. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med* 121: 761-770, 1965
3. Borza CM, Hult-Fletcher LM. Alternate replication in B-cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nature Med* 8: 594-599, 2002
4. Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr Virus and Cancer. *Clinical Cancer Research* 10: 803-821, 2004
5. Murray PG, Young LS. The role of Epstein-Barr virus in human disease. *Front Biosci (7d)* : 519-540, 2002
6. Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA, Pagano JS. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med* 310:1225-1230, 1984
7. Gerber P, Lucas S, Nonoyama M, Perlin E, Goldstein LI. Oral excretion of Epstein-Barr viruses by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet* 2: 988-989, 1972
8. Küppers R. B Cells under influence: Transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nature Reviews Immunology* 3: 801-812, 2003
9. Miyashita EM, Yang B, Babcock GJ, Thorlry-Lawson DA. Identification of the Site of Epstein-Barr Virus Persistence In Vivo as a Resting B Cell. *J Virol* 71: 4882-4891, 1997
10. Nilsson K. Human B-lymphoid cell lines. *Human Cell* 5: 25-41, 1992
11. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr Virus: 40 Years on. *Nature Reviews Cancer* 4: 757-768, 2004
12. Pelicci PG, Knowles DM, Magrath I, Dalla-Favera R. Chromosomal breakpoints and structural alterations of the c-myc locus differ in endemic and sporadic forms of Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2984-2988, 1986
13. Sibh-Lammali F, Djennaoui D, Belaoui D, Bouguermouh A, Decaussin G, Ooka T. Transcriptional expression of Epstein-Barr virus genes and proto-oncogenes in north African nasopharyngeal carcinomas. *J Med Virol* 49: 7-14, 1996

14. Rowe M, Rowe D, Gregory C, Young LS, Farrell PJ, Rupani H, Rickinson AB.
Differences in B-cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma. *EMBO J* 6: 2743-2751, 1987
15. Cohen J, Wang F, Mannick J, Kieff E. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci* 86: 9558-9562, 1989
16. Hammerschmidt W, Sugden B. Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* 340: 393-397, 1989
17. Young LS, Dawson CW, Eliopoulos AG. The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 53: 238-247, 2002
18. Anderson J. An Overview of Epstein-Barr Virus: from Discovery to Future Directions for Treatment and Prevention. *Herpes* 7:3:76-82, 2000
19. Yu MC. Nasopharyngeal Carcinoma: Epidemiology and Dietary Factors. Lyon, IARC: 39-47, 1991
20. Ho J. Nasopharyngeal carcinoma(NPC). *Adv Cancer Res* 15: 57-92, 1972
21. Yeh S, Cowdry E. Incidence of malignant tumors in Chinese. *Cancer (Phila.)*7: 425-436, 1954
22. Lanier A, Bender T, Talbot M, Wilmeth S, Tschopp C, Henle W et al. Nasopharyngeal carcinoma in Alaskan eskimos, Indians, and Aleutes: a review of cases and study of Epstein-Barr virus, HLA and environmental risk factors. *Cancer (Phila.)* 46: 2100-2106, 1980
23. Simons M, Wee G, Day N, Morris PJ, Shanmugaratnam K. Immunogenetic aspects of nasopharyngeal carcinoma: I. Difference in HLA antigen profiles between patients and control groups. *Int J Cancer* 13: 122-134, 1974
24. Simons M, Wee G, Goh E, Shan SH, Shanmugaratnam K, Day NE. Immunogenetic aspects of nasopharyngeal carcinoma: IV. Increased risk in Chinese of nasopharyngeal carcinoma associated with a Chinese-related HLA profile. *J Natl Cancer Inst(Bethesda)* 57: 977-980, 1976
25. Henderson B, Louie E, Jing J, Buell P, Gardner MB. Risk factors associated with nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med* 295: 1101-1106, 1976
26. Lu S, Day N, Degos L, Lepage V, Wang PC, Chan SH et al. Linkage of a nasopharyngeal carcinoma susceptibility locus to the HLA region. *Nature (Lond.)*346: 470-471, 1990

27. Zheng X, Yan L, Nilsson B, Eklund G, Drettner B. Epstein-Barr virus infection, salted fish and nasopharyngeal carcinoma. *Acta Oncologica* 33: 867-872, 1994
28. Prasad U. Fossa of Rosenmuller and nasopharyngeal carcinoma. *Med J Malaysia* 33: 222-225, 1979
29. Young L, Dawson C, Brown K, Rickinson A. Identification of human epithelial cell surface protein sharing an epitope with the C3d/Epstein-Barr virus receptor molecule of B lymphocytes. *Int J Cancer* 43: 786-794, 1989
30. Lin CT, Lin CR, Tan GK, Chen W, Dee AN, Chan WY. The mechanism of Epstein-Barr virus infection in nasopharyngeal carcinoma cells. *Am J Pathol* 150: 1745-1756, 1997
31. Pathmanathan R, Prasad U, Sadler R, Flynn K, Raab-Traub N. Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med* 333: 693-698, 1995
32. Okano M. Epstein-Barr virus infection and its role in the expanding spectrum of human diseases. *Acta Paediatr* 87: 11-18, 1998
33. Niedobitek G, Young L, Sam C, Brooks L, Prasad U, Rickinson AB. Expression of Epstein-Barr virus genes and of lymphocyte activation molecules in undifferentiated nasopharyngeal carcinomas. *Am J Pathol* 140: 879-887, 1992
34. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Pathology and genetics: Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health Organization Classification of Tumors. IARC Press, Lyon 2001
35. Pelicci PG, Knowles DM, Magrath I, Dalla-Favera R. Chromosomal breakpoints and structural alterations of the c-myc locus differ in endemic and sporadic forms of Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2984-2988, 1986
36. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 338:1175-1176, 1991
37. Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, Isaacson PG. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of Helicobacter pylori. *Lancet* 342: 575-577, 1993

38. Neubauer A, Thiede C, Morgner A, Alpen B, Ritter M, Neubauer B, Stolte M, Bayerdorffer E. Cure of *Helicobacter pylori* infection and duration of remission of low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 89:1350-1355, 1997
39. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol* 16: 2780-2795, 1998
40. Anon. (1993). A predictive model for aggressive Non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 329: 987-994, 1993
41. Gaidano G, Carbone A. AIDS-related lymphomas: from pathogenesis to pathology. *Br J Haematol* 90: 235-243, 1995
42. Hamilton-Dutoit SJ, Raphael M, Audouin J, Diebold J, Lisse I, Pedersen C, Oksenhendler E, Marelle L, Pallesen G. In situ demonstration of Epstein-Barr virus small RNAs (EBER1) in acquired immunodeficiency syndrome-related lymphomas: correlation with tumor morphology and primary site. *Blood* 82: 619-624, 1993
43. Knowles DM, Chamulak GA, Subar M, Burke JS, Dugan M, Wernz J, Slywotzky C, Pelicci G, Dalla-Favera R, Raphael B: Lymphoid neoplasia associated with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The New York University Medical Center experience with 105 patients (1981-1986). *Ann Intern Med* 108: 744-753, 1988
44. Raphael M, Gentilhomme O, Tulliez M, Byron PA, Diebold J. Histopathologic features of high-grade non-Hodgkin's lymphomas in acquired immunodeficiency syndrome. The French study group of Pathology for Human immunodeficiency Virus-associated Tumors. *Arch Pathol Lab Med* 115: 15-20, 1991
45. Cleary ML, Warnke R, Sklar J. Monoclonality of lymphoproliferative lesions in cardiac-transplant recipients. Clonal analysis based on immunoglobulin rearrangements. *N Engl J Med* 310: 477-482, 1984
46. Ferry JA, Jacobson JO, Conti D, Delmonico F, Harris NL. Lymphoproliferative disorders and hematologic malignancies following organ transplantation. *Mod Pathol* 2: 583-592, 1989

47. Knowles DM, Cesarman E, Chadburn A, Frizzera G, Chen J, Rose EA, Michler RE. Correlative morphologic and molecular genetic analysis demonstrates three distinct categories of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood* 85: 552-565, 1995
48. Larson RS, Scott MA, McCurley TL, Vnencak-Jones CL. Microsatellite analysis of posttransplant lymphoproliferative disorders: determination of donor/recipient origin and identification of putative lymphomagenic mechanism. *Cancer Res* 56: 4378-4381, 1996
49. Weissman DJ, Ferry JA, Harris NL, Louis DN, Delmonico F, Spiro I. Posttransplantation lymphoproliferative disorders in solid organ recipients are predominantly aggressive tumors of host origin. *Am J Clin Pathol* 103: 748-755, 1995
50. Chadburn A, Suci-Foca N, Cesarman E, Reed E, Michler RE, Knowles DM. Post-transplantation lymphoproliferative disorders arising in solid organ transplant recipients are usually of recipient origin. *Am J Pathol* 147: 1862-1870, 1995
51. Nalesnik MA, Jaffe R, Starzl TE, Demetris AJ, Porter K, Burnham JA, Makowka L, Ho M, Locker J. The pathology of posttransplant lymphoproliferative disorders occurring in the setting of cyclosporine A-prednisone immunosuppression. *Am J Pathol* 133: 173-192, 1988
52. Lones MA, Mishalani S, Shintaku IP, Weiss LM, Nichols WS, Said JW. Changes in tonsils and adenoids in children with posttransplant lymphoproliferative disorder: report of three cases with early involvement of Waldeyer's ring. *Hum Pathol* 26: 525-530, 1995
53. Starzl TE, Nalesnik MA, Porte KA, Ho M, Iwatsuki S, Griffith BP, Rosenthal JT, Hakala TR, Shaw BW Jr., Hardesty RL. Reversibility of lymphomas and lymphoproliferative lesions developing under cyclosporin-steroid therapy. *Lancet* 1: 583-587, 1984
54. Shimoyama Y, Oyama T, Asano N, Oshiro A, Suzuki R, Kagami Y, Morishima Y, Nakamura S. Senile Epstein-Barr Virus-Associated B-Cell Lymphoproliferative Disorders: a Mini Review. *J Clin Exp Hematopathol* 46(1):1-4, 2006

55. Oyama T, Ichimura K, Suzuki R, Suzumiya J, Ohshima K, Yatabe Y, Yokoi T, Kojima M, Kamija Y, Taji H, Kagami Y, Ogura M, Saito H, Morishima Y, Nakamura S. Senile EBV+B-Cell Lymphoproliferative Disorders.
Am J Surg Pathol 27(1): 16-26, 2003
56. Zettl A, Lee SS, Rüdiger T, Starostik P, Marino M, Kirchner T, Ott M, Müller-Hermelink HK, Ott G. Epstein-Barr Virus-Associated B-Cell Lymphoproliferative Disorders in Angioimmunoblastic T-Cell-Lymphoma and peripheral T-Cell Lymphoma, Unspecified. Am J Clin Pathol 117: 368-379, 2002
57. Stein H, Hummel M, Korbjuhn P, Niedobitek G, Dallenbach F, Herbst H. Epstein-Barr-Virus assoziierte Lymphoproliferationen.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 76: 79-95, 1992
58. Meister S (2003). Etablierung und Validierung eines Gewebemicroarrays für Non-Hodgkin-Lymphome. Med. Dissertationsschrift , Universität Würzburg
59. Zettl A, Meister S, Katzenberger T, Kalla J, Ott MM, Müller-Hermelink HK, Ott G. Immunohistochemical analysis of B-cell lymphoma using tissue microarrays identifies particular phenotypic profiles of B-cell lymphomas.
Histopathology 43: 209-219, 2003
60. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. Blood 103: 275-282, 2004
61. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning.
Nat Med 8: 68-74, 2002
62. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RG, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. N Engl J Med 346(25): 1937-1947, 2002
63. Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene Rearrangement in B- and T-Lymphoproliferative Disease Detected by the Polymerase Chain Reaction. Blood 78 (1): 192-196, 1991

64. Zinzani PL, Dirnhofer S, Sabbatini E, Alinari L, Piccaluga PP, Stefoni V, Tani M, Musuraca G, Marchi E, Baccarani M, Pileri SA. Identification of outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma. Immunohistochemical profiling of homogeneously treated de novo tumors with nodal presentation on tissue microarrays. *Haematologica* 90(3): 341-345, 2005
65. Kuze T, Nakamura N, Hashimoto Y, Sasaki Y, Abe M. The Characteristics of Epstein-Barr Virus (EBV)-positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Comparison between EBV+ and EBV- Cases in Japanese Population. *Jpn J Cancer Res* 91: 1233-1240, 2000
66. Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G. A Survey of Epstein-Barr Virus Gene Expression in Sporadic Non-Hodgkin's Lymphomas. *Am J Pathol* 140 (6): 1315-1325, 1992
67. Au WY, Trendell-Smith N, Chow C, Liang R. Senile EBER positive diffuse large B cell lymphoma relapsing in the nasopharynx. *Hematologica/the hematology journal* 91(1): 20, 2006
68. Klauss E (2007): Immunhistochemische Untersuchungen zu Differenzierungsstadien der B-Lymphozyten in EBV-assoziierten Lymphoproliferationen. Med. Dissertationsschrift, Universität Würzburg
69. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martinez A, Bosch F, Colomer D, Falini B, Montserrat E, Campo E. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 101(1): 78-84, 2003
70. Carbone A, Gloghini A, Larocca LM, Capello D, Perconti F, Canzonieri V, Tirelli U, Dalla-Favera R, Gaidano G. Expression profile of MUM1/IRF4, BCL-6, and CD138/syndecan-1 defines novel histogenetic subsets of human immunodeficiency virus-related lymphomas. *Blood* 97 (3):744-751, 2001
71. Johnson LR, Nalesnik MA, Swerdlow SH. Impact of Epstein-Barr Virus in Monomorphic B-cell Posttransplant Lymphoproliferative Disorders. *Am J Surg Pathol* 30(12):1604-1611, 2006
72. Attygalle A, Al-Jehani R, Diss TC, Munson P, Liu H, Du MQ, Isaacson PG, Dogan A. Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. *Blood* 99(2): 627-633, 2002

73. Lossos IS, Morgenstern D. Prognostic Biomarkers in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 24(6): 995-1007, 2006
74. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, Lynch J, Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Campo E, Ott G, Müller-Hermelink HK, Delabie J, Jaffe ES, Grogan TM, Connors JM, Vose JM, Armitage JO, Staudt LM, Chan WC. BCL2 Expression Is a Prognostic Marker for the Activated B-Cell-Like Type of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 24(6): 961-968, 2006
75. Iqbal J, Sanger WG, Horsman D, Rosenwald A, Pickering DL, Dave B, Dave S, Xiao L, Cao K, Zhu Q, Sherman S, Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Ott G, Müller-Hermelink HK, Delabie J, Braziel RM, Jaffe ES, Campo E, Lynch JC, Connors JM, Vose JM, Armitage JO, Grogan TM, Staudt LM, Chan WC for the Leukemia/Lymphoma Molecular Profiling Project. BCL2 Translocation defines a Unique Tumor Subset within the Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am J Pathol* 165 (1):159-166, 2004
76. Ott G, Rosenwald A. Sind primär extranodale diffuse großzellige B-Zell-Lymphome organotypische Erkrankungen? *Pathologe* 28: 29-35, 2007
77. Kramer MHH, Hermans J, Wijburg E, Phillip K, Geelen E, van Krieken JHJM, de Jong D, Maartense E, Schuurung E, Kluin PM. Clinical Relevance of BCL2, BCL6 and MYC Rearrangements in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Blood* 92(9): 3152-3162, 1998
78. Schlegelberger B, Lipp M (2003): Hochmaligne B-Zell-Lymphome. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg.): Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien. Springer Verlag Heidelberg Berlin 2003
79. Djokic M, Le Beau MM, Swinnen LJ, Smith SM, Rubin CM, Anastasi J, Carlson KM. Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder Subtypes Correlate with Different Recurring Chromosomal Abnormalities. *Genes, Chromosomes & Cancer* 45: 313-128, 2006

80. Vitolo U, Gaidano G, Botto B, Volpe V, Audisio E, Bertini M, Calvi R, Freilone R, Novero D, Orsucci L, Pastore C, Capello D, Parvis G, Sacco C, Zagonel V, Carbone A, Mazza U, Palestro G, Saglio G, Resegotti L. Rearrangements of bcl-6, bcl-2, c-myc and 6q deletion in B-diffuse large-cell Lymphoma: Clinical relevance in 71 patients. *Ann Oncol* 9: 55-61, 1998
81. Wang XQ, Sino-US Leukemia Cooperative Group of Shanghai. Cytogenetic study on 155 cases of non-Hodgkin's Lymphoma. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 27(10): 656-660, 2006 (Abstract)
82. Horsman D (2006): Cytogenetic Analysis of Malignant Lymphoma. In: Canellos GP (Hrsg.): *The Lymphomas*. Second Edition. Saunders Elsevier, Philadelphia, 43-46
83. Loddenkemper C, Logerich T, Schneider T, Anagnostopoulos I, Foss HD, Schirmacher P, Stein H. Die Vielfalt der KSHV/HHV8-assoziierten Lymphoproliferationen. *Pathologe* 28: 46-50, 2007
84. Cioc AM, Allen C, Kalmar JR, Suster S, Baiocchi R, Nuovo GJ. Oral Plasmablastic Lymphomas in AIDS Patients Are Associated With Human Herpesvirus 8. *Am J Surg Pathol* 28(1):41-46, 2004
85. Costes V, Faumont N, Cesarman E, Rousset T, Meggetto F, Delsol G, Brousset P. Human herpesvirus-8-associated lymphoma of the bowel in human immunodeficiency virus-positive patients without history of primary effusion lymphoma. *Hum Pathol* 33(8): 846-849, 2002

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. German Ott für die freundliche Überlassung des Themas und die gute Betreuung bedanken. Frau Dr. Sylvia Höller danke ich für die hervorragende fachliche und menschliche Betreuung während meiner gesamten Doktorandenzeit. Ferner möchte ich mich bei Frau Petra Stempfle für die hilfreiche Unterstützung bei allen immunhistochemischen Fragestellungen und ihre freundliche Zusammenarbeit bedanken. Frau Irina Eichelbrönner danke ich für die Unterstützung im zytogenetischen Labor und Frau Dr. Eugenia Haralambieva für die Betreuung in Bezug auf die FISH.

Herrn Dr. Bernhard Puppe möchte ich herzlich für die Unterstützung in allen statistischen Fragen danken. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Chris Schmelter und Herrn Jan Almanritter bedanken. Meinen Eltern danke ich für ihre stete und unermüdliche geistige und finanzielle Unterstützung während allen Phasen dieser Arbeit.