

**Aus dem Institut für Pathologie  
der Universität Würzburg**

**Vorstand: Professor Dr. med. Andreas Rosenwald**

**Untersuchungen zu sekretorisch differenzierten Marginalzonen-  
Lymphomen unter besonderer Berücksichtigung primär kutaner  
Marginalzonen-Lymphome**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Isabel Katharina Brenner**

**aus Gröningen**

**Würzburg, Juni 2016**

**Referentin:** Prof. Dr. Eva Geißinger

**Koreferent:** Prof. Dr. Stefan Knop

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 23.03.2017

**Die Promovendin ist Ärztin**

**Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

Isabel Brenner, Sabine Roth, Bernhard Puppe, Marion Wobser, Andreas Rosenwald, Eva Geissinger

Primary cutaneous marginal zone lymphomas with plasmacytic differentiation show frequent IgG<sub>4</sub> expression

Modern Pathology 2013; 26(12): 1568-76. doi: 10.1038/modpathol.2013.106

Isabel Brenner, Sabine Roth, Lucia Flossbach, Marion Wobser, Andreas Rosenwald, Eva Geissinger

Lack of MyD88 L265P Mutation in Primary Cutaneous Marginal Zone Lymphoma

British Journal of Dermatology 2015; 173(6):1527-8. doi: 10.1111/bjd.13960

**Beitrag der einzelnen Koautoren zu diesen Publikationen:**

Sabine Roth: Anleitung und Hilfestellung bei der Durchführung der immunhistochemischen sowie der molekularbiologischen Methoden.

Bernhard Puppe: Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Marion Wobser: Diskussion der Ergebnisse, speziell im Kontext der klinischen Daten.

Lucia Floßbach: Unterstützung und Anleitung bei der Durchführung der molekularbiologischen Methoden sowie Bereitstellung der MyD88-Primer.

Andreas Rosenwald: Diskussion der Ergebnisse. Überarbeitung der Publikationen.

Eva Geißinger: Unterstützung und Anleitung bei der Erhebung und Auswertung der Daten. Diskussion der Ergebnisse. Überarbeitung der Publikationen.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Immunologie.....	1
1.1.1	Das Immunsystem .....	1
1.1.2	B-Zellen und die B-Zell-Entwicklung .....	4
1.1.2.1	Antigenunabhängige Entwicklung im Knochenmark .....	4
1.1.2.2	Antigenabhängige Entwicklung in peripheren lymphatischen Organen .....	6
1.1.2.3	Cluster of Differentiation.....	9
1.1.3	Immunglobuline .....	9
1.1.3.1	Somatische Rekombination.....	17
1.1.3.2	Klassenwechsel .....	20
1.1.4	T-Zellen .....	21
1.1.4.1	CD4+ T-Zellen.....	21
1.1.4.2	CD8+ T-Zellen.....	22
1.1.4.3	Regulatorische T-Zellen .....	23
1.1.4.4	Follikuläre Helfer-T-Zellen .....	23
1.2	Maligne Lymphome .....	24
1.3	Non-Hodgkin-Lymphome .....	24
1.4	Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) .....	28
1.5	Marginalzonen-Lymphome.....	30
1.5.1	Extranodales Marginalzonen-Lymphom vom MALT-Typ.....	31
1.6	IgG <sub>4</sub> -assoziierte Erkrankung.....	37
1.7	Fragestellung und Ziele.....	40
2	Material und Methoden.....	42

2.1	Auswahl der Fälle.....	42
2.2	Ethikvotum und Datenschutz.....	43
2.3	Immunhistochemie .....	43
2.3.1	Färbemethode .....	43
2.3.2	Geräte und Materialien .....	44
2.3.3	Chemikalien.....	45
2.3.4	Primärantikörper .....	46
2.3.5	Immunhistochemische Einfachfärbungen.....	47
2.3.6	Fluoreszenzfärbung .....	49
2.3.6.1	Auswahlkriterien für die Färbung.....	49
2.3.6.2	Färbemethode.....	49
2.3.6.3	Materialien und Chemikalien .....	49
2.3.6.4	Primärantikörper und fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper .....	50
2.3.6.5	Immunfluoreszenzfärbung.....	51
2.3.6.6	Auswertung mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie.....	53
2.4	Evaluationskriterien der Immunglobulinleicht- und - schwerkettenexpression .....	53
2.5	Primär kutane Marginalzonen-Lymphome.....	54
2.5.1	Analyse des B-Zell-Infiltrates .....	54
2.5.2	Analyse des T-Zell-Infiltrates .....	55
2.6	Molekularbiologische Methoden.....	56
2.6.1	Materialien und Chemikalien .....	57
2.6.2	DNA-Extraktion aus Paraffinmaterial .....	58
2.6.3	PCR und Sequenzierung.....	58
2.7	Klinische Daten .....	62

2.8	Statistische Auswertung .....	63
3	Ergebnisse .....	64
3.1	Immunhistochemie .....	64
3.1.1	Leichtkettenexpression .....	64
3.1.2	Schwerkettenexpression.....	65
3.2	Morphologische und immunphänotypische Charakterisierung der PCMZL.....	68
3.2.1	B-Zell-Infiltrat .....	71
3.2.2	T-Zell-Infiltrat.....	71
3.2.3	Klinische Charakteristika der primär kutanen MZL: .....	75
3.3	Analyse der MyD88 (L265P)-Mutation in den PCMZL.....	79
4	Diskussion.....	81
5	Zusammenfassung.....	95
6	Literaturverzeichnis .....	100
7	Tabellenverzeichnis .....	114
8	Abbildungsverzeichnis.....	116
9	Abkürzungsverzeichnis .....	119
10	Danksagung .....	
11	Lebenslauf .....	

# 1 Einleitung

## 1.1 Immunologie

### 1.1.1 Das Immunsystem

Das Abwehrsystem des menschlichen Körpers ist ein komplexes System von Zellen und Faktoren, welches den Organismus dazu befähigt, Infektionen aller Art, Erreger (Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen), Fremdzellen sowie Tumorzellen abzuwehren und den Körper vor entsprechenden schädlichen Einflüssen zu schützen.<sup>1</sup>

Dem menschlichen Organismus stehen für seine Abwehrfunktion zwei verschiedene komplexe Systeme zur Verfügung. Dies ist zum einen das angeborene, unspezifische Immunsystem, dessen Bedeutung vor allem in der frühen Phase der Abwehr liegt. Zum anderen ist es das adaptive, erworbene bzw. spezifische Immunsystem, das verzögert, d.h. nach einigen Stunden bis Tagen, zur gezielten Abwehr von Mikroorganismen führt. Die beiden Systeme kooperieren und aktivieren sich gegenseitig über verschiedene Botenstoffe (Chemokine, Zytokine) und stehen über Zell-Zell-Kontakte miteinander in Verbindung. Dies ist für eine schnelle und adäquate Immunantwort von großer Bedeutung.<sup>1-5</sup>

Alle am Immunsystem beteiligten Zellen stammen von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab.<sup>1, 4, 6</sup>

Das angeborene, unspezifische Immunsystem ist von Geburt an vorhanden und besteht aus zellulären und humoralen Komponenten. Seine Hauptaufgaben sind die rasche Beseitigung des Erregers sowie die Aktivierung des adaptiven, spezifischen Immunsystems. Das angeborene Immunsystem spielt somit in der frühen Phase der Abwehr eine zentrale Rolle.<sup>1, 3, 4</sup> Die folgende Tabelle 1 zeigt die zum angeborenen Immunsystem gehörenden zellulären und humoralen Bestandteile.

*Tabelle 1: Bestandteile des angeborenen Immunsystems*

<b>Zelluläre Bestandteile</b>	<b>Humorale Faktoren</b>
Granulozyten (neutrophile, basophile, eosinophile)	Komplementsystem
Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen	
Natürliche-Killer-Zellen (NK-Zellen)	

Das adaptive, spezifische Immunsystem zeichnet sich aus durch ein hohes Maß an Spezifität und der Unterscheidung zwischen Selbst und Nichtselbst (Fremd). Es besitzt die Eigenschaft ein immunologisches Gedächtnis zu bilden und so beim Zweitkontakt mit einem Erreger schneller und präziser als beim Erstkontakt zu reagieren.<sup>1, 4</sup> Das adaptive Immunsystem besteht ebenso aus zellulären und humoralen Bestandteilen. Zu den humoralen Bestandteilen gehören die Immunglobuline, die von den B-Lymphozyten gebildet werden.<sup>1, 4, 5, 7</sup> In Tabelle 2 sind die zellulären Bestandteile mit ihren jeweiligen Aufgaben gezeigt.

B- und T-Lymphozyten entwickeln sich beide aus einer lymphatischen Vorläuferzelle.<sup>6, 7</sup> Die Reifung der B-Lymphozyten erfolgt im Knochenmark, die der T-Lymphozyten im Thymus. Nach Aktivierung des adaptiven Immunsystems kommt es zu zeitaufwendigen Differenzierungsschritten der beteiligten B- und T-Lymphozyten und führt in der Regel zur vollständigen und gezielten, spezifischen Beseitigung des Erregers bzw. des Antigens. Das adaptive Immunsystem besitzt die Fähigkeit zwischen unterschiedlichen Antigenen zu unterscheiden. Dies wird unter anderem durch Genumlagerungsprozesse in B- und T-Zellen, die sog. somatische Rekombination, ermöglicht, wodurch erst die Vielfalt an Immunglobulinen bzw. T-Zell-Rezeptoren entsteht (geschätzt etwa  $10^{15}$  für die T-Zell- und  $10^{12}$  für die B-Zell-Population).<sup>4, 5, 8, 9, 1, 6</sup>



*Tabelle 2: Bestandteile und Aufgaben des adaptiven Immunsystems*

<b>Zelluläre Bestandteile</b>	<b>Haupteigenschaften</b>
B-Lymphozyten	Bildung und Sezernierung von Immunglobulinen Antigenpräsentation Spezifität Toleranz Immunologisches Gedächtnis
T-Lymphozyten	Direkte Elimination infizierter oder transformierter Zellen (CD8+ T-Lymphozyten) Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. Makrophagen) und Unterstützung bei der Elimination von Fremdpartikeln über Phagozytose (CD4+ T-Lymphozyten) Toleranz

Die Abwehrfunktionen des menschlichen Immunsystems spielen sich im lymphatischen Gewebe ab, welches sich in ein primäres und sekundäres lymphatisches Gewebe unterteilt. Tabelle 3 zeigt die Komponenten der primären und sekundären lymphatischen Gewebe.

Die lymphatischen Geweben stehen über im Blut zirkulierende Lymphozyten miteinander in Verbindung, wobei an fast jedem Ort und in jedem Organ des menschlichen Körpers sekundär lymphatisches Gewebe neu entstehen kann.<sup>10</sup>

Das Immunsystem des menschlichen Organismus kann allerdings auch fehlreguliert sein und dem Organismus schaden. Dies spielt bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Immundefekten, aber auch bei malignen Lymphomen eine Rolle.<sup>4, 6-8, 10-12</sup>

Tabelle 3: Lymphatisches Gewebe

Primär lymphatisches Gewebe	Sekundär lymphatisches Gewebe
Thymus Knochenmark	Lymphknoten Milz Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe: z.B. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peyer-Plaques</li> <li>• Konjunktiven</li> <li>• Tonsillen</li> </ul>

### 1.1.2 B-Zellen und die B-Zell-Entwicklung

Wie oben bereits beschrieben, bilden B-Lymphozyten zusammen mit T-Lymphozyten die zentralen Bestandteile des adaptiven Immunsystems. B-Zellen bilden hierbei die humorale Immunantwort. Nach Aktivierung können diese sich zu Plasmazellen differenzieren und spezifisch Immunglobuline produzieren. Desweiteren haben sie an ihrer Oberfläche die Möglichkeit Antigene über MHC-Klasse-II-Proteine zu präsentieren.<sup>7, 8, 13</sup> Während der B-Zell-Entwicklung durchläuft die B-Zelle verschiedene Differenzierungsstufen, die zum Teil auch zytologisch unterscheidbar sind.

#### 1.1.2.1 Antigenunabhängige Entwicklung im Knochenmark

Wie oben bereits erwähnt, entwickeln sich B- und T-Lymphozyten sowie NK-Zellen aus einer gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle im Knochenmark.<sup>6, 7</sup> Diese Vorläuferzelle entwickelt sich wiederum aus einer multipotenten hämatopoetischen Stammzelle.<sup>7</sup> Die sich nun anschließende Differenzierung hin zur B-Zelle ist abhängig von den Stromazellen des Knochenmarks, die in engem Kontakt zur hämatopoetischen Vorläuferzelle stehen und Signale aussenden, welche für die B-Zell-Entwicklung entscheidend sind. Die B-Zell-

Differenzierung im Knochenmark erfolgt bis hin zur unreifen B-Zelle, wohingegen die Differenzierung zur reifen B-Zelle außerhalb, antigenabhängig, in den peripheren lymphatischen Organen erfolgt.<sup>1, 4, 6</sup>

Als erstes entwickelt sich aus der hämatopoetischen Vorläuferzelle unter den Signalen der Stromazellen des Knochenmarks die sog. Pro-B-Zelle. IL-7 und Transkriptionsfaktoren wie Pax5, PU.1, E2F und EBF sind hierfür von Bedeutung. In der frühen Pro-B-Zelle beginnt nun die Umlagerung der Gene für die Schwereketten, welche sich dann zur späten Pro-B-Zelle entwickelt. Mit vollständiger Bildung einer funktionsfähigen Schwereketten ( $\mu$ -Kette) und eines Prä-B-Zell-Rezeptors, der sich teilweise auf der Zelloberfläche und im Zytoplasma befindet, differenziert die späte Pro-B-Zelle hin zur großen Prä-B-Zelle. Diese große Prä-B-Zelle führt mehrere Zellteilungen durch, arretiert und entwickelt sich hin zur kleinen Prä-B-Zelle mit Prä-B-Zell-Rezeptor und assoziierten Proteinen  $Ig\alpha$ ,  $Ig\beta$  (CD79a, CD79b). B-Zellen, die keinen funktionsfähigen Prä-B-Zell-Rezeptor exprimieren, werden eliminiert. Die kleine Prä-B-Zelle beginnt daraufhin mit der Umlagerung der Gene für die Leichtketten. Nach erfolgter Umlagerung der Leichtkettengene entstehen Leichtketten, die an die  $\mu$ -Kette binden und damit ein komplettes IgM-Molekül bilden. Es entstehen die sog. unreifen B-Zellen. Wichtig ist nun noch die Überprüfung der unreifen B-Zellen hinsichtlich ihrer Autoreaktivität. Die unreifen B-Zellen verlassen nun das Knochenmark und siedeln sich in den sekundär lymphatischen Organen an. In den Lymphfollikeln erfahren die unreifen B-Zellen eine erneute Selektion. Hierfür von Bedeutung ist BAFF (B-Zell aktivierender Faktor der TNF-Familie). Die unreifen B-Zellen entwickeln sich so zu reifen, naiven B-Zellen, die IgM und IgD (BCR) gleicher Antigenpezifität auf der Zelloberfläche exprimieren. Diese kreisen nun im Blut und in den peripheren lymphatischen Organen und warten auf die Stimulation durch ein Antigen, welche zur weiteren antigenabhängigen B-Zell-Differenzierung führt.<sup>4, 6-8, 10, 11, 13</sup>

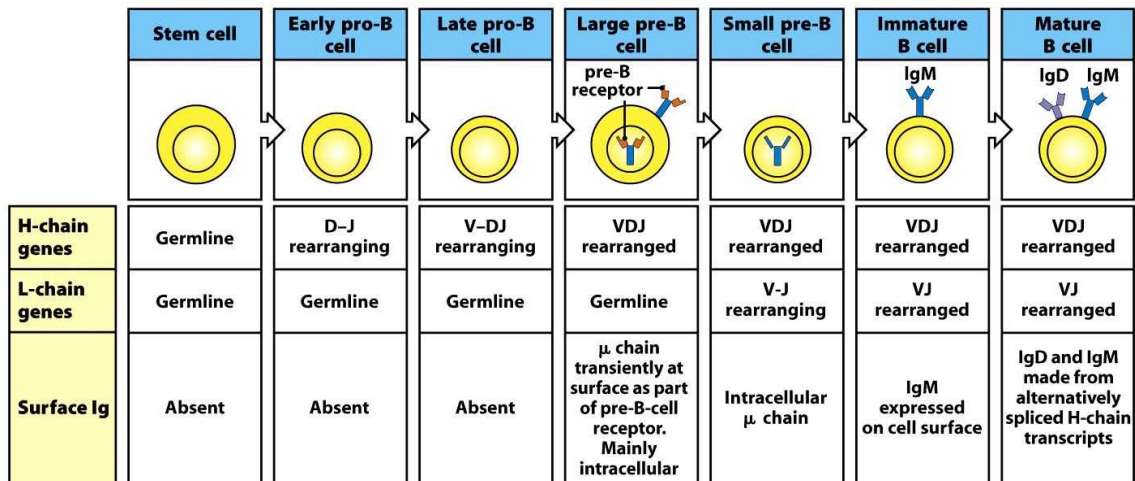


Abbildung 1: B-Zell-Differenzierung und die verschiedenen Differenzierungsstufen, aus Janeway's immunobiology <sup>4</sup>

### 1.1.2.2 Antigenabhängige Entwicklung in peripheren lymphatischen Organen

Die naiven, reifen B-Zellen können direkt durch Antigene oder durch T-Helferzellen aktiviert werden und zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen differenzieren.<sup>9, 13</sup>

B-Zellen, die auf ein Antigen treffen, können dieses über ihren membranständigen B-Zell-Rezeptor binden, ins Zellinnere einschleusen und über MHC-Klasse-II-Proteine an ihrer Oberfläche aktivierten T-Zellen präsentieren. Findet so eine Interaktion zwischen B- und T-Zelle statt, regt die T-Zelle durch bestimmte Signale die B-Zelle zur Proliferation an. Von zentraler Bedeutung sind hier das CD40 der B-Zelle, der CD40-Ligand sowie das IL-4, die beide von der aktivierten T-Zelle nach Kontakt sezerniert werden.<sup>8-14</sup>

Ein Teil der nun aktivierten B-Zellen wandert direkt zum sog. Primärfokus, der sich in den Marksträngen der Lymphknoten oder in der roten Pulpa der Milz befindet und differenziert über Plasmablasten direkt zu Plasmazellen (sog. short-lived Plasmazellen), die IgM produzieren. Dies führt zur frühen Immunantwort ohne genaue Spezifität.<sup>5, 7, 9, 10, 12, 14</sup> Der andere Teil der aktivierten B-Zellen wandert in die nächstgelegenen Lymphfollikel, bildet

sekundäre Lymphfollikel mit Keimzentren und beginnt zu proliferieren. Primär- und Sekundärfollikel können sich unter bestimmten Bedingungen auch in nicht-lymphatischen Geweben ausbilden.<sup>10</sup>

Keimzentren sind speziell organisierte Strukturen und sind aufgebaut aus einer dunklen und einer hellen Zone, die von einer sog. Mantelzone umgeben sind.<sup>4</sup>

Im Keimzentrum entwickeln sich die aktivierten B-Zellen zunächst zu Zentroblasten, die sich in der dunklen Zone des Keimzentrums vermehren und anschließend zu Zentrozyten differenzieren. In diesen Differenzierungsphasen finden nun somatische Rekombination, Hypermutation und Klassenwechsel statt. So entstehen mit jeder Teilung neue somatische Mutationen in den hypervariablen Regionen des Immunglobulinrezeptors, welche dessen Bindungseigenschaft verändern.<sup>8,9</sup> Das hierfür wichtige Enzym AID (activation-induced cytidine deaminase) wird spezifisch von diesen beiden Differenzierungsstufen (Zentroblasten und Zentrozyten) exprimiert.<sup>6,7,9,10,14</sup> Mit Hilfe weiterer Keimzentrumszellen, wie follikuläre dendritische Zellen und follikuläre Helfer-T-Zellen, werden die B-Zellen in der hellen Zone des Keimzentrums auf ihre Funktionsfähigkeit überprüft und selektioniert. Funktionslose B-Zellen gehen in Apoptose und werden durch die sog. Kerntrümmer- bzw. Sternhimmelmakrophagen des Keimzentrums phagozytiert.<sup>7,9-11,13,14</sup> Funktionsfähige B-Zellen entwickeln sich anschließend über Plasmablasten zu Plasmazellen. Diese sind terminal differenzierte B-Zellen, die nun die gewünschten spezifischen Antikörper produzieren, sog. langlebige Plasmazellen. Ein anderer Teil entwickelt sich zu sog. langlebigen Gedächtniszellen.<sup>4,8-10,14</sup>

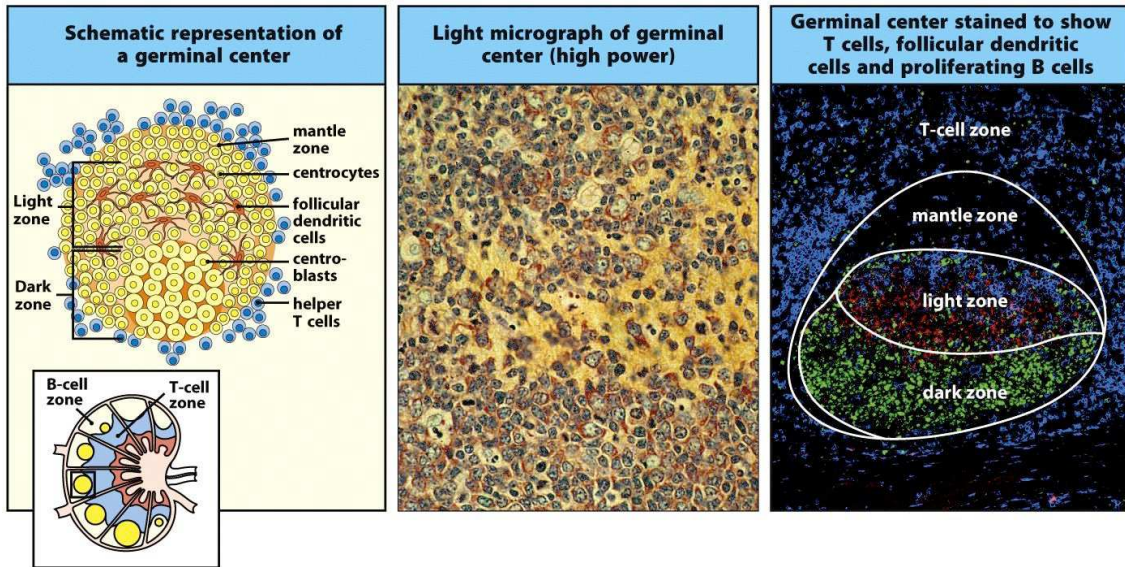


Abbildung 2: Aufbau eines Keimzentrums mit typisch dunkler und heller Zone, umgeben von einer Mantelzone, aus Janeway's immunobiology<sup>4</sup>

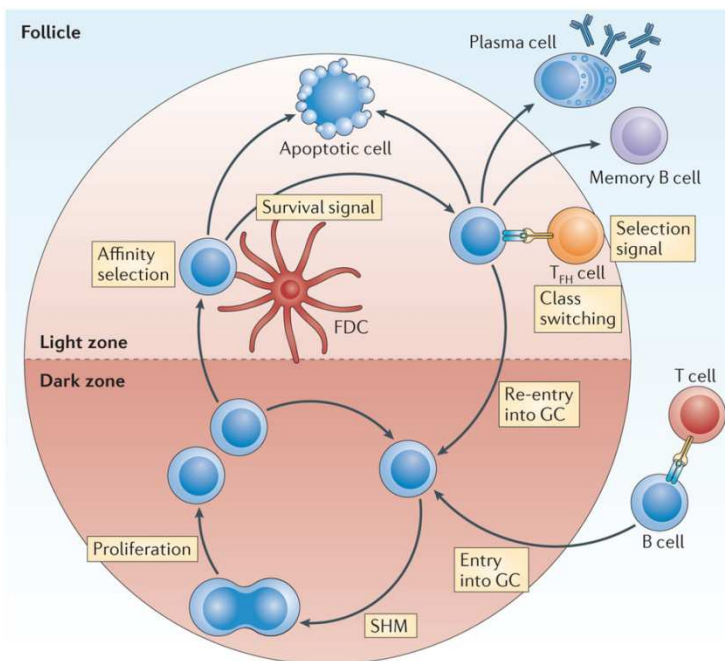


Abbildung 3: Keimzentrumsreaktion und die Differenzierung von aktivierten B-Zellen hin zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen, aus Heesters et al.<sup>15</sup>

### 1.1.2.3 Cluster of Differentiation

Während der B-Zell-Entwicklung kommt es an der Oberfläche der B-Zellen zu unterschiedlicher Expression von Oberflächenantigenen, sog. Cluster of Differentiation (CD)-Moleküle. Anhand dieser CD-Moleküle lässt sich jeder B-Zell-Entwicklungsstufe ein bestimmter Immunphänotyp zuordnen, der diese voneinander unterscheidet. Dies spielt eine entscheidende Rolle in der Diagnostik von Lymphomen und Leukämien. CD79a (Ig $\alpha$ ), CD79b (Ig $\beta$ ), CD179 (V preB) und CD179b (Lambda5) sind typische CD-Antigene, die mit dem BCR assoziiert sind. Weitere, nur auf B-Zellen vorkommende CD-Moleküle, sind CD19, CD20 und CD22. Tabelle 4 zeigt die unterschiedlichen B-Zell-Entwicklungsstadien mit dem jeweils spezifischen Immunphänotyp.<sup>8, 16</sup>

*Tabelle 4: B-Zell-Differenzierung und spezifischer Immunphänotyp*

<b>B-Zell-Entwicklungsstufe</b>	<b>CD-Molekül/ Immunphänotyp</b>
Pro-B-Zelle	CD19, CD10, CD34
Prä-B-Zelle	CD19, CD10, CD79a, CD20
Unreife B-Zelle	CD19, CD10, IgM, CD79a, CD20
Reife B-Zelle	CD19, IgD, CD79a, CD20
Keimzentrums-B-Zelle	CD19, CD38, CD79a, CD20
Gedächtnis-B-Zelle	CD19, CD27, CD79a, CD20
Plasmazelle	CD38, CD138, CD79a

### 1.1.3 Immunglobuline

Immunglobuline bzw. Antikörper sind Glykoproteine mit  $\beta$ -Faltblattstruktur. Sie können Strukturen von Fremdartigen erkennen und binden. Zudem haben sie weitere Aufgaben im Immunsystem und gelten als Verbindungsglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität.<sup>4, 17, 18</sup>

Immunglobuline kommen auf der Oberfläche von B-Zellen vor, membrangebunden in Form des B-Zell-Rezeptorkomplexes oder können von Plasmazellen direkt gebildet und als sog. lösliche Form ins Blut abgegeben werden.<sup>4, 19, 20</sup>

Der B-Zell-Rezeptorkomplex entspricht, wie oben beschrieben, der membrangebundenen Form der Antikörper der Klassen IgM oder IgD. Zum Komplex gehören weiterhin zwei Proteine, Ig $\alpha$  (CD79a) und Ig $\beta$  (CD79b), die für die Signalübertragung ins Zellinnere verantwortlich sind, sowie die weiteren Oberflächenantigene CD19, CD21 und CD81, welche zur Signalverstärkung beitragen.<sup>4, 19</sup>

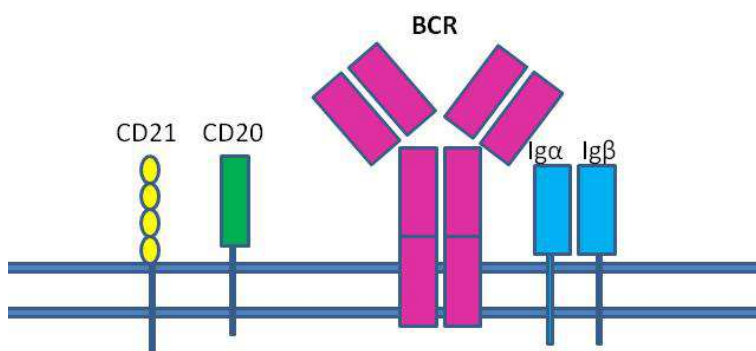


Abbildung 4: Aufbau des B-Zell-Rezeptor-Komplexes (membrangebundene Form), modifiziert nach Janeway's immunobiology<sup>4</sup>

Im Folgenden wird nun der Aufbau der löslichen Form der Immunglobuline beschrieben, der in Abbildung 5 dargestellt ist.

Immunglobuline bestehen jeweils aus zwei identischen Schwer- und Leichtketten (H- und L-Ketten) und kommen als Y-Form zur Darstellung. Die beiden Schwer- und Leichtketten stehen jeweils über Disulfidbrücken miteinander kovalent in Verbindung, bilden  $\beta$ -Faltblattstrukturen und lassen sich in Proteindomänen von ca. 110 Aminosäuren unterteilen. Jede dieser Domäne enthält mindestens eine Disulfidbrücke.<sup>4, 17</sup>



Die beiden Leichtketten bestehen jeweils aus einer variablen Domäne ( $V_L$ ) und einer konstanten Domäne ( $C_L$ ). Es gibt zwei unterschiedliche Typen von Leichtketten, Kappa und Lambda, wobei immer nur eine Variante in einem Antikörper vorkommen kann, was auch als sog. Allelausschluss bezeichnet wird.<sup>4, 19, 20</sup>

Die beiden Schwereketten bestehen ebenfalls aus je einer variablen Region ( $V_H$ ) und je drei bis vier konstanten Domänen ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ,  $C_{H4}$ ), mit denen sie die Antikörperklasse definieren. Es gibt fünf verschiedene Klassen von Antikörpern, die zum Teil in weitere Subklassen unterteilt werden können (Tabelle 5).

*Tabelle 5: Immunglobulinklassen*

IgM	IgD	IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2</sub>	IgG <sub>3</sub>	IgG <sub>4</sub>	IgA <sub>1</sub>	IgA <sub>2</sub>	IgE
-----	-----	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	-----

IgG, IgA und IgD haben jeweils drei konstante Domänen ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ), während IgM und IgE aus je vier konstanten Domänen bestehen ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ,  $C_{H4}$ ). Desweiteren unterscheiden sich die fünf verschiedenen Immunglobulinklassen in der Ausbildung einer sog. Hinge-Region. Die Hinge-Region ist eine sog. Gelenkregion, wodurch das Antikörpermolekül eine gewisse Flexibilität erhält. Dies trägt zur Erhöhung der Effizienz der Antigenbindung und Quervernetzung bei.<sup>21</sup> Ein weiterer Unterscheidungspunkt der Immunglobulinklassen liegt in ihrem Aufgabenbereich innerhalb des menschlichen Immunsystems.<sup>4, 17, 19</sup>

Der Stamm der Y-Form wird von den konstanten Domänen der Schwereketten gebildet und bestimmt die Antikörperklasse. Die beiden variablen Domänen der Schwer- und Leichtketten ( $V_H$ ,  $V_L$ ) befinden sich an den Armen des Y und bilden zusammen die sog. Antigenbindestelle. Jedes Antikörpermolekül besitzt somit zwei Antigenbindestellen, die in ihrer Struktur und Spezifität identisch sind. Betrachtet man die Antigenbindestelle genauer, so finden sich innerhalb dieser

Stelle drei sog. hypervariable Regionen (HV1, HV2, HV3), auch als complementary determining regions (CDR1, CDR2, CDR3) bezeichnet, die das Antigen binden. Hier findet sich eine starke Variation in der Aminosäurezusammensetzung, was für die Antigen-spezifität von Bedeutung ist. Zwischen den HV-Regionen liegen vier konservierte Regionen, framework regions (FR1, FR2, FR3, FR4), die eine geringere Variabilität zeigen.<sup>4, 17, 19</sup>

Durch die genannte Variabilität in der Aminosäuresequenz der Antigenbindungsstellen (V-Domänen), die unter anderem durch somatische Hypermutationen zustande kommt, resultiert ein großes Spektrum an Antigen-spezifitäten, das sog. Antikörper-repertoire, das in einem menschlichen Individuum ca.  $10^{12}$  verschiedene Immunglobuline umfasst.<sup>4</sup>

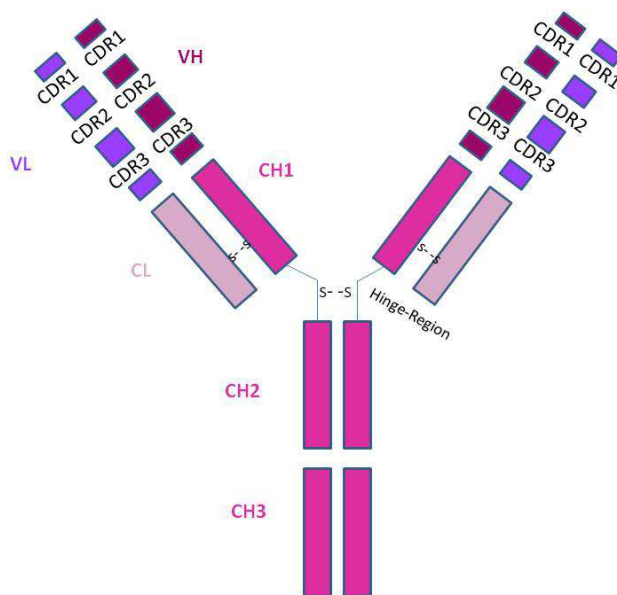


Abbildung 5: Aufbau eines Immunglobulinmoleküls am Beispiel von IgG, modifiziert nach Janeway's immunobiology<sup>4</sup>

Die Y-Form der Antikörper kann durch enzymatische Spaltung in Fragmente zerlegt werden. Dabei entstehen drei Teile: Die beiden  $F_{ab}$ -Fragmente, welche die variablen Domänen enthalten, sowie ein  $F_c$ -Fragment, das die konstante Region der Schwere-kette enthält und die Antikörper-klasse bestimmt.<sup>4, 17</sup>

### **Immunglobulin M:**

Das Immunglobulin M ist das Immunglobulin, das als Erstes bei einem Antigenkontakt von einer aktivierten B-Zelle gebildet wird und gilt somit als Zeichen einer akuten Infektion.<sup>4, 17, 18</sup>

IgM kommt als Monomer auf der Oberfläche von naiven reifen B-Zellen vor (membrangebundene Form). In der löslichen Form lagern sich fünf IgM-Moleküle zu einem Pentamer zusammen, stabilisiert durch eine sog. Joining (J)-Kette (Polypeptidkette). Ein IgM-Molekül besteht aus vier konstanten Domänen, C<sub>H</sub>1-4, wobei die Hinge-Region hier fehlt. Durch die Bildung eines Pentamers können mehrere Antigene gleichzeitig gebunden werden, woraus eine hohe Bindungsavidität, also eine hohe Gesamtbindungsstärke, resultiert.<sup>4, 17, 18</sup>

### **Immunglobulin D:**

Immunglobulin D wird zusammen mit IgM auf der Oberfläche naiver B-Zellen exprimiert. Es kommt nur in geringen Mengen, < 1 % aller Immunglobulinklassen, als lösliche Form im Blut vor. Die genaue Funktion ist bisher nicht geklärt, wobei es wohl eine Rolle bei der B-Zell-Reifung spielen soll.<sup>4, 17, 22</sup> IgD hat drei konstante Regionen, C<sub>H</sub>1-3, und besitzt eine zusätzliche Hinge-Region.<sup>4</sup>

### **Immunglobulin A:**

Immunglobulin A ist das am meisten, allerdings nicht im Serum, produzierte Immunglobulin.<sup>4, 23</sup> Es existieren zwei Subklassen, IgA<sub>1</sub> und IgA<sub>2</sub>. Als sezerniertes Immunglobulin kann es als Monomer oder als Dimer vorkommen, wobei letztere Form dominiert. Als Dimer besteht es aus zwei IgA-Molekülen, die über eine J-Kette verbunden sind. IgA-Moleküle besitzen drei konstante Domänen, C<sub>H</sub>1-3, und eine Hinge-Region.<sup>4, 17, 23</sup>

IgA ist für die Immunität an den Schleimhäuten verantwortlich. Somit kommt es als dimere Form in der Tränenflüssigkeit, in den Speichel-, Bronchial- und Urogenitalsekreten, in der Darmschleimhaut sowie in der Muttermilch vor.<sup>4, 17, 23</sup>

### **Immunglobulin E:**

Immunglobulin E besteht, wie IgM, aus vier konstanten Regionen, C<sub>H</sub>1-4, und besitzt keine Hinge-Region.<sup>4, 17</sup>

IgE ist vor allem verantwortlich für die Abwehr von Parasiten und spielt eine wesentliche Rolle bei allergischen Reaktionen vom Soforttyp.<sup>4, 17</sup>

Zudem ist IgE das einzige Immunglobulin, das im Gewebe an Oberflächen gebunden wird ohne als Immunkomplex zu fungieren. Hierfür bindet es über den F<sub>c</sub>-Teil an Basophile, Mastzellen und aktivierte Eosinophile.<sup>4, 24</sup>

### **Immunglobulin G:**

Die Produktion von Immunglobulin G findet erst in der Spätphase einer Immunantwort statt. Es gilt somit als Zeichen einer protrahierten, chronischen oder bereits durchgemachten Infektion oder eines Impfschutzes. Es bildet mit 75 % den größten Anteil aller Immunglobuline im Serum und hat die längste Halbwertszeit von 21 Tagen.<sup>4, 25</sup>

Wie oben beschrieben, gibt es vier Subklassen, IgG<sub>1-4</sub>, die alle unterschiedliche Funktionen im menschlichen Immunsystem haben. Die Nummerierung erfolgt absteigend anhand der vorhandenen Menge im Serum.<sup>25</sup>

Hinsichtlich des strukturellen Aufbaus bildet IgG drei konstante Domänen, C<sub>H</sub>1-3, und besitzt ebenfalls eine Hinge-Region. Die einzelnen IgG-Subklassen ähneln sich in ca. 90 % in der Struktur, hingegen finden sich Unterschiede in der Länge der Hinge-Region oder in der Anzahl der Disulfidbrückenbindungen. IgG<sub>3</sub> besitzt im Gegensatz zu den restlichen IgG-Subklassen eine sehr lange

Hinge-Region. Dies erklärt die kürzere Halbwertszeit von sieben Tagen von IgG<sub>3</sub>.<sup>4, 25</sup>

Da für diese Arbeit insbesondere IgG<sub>4</sub> eine wichtige Rolle spielt, soll diese IgG-Subklasse genauer erläutert werden.

IgG<sub>4</sub> ist mit < 5 % die im Serum am wenigsten vorkommende IgG-Subklasse und zeigt einige Besonderheiten, die im Folgenden beschrieben werden.<sup>26, 27</sup>

Zum einen variieren die Serumkonzentrationen innerhalb der Bevölkerung stark (0,01-1,4 mg/ml), wohingegen die Konzentrationen innerhalb eines Individuums relativ stabil sind.<sup>27-29</sup>

Hinsichtlich ihrer molekularen Struktur unterscheiden sich die vier IgG-Subklassen in der Aminosäuresequenz der Hinge-Region (CH<sub>2</sub>-Region). Eine bestimmte Sequenz CXXC (C = Cystein, X = variable Aminosäure) ist für die Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen und damit zur Stabilität der Schwereketten innerhalb eines IgG-Moleküls relevant. IgG<sub>4</sub> zeigt hier eine andere Aminosäurefolge als die übrigen Immunglobuline, CPSC anstatt beispielsweise der CPPC-Sequenz der IgG<sub>1</sub>-Subklasse. Durch das Serin anstelle des Prolins resultiert eine gewisse Instabilität der Disulfidbindungen in der Hinge-Region, so dass sich die Disulfidbrücken zwischen den beiden Schwereketten lösen und sich Disulfidbrückenbindungen zwischen Schwereketten verschiedener, "nicht verwandter/identischer" IgG<sub>4</sub>-Moleküle bilden können. Dadurch trennen sich die beiden Antikörperhälften voneinander, bilden sog. "half molecules" und lagern sich mit anderen IgG<sub>4</sub>-"half molecules" zusammen. So entstehen heterobivalente, bispezifische IgG<sub>4</sub>-Moleküle, die nun zwei unterschiedliche V-Domänen besitzen und deshalb nicht zur Antigenquervernetzung und zur Bildung von Immunkomplexen fähig sind. Dies wird als sog. "half-antibody-exchange-reaction/Fab-arm-exchange" bezeichnet und ist eine Besonderheit des IgG<sub>4</sub>-Moleküls. Abbildung 6 zeigt diesen Vorgang.<sup>25, 26, 28-31</sup> Weiterhin wird vermutet, dass IgG<sub>4</sub>-Moleküle sich mit ihrem Fc-Teil, ähnlich wie es für Rheumafaktoren beschrieben ist, an den Fc-Teil

vorzugsweise anderer IgG<sub>4</sub>-Moleküle binden können. Dies wird als eine Art Zwischenstufe der Fab-arm-exchange-Reaktion angesehen.<sup>28</sup>

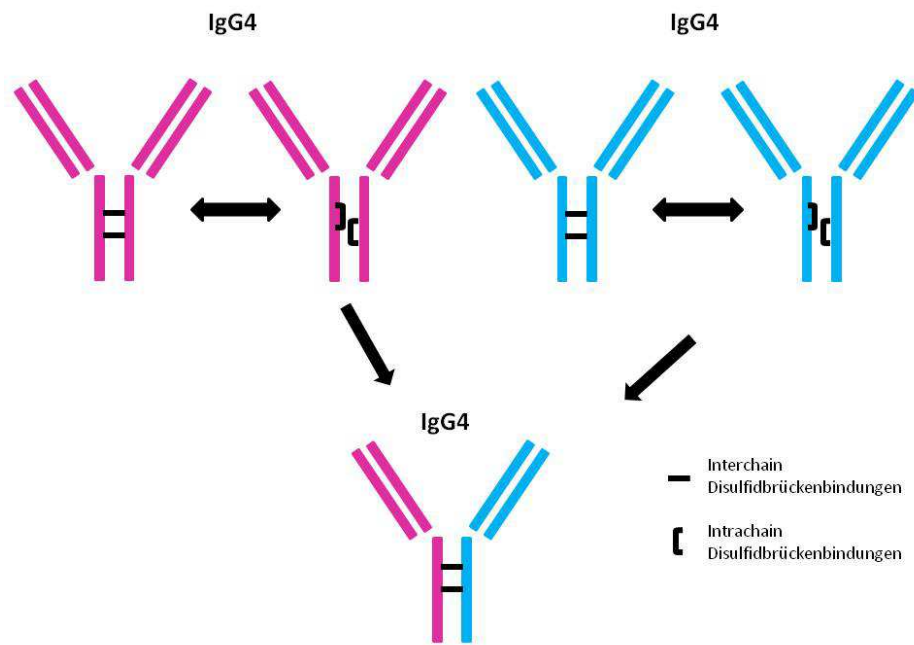


Abbildung 6: Fab-arm-exchange-Reaktion mit Bildung von heterobivalenten, bispezifischen IgG<sub>4</sub>-Molekülen, modifiziert nach Nirula et al.<sup>29</sup>

Weiterhin können IgG<sub>4</sub>-Moleküle den klassischen Komplementweg nur in geringem Ausmaß aktivieren, da sie zum Fc- und C1q-Rezeptor nur eine schwache Bindungsfähigkeit zeigen. Dies, zusammen mit der Besonderheit der Fab-arm-exchange-Reaktion, könnten Erklärungen für die eher anti-inflammatorische Rolle von IgG<sub>4</sub> sein.<sup>25-29, 31</sup>

Zu einer IgG<sub>4</sub>-Antwort kommt es in Geweben mit langanhaltender oder wiederholter Antigenexposition. Die Produktion von IgG<sub>4</sub> ist, ebenso wie IgE, kontrolliert durch T2-Helferzellen. Deren Zytokine IL-4 und IL-13 sorgen dafür, dass B-Zellen sowohl zu IgE- als auch zu IgG<sub>4</sub>-produzierenden Plasmazellen differenzieren. Nach längerem Entzündungsgeschehen kommen schließlich die Th2-Zytokine IL-10 und IL-21 ins Spiel, was eine verstärkte IgG<sub>4</sub>-Produktion

und eine verminderte IgE-Produktion zur Folge hat. IL-10 wird insbesondere von regulatorischen T-Zellen ausgeschüttet, die physiologischerweise die Herabregulation bzw. das Beenden einer Immunantwort kontrollieren, wobei in Bezug auf eine IgG<sub>4</sub>-Antwort von einer sog. modifizierten Th2-Antwort gesprochen wird.<sup>25, 26, 28, 29, 32</sup>

### 1.1.3.1 Somatische Rekombination

Die Vielfalt der Immunglobuline kommt unter anderem durch Umlagerung der Gene für die Schwer- und Leichtketten, die sog. somatische Rekombination, zustande. Die Genumlagerung für die Schwereketten finden auf Chromosom 14 und für die Leichtketten auf Chromosom 22 (Lambda) und Chromosom 2 (Kappa) statt. Bei der somatischen Rekombination, die während der Keimzentrumsreaktion der B-Zell-Reifung stattfindet, werden Genabschnitte, welche für die variablen und konstanten Domänen kodieren, neu kombiniert. So entsteht ein großes Repertoire an Immunglobulinen mit unterschiedlicher Spezifität.<sup>4, 33-35</sup>

Während der B-Zell-Differenzierung erfolgt als erstes die Umlagerung der Gensegmente für die Bildung der Schwerekette. Hierfür existieren auf Chromosom 14 für die variable Domäne 65 V (variable)-, 27 D (diversity)- und 6 J (Joining)-Gensegmente. Neben diesen befinden sich die Segmente für die konstante Domäne (C-Segmente). In einem ersten Schritt erfolgt die zufällige Kombination eines D- mit einem J-Segment. Anschließend erfolgt die Verknüpfung eines V-Gensegments mit dem DJ-Gensegment. Die dazwischenliegenden Genabschnitte werden durch Deletion entfernt. Nun folgt die Transkription dieser rekombinierten DNA in RNA und es entsteht ein sog. Primärtranskript, das noch das vorhandene Intron zwischen den J- und C-Gensegmenten und die Segmente für die Schwerekette  $\mu$  und  $\delta$  enthält. Da IgM und IgD zunächst in einer gemeinsamen RNA überschrieben werden, können B-Zellen anfänglich sogar beide Antikörper gleichzeitig synthetisieren. Durch alternatives Spleißen werden das Intron und eine der beiden Schwerekettengene

entfernt. Aus der fertigen mRNA kann dann das rekombinierte Immunglobulin als Protein gebildet werden.<sup>4</sup>

Es schließt sich die Genumlagerung für die Leichtketten an, welche nach demselben Prinzip abläuft, wobei hier keine D-Segmente existieren. So kommt es zur Verknüpfung eines von 40 V-Gensegmenten mit einem der 5 J-Gensegmente.<sup>4</sup>

Wichtige Steuerelemente für die somatische Rekombination sind die sog. RSS (recombination signal sequences). Diese Sequenzen schließen sich an jedes kodierende Segment an und dienen als Erkennungsstellen. Hier binden die sog. RAG-1- und RAG-2- Proteine (recombination activating gene), welche die jeweiligen Abschnitte miteinander verknüpfen.<sup>4, 6, 19, 33, 36, 37</sup>

Durch anschließende, während der antigenabhängigen B-Zell-Entwicklung im Keimzentrum stattfindende, somatische Hypermutationen in den hypervariablen Regionen der Schwer- und Leichtketten und das zufällige Einführen von P- und N-Nukleotiden wird für weitere Antikörperdiversität mit hoher Affinität gesorgt. Dies erfolgt wiederum mit Hilfe des bereits oben beschriebenen Enzyms AID (activation-induced cytidine deaminase).<sup>4, 33, 38-40</sup>



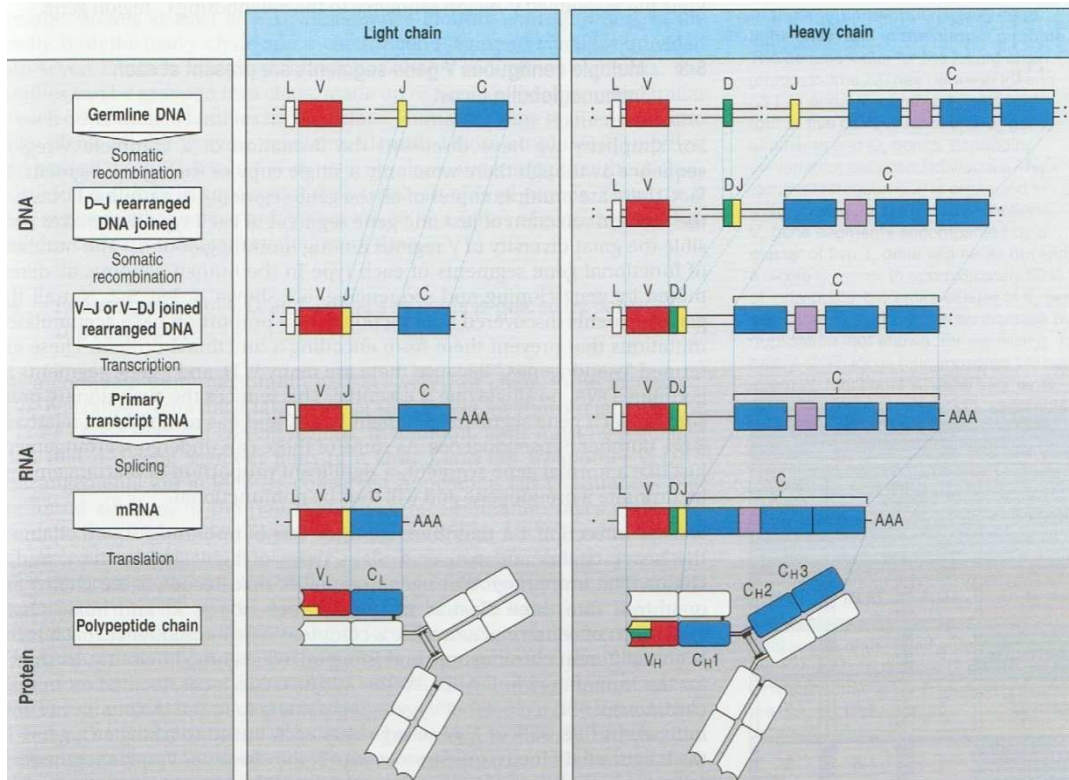


Abbildung 7: Somatische Rekombination mit Verknüpfung von je einem VDJ-Gensegment (Schwerkette) bzw. je einem VJ-Gensegment (Leichtkette), aus Janeway's immunobiology<sup>4</sup>

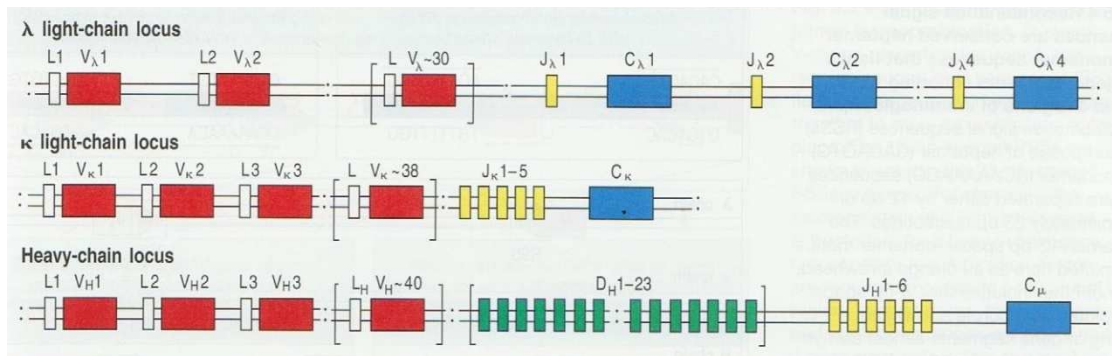


Abbildung 8: Darstellung des Schwereketten (Chromosom 14)- und Leichtkettengens (Chromosom 2 für Kappa, Chromosom 22 für Lambda), aus Janeway's immunobiology<sup>4</sup>

### 1.1.3.2 Klassenwechsel

Durch den Klassenwechsel kann eine aktivierte B-Zelle die Effektorfunktionen des Immunglobulins verändern ohne dabei Änderungen an der Antigenbindestelle vorzunehmen. Die hierfür nötigen C-Gensegmente, die für den konstanten Teil eines Antikörpers kodieren, befinden sich im IgH-Lokus nebeneinander.<sup>4, 33</sup>

Die Gensegmente für die beiden Immunglobuline IgM und IgD ( $C_{\mu}$  und  $C_{\delta}$ ) kommen als erstes neben den VDJ-Segmenten. Somit werden zunächst nur diese beiden Gensegmente abgelesen und es kommt zur Bildung von IgM und IgD. Alle naiven reifen B-Zellen exprimieren somit IgM und IgD auf ihrer Zelloberfläche. Zur Produktion der anderen Immunglobulinklassen findet in der aktivierten B-Zelle erneut eine Rekombination zwischen den sog. S(Switch)-Regionen statt. Diese Regionen befinden sich am 5'-Ende vor den jeweiligen Gensegmenten für die konstanten Regionen. Vor dem Gensegment für IgD ( $C_{\delta}$ ) fehlt eine solche S-Region. Dies hat zur Folge, dass  $C_{\mu}$  und  $C_{\delta}$  immer zusammen herausgeschnitten werden und kein Klassenwechsel hin zu IgD möglich ist.<sup>4, 33</sup>

Für den Vorgang des Klassenwechsels wird wiederum das Enzym AID, das, wie bereits beschrieben, von proliferierenden B-Zellen exprimiert wird, benötigt. Dieses baut in den gewünschten S-Regionen Doppelstrangbrüche ein und die dazwischengelegenen C-Regionen, die nicht benötigt werden, werden entfernt. Anschließend werden die beiden Enden zusammengefügt. So entsteht eine rekombinierte DNA mit neuem C-Segment, aber mit der gleichen VDJ-Sequenz, wobei der Vorgang des Klassenwechsels irreversibel ist, da die entfernten Regionen dabei verlorengehen.<sup>4, 6, 13, 33, 38-40</sup> Signalmoleküle, die von T-Helferzellen im Rahmen der B-Zell-Differenzierung ausgeschüttet werden, geben das Signal, zu welcher Antikörperklasse hin die B-Zelle wechseln soll.<sup>4, 5, 9, 13, 33</sup> Diese Zytokine erzeugen in der S-Region des gewünschten Typs Transkriptionsaktivität. Beispiele für Signalmoleküle mit präferiertem Antikörper finden sich in Tabelle 6.

*Tabelle 6: Signalmoleküle und produzierte Immunglobuline*

<b>Signalmolekül</b>	<b>Immunglobulin</b>
Interleukin-4	IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>4</sub> , IgE
Interleukin-5	IgA
Interleukin 6	IgM, IgG
Interleukin 10	IgG <sub>4</sub>
Interleukin 21	IgG <sub>4</sub>
TGF-β	IgG <sub>2</sub> , IgA
Interferon-γ	IgG <sub>2</sub> , IgG <sub>3</sub>

#### 1.1.4 T-Zellen

T-Zellen entwickeln sich aus der lymphatischen Vorläuferzelle und wandern zur weiteren Differenzierung in den Thymus. Es entstehen verschiedene T-Zell-Subpopulationen, die unterschiedliche Aufgaben im menschlichen Immunsystem haben. Desweiteren tragen sie auf ihrer Oberfläche unterschiedlich Moleküle, anhand derer sie differenziert werden können. Allen T-Zell-Subpopulationen gemeinsam ist das CD3-Molekül, das mit dem T-Zell-Rezeptor auf der Oberfläche der T-Zellen als TCR-CD3-Komplex exprimiert wird. T-Zellen zirkulieren im Blut und finden sich in der interfollikulären Region der lymphatischen Gewebe sowie im Keimzentrum.<sup>4, 41</sup>

##### 1.1.4.1 CD4+ T-Zellen

T-Zellen, die den Korezeptor CD4 auf ihrer Zelloberfläche tragen, werden T-Helferzellen genannt. Sie erkennen Antigene, die von Antigen-präsentierenden Zellen über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert werden, binden mit Hilfe von CD4 daran und stimulieren B-Zellen zur Antikörperbildung. Weiterhin entwickeln sich CD4+ T-Helferzellen mit Hilfe dendritischer Zellen und deren Zytokine zu verschiedenen Subpopulationen, T-Helfer (Th)1, Th2, Th17, regulatorische T-Zellen und follikuläre Helfer-T-Zellen. Diese besitzen jeweils wieder spezifische

Effektorfunktionen und schütten diverse Zytokine aus, die wiederum unterschiedliche Zellen des Immunsystems aktivieren oder supprimieren.<sup>4, 41</sup>

T1-Helferzellen sorgen für zellvermittelte Immunität durch Aktivierung von Makrophagen. Desweiteren regen sie B-Zellen zur Produktion bestimmter Antikörper, vor allem IgG, an, indem sie hierfür bestimmte Zytokine wie IFN- $\gamma$  oder IL-2 ausschütten.<sup>41, 42</sup>

T2-Helferzellen sorgen für die humorale Immunität und regen B-Zellen zum Klassenwechsel an. Hierfür verantwortlich sind IL-4- und IL-5-Signale, die zur Produktion von IgE, IgG<sub>4</sub> und IgA führen.<sup>4, 41, 42</sup>

Bei einer akuten Immunantwort kommt es zur Beteiligung von T1- und T2-Helferzellen, wohingegen bei längerdauernden, chronischen Immunantworten eine der beiden Populationen dominiert. So spielen beispielsweise bei allergischen Reaktionen vor allem T2-Helferzellen eine Rolle, hingegen bei Autoimmunität, intrazellulären Infektionen oder Transplantatabstoßungen T1-Helferzellen.<sup>41, 42</sup>

#### 1.1.4.2 CD8+ T-Zellen

CD8+ T-Zellen werden auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Zytotoxische T-Zellen erkennen Fremddantigene, die von allen Körperzellen über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden und binden an diese mit Hilfe ihres Korezeptors CD8. Zytotoxische T-Zellen können infizierte Körperzellen direkt eliminieren, in dem sie in diesen Zellen die Apoptose induzieren. Für diese Apoptoseinduktion sind unter anderem die zytotoxischen Moleküle Perforin, TIA-1 (T-cell intracellular antigen-1) sowie Granzyme B verantwortlich. Diese kommen in Form von Granula in zytotoxischen T-Zellen vor und werden zur Apoptoseinduktion freigesetzt.<sup>4</sup> Weiterhin sind zytotoxische T-Zellen für die Abwehr einer Virusinfektion von Bedeutung.<sup>4, 41, 42</sup>

In den lymphatischen Organen aber beispielsweise auch in Mukosa-assoziierten lymphatischen Geweben kommen CD4+ und CD8+ T-Zellen im Verhältnis von 3:1 vor.

#### 1.1.4.3 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen, die unter anderem durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (forkhead box transcription factor 3) charakterisiert sind, machen nur < 10 % aller T-Zellen aus. Sie sind vor allem zur Unterdrückung einer Immunantwort, zur Verhinderung von Autoimmunität und bei der Beendigung von allergischen Reaktionen von Bedeutung. Weiterhin spielen sie eine Rolle bei malignen Neoplasien, wenngleich der genaue Mechanismus, der unter anderem auch einen Einfluss auf die Prognose maligner B-Zell-Neoplasien sowie solider Tumore hat, noch nicht verstanden ist.

41, 43-48

#### 1.1.4.4 Follikuläre Helfer-T-Zellen

Follikuläre Helfer-T-Zellen sind eine weitere Subgruppe der T-Helferzellen. Man unterscheidet sog. intrafollikuläre von extrafollikulären Helfer-T-Zellen.

Intrafollikuläre Helfer-T-Zellen finden sich in den Keimzentren der Sekundärfollikel und sind wichtig für die Differenzierung der B-Zellen in langlebige Gedächtniszellen oder Antikörper-produzierende Plasmazellen. Extrafollikuläre Helfer-T-Zellen kommen in sekundären lymphatischen Organen außerhalb des Lymphknotens vor. Diese interagieren mit B-Zellen und unterstützen vermutlich die Antikörperproduktion außerhalb des Follikels.<sup>41, 42, 49</sup>

Follikuläre Helfer-T-Zellen exprimieren PD1(programmed cell death-1), ein Protein der CD28-Familie, das durch Interaktion mit seinen Liganden PD-L1/2 eine Bedeutung für den Kontakt zu B-Zellen, für die B-Zell-Differenzierung, für das Überleben in den Keimzentren und für die Antikörperproduktion hat. Die Liganden PD-L1/L2 sind Transmembranproteine und werden unter anderem

von B-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen oder T-Zellen exprimiert.<sup>42, 50, 51</sup>

Weiterhin spielen folliculäre Helfer-T-Zellen bei der Entstehung von auto-immunen Prozessen sowie in der Entwicklung von Lymphomen eine Rolle.<sup>42, 50</sup> Beispielsweise sollen sie unter anderem bei folliculären Lymphomen oder lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphomen zu deren Progression beitragen.<sup>52</sup>

## 1.2 Maligne Lymphome

Maligne Lymphome sind bösartige Erkrankungen der lymphatischen Zellen, den reifen oder unreifen B-, T- oder NK-Zellen. Die maligne Transformation kann zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der normalen Lymphopoese stattfinden und führt zu einer unkontrollierten Vermehrung der jeweiligen, neoplastischen, lymphoiden Zelle. Dies erklärt die Vielzahl an unterschiedlichen Lymphomentitäten, wobei die Klassifikation der Lymphome häufig über eine bestimmte Differenzierungsstufe in der normalen Lymphopoese bzw. ein morphologisches Korrelat in den lymphatischen Geweben erfolgt (z.B. Vorläufer-T/B-Zell-Lymphom/Leukämie, folliculäres Lymphom, Marginalzonen-Lymphom, Mantelzell-Lymphom).<sup>53</sup>

Unterteilt werden die malignen Lymphome traditionell in die sog. Hodgkin-Lymphome (Morbus Hodgkin) und in die Non-Hodgkin-Lymphome. Hodgkin-Lymphome machen etwa 20-30 % und Non-Hodgkin-Lymphome etwa 70-80 % aller malignen Lymphome aus.<sup>54</sup>

## 1.3 Non-Hodgkin-Lymphome

Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) sind neoplastische Erkrankungen des lymphatischen Systems, ausgehend von den B-, T- oder NK-Zellen. 80-85 % der NHL entstammen der B-Zell-Reihe und 15-20 % der T-Zell-Reihe.<sup>1, 54</sup>

Wie oben schon beschrieben, entsprechen die meisten NHL arretierten Entwicklungsstufen der jeweiligen normalen Ausgangszellpopulation. Dennoch lassen sich nicht alle Lymphomentitäten einer eindeutigen Differenzierungsstufe zuordnen (z.B. Haarzell-Leukämie). Bei den B-Zell-Lymphomen unterscheidet man Vorläufer-B-Zell-Neoplasien von reifen B-Zell-Lymphomen. Desweiteren werden die reifen B-Zell-Lymphome in kleinzellige, indolente Lymphome sowie in blastische, aggressive Lymphome unterteilt. Eine hochmaligne Transformation eines indolenten B-NHL in ein aggressives B-NHL ist möglich. 2/3 manifestieren sich primär nodal mit teilweise sekundär extranodaler Beteiligung (bevorzugt Leber, Knochenmark, Gastrointestinaltrakt) und 1/3 primär extranodal (bevorzugt Haut und Gastrointestinaltrakt). Die NK-/T-Zell-Lymphome werden ebenfalls unterteilt in Vorläufer-T-Zell-Neoplasien und reifzellige NK-/T-Zell-Neoplasien.<sup>1, 54, 55</sup>

Tabelle 7 zeigt einen Auszug aus der aktuellen WHO-Klassifikation der lymphoiden Neoplasien.<sup>53, 54</sup>

90 % der NHL sind reife B-Zell-Lymphome, wobei das folliculäre Lymphom und das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom am häufigsten vorkommen, zusammen machen sie ungefähr 60 % aller malignen Lymphome aus. Die am meisten vorkommenden T-Zell-Lymphome sind das nicht weiter spezifizierte periphere T-Zell-Lymphom und das angioimmunoblastische T-Zell-Lymphom.<sup>53</sup>

Die Ätiologie der malignen Lymphome ist weitgehend ungeklärt. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von bestimmten Lymphomen und gewissen Infektionserregern wird vermutet. Exogene Einflüsse wie Ernährung und Umwelt (Rauchen, radioaktive Strahlung, Pestizide, u.a.) spielen ebenso eine Rolle bei der Lymphomentstehung. Desweiteren wurden in den vergangenen Jahren charakteristische Mutationen oder Translokationen beschrieben, die bei der Pathogenese bestimmter Lymphomentitäten eine wesentliche Rolle spielen (z. B. BCL-2 Translokation bei folliculären Lymphomen, MYC-Translokation bei Burkitt-Lymphomen, BRAF-Mutation bei Haarzell-Leukämien, MyD88-Mutation bei lymphoplasmazytischen Lymphomen; vgl. Tabelle 8).<sup>35, 53, 56</sup>

Tabelle 7: WHO-Klassifikation der wichtigsten unreifen und reifen lymphoiden Neoplasien

<b>B-Zell-Reihe</b>
<b>Vorläufer-B-Zell-Neoplasien</b>
○ Vorläufer-B-lymphoblastisches Lymphom/Leukämie
<b>Reifzellige-B-Zell-Neoplasien</b>
○ chronische lymphatische Leukämie, kleinzelliges lymphozytisches Lymphom
○ lymphoplasmazytisches Lymphom
○ splenisches Marginalzonen-Lymphom
○ Haarzell-Leukämie
○ Plasmazellneoplasien
○ Nodales Marginalzonen-Lymphom
○ Extranodales Marginalzonen-Lymphom des MALT
○ folliculäres Lymphom
○ Mantelzell-Lymphom
○ diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
○ Burkitt-Lymphom
<b>NK/T-Zell-Reihe</b>
<b>Vorläufer-T-Zell-Neoplasien</b>
○ Vorläufer T-lymphoblastisches Lymphom/Leukämie
<b>Reifzellige NK/T-Zell-Neoplasien</b>
○ T-Prolymphozyten Leukämie
○ T-Zell-Leukämie der azurgranulierten Lymphozyten ("large granular lymphocytes")
○ NK/T-Zell-Lymphom, nasaler Typ
○ Enteropathie-assoziiertes T-Zell-Lymphom
○ hepatosplenisches T-Zell-Lymphom
○ subkutanes Pannikulitis-ähnliches T-Zell-Lymphom
○ Mycosis fungoides
○ Sézary-Syndrom
○ peripheres T-Zell-Lymphom (nicht weiter spezifiziert)
○ angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom
○ anaplastisches großzelliges Lymphom



*Tabelle 8: Ätiopathogenetisch relevante genetische Alterationen bzw. Erreger bei malignen Lymphomen*

<b>NHL</b>	<b>Genetische Aberration</b>	<b>Infektionserreger</b>
Follikuläres Lymphom	t(14;18), BCL-2-Translokation	
Burkitt-Lymphom	t(8;14), MYC-Translokation	Epstein-Barr Virus
Extranodales Marginalzonen-Lymphom vom MALT-Typ	t(11;18), API2/MALT1 Translokation	Helicobacter pylori, Borrelia burgdorferi, Chlamydia psittaci, pneumoniae und trachomatis, Campylobacter jejuni
Mantelzell-Lymphom	t(11;14), CCND1-Translokation	
Lymphoplasmocytisches Lymphom, Marginalzonen-Lymphom, diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	MyD88-L265P-Mutation	
Haarzell-Leukämie	BRAF-V600E-Mutation	
Anaplastisches großzelliges Lymphom	t(2;5), NPM/ALK Translokation	
Primäres Ergusslymphom		Humanes Herpesvirus 8 und Epstein-Barr Virus

Als Risikofaktoren für die Entwicklung von malignen Lymphomen gelten weiterhin angeborene und erworbene Immundefekte (z.B. CVID und AIDS) sowie Autoimmunerkrankungen, z.B. Hashimoto-Thyreoiditis oder Sjögren-Sialadenitis.<sup>53</sup>

Die Klassifikation maligner Lymphome erfolgt anhand typischer histologischer, immunhistochemischer und genetischer Merkmale.<sup>53, 57</sup>

Die Stadieneinteilung richtet sich nach der Ann-Arbor-Klassifikation, die vier Stadien unterscheidet (Tabelle 9).<sup>53, 55</sup>

Tabelle 9: Ann-Arbor-Klassifikation

Stadium	Befallsmuster
Stadium I	Befall einer einzigen Lymphknotenregion
Stadium II	Befall von zwei oder mehreren Lymphknotenregionen auf der gleichen Seite des Zwerchfells
Stadium III	Befall von Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells
Stadium IV	Diffuser oder disseminierter Befall von Lymphknotenregionen oder extralymphatischen Organen
Zusatz E	Befall von extranodalen Organen
Zusatz A	Keine B-Symptomatik
Zusatz B	Mit B-Symptomatik

#### 1.4 Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)

Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) spielt eine Rolle in der natürlichen Abwehrfunktion des angeborenen Immunsystems. Es ist ein zentrales Adaptormolekül im Toll-like Rezeptor (TLR)- und IL-1 Rezeptor-assoziierten-Kinase (IRAK)-vermittelten Signalweg der B-Zelle, der zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führt. Diese NF- $\kappa$ B-Aktivierung führt zur Transkriptionsinduktion verschiedener Gene proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 und IL-6 und ist somit wichtig für die Entwicklung und das Überleben von B-Zellen.<sup>4, 58-60</sup>

Das MyD88-Molekül selbst besteht aus zwei Proteindomänen. Dazu gehören zum einen die sog. Toll-Interleukin -1-Rezeptor (TIR)-Domäne am C-Terminus sowie die Death-Domäne (DD) am N-Terminus, die für die Adaptorfunktion im Signalweg verantwortlich ist.<sup>4</sup>

In der nachfolgenden Abbildung 9 sind der Aufbau von MyD88 sowie der Signalweg hin zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung dargestellt.

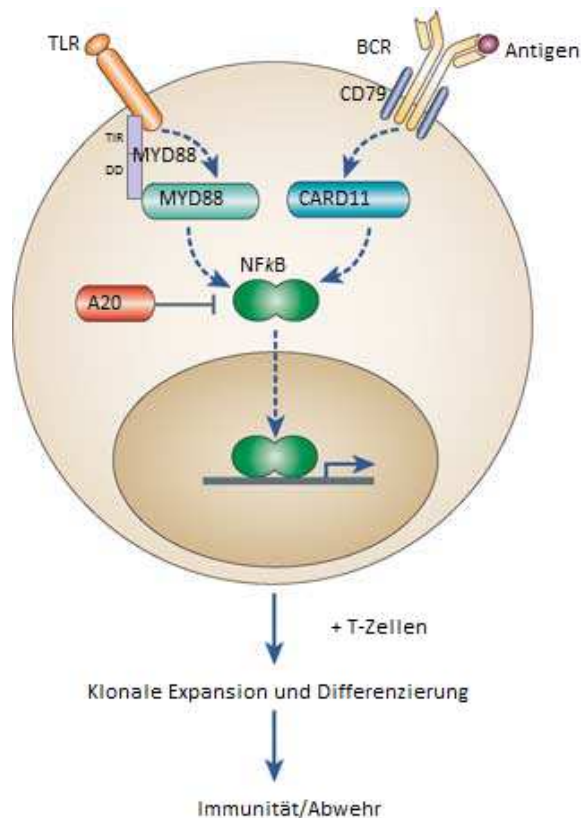


Abbildung 9: Aufbau und Signalweg von MyD88, modifiziert nach Jeelall et al.<sup>61</sup>

### MyD88 (L265P)-Mutation und die Rolle in der Pathogenese von B-Zell-Lymphomen:

Mutationen im NF-κB- und BCR-vermittelten Signalweg und deren Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung verschiedener B-Zell-Lymphome wurden in den vergangenen Jahren immer wieder impliziert. Ngo et al. beschrieben zum ersten Mal die MyD88 (L265P)-Mutation bei diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen (ABC-like-Typ). Eine einzelne Nukleotidvariante (c.794T>C) in der TIR-Domäne führt zu einem Austausch der Aminosäure Leucin zu Prolin an Position 265 der MyD88-Aminosäuresequenz (p.L265P).<sup>62-65</sup> Diese Mutation führt zu einer konstitutiven Aktivierung von NF-κB- und dem JAK-STAT3-Signalweg, woraus eine erhöhte Proliferation und das Überleben von Tumorzellen resultieren.<sup>58</sup>

Diese MyD88 (L265P)-Mutation spielt eine Rolle in der Pathogenese verschiedener B-Zell-Lymphome, die in der nachfolgenden Tabelle 10 aufgelistet sind.<sup>58, 59, 66-69</sup>

*Tabelle 10: MyD88 (L265P)-Mutation in B-Zell-Lymphomen*

<b>B-Zell-Lymphom</b>	<b>Häufigkeit des Vorkommens (%)</b>
Lymphoplasmazytische Lymphome (Morbus Waldenström)	Über 90 %
Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (ABC-like Typ)	Bis zu 29 %
Primäre diffuse großzellige B-Zell-Lymphome des zentralen Nervensystems	Bis zu 38 %
Primäre diffuse großzellige B-Zell-Lymphome des Hodens	Bis zu 68 %
Primär kutane diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (sog. Bein-Typ)	Bis zu 69 %
Monoklonale Gammopathie Unklarer Signifikanz (IgM-MGUS)	Bis zu 87 %
Splenische Marginalzonen-Lymphome	Bis zu 21 %
Extranodale Marginalzonen-Lymphome vom MALT-Typ, verschiedene Lokalisationen (Magen, Speicheldrüse, Orbitaregion)	Bis zu 9 %

## 1.5 Marginalzonen-Lymphome

Marginalzonen-Lymphome gehören zur Gruppe der kleinzelligen, indolenten B-NHL und machen ca. 10 % aller Lymphome aus.<sup>53, 55, 70, 71</sup>

Die Marginalzone schließt sich außen an die das Keimzentrum umgebende Mantelzone an und besteht aus kleinen bis mittelgroßen B-Lymphozyten.

Marginalzonen-Lymphome (MZL) werden nach der aktuellen WHO-Klassifikation in das nodale MZL, das splenische MZL und das extranodale MZL des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT-Lymphom) unterteilt. Letzteres ist mit ca. 8 % aller malignen Lymphome das häufigste MZL. Das

nodale und das splenische MZL werden hingegen seltener beobachtet, ca. 1 % aller malignen Lymphome.<sup>53, 55, 70-73</sup>

### 1.5.1 Extranodales Marginalzonen-Lymphom vom MALT-Typ

Das extranodale MZL vom MALT-Typ entwickelt sich in Organen mit Mukosa-assoziiertem lymphatischem Gewebe (MALT). Als MALT wird das lymphatische Gewebe der Schleimhäute bezeichnet, welches aber prinzipiell in jedem Organ vorkommen kann. Es kann primär vorhanden sein oder sich sekundär durch Antigenkontakt entwickeln. Primär entwickelt ist das MALT z.B. in Form der Peyerschen Plaques im Intestinaltrakt. Sekundär nach Antigenstimulation entwickeltes MALT-Gewebe findet sich häufig im Magen, in den Atemwegen, im Urogenitaltrakt, in den Augenanhangsgebilden oder in der Haut.<sup>1, 4</sup>

Ganz entsprechend kann sich das MALT-Lymphom prinzipiell in jedem Organ entwickeln. Typischer Manifestationsort ist der Gastrointestinaltrakt (50 %), wovon der Magen mit 85 % am häufigsten befallen ist. Andere typische Lokalisationsstellen sind Speicheldrüsen, Haut, Lunge, Schilddrüse, Tonsillen, Mamma und Augenanhangsgebilde. Das durchschnittliche Alter liegt bei ca. 60 Jahren, wobei Frauen insgesamt etwas häufiger betroffen sind. Als wichtiger ätiopathogenetischer Faktor gilt chronische Antigenstimulation durch Infektionen oder Autoimmunerkrankungen, die zur Ausbildung und Persistenz von lymphatischem Gewebe in den entsprechenden extranodalen Lokalisationen führen. Das bekannteste und am besten untersuchte Beispiel hierfür ist die Entstehung des extranodalen MZL vom MALT-Typ des Magens auf dem Boden einer chronischen *Helicobacter pylori*-assoziierten Gastritis.<sup>53, 55, 70, 73-75</sup>

Tabelle 11 zeigt die assoziierten Infektionen und Autoimmunerkrankungen mit den für sie typischen Lokalisationen.

Table 11: Typische Vorerkrankungen bei extranodalen MZL

Infektion/Autoimmunerkrankung	Manifestationsort
Helicobacter pylori	Magen
Chlamydia psittaci	Augenanhangsgebilde
Campylobacter jejuni	Darm
Borrelia burgdorferi	Haut
Hashimoto-Thyreoiditis	Schilddrüse
Sjögren-Syndrom	Speicheldrüse

Ebenso spielen chromosomale Veränderungen in der Pathogenese dieser Lymphome eine Rolle. Hierunter zählen die in Tabelle 12 stehenden Translokationen, die vor allem Gene betreffen, die den NF- $\kappa$ B-Signalweg in der B-Zelle regulieren. Die konstitutive Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt zu einer unkontrollierten Proliferation von B-Zellen. Die Translokation t(11;18)(q21;21) findet sich am häufigsten und kommt in 15-40 % der MALT-Lymphome vor. Ferner wurden Deletionen im Bereich des Tumorsuppressorgens TNFAIP3 (A20) in MALT-Lymphomen beschrieben.<sup>70, 73, 75-80</sup>

Table 12: Genetische Veränderungen bei extranodalen MZL

Chromosomale Aberration	Produkt/Folge	Häufigste Lokalisation
t(11;18)(q21;q21)	Entstehung eines Fusionsproteins AIP-2/MALT1	Magen Lunge
t(14;18)(q32;q21)	Transkriptionelle Deregulation von MALT-1	Augenanhangsgebilde Speicheldrüse
t(3;14)(p14.1;q32)	Transkriptionelle Deregulation von FoxP1	Schilddrüse Augenanhangsgebilde Haut
t(1;14)(q22;32)	Transkriptionelle Deregulation von BCL10	Lunge Magen

Das neoplastische Infiltrat eines MZL besteht typischerweise aus einer heterogenen Population von kleinen bis mittelgroßen B-Lymphozyten. Die Tumorzellen finden sich prädominant in den dann auch verbreiterten Marginalzonen, können aber auch Lymphfollikel kolonisieren bzw. in fortgeschrittenen Stadien präexistentes lymphatisches Gewebe vollständig destruieren. In Organen mit epithelalem Parenchym ist eine Infiltration und später auch Destruktion des Epithels durch neoplastische B-Zellen, sog. lymphoepitheliale Läsionen, typisch. Eine variabel ausgeprägte plasmazelluläre (Aus-) Differenzierung kann in einem Teil der MZL morphologisch bzw. immunhistochemisch nachgewiesen werden und ist speziell für diese Entität recht typisch. Diese neoplastischen, plasmazytoid differenzierten Zellen finden sich meist in Clustern und sind vor allem im Randbereich des lymphoid differenzierten Hauptinfiltrates zu finden. Hinsichtlich des Immunophänotypes zeigen die lymphoid differenzierten Tumorzellen Antigene reifer B-Zellen und exprimieren auf ihrer Oberfläche CD20 und CD79a, wohingegen CD5, CD10 und CD23 in der Regel nicht exprimiert werden. Kommt es zu einer plasmazellulären Ausdifferenzierung, werden CD38, CD138 und IRF4/MUM1 (Interferon regulatory factor 4) von dieser Population exprimiert. Durch die in plasmazytoid differenzierten Zellen vermehrte Expression/ Produktion der monoklonal rearrangierten Schwer- und Leichtketten, sind diese in der plasmazytoid differenzierten neoplastischen Population (im Gegensatz zu der lymphoid differenzierten neoplastischen Population) meist auch immunhistochemisch am Schnittpräparat detektierbar. Die Monoklonalität bzw. Leichtkettenrestriktion für Kappa oder Lambda ist in diesem Kontext insbesondere auch diagnostisch zur Unterscheidung von benignen, reaktiven gegenüber neoplastischen Infiltraten von Bedeutung. Im Hinblick auf die Schwerekettenexpression findet sich bei MZL generell IgM am häufigsten.<sup>53, 55, 70, 71, 73</sup>

Bei Diagnosestellung befinden sich die meisten Patienten mit einem extranodalen MZL im klinischen Stadium 1 oder 2 nach Ann-Arbor. Die Symptomatik variiert abhängig von der Primärlokalisierung, wobei eine sog. B-Symptomatik (Gewichtsverlust, Nachtschweiß, Fieber) nur von wenigen

Patienten angegeben wird. Infiltrationen ins Knochenmark oder Ausbreitung auf andere Organe kommen bei MALT-Lymphomen selten vor. Eine Transformation in ein diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom ist möglich, aber selten.<sup>53, 55, 72</sup>

Therapiert werden MALT-Lymphome in Abhängigkeit von der Primärlokalisierung und dem Stadium durch Exzision, Bestrahlung oder Chemotherapie nach unterschiedlichen Schemata.<sup>53, 72, 81-83</sup> Bei MALT-Lymphomen des Magens, verursacht durch *Helicobacter pylori*, kann eine Eradikationstherapie mit Antibiotika zur Ausheilung führen.<sup>84 53, 55, 73, 81</sup>

Insgesamt hat das extranodale MZL mit einer 5 Jahres-Überlebensrate von 70-95 % eine gute Prognose, wobei Rezidive recht häufig vorkommen, die sich sowohl in gleicher als auch in anderer Lokalisation manifestieren können. Eine Infiltration ins Knochenmark, eine Mitbeteiligung anderer Organe oder Rezidive verschlechtern die Prognose nicht zwingend.<sup>53, 72, 85</sup>

### **Primär kutanes Marginalzonen-Lymphom:**

Primär kutane B-Zell-Lymphome unterteilen sich in primär kutane folliculäre Lymphome (sog. Keimzentrumslymphome), primär kutane Marginalzonen-Lymphome und primär kutane diffuse großzellige B-Zell-Lymphome.<sup>53, 86, 87</sup> Das primär kutane MZL (PCMZL) ist mit 35-40 % das am häufigsten vorkommende primär kutane B-Zell-Lymphom. Nach der aktuellen WHO-Klassifikation gehört dieses zu den extranodalen MZL vom MALT-Typ<sup>53, 87</sup>. PCMZL sind definiert als Proliferation von kleinen B-Lymphozyten, lymphoplasmozytoiden Zellen und Plasmazellen.<sup>87, 88</sup> PCMZL manifestieren sich vorwiegend im 3.-5. Lebensjahrzehnt, können aber gelegentlich auch im Kindesalter vorkommen.<sup>89</sup> Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (m:w = 1,5-2:1).<sup>90</sup>

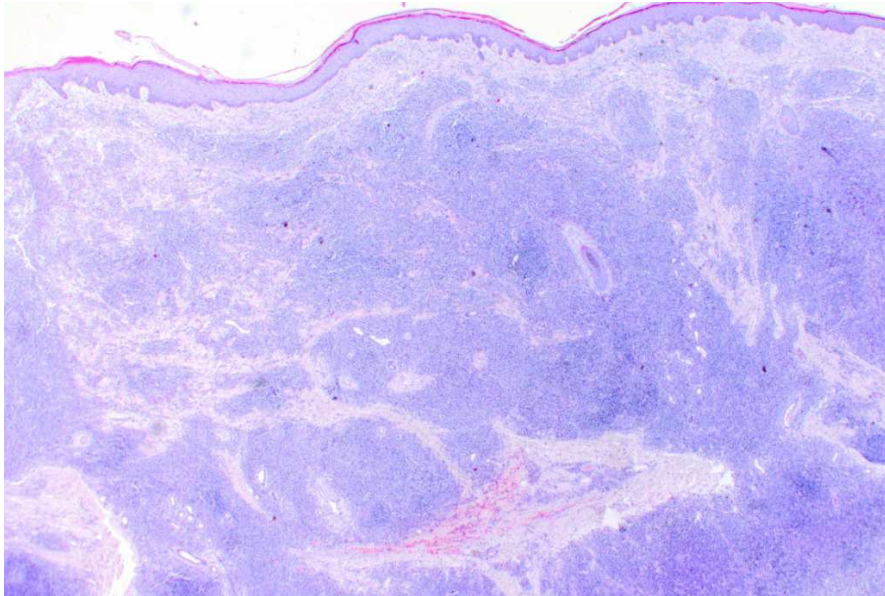
Ätiologie und Pathogenese sind bisher noch nicht gut verstanden. Wie oben bereits beschrieben, spielt auch bei den PCMZL eine chronische Antigenstimulation, verursacht durch Infektionen oder Autoimmunerkrankungen, eine pathogenetische Rolle. Hier steht vor allem die Infektion mit dem Bakterium *Borrelia burgdorferi* im Vordergrund, wobei es diesbezüglich offenbar



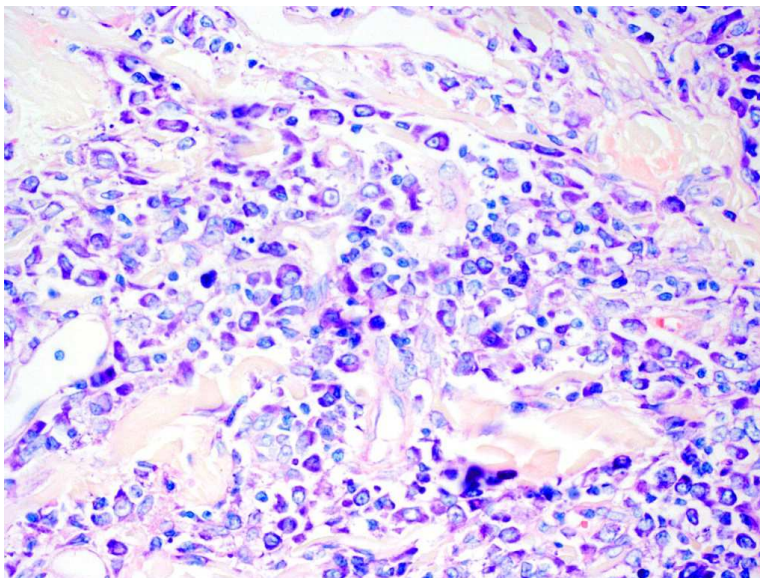
regionale Unterschiede gibt. Eine solche Assoziation wurde in Europa postuliert, wohingegen in den USA oder in Asien ein solcher Zusammenhang nicht evident ist.<sup>53, 86, 90-93</sup> Desweiteren wird ein Zusammenhang mit anderen chronischen Antigenstimuli wie Vakzination, Tätowierungen oder Bestrahlungstherapie bei der Genese kutaner Lymphome diskutiert<sup>90, 94, 95</sup>. Die oben beschriebenen chromosomalen Aberrationen spielen bei PCMZL offenbar nur eine untergeordnete Rolle, wenngleich die MALT-1-Translokation t(14;18) auch in bis zu 14 % der PCMZL nachgewiesen werden konnte. Translokationen, die die Gene für AIP2 (bis zu 8 %) und BCL10 (0 %) betreffen, können in PCMZL jedoch nur äußerst selten bzw. nicht nachgewiesen werden.<sup>53, 76-78, 91, 96-98</sup>

Zu den typischen morphologischen Merkmalen des PCMZL gehört ein meist knotiges, in fortgeschrittenen Läsionen auch ein diffuses lymphoides Infiltrat in der Dermis, das bis in die Subkutis reichen kann (vgl. Abbildung 10). Die Epidermis und eine Grenzzone zur Epidermis bleiben in der Regel infiltratfrei. Innerhalb der Infiltrate finden sich in einem Teil der Fälle noch kleine reaktive Lymphfollikel, die vom neoplastischen Infiltrat umgeben und ebenfalls durchsetzt/ kolonisiert werden. Der lymphoid differenzierte Anteil eines PCMZL besteht aus kleinen bis mittelgroßen B-Zellen, die oft eine unregelmäßige Kernkontur, ein gering aufgelockertes Chromatin und einen hellen Zytoplasmasaum aufweisen. In einer Vielzahl der Fälle findet sich eine plasmazelluläre Ausdifferenzierung mit lymphoplasmozytoiden und reifen Plasmazellen, die vor allem in der Peripherie des Infiltrates oder subepidermal in Erscheinung treten (vgl. Abbildung 11).

Immunphänotypisch zeigen die PCMZL eine Positivität für CD20 und die stark plasmazellulär ausdifferenzierten Zellen eine Positivität für CD138, wobei in Letzterem dann auch eine Leichtkettenexpression/-restriktion für Kappa oder Lambda immunhistochemisch detektierbar ist.<sup>53, 86, 87</sup> In dieser Population lässt sich dann auch eine Schwerkettenexpression immunhistochemisch nachweisen, wobei von PCMZL präferentiell IgG und nicht, wie von der Mehrzahl der extrakutanen MZL, IgM exprimiert wird.<sup>88, 99-101</sup>



*Abbildung 10: Typisches Infiltrat eines PCMZL. Das Infiltrat durchsetzt hier, unter Aussparung einer infiltratfreien Grenzzone zur Epidermis, sämtliche Schichten der Dermis und reicht bis in die Subkutis.*



*Abbildung 11: Ausschnitt eines PCMZL mit plasmazellulärer Differenzierung. Zu erkennen sind zahlreiche, plasmazellulär differenzierte Zellen mit exzentrisch gelegenem Zellkern und einem speziell, anhand der hier dargestellten Giemsa-Färbung, stark basophilen Zytoplasmasaum, das eine charakteristische Aufhellung in der Golgizone zeigt.*

Klinisch erscheint das PCMZL als roter, solitär oder multifokal vorkommender Knoten, Papel oder Plaque. Typische Primärmanifestationen sind Rücken, obere Extremität, Schulter und Stamm, wohingegen Kopf, Hals und untere Extremität seltenere Manifestationsorte sind.<sup>53, 86</sup>

Rezidive kommen in ca. 50 % der Fälle vor. Diese können sich in gleicher oder einer anderen Lokalisation manifestieren. Extrakutane Manifestationen finden sich hingegen in weniger als 10 %. Wichtig hierbei ist die Differenzierung des primär kutanen MZL von einer sekundären Hautinfiltration eines primär extrakutanen Lymphoms mittels Staging-Untersuchungen.<sup>88, 90, 102</sup>

PCMZL haben einen relativ indolenten Verlauf und zeigen eine 5-Jahres-Überlebensrate von über 95 %. Auch das Vorkommen von Rezidiven scheint an dieser exzellenten Prognose wenig zu verändern.

Die Therapieform richtet sich nach dem klinischen Stadium sowie dem Befallsmuster (lokal versus multifokal). Als Therapie bei lokal begrenzten Herdbefunden kommen Exzision oder lokale Bestrahlung zur Anwendung. Multifokaler oder disseminierter Hautbefall wird mit Observation (watch and wait) oder mit dem CD20-Antikörper Rituximab behandelt. In sehr seltenen Fällen, Therapie der zweiten Wahl, kommt eine systemische Chemotherapie nach bestimmten Schemata zum Einsatz. Ergänzend kann eine topische Therapie mit Steroiden oder IFN- $\alpha$  intraläsional erfolgen. In Ausnahmefällen kann Doxycyclin fakultativ in Endemiegebieten bei Infektionen mit *Borrelia burgdorferi* angewandt werden.<sup>88, 90, 103, 104</sup>

## 1.6 IgG<sub>4</sub>-assoziierte Erkrankung

Von Kamisawa et al<sup>105</sup> erstmals im Jahre 2003 beschrieben und seither viel diskutiert und zunehmend besser verstanden sind die sog. IgG<sub>4</sub>-assoziierten Erkrankungen. Es handelt sich hierbei um eine chronische, fibrosklerosierende, meist tumorbildende Entzündung, die in praktisch jedem Organ vorkommen kann und sich bei einem Teil der Patienten auch in multiplen Lokalisationen als

Systemerkrankung manifestiert.<sup>106, 107</sup> Zahlreiche, bereits lange bekannte Erkrankungen wurden in den vergangenen Jahren dieser neuen Entität zugeordnet, allen voran die autoimmune Pankreatitis Typ 1. Weitere Beispiele für IgG<sub>4</sub>-assoziierte Erkrankungen sind in Tabelle 13 aufgezeigt.<sup>106-109</sup>

*Tabelle 13: IgG<sub>4</sub>-assoziierte Erkrankungen*

<b>Organ</b>	<b>IgG<sub>4</sub>-assoziierte Erkrankungen</b>
Pankreas	Autoimmunpankreatitis Typ I
Leber und Gallenwege	IgG <sub>4</sub> -assoziierte Hepatitis IgG <sub>4</sub> -assoziierte Cholangitis
Kopf- und Halsbereich	Chronisch sklerosierende Sialadenitis Riedel-Struma Chronisch sklerosierende Dakryoadenitis Orbitale Pseudotumore Eosinophile angiozentrische und zervikale Fibrose Mikulicz-Syndrom Küttner-Tumor
Gefäße	IgG <sub>4</sub> -assoziierte Aortitis IgG <sub>4</sub> -assoziiertes abdominales Aortenaneurysma
Niere	IgG <sub>4</sub> -assoziierte interstitielle Nephritis
Retroperitonealraum	Morbus Ormond, retroperitoneale Fibrose
Gehirn	IgG <sub>4</sub> -assoziierte Hypophysitis IgG <sub>4</sub> -assoziierte Pachymeningitis
Genitalorgane	IgG <sub>4</sub> -assoziierte Prostatitis IgG <sub>4</sub> -assoziierte Orchitis
Lunge	Inflammatorischer Pseudotumor Idiopathische interstitielle Pneumonie Fibrosierende (sklerosierende) Mediastinitis
Lymphknoten	IgG <sub>4</sub> -assoziierte Lymphadenopathie Typ I bis V
Haut	IgG <sub>4</sub> -assoziierte Erkrankungen der Haut, Typ I bis VII

Diese Erkrankungen manifestieren sich bevorzugt ab dem 5. Lebensjahrzehnt. Männer sind generell häufiger betroffen als Frauen (62-83 % Männer, 3,5:1). Die Inzidenz ist bislang noch unklar.<sup>107, 108</sup>

Typisches histomorphologisches Charakteristikum der Erkrankung ist ein dichtes lymphoplasmazelluläres Infiltrat mit absoluter (>10/HPF in kleinen Biopsien bis > 50-200/HPF in größeren Gewebeproben) und relativer (> 40 % IgG<sub>4</sub>/IgG) Vermehrung IgG<sub>4</sub>-positiver Plasmazellen sowie eine ausgeprägte Fibrosklerose, eine obliterative Phlebitis und eine Vermehrung eosinophiler Granulozyten.<sup>107, 110-112</sup>

Die klinische Symptomatik variiert in Abhängigkeit von den jeweiligen Organmanifestationen. Es kann zu lokalen Raumforderungen mit Organschwellung bis hin zu Gewebeerstörungen kommen.<sup>106-108, 110</sup>

Typisches, aber nur bei etwa 60 % der Patienten zu beobachtendes, serologisches Merkmal ist eine Erhöhung des Serum-IgG<sub>4</sub>. Desweiteren können sich erhöhte Werte des sIL-6, des Rheumafaktors sowie erhöhte IgE-Werte im Serum neben polyklonaler Hypergammaglobulinämie und Komplementverbrauch finden.<sup>106, 107</sup> Als die drei Haupt-Diagnosekriterien gelten die klinisch/ radiologisch nachweisbare Raumforderung, das erhöhte Serum-IgG<sub>4</sub> zusammen mit der typischen, oben bereits beschrieben, Histologie.<sup>111, 112</sup>

Ätiologie und Pathogenese sind bisher unklar. Diskutiert werden eine allergische Genese, Infektionen und molekulares Mimikry sowie Autoimmunität. Regional unterschiedliche genetische Risikofaktoren werden vermutet, so HLA-Serotyp DRB1\*0405, DQB1\*0401 in Japan und HLA-Serotyp DQβ1-57 in Korea. Inwiefern die IgG<sub>4</sub>-Vermehrung Ursache oder Folge dieser Erkrankung ist, ist noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Grundsätzlich wird vermutet, dass T2-Helferzellen und regulatorische T-Zellen über bestimmte Zytokine, unter anderem IL-4, IL-10 und TGF-β, die Plasmazellen zum IgG<sub>4</sub>-Klassenwechsel veranlassen. Die Zytokine IL-4 und TGF-β sollen unter anderem auch für die typische Fibrose verantwortlich sein.<sup>28, 113, 114</sup> Weiterhin beschreiben Lighaam et al, dass neben regulatorischen T-Zellen auch regulatorische B-Zellen für eine vermehrte IL-10-Ausschüttung sorgen. Diese

werden zum Entzündungsort gelockt, interagieren dort mit mesenchymalen Stammzellen und durch kontinuierliche IL-10-Ausschüttung kommt es in den B-Zellen zum IgG<sub>4</sub>-Klassenwechsel und somit zur Entwicklung von IgG<sub>4</sub>-produzierenden Plasmazellen.<sup>27</sup> Weiterhin vermuten sie, dass der BCR dieser IgG<sub>4</sub>-produzierenden B-Zellen in der Fab-Region ungewöhnlich glykosyliert sei und mit einem, bisher unbekanntem, endogenem Lektin reagieren würde.<sup>27</sup>

IgG<sub>4</sub>-assoziierte Erkrankungen sprechen gut auf eine Therapie mit Steroiden an. Weiterhin können Immunsuppressiva wie Azathioprin oder Mycophenolat Mofetil sowie chirurgischen Maßnahmen und auch Rituximab zum Einsatz kommen.<sup>106, 115-117</sup>

## 1.7 Fragestellung und Ziele

Speziell bei MZL mit plasmazytoider Differenzierung kann immunhistochemisch eine klonale Leicht- und Schwerekettenexpression nachgewiesen werden. In Voruntersuchungen war aufgefallen, dass von primär kutanen MZL ungewöhnlich häufig IgG bzw. IgG<sub>4</sub> exprimiert wird, während extrakutanen MZL auch in der Literatur eine präferentielle IgM-Expression zugeschrieben wird. Eine überzufällig häufige IgG<sub>4</sub>-Expression ist in der Literatur nur für eine kleine Serie primär duraler MZL und in der Zusammenschau von Einzelfallberichten für MZL der okulären Adnexen dokumentiert.<sup>118-122</sup>

Bekanntermaßen können extranodale MZL vom MALT-Typ auf dem Boden chronisch entzündlicher Erkrankungen entstehen, ein Zusammenhang der insbesondere für die chronische HP-assoziierte Gastritis und das MZL vom MALT-Typ des Magens seit vielen Jahren anerkannt ist. Ein analoger pathogenetischer Zusammenhang zwischen einer sog. IgG<sub>4</sub>-assoziierten Erkrankung und einem IgG<sub>4</sub>-positiven MZL wurde speziell für die okulären Adnexen diskutiert, konnte aber bislang noch nicht definitiv bewiesen werden und ist somit Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Bemühungen.

In der hier vorgelegten Arbeit soll die Prävalenz einer IgG<sub>4</sub>-Expression an einer großen Kohorte von Marginalzonen-Lymphomen unterschiedlicher Primärlokalisationen untersucht werden, wobei hierfür ausschließlich MZL mit sekretorischer /plasmazellulärer Differenzierung herangezogen wurden, da nur in den plasmazellulär ausdifferenzierten Infiltratanteilen eine ausreichend hohe, immunhistochemisch detektierbare Leicht- und Schwerekettenexpression vorliegt. Weiterhin soll in den IgG<sub>4</sub>-positiven MZL anschließend eine Assoziation zu einer vorausgegangenen IgG<sub>4</sub>-assoziierten Erkrankung überprüft werden.

Da sich im Zuge der hier vorgelegten Arbeit eine IgG<sub>4</sub>-Expression praktisch ausschließlich für primär kutane MZL und in dieser Entität sogar für mehr als ein Drittel der Fälle zeigen ließ, sollen ferner das begleitende B- und T-Zell-Infiltrat in den PCMZL mit unterschiedlicher Schwerekettenexpression analysiert und verglichen werden, um Aufschluss darüber zu erlangen, ob die für einen IgG<sub>4</sub>-Klassenwechsel mitverantwortlichen Subpopulationen des Immunsystems auch in einem manifesten Lymphominfiltrat in anderer Verteilung vorhanden sind, als in den nicht-IgG<sub>4</sub>-rearrangierten MZL.

Desweiteren ergab sich die Frage, ob auch in der Pathogenese der PCMZL eine MyD88 (L265P)-Mutation eine Rolle spielt, die nach Literaturangaben in bis zu 10 % der extrakutanen Marginalzonen-Lymphome gefunden werden kann, jedoch für PCMZL noch nicht systematisch und an einem größeren Kollektiv untersucht worden war. Diesbezüglich wurden an dem in dieser Arbeit näher charakterisierten Kollektiv der PCMZL molekularbiologische Untersuchungen zur Frage einer MyD88 (L265P)-Mutation durchgeführt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Auswahl der Fälle

Aus dem Befundsystem des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg wurden Marginalzonen-Lymphome unterschiedlicher Primärlokalisationen in repräsentativer Anzahl ausgewählt. Zu den verschiedenen Lokalisationen zählten Haut, Magen-Darm-Trakt, Lymphknoten, Speicheldrüse, Auge, Lunge, Weichgewebe, Mamma, Oropharynx/ Larynx, Tonsille sowie Schilddrüse. Die in Paraffin eingebetteten Gewebelöcke und die dazugehörigen, bereits zur Diagnosestellung HE, Giemsa- und immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparate, wurden im Anschluss aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg herausgesucht und im Hinblick auf folgende Kriterien erneut mikroskopiert:

- 1.) Diagnose Marginalzonen-Lymphom nach den Kriterien der aktuellen WHO-Klassifikation
- 2.) Repräsentative Fallzahl aus verschiedenen Primärlokalisationen
- 3.) Sekretorische/ plasmazelluläre Differenzierung
- 4.) Immunhistochemisch detektierbare Leichtkettenexpression/-restriktion (Kappa/ Lambda)
- 5.) Materialtauglichkeit, ausreichend vorhandenes Restmaterial für die Durchführung der im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit erforderlichen Zusatzuntersuchungen

Fälle, die die Kriterien nicht erfüllten, wurden ausgeschlossen.

Es wurden 169 MZL aus insgesamt 13 verschiedenen Primärlokalisationen in die Studie aufgenommen (vgl. Tabelle 14), wobei die Fälle sich in zwei Gruppen, primär extrakutane MZL (n = 120) versus primär kutane MZL (n = 49), unterteilen lassen.



Tabelle 14: 169 MZL verschiedener Primärlokalisationen

Lokalisation	Anzahl
Haut	49
Magen	21
Speicheldrüse	20
Lymphknoten	20
Darm	12
Auge	12
Lunge	12
Weichgewebe	11
Mamma	3
Oropharynx/Larynx	3
Tonsille	3
Schilddrüse	1
Thymus	2

## 2.2 Ethikvotum und Datenschutz

Für die durchgeführten Untersuchungen an Archivmaterial des Pathologischen Instituts liegt ein entsprechendes Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg vor, wobei die Bearbeitung und Auswertung der Daten in anonymisierter Form erfolgte.

## 2.3 Immunhistochemie

### 2.3.1 Färbemethode

Mit immunhistochemischen Methoden können Proteine in einem histologischen Schnittpräparat durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden.<sup>4, 123</sup>

Antikörpermoleküle können unter dem Lichtmikroskop nicht gesehen werden. Deshalb werden Nachweis- bzw. Detektionssysteme zur Visualisierung der Bindung von Antikörpern an bestimmte Antigene in Zellen und Geweben

benötigt. Unterschieden wird eine direkte von einer indirekten Immunmarkierung. Die in der hier vorgelegten Arbeit verwendete Färbemethode basiert auf der indirekten Immunmarkierungsmethode und besteht aus den folgenden Schritten (Abbildung 12).<sup>123</sup>

Der Primärantikörper (Maus- oder Kaninchenantikörper) bindet in einem ersten Schritt an das gewünschte Antigen. In einem zweiten Schritt wird nun ein Sekundärantikörper hinzugegeben, der gegen den F<sub>c</sub>-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist und an diesen bindet (sekundäre anti-Maus- oder anti-Kaninchenantikörper). Als nächstes erfolgt die Zugabe eines Reagenz, das mit Meerrettichperoxidase polymerisierte Tertiärantikörper enthält. Diese Tertiärantikörper binden den F<sub>c</sub>-Teil des Sekundärantikörpers (spezifisch für Maus oder Kaninchen), wobei durch die an den Polymerstrang gekoppelten Enzyme (hier einer Peroxidase) nun die Chromogenfärbereaktion erfolgt. Hierfür wird 3,3' Diaminobenzidin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben, welches mit Hilfe der enzymatischen Reaktion zu einem braunen Endprodukt, das unlöslich in Alkohol oder anderen organischen Lösungsmitteln ist, oxidiert wird. Jeder Tertiärantikörper ist mit vielen Peroxidaseenzymen polymerisiert, so dass es zu einer verstärkten und sensitiven Farbreaktion kommt.<sup>4, 123, 124</sup>

### 2.3.2 Geräte und Materialien

Zur Durchführung der immunhistochemischen Färbungen wurden folgende Geräte und Materialien verwendet:

- Schlittenmikrotom SM2000R der Firma Leica
- Kühlplatte (-20 Grad Celsius) der Firma Medax
- SuperFrost®-Plus-Objektträger Firma Gerhard Menzel GmbH
- Vario-Pipetten und dazugehörige Pipettenspitzen der Firma Eppendorf
- Racks der Firma Shandon®
- Shandon® Coverplates
- Vortexer der Firma Bender und Hobein AG
- Folieneindeckautomat Tissue-Tek® der Firma Sakura
- Lichtmikroskop der Firma Olympus (BX50)
- Eppendorf Safe-Lock Tubes der Firma Eppendorf

- Dampfkochtopf von WMF

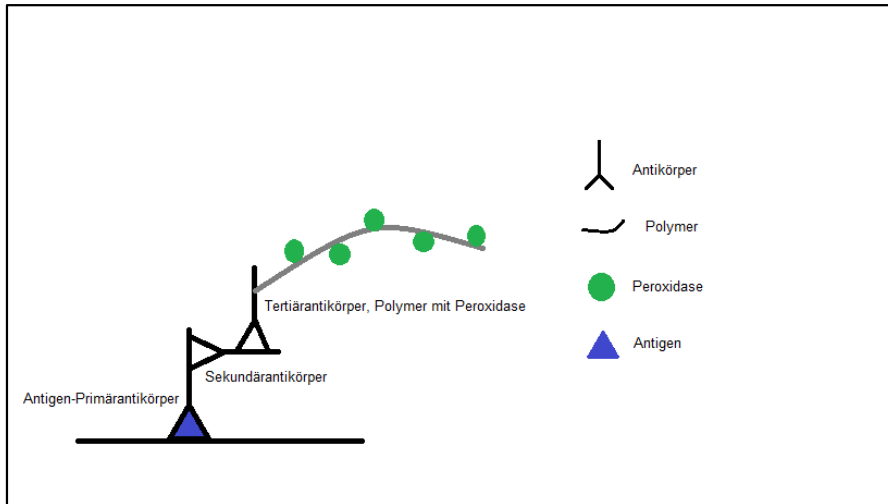


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbemethode, modifiziert nach Education Guide Immunohistochemical (IHC) Staining Methods<sup>124</sup>

### 2.3.3 Chemikalien

Zur Durchführung der immunhistochemischen Färbungen wurden folgende Chemikalien verwendet:

- Wasserbad mit destilliertem Wasser, 50 °C
- Alkoholreihe (100 %, 90 %, 80 %, 70 %)
- Xylol
- Destilliertes Wasser
- Leitungswasser
- 20mM Citratpuffer, pH 6,0
  - 42 g Citronensäure
  - 21 g NaOH Plätzchen
- Target Retrieval S1699, pH 6,1, Firma Dako
- PBS-Puffer, pH 7,4
  - 72,0 g NaCl
  - 14,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 4,3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Advance<sup>TM</sup> HRP Detection kit, K4068 der Firma Dako:
  - Advance<sup>TM</sup> HRP link (Sekundärantikörper)
  - Advance<sup>TM</sup> HRP Enzym (Tertiärantikörper)

- DAB (Diaminobenzidin) K3468 der Firma Dako
- Hämatoxylin

### 2.3.4 Primärantikörper

In Tabelle 15 sind die verschiedenen Primärantikörper, deren Verdünnung und entsprechende Vorbehandlung der Gewebeschnitte aufgeführt, die im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit verwendet wurden. Zur Verdünnung der Primärantikörper wurde Antibody Diluent der Firma DAKO verwendet.

*Tabelle 15: Primärantikörper*

Antikörper	Firma	Klon	Verdünnung	Vorbehandlung
IgA	Dako	Polyklonal	1:20 000	CS 6.0
IgM	Dako	Polyklonal	1:20 000	CS 6.0
IgG	Epitomics	EPR4422	1:500	CS 6.0
IgG <sub>4</sub>	Invitrogen	HP6025	1:8 000	TR 6.1
IgE	Dako	Polyklonal	1:2 000	CS 6.0
Kappa	Dako	Polyklonal	1:80 000	CS 6.0
Lambda	Dako	Polyklonal	1:80 000	CS 6.0
CD20	Dako	L26	1:500	CS 6.0
CD5	Novocastra	4C7	1:500	CS 6.0
CD4	Novocastra	1FG	1:40	CS 6.0
CD8	Dako	C8/144B	1:80	CS 6.0
FoxP3	Abcam	236A/E7	1:50	TR 6.1
PD1	Abcam	NAT	1:200	TR 6.1

### 2.3.5 Immunhistochemische Einfachfärbungen

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcke werden zunächst auf einer Eisplatte bei minus 20 °C gekühlt, um mit dem Schlittenmikrotom sehr dünne (4 µm) Paraffinschnitte anfertigen zu können. Die Paraffinschnitte werden mit dem Pinsel vom Mikrotom abgenommen und in einem Wasserbad gesammelt. Anschließend werden die Schnitte einzeln in ein heißes Wasserbad (50 °C) überführt und auf Objektträger von Hand faltenfrei aufgezogen. Die Objektträger werden in Metallständer gestellt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Am nächsten Tag folgt die eigentliche immunhistochemische Färbung. Die getrockneten Paraffinschnitte werden zum Entparaffinieren in Xylol überführt. Diese verbleiben nun für 25 Minuten in Xylol, so dass das Paraffin vollständig aus dem Gewebe herausgelöst werden kann. Daraufhin erfolgt die Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (100 %, 90 %, 80 %, 70 %), jeweils 2 Küvetten pro Alkoholverdünnung. Die vollständig rehydrierten Schnitte werden zur Entfernung des noch verbliebenen Alkohols nun für eine Minute in destilliertem Wasser gespült. Im Anschluss folgt die Weiterbehandlung der Schnitte im Dampfkochtopf. Der Boden des Dampfkochtopfes wird mit 400 ml destilliertem Wasser gefüllt, die Ständer mit den Objektträgern in einen Einsatz des Dampfkochtopfes überführt und auf das Fußgestell des Dampfkochtopfes gebracht. Für die Vorbehandlung werden anschließend die Ständer mit der jeweiligen, für die Antikörper nötigen Vorbehandlungslösung (Citratpuffer oder Target Retrieval) übergossen, so dass alle Objektträger gut bedeckt sind. Citratpuffer wird zur Vorbehandlung im Wasserkocher auf 100 °C erhitzt, wohingegen Target Retrieval kalt über die Schnitte gegossen werden muss. Die Objektträger werden nun für 9-15 Minuten im Dampfkochtopf gekocht, wobei die optimale Temperatur bei ca. 120 °C liegt. Durch die Fixierung in Formalin wurden Aldehydvernetzungen gebildet, die nun durch die Vorbehandlung im Dampfkochtopf wieder gebrochen werden müssen, damit das maskierte Antigen wieder zugänglich für den Primärantikörper ist und dieser binden kann. Dies wird auch als sog. Antigendemaskierung bezeichnet.<sup>4, 123</sup> Anschließend

werden die gekochten Objektträger in destilliertem Wasser für einige Minuten gespült, um die zur Vorbehandlung nötige Lösung zu entfernen.

Als nächstes werden die Objektträger in Shandon Coverplates® eingelegt. Hier ist besonders auf einen optimalen und luftblasenfreien Sitz der Objektträger in den Coverplates zu achten, damit die nachfolgend aufzubringenden Flüssigkeiten das jeweilige Gewebe gut benetzen und anhaften können, um ein optimales und gleichmäßiges Färbeergebnis zu erzielen. Die Färbeschritte erfolgen nun nach dem unten aufgeführten Protokoll.

1. Spülen der Objektträger mit PBS-Puffer-Lösung für sieben Minuten.
2. Primärantikörper, 130 µl pro Objektträger, eine Stunde Einwirkzeit.
3. Spülen der Schnitte mit PBS-Puffer-Lösung für sieben Minuten. Hierdurch wird der nicht gebundene, überschüssige Primärantikörper abgewaschen.
4. Sekundär-Antikörper: Advance™ HRP Link, 100 µl pro Objektträger, 30 Minuten Einwirkzeit.
5. Spülen in PBS-Puffer-Lösung für sieben Minuten zum Abwaschen des nicht gebundenen, überschüssigen Sekundärantikörpers.
6. Tertiär-Antikörper: Advance™ HRP Enzyme, 100 µl pro Objektträger, 30 Minuten Einwirkzeit.
7. Spülen in PBS-Puffer-Lösung für sieben Minuten zum Abwaschen des nicht gebundenen, überschüssigen Tertiärantikörpers.
8. DAB-Lösung, 200 µl pro Objektträger, zehn Minuten Einwirkzeit.
9. Spülen in PBS-Puffer-Lösung für sieben Minuten.
10. Entfernen der Objektträger aus den Coverplates und Überführen in Ständer, die für den Eindeckautomaten geeignet sind.
11. Gegenfärbung der Objektträger mit Hämatoxylin, drei Minuten Einwirkzeit.
12. Bläuen der Objektträger in Leitungswasser für zehn Minuten. Hierdurch kommt es zur Erhöhung des pH-Wertes und zum, für die Hämatoxylinfärbung typischen, blau-violetten Farbumschlag.
13. Tauchen der Ständer mit den Objektträgern in absoluten Alkohol und anschließend Trocknung der Objektträger im Wärmeschrank (56 °C) für 25 Minuten.

14. Eindecken der Objektträger im Eindeckautomaten. Hierfür werden die Objektträger in entsprechende Ständer gestellt, kurz in Xylol getaucht und anschließend in den Automaten eingebracht. Dieser zieht nun automatisch eine Folie über das Schnittpräparat auf dem Objektträger.

## 2.3.6 Fluoreszenzfärbung

### 2.3.6.1 Auswahlkriterien für die Färbung

Marginalzonen-Lymphome mit Positivität für IgG<sub>4</sub> wurden einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen. Hierdurch sollte die Expression von IgG<sub>4</sub> in den MZL validiert werden, die eine Positivität für den Pan-IgG-Antikörper gezeigt hatten. Desweiteren wurden Fälle, bei denen aus materialtechnischen Gründen eine zweifelsfreie Bestimmung einer monotypischen Leicht- und/ oder Schwerekettenexpression nicht möglich war, mittels Immunfluoreszenzdoppel- oder -dreifachfärbung, validiert.

### 2.3.6.2 Färbemethode

Für diese Methode wurden fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper verwendet.

### 2.3.6.3 Materialien und Chemikalien

Die folgenden Materialien und Chemikalien wurden für die Immunfluoreszenzfärbung benötigt.

- Schlittenmikrotom SM2000R der Firma Leica
- Kühlplatte (-20 °C) der Firma Medax
- SuperFrost®-Plus-Objektträger der Firma Gerhard Menzel GmbH
- Dampfkochtopf von WMF
- Vario-Pipetten und dazugehörige Pipettenspitzen der Firma Eppendorf
- Färbebank mit feuchter und lichtgeschützter Kammer

- Plattformschüttler der Firma Phoenix Instrument
- Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop TCS SP2 der Firma Leica
- Wasserbad mit destilliertem Wasser, 50 °C
- Alkoholreihe (100 %, 90 %, 80 %, 70 %)
- Xylol
- Destilliertes Wasser
- Leitungswasser
- 20mM Citratpuffer, pH 6,0 (Zusammensetzung siehe unter 2.3.3)
- Target Retrieval S1699, pH 6,1, Firma Dako
- TRIS-Puffer (pH 7,6/ 0,1M), Stammlösung
  - 12,1g Tris
  - 90g NaCl
  - 600 ml destilliertes Wasser, pH-Wert auf 7,6 einstellen
  - Auffüllen ad 1000 ml destilliertes Wasser
  - Aus der fertigen Stammlösung wurden nun 100 ml zu 900 ml destilliertem Wasser hinzugefügt.
- Antibody Diluent der Firma Dako
- Eindeckmittel Fluormount G® der Firma Biozol

#### 2.3.6.4 Primärantikörper und fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper

Für Doppel- oder Mehrfachfärbungen wurden idealerweise Antikörper unterschiedlicher Tierspezies gewählt, um eine mögliche Kreuzreaktion zu verhindern. Die Verdünnungen der verwendeten Antikörper wurden dem Protokoll entsprechend austitriert und an die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper angepasst. Tabelle 16 zeigt die bereits unter 2.3.4 beschriebenen Primärantikörper mit der jeweiligen Tierspezies und austitrierten Verdünnungsstufen.

Die fluorchromkonjugierten Sekundärantikörper wurden passend zur Tierart der Primärantikörper gewählt. Bei Doppel- oder Mehrfachfärbungen wurden Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Wellenlängen und Emissionsraten gewählt, so dass eine eindeutige Auswertung gewährleistet werden konnte.

Tabelle 17 zeigt die verwendeten fluorchromkonjugierten Sekundärantikörper.



Tabelle 16: Immunfluoreszenz- Antikörper

Primärantikörper	Tierspezies	Verdünnung
IgG	Kaninchen	1:125
IgG <sub>4</sub>	Maus	1:2000
Kappa	Kaninchen	1:5000
Lambda	Kaninchen	1:5000
CD138	Maus	1:100
CD56	Maus	1:20
ICSAT	Ziege	1:200

Tabelle 17: Fluorchromkonjugierte Sekundärantikörper (Firma Dianova)

Bezeichnung	Absorptionsmaximum/ Emissionsmaximum	Verdünnung	Tierspezies
Esel anti-Maus Alexa555	553nm, 568nm	1:400	Maus
Esel anti- Kaninchen Alexa555	553nm, 568nm	1.400	Kaninchen
Esel anti-Maus Alexa488	493nm, 519nm	1:400	Maus
Esel anti-Ziege Cy <sup>5</sup>	650nm, 670nm	1:100	Ziege

### 2.3.6.5 Immunfluoreszenzfärbung

Die Entparaffinierung, Rehydrierung und Vorbehandlung im Dampfkochtopf der zu färbenden Objektträger erfolgte wie unter 2.3.5 beschrieben.

Die nun folgenden Färbeschritte erfolgten in einer Färbekammer mit feuchter und lichtgeschützter Kammer.

1. Die Objektträger wurden um das Gewebe herum trocken gewischt.
2. Auftragen von 100 µl Antibody Diluent auf die Gewebeproben, zehn Minuten Einwirkzeit, dann abkippen.

3. Auftragen des ersten Primärantikörpers. Auf kleine Gewebeproben wurden 100 µl und auf größere Gewebeproben 200 µl Antikörper pro Objektträger aufgetragen, eine Stunde Einwirkzeit.
4. Dreimaliges Spülen der Objektträger in TRIS-Puffer. Hierfür wurden die Objektträger in eine Glasküvette gestellt und für jeweils 5 Minuten auf dem Plattformschüttler im Puffer gespült, so dass der nicht gebundene, überschüssige Primärantikörper vollständig entfernt wurde.
5. Nun erfolgte das Auftragen des ersten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers, 100 µl für kleine und 200 µl für größere Gewebeproben. eine Stunde Einwirkzeit.
6. Dreimaliges Spülen der Objektträger in TRIS-Puffer für jeweils fünf Minuten zur Entfernung des nicht gebundenen, überschüssigen Sekundärantikörpers. Hierfür wurden nun lichtgeschützte Glasküvetten verwendet.
7. Auftragen des zweiten Primärantikörpers, 100 µl für kleine und 200 µl für größere Gewebeproben, eine Stunde Einwirkzeit.
8. Dreimaliges Spülen der Objektträger in TRIS-Puffer, für jeweils fünf Minuten, in lichtgeschützten Küvetten zur Entfernung des nicht gebundenen, überschüssigen zweiten Primärantikörpers.
9. Auftragen des zweiten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers, 100 µl für kleine bzw. 200 µl für größere Gewebeproben. Einwirkzeit von einer Stunde.
10. Dreimaliges Spülen der Objektträger in TRIS-Puffer zur Entfernung des nicht gebundenen, überschüssigen zweiten Sekundärantikörpers, jeweils fünf Minuten in lichtgeschützten Glasküvetten.
11. Eindecken der Objektträger mit dem Fluoromount G® der Firma Biozol. Der noch verbliebene Puffer wurde um das Gewebe herum abgewischt. Anschließend erfolgte die Auftragung von einem Tropfen Fluormount G® und das Eindecken der Objektträger mit den Deckgläsern. Hier war darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen Gewebeprobe und Deckglas entstehen.

### 2.3.6.6 Auswertung mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie

Die gefärbten Gewebeproben wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop TCS SP2 der Firma Leica ausgewertet. Hierfür wurde die Software Leica Confocal Software genutzt und Bildaufnahmen erstellt.

## 2.4 Evaluationskriterien der Immunglobulinleicht- und -schwerkettenexpression

Wie oben bereits beschrieben, wurden lediglich MZL mit sekretorischer/plasmazellulärer Differenzierung und immunhistochemisch nachweisbarer Immunglobulinleicht- und -schwerkettenexpression in die Studie aufgenommen. Die Auswertung der Immunglobulinleicht- und -schwerkettenexpression erfolgte für alle Fälle am Lichtmikroskop. Das physiologische Verhältnis der Leichtkettenexpression von Kappa zu Lambda liegt bei etwa 1,5 : 1. Eine einheitliche Definition einer Leichtkettenrestriktion findet sich in der Literatur nicht, wobei ein um das 4-fache verschobene Verhältnis als verlässlich angesehen werden kann. Da klonale B-Zell-Populationen eine monotypische Kappa- oder Lambdaexpression zeigen und in den hier untersuchten Lymphomen, die diesbezüglich immunhistochemisch detektierbaren lymphoplasmozytoid bzw. plasmazellulär differenzierten Anteile des neoplastischen Infiltrates charakteristischerweise den Anteil reaktiver Plasmazellen deutlich überwiegen, stellte die Definition einer Leichtkettenrestriktion bei optimalen Gewebeschaffenheiten und optimalen Färbereaktionen kein relevantes Problem dar (vgl. auch 3.1.1). Die Bestimmung der monotypischen Immunglobulinschwerkettenexpression (IgA, IgG, IgG<sub>4</sub>, IgM, IgE) erfolgte im Vergleich zu den Leichtketten-restringierten Tumorzellen, d. h. ob von dieser Population nach Anzahl und Verteilung auch eine bestimmte Schwereketten exprimiert wurde, während sich in den Färbungen für die jeweils anderen Schwereketten nur wenige locker gelegene, reaktive Plasmazellen nachweisen ließen.

In MZL mit Positivität für die Schwereketten IgG<sub>4</sub> wurde die absolute Zahl an IgG und IgG<sub>4</sub>-positiven, Leichtketten-restringierten Plasmazellen an fünf verschiedenen high-power fields ausgezählt und so das Verhältnis von IgG<sub>4</sub>/IgG ausgewertet. Ein Verhältnis von > 70 % wurde als Wert festgelegt, ab dem ein MZL als IgG<sub>4</sub>-positiv beschrieben werden konnte. Da die IgG und IgG<sub>4</sub>-Antikörper etwas unterschiedliche Färbereigenschaften aufweisen, wurden diese Untersuchungen mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbungen bei allen IgG<sub>4</sub>-positiven MZL validiert. Desweiteren wurden Fälle, bei denen aus materialtechnischen Gründen eine zweifelsfreie Bestimmung einer monotypischen Leicht- und/ oder Schwerekettenexpression nicht möglich war mittels Immunfluoreszenzdoppel- oder -dreifachfärbung validiert.

## 2.5 Primär kutane Marginalzonen-Lymphome

An den primär kutanen MZL erfolgte zusätzlich eine Analyse des B- und des T-Zell-Infiltrates hinsichtlich verschiedener, unten aufgeführter Kriterien. Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop. Statistisch wurden IgG<sub>4</sub>-positive PCMZL mit den PCMZL verglichen, die eine andere Schwerekettenexpression aufwiesen.

### 2.5.1 Analyse des B-Zell-Infiltrates

Im Hinblick auf den mit dem B-Zell-Marker CD20 darstellbaren B-zellulären Anteil des Gesamtinfiltrates wurde das Vorhandensein oder das Fehlen von Lymphfollikeln sowie bei Nachweis von Lymphfollikeln auch die Ausbildung bzw. das Fehlen von Keimzentren bewertet. Folgende Marker wurden für diese Auswertung verwendet (Tabelle 18).

Tabelle 18: Analyse des B-Zell-Infiltrates

Marker	Kriterium	Kategorien
CD20 (Pan-B-Zell-Marker)	B-Zellen, Lymphfollikelbildung oder diffuse Infiltration	Lymphfollikelbildung Diffuse Infiltration
CD10, BCL6 (Keimzentrumsmarker)	Keimzentrumsbildung	Lymphfollikel mit Keimzentrumsbildung Lymphfollikel ohne Keimzentrumsbildung

### 2.5.2 Analyse des T-Zell-Infiltrates

Hinsichtlich des T-Zell-Infiltrates der PCMZL wurde zunächst der Anteil der T-Zellen am gesamten lymphoiden Infiltrat in Relation zum B-Zell-Infiltrat geschätzt. Desweiteren wurde die Verteilung und das Vorhandensein unterschiedlicher T-Zell-Subpopulationen (T-Helfer-/zytotoxische T-Zellen, regulatorische T-Zellen, folliculäre Helfer-T-Zellen) bewertet und quantifiziert. Die folgende Tabelle 19 zeigt die hierfür verwendeten Marker und die unterteilten und ausgewerteten Kategorien.

Tabelle 19: Analyse des T-Zell-Infiltrates

Marker	Kriterium	Kategorien
CD5 (Pan-T-Zell-Marker)	T-Zell-Infiltrat, T-Zellgehalt, bezogen auf das Gesamtinfiltrat	Gering (< 20 %) Intermediär (20-50 %) Hoch (> 50 %)
CD4, CD8	CD4-positive T-Helferzellen, CD8-positive zytotoxische T-Zellen	CD4/CD8-positive T-Zellen: > 3:1 < 3:1
FoxP3	Regulatorische T-Zellen	Anteil am gesamten T-Zell-Infiltrat: < 1 % 1-5 % 5-10 % > 10%
PD1	Follikuläre Helfer-T-Zellen	Anteil am gesamten T-Zell-Infiltrat: < 1 % 1-5 % 5-10 % > 10 %

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Untersuchungen zum Nachweis einer MyD88 (L265P)-Mutation wurden an den primär kutanen MZL durchgeführt. Hierzu wurde die relevante Region im Exon 5 (Position 794 der DNA; Codon 265) mittels PCR amplifiziert und mit der Sanger-Methode sequenziert.

## 2.6.1 Materialien und Chemikalien

Tabelle 20: Verwendete Materialien

Geräte	Firma
Schlittenmikrotom SM2000R	Leica
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415 D
Vortexer	Bender und Hobein AG
Thermocycler	Eppendorf
Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Gelelektrophoresekammer	cti gmbh
Power Supply	Pharmacia
Geldokumentation red <sup>®</sup>	ProteinSimple
<b>Materialien</b>	
Pipetten	Eppendorf AG
Pipettenspitzen	Eppendorf AG
Eppendorf-Caps	Eppendorf AG
QIAamp Mini spin column	QIAGEN Hilden, Germany
8-Strip-PCR Tube	STAR LAB
<b>Kits</b>	
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN Hilden, Germany
QIAquick PCR Purification kit	QIAGEN Hilden, Germany
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Life Technologies GmbH Darmstadt, Germany
<b>Software</b>	
ChromasPro Software	ChromasPro Version 1.6 (2012), Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia

Tabelle 21: Primer

MyD88-Primer	Sequenz	Firma
Forward	5'-TGCCAGGGGTA CTTAGATGGGG-3'	Euofins Genomics, Ebersberg, Germany
Reverse	5'-AGGCCCTGGGTGTGTGTGTA-3'	Euofins Genomics, Ebersberg, Germany

## 2.6.2 DNA-Extraktion aus Paraffinmaterial

Zunächst wurde die genomische DNA aus dem Paraffinmaterial extrahiert. Hierzu wurden von den Paraffingewebeblöcken mit dem Schlittenmikrotom 10 µm dicke und in Abhängigkeit des Infiltratmaßes bis zu 2-10 Paraffinröllchen gefertigt. Diese wurden mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit zur DNA-Extraktion entsprechend den Anweisungen des Herstellers weiterverarbeitet.

## 2.6.3 PCR und Sequenzierung

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) lassen sich bestimmte DNA-Abschnitte vervielfältigen. Hierfür sind ein bestimmtes Enzym (Polymerase) sowie sog. Primer notwendig. Primer sind kurze einzelsträngige Oligonukleotide, deren Basenabfolge komplementär zum Anfang und zum Ende des gesuchten DNA-Abschnittes ist und somit spezifisch an diese binden kann, so dass die Polymerase den Abschnitt zwischen den beiden Primern vervielfältigen kann. Diese zyklische Amplifikation besteht aus den folgenden drei Schritten<sup>4, 125</sup>

- Denaturierung: Trennung der doppelsträngigen DNA, bei ca. 94 °C. Zwei zueinander komplementäre Einzelstränge entstehen.
- Annealing: Bindung der Primer an die komplementäre Sequenz des gesuchten DNA-Abschnittes, bei 50-60 °C, abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer ( $T_A$  °C).
- Elongation des durch Primer gebundenen DNA-Abschnittes durch die Polymerase, bei ca. 72 °C (Temperaturoptimum der Polymerase).

Alle drei Schritte laufen mehrmals hintereinander ab, wodurch es zu einer exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnittes kommt.

Folgender PCR-Reaktionsansatz (Mastermix) wurde in dieser Arbeit verwendet:

- 17,5 µl Aqua dest.
- 2,5 µl PCR-Puffer (10x-MgCl<sub>2</sub>)
- 0,5 µl dNTP der Firma Genaxxon bioscience



- 1,0 µl Primer Forward (MyD88 der Firma Eurofins, 10 pmol/µl)
- 1,0 µl Primer Reverse (MyD88 der Firma Eurofins, 10 pmol/µl)
- 0,13 µl Taq-Polymerase der Firma Genaxxon Bioscience

Nach Zufügen von 1,5 µl extrahierter DNA wurden die Reaktionsgemische in den Thermocycler überführt und durchliefen das folgende Protokoll.

*Tabelle 22: PCR-Protokoll*

Temperatur	Zeit	Schritte
95 °C	3 Minuten	
95 °C	30 Sekunden	Denaturierung
60 °C	30 Sekunden	Annealing
72 °C	30 Sekunden	Elongation
72 °C	7 Minuten	
8 °C	Hold	

35 Zyklen, wobei die Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsschritte fortlaufend wiederholt werden.

### **Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung der mithilfe der PCR gewonnen DNA-Fragmente wurde im nächsten Schritt die Gelelektrophoresemethode angewandt. Durch eine Elektrophorese werden DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt. In dieser Arbeit wurden 2 % Agarosegele verwendet. Zur Herstellung des Agarosegels wurde 2 g Agarose der Firma Genaxxon Bioscience zusammen mit 100 ml TBE-Puffer 3 Minuten in der Mikrowelle gekocht, anschließend 7 µg des Fluoreszenzfarbstoffes GelRed® der Firma Genaxxon Bioscience, welcher die DNA im Agarosegel färbt, hinzugefügt und die Flüssigkeit auf Platten gegossen. Ein spezieller Kamm wurde zur Erzeugung von Geltaschen in die noch flüssige Substanz eingebracht. Nach ca. 30 Minuten hat sich das Gel verfestigt und kann verwendet werden. 4 µl PCR-Produkt wurde zur Erhöhung der Dichte sowie zur Konstanthaltung des pH-Wertes mit einem Ladepuffer (GelPilot DNA Loading Dye der Firma Qiagen) gemischt und in die Geltaschen

pipettiert. Desweiteren wurde neben die Gewebeproben eine 100bp-Leiter (GeneRuler 100bp DNA Ladder der Firma Thermo Fisher Scientific) zur Fragmentlängenbestimmung mit aufgetragen. Anschließend wurde zur Auftrennung der Proben an das Gel eine Spannung von 100 V angelegt. Nach ca. 10 Minuten Laufzeit wurde mit Hilfe der Geldokumentation unter UV-Licht die mit GelRed® im Agarosegel gefärbten Banden sichtbar gemacht und der Sequenzierung zugeführt.

## Sequenzierung

Zur Sequenzierung mittels der Cycle-Sequenzierungsmethode wurde das BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit verwendet.

Zur Entfernung möglicher niedermolekularer Verunreinigungen erfolgte zunächst eine Aufreinigung der PCR-Produkte mittels des QIAquick PCR Purification kit der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers.

Sequenzierungs-PCR-Reaktionsansatz:

- 4 µl Aqua dest.
- 1 µl BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit
- 1 µl MyD88-Primer Forward
- 4 µl DNA (aufgereinigtes PCR-Produkt)

→ analoger Ansatz mit Primer Reverse.

Die Reaktionsgemische wurden anschließend in den Thermocycler überführt und durchliefen das in Tabelle 23 dargestellte Protokoll.

*Tabelle 23: Sequenzierungs-PCR-Protokoll (35 Zyklen)*

Temperatur	Zeit
95 °C	1 Minute
95 °C	15 Sekunden
50 °C	15 Sekunden
60 °C	2 Minuten
8 °C	Hold

### **Sephadexaufreinigung:**

Die Aufreinigung mit Sephadex dient dazu, niedermolekulare Verunreinigungen und Nukleotide aus dem Sequenzierungs-PCR-Produkt zu entfernen. Hierzu werden Pipettenspitzen mit Sephadex G50 befüllt und anschließend das Sequenzierungs-PCR-Produkt aufgetragen. Durch Zentrifugation bleiben die unerwünschten Bestandteile, wie Primer und Nukleotide, im Sephadex zurück. Folgendes Protokoll wurde hierfür verwendet:

1. Pipettenspitzen mit 250 µl Sephadex G50 der Firma GE Healthcare Life Sciences befüllen.
2. Zentrifugation: 3 Minuten 3600 rpm x 1000. Dieser Schritt dient der Abzentrifugation und dem Verwerfen der Sephadex-Flüssigkeit.
3. Umsetzen der Pipettenspitzen auf neue Eppendorf-Caps.
4. 10 µl Sequenzierungs-PCR-Produkt pipettieren.
5. Zentrifugation: 3 Minuten 3600 rpm x 1000.
6. Pipettenspitzen abnehmen und Auffangen des aufgereinigten Produktes im Reaktionsgefäß.

Zur Vorbereitung für den Sequenzer wurde zu den aufgereinigten Proben 20 µl Hi-Di™ Formamide hinzugefügt, die Mischprodukte auf Mikrotiterplatten pipettiert und anschließend im Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer analysiert. Mit Hilfe der ChromasPro Software wurden die Daten ausgewertet. Hierzu wurde die Nukleotidsequenz des entsprechenden Codons im Exon 5 (Position 794 der DNA bzw. Position 265 der Aminosäuresequenz) des MyD88-Gens analysiert und auf eine Mutation von Thymin zu Cytosin (c.794T>C), entsprechend einem Aminosäureaustausch von Leucin zu Prolin an Position 265 der Aminosäuresequenz (p.L265P) überprüft.

## 2.7 Klinische Daten

Tabelle 24: Klinische Daten

Klinische Daten	Kriterien
Alter	
Geschlecht	Weiblich Männlich
Lokalisationsstelle der Primärmanifestation	
Staging	Extrakutane Manifestation/en Keine extrakutane Manifestation
Rezidiv	Ja Nein
Therapie	Exzision Bestrahlung Chemotherapie Doxycyclin-Therapie
Borrelia burgdorferi	Positiv Negativ
LDH	Normal (0 Punkte) Erhöht (1 Punkt)
Klinisches Erscheinungsbild der Primärmanifestation	Andere (0 Punkte) Knotig (1 Punkt)
Anzahl der Läsionen bei Primärmanifestation	1-2 (0 Punkte) > 2 (1 Punkt)
Hinweise auf eine IgG <sub>4</sub> abhängige Erkrankung	Ja Nein
CLIPi	Score 0 (geringes Risiko) Score 1 (mittleres Risiko) Score 2 und 3 (hohes Risiko)

Für sämtliche primär kutanen MZL wurden die verfügbaren klinischen Daten hinsichtlich verschiedener Kriterien ausgewertet (vgl. Tabelle 24). Der Cutaneous Lymphoma International Prognostic Index (CLIPi) ist ein Prognosewert für indolente kutane B-Zell-Lymphome, der von der International

Extranodal Lymphoma Study Group (IELSG 11) zur individuellen Prognoseabschätzung definiert wurde. Hierzu werden folgende drei Parameter erhoben: LDH (nicht erhöht versus erhöht), Anzahl der Läsionen bei Primärmanifestation (1-2, > 2), klinisches Erscheinungsbild der Primärmanifestation/en (andere versus knotig). Jedes der drei Kriterien wird mit 0 oder 1 Punkt bewertet, wodurch sich ein Score von 0 bis 3 ergibt. Hieraus resultieren drei Risikogruppen, die ebenfalls in Tabelle 24 aufgeführt sind.<sup>126</sup>

## 2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte anhand des Chi-Quadrat-Testes mit dem Statistikprogramm IBM SPSS Statistics 21. Ein p (probability)-value < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

Der Chi-Quadrat-Test ist ein Test zur Analyse von Häufigkeitsunterschieden. Damit kann zum Beispiel geprüft werden, ob ein bestimmtes Merkmal in zwei verschiedenen Gruppen gleichverteilt oder ob ein signifikanter Unterschied zu finden ist. Der p-Wert gibt an, ob ein statistisch signifikanter Unterschied besteht.

In unserer Serie wurden die zwei Ergebnisgruppen in kutane versus nicht kutane MZL unterteilt und anhand der verschiedenen Kriterien miteinander verglichen und auf statistisch signifikante Unterschiede überprüft.

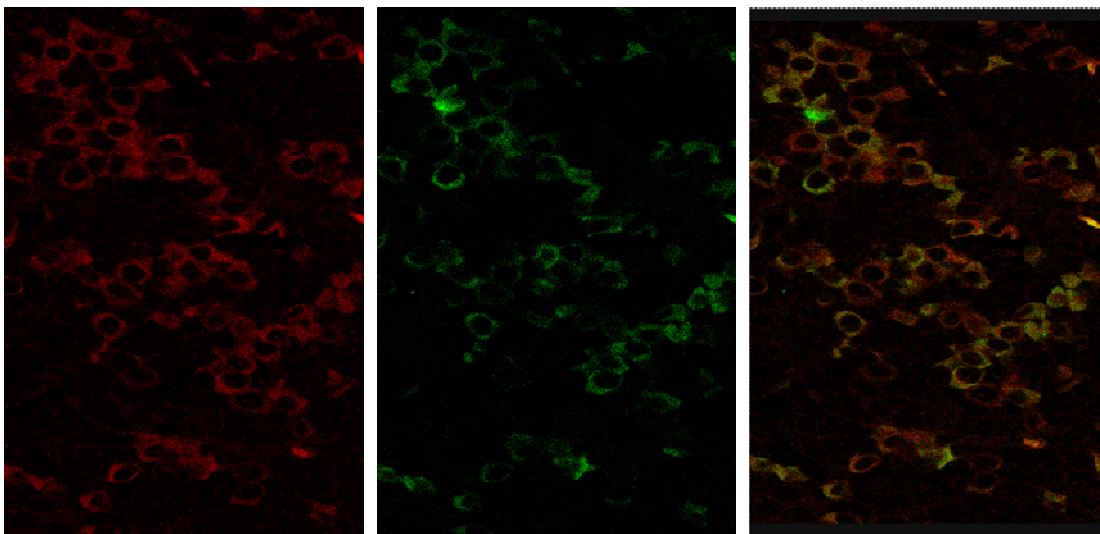
Die PCMZL mit unterschiedlicher Schwerkettenexpression wurden zur statistischen Analyse der Infiltratzusammensetzung sowie klinischer Daten in zwei Gruppen unterteilt, IgG<sub>4</sub>-positive PCMZL versus PCMZL mit anderer Schwerkettenexpression (IgA, IgM oder IgG<sub>1-3</sub>). IgG<sub>1-3</sub> ist definiert als positiv für die Schwerkette IgG bei Negativität für IgG<sub>4</sub>.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Immunhistochemie

##### 3.1.1 Leichtkettenexpression

Hinsichtlich der monotypischen Leichtkettenexpression ergab sich zwischen den extrakutanen und den primär kutanen MZL kein signifikanter Unterschied. Beide Gruppen waren mehrheitlich monotypisch für die Leichtkette Kappa. 75 % der extrakutanen MZL waren positiv für Kappa (90/120) und 23 % positiv für Lambda (28/120). Zwei Fälle (ein primär enterales und ein primär okuläres MZL) zeigten eine duale Leichtkettenexpression, die mittels einer Fluoreszenzfärbung bestätigt werden konnte (siehe Abb. 13).



*Abbildung 13: Duale Expression der beiden Leichtketten Kappa (links, rot) und Lambda (Mitte, grün). Das rechte Bild zeigt die Kappa- und Lambda-Färbung überlappend in einer gelblichen Farbe.*

Unter den primär kutanen MZL waren 71 % positiv für Kappa (35/49) und 29 % positiv für Lambda (14/49). Im Detail zeigten 22 der 35 Kappa-positiven primär kutanen MZL ein Kappa/Lambda-Verhältnis von  $> 10:1$  und 13 Fälle von  $> 20:1$ . Unter den 14 Lambda-positiven Fällen zeigten 5 Fälle ein Lambda/Kappa-

Verhältnis von > 10:1, 8 Fälle ein Verhältnis von > 20:1 und lediglich ein Fall ein Lambda/Kappa-Verhältnis von 5:1.

### 3.1.2 Schwerkettenexpression

In der Verteilung der Immunglobulinschwerketten (IgA, IgE, IgG, IgG<sub>4</sub>, IgM) unterschieden sich die primär extrakutanen MZL von den primär kutanen MZL signifikant ( $p$ -value < 0,001). Von den 120 extrakutanen MZL waren 13 % positiv für IgA (15/120), 9 % positiv für IgG (11/120) und 78 % positiv für IgM (94/120). Hier dominierte klar die Immunglobulinschwerkette IgM. Unter den 49 primär kutanen MZL waren 16 % positiv für IgA (8/49), 72 % positiv für IgG (35/49) und lediglich 12 % positiv für IgM (6/49). Beide Gruppen zeigten keine Expression der Immunglobulinschwerkette IgE.

Auffallend und für die hier vorgelegte Arbeit entscheidend war das Ergebnis für die Immunglobulinschwerkette IgG<sub>4</sub>. 39 % aller in unserer Fallserie untersuchten primär kutanen MZL zeigten eine Expression von IgG<sub>4</sub> (19/49), entsprechend 19 der 35 IgG-positiven Fälle (54 %). In der Gruppe der primär extrakutanen MZL war hingegen lediglich ein primär okuläres MZL positiv für IgG<sub>4</sub> (1%, 1/120).

Tabelle 25 sowie die Abbildungen 14 und 15 fassen die Verteilung der Leicht- und Schwerkettenexpression bzw. deren Korrelation zur Primärlokalisierung noch einmal zusammen.

Tabelle 25: Leicht- und Schwerekettenexpression in den verschiedenen Lokalisationen

Lokalisation	n	IgA (%)	κ (%)	λ (%)	IgG <sub>1-3</sub> (%)	κ (%)	λ (%)	IgG <sub>4</sub> (%)	κ (%)	λ (%)	IgM (%)	κ (%)	λ (%)
Haut	49	8 (16)	7 (88)	1 (12)	16 (33)	9 (56)	7 (44)	19 (39)	13 (68)	6 (32)	6 (12)	6 (100)	0
Magen	21	3 (14)	1 (33)	2 (67)	4 (19)	2 (50)	2 (50)	0	0	0	14 (67)	12 (86)	2 (14)
Speicheldrüse	20	1 (5)	1 (100)	0	2 (10)	2 (100)	0	0	0	0	17 (85)	16 (94)	1 (6)
Lymphknoten	20	2 (10)	0	2 (100)	1 (5)	1 (100)	0	0	0	0	17 (85)	13 (76)	4 (24)
Darm	12	2 (17)	2 (100)	0	1 (8)	1 (100)	0	0	0	0	9 (75)	7 (78)	2 (22)
Lunge	12	1 (8)	1 (100)	0	0	0	0	0	0	0	11 (92)	8 (73)	3 (27)
Auge	12	2 (17)	1 (50)	1 (50)	1 (8)	1 (100)	0	1 (8)	1 (100)	0	8 (67)	6 (75)	2 (25)
Weichgewebe	11	2 (18)	1 (50)	1 (50)	0	0	0	0	0	0	9 (82)	6 (67)	3 (33)
Mamma	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3 (100)	3 (100)	0
Oropharynx/ Larynx	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3 (100)	2 (67)	1 (33)
Tonsille	3	1 (33)	0	1 (100)	0	0	0	0	0	0	2 (67)	2 (100)	0
Thymus	2	0	0	0	1 (50)	0	1 (100)	0	0	0	1 (50)	1 (100)	0
Schilddrüse	1	1 (100)	1 (100)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



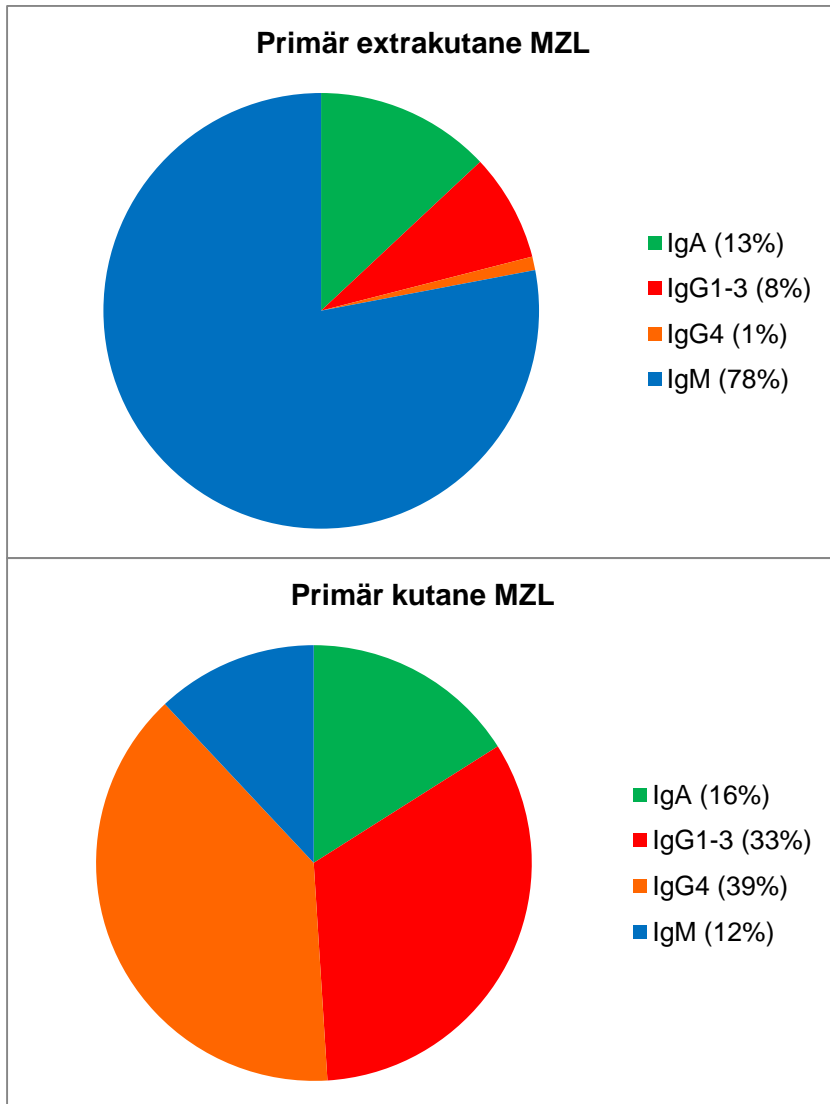


Abbildung 14: Verteilung der Schwerekettenexpression

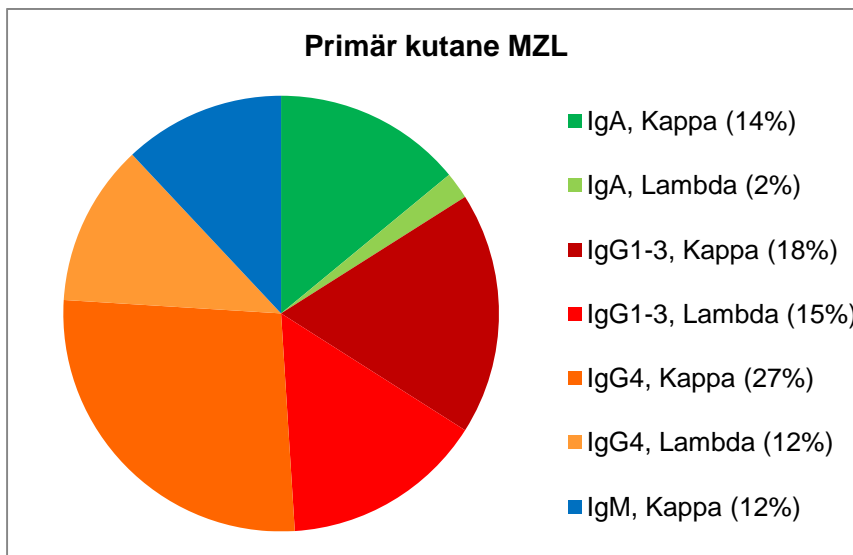
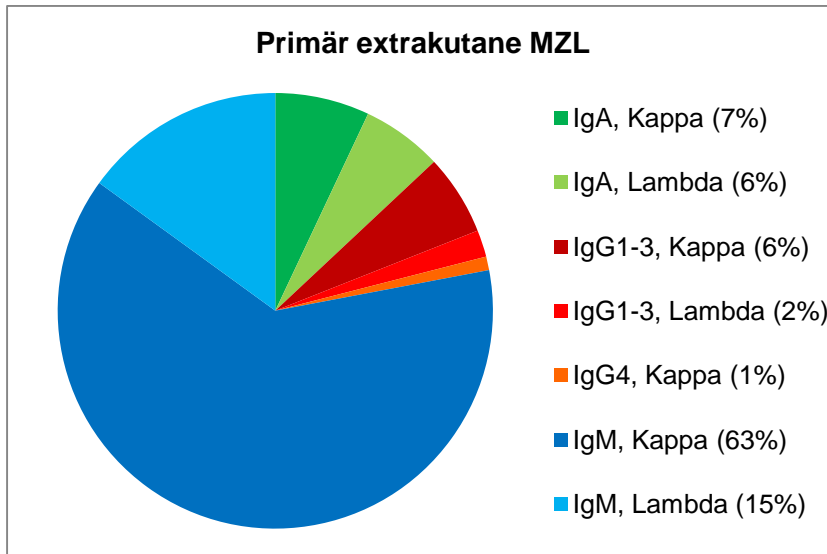
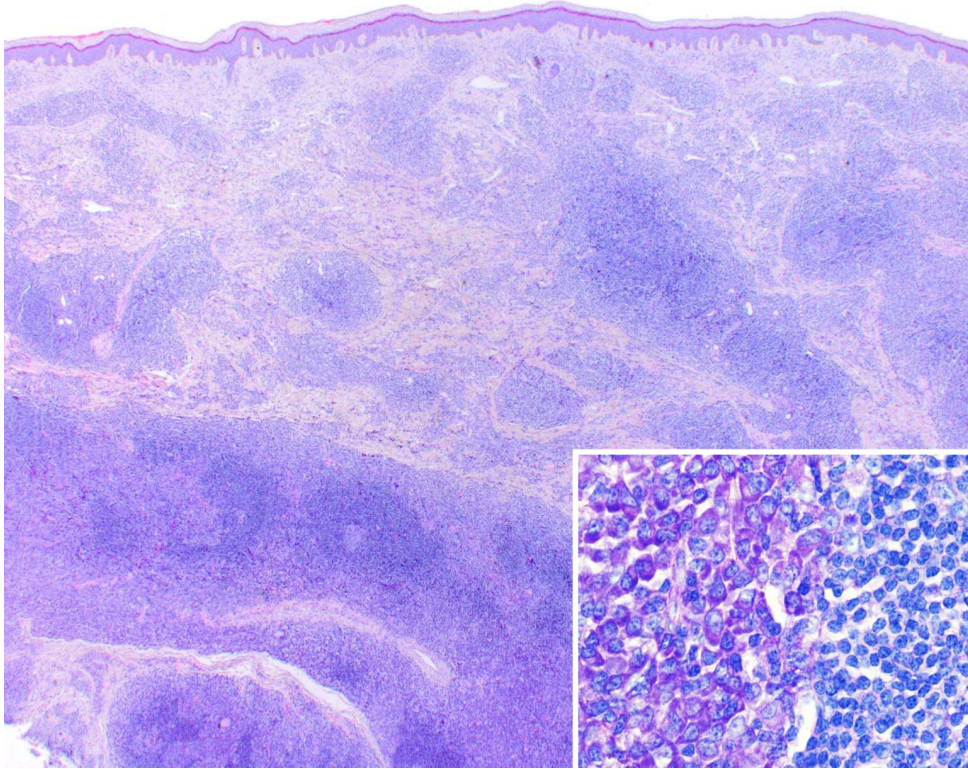


Abbildung 15: Leicht- und Schwerekettenexpression in den beiden Gruppen

### 3.2 Morphologische und immunphänotypische Charakterisierung der PCMZL

Ein typisches, voll ausgebildetes PCMZL (siehe Abbildung 16) besteht aus einem zum Teil knotigen, zum Teil diffusen lymphoiden Infiltrat, das unter Wahrung einer infiltratfreien Grenzzone zur ebenfalls infiltratfreien Epidermis die gesamte Dermis einnimmt und gelegentlich auch auf die Subkutis übergreift. Innerhalb des Infiltrates finden sich reaktive Lymphfollikel, die häufig auch

Keimzentren ausgebildet haben und von breiten interfollikulären Zonen, den Marginalzonen, umgeben werden. Im hier abgebildeten Beispiel erkennt man auch prominente Tumorzellcluster mit plasmazytoider Differenzierung.



*Abbildung 16: Typisches Infiltrat eines PCMZL. Das Inset zeigt die plasmazytoide Differenzierung (Giemsa-Färbung).*

Immunhistochemisch zeigten die plasmazytoid differenzierten Tumorzellen dieses Falles eine monotypische Lambda-Leichtkettenexpression sowie eine Positivität für IgG<sub>4</sub> (vgl. Abbildung 17). In der Fluoreszenzfärbung kommt dann die Kolokalisation von IgG und IgG<sub>4</sub>-positiven Zellen zur Darstellung (vgl. Abbildung 18).

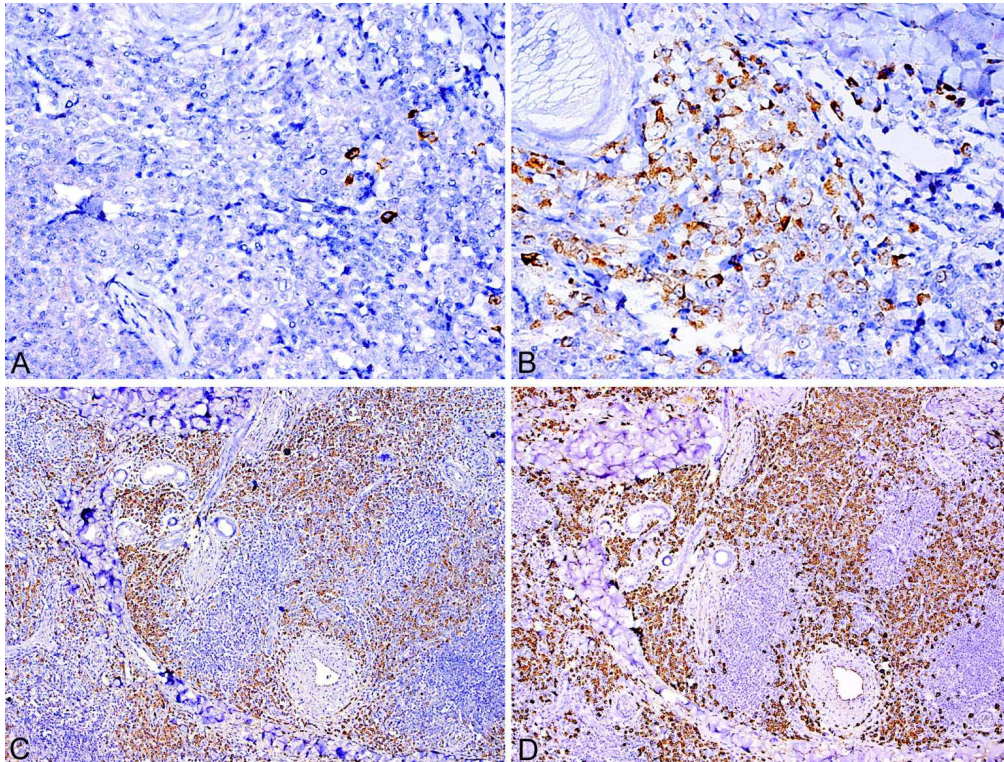


Abbildung 17: PCMZL mit Leichtkettenrestriktion für Lambda (B), wohingegen nur wenige Zellen Kappa exprimieren (A). Desweiteren sind auf dieser Abbildung das typische immunhistochemische Erscheinungsbild der IgG<sub>4</sub>-positiven Plasmazellen (D) dargestellt im Vergleich zur IgG-Expression (C).

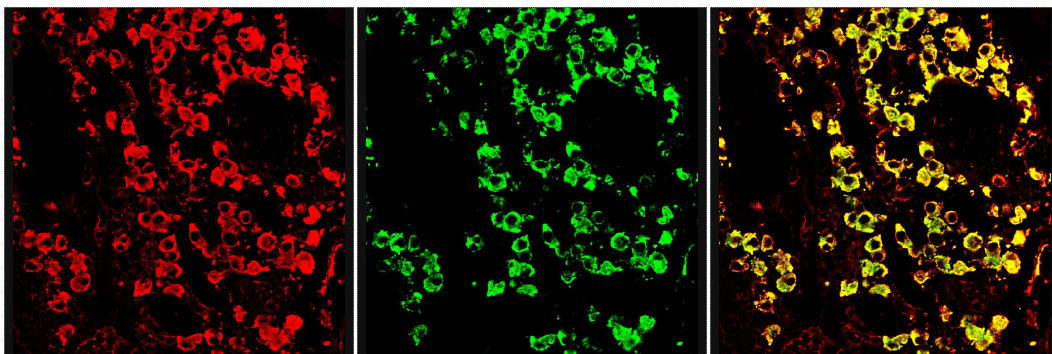


Abbildung 18: Kolokalisation der IgG (links, rot)- und IgG<sub>4</sub> (Mitte, grün)-positiven Zellen in der Fluoreszenzfärbung mit gelblicher Farbe in der Überlagerung (rechts).

### 3.2.1 B-Zell-Infiltrat

Im Hinblick auf das B-zelluläre Hintergrundinfiltrat (CD20) wurde das Vorhandensein oder das Fehlen von Lymphfollikeln mit oder ohne Keimzentrumsbildung bewertet. Hier fanden sich in 71 % der 49 PCMZL Lymphfollikel mit Keimzentrumsbildung, in 14% Lymphfollikel ohne Keimzentrumsbildung und in 15 % zeigte sich keine Follikelbildung. Bezüglich dieser Parameter zeigten die vier verschiedenen Schwereketten-Gruppen der PCMZL keine signifikanten Unterschiede.

### 3.2.2 T-Zell-Infiltrat

Die vier verschiedenen Schwerekettengruppen der PCMZL wurden hinsichtlich ihres Gehaltes an reaktiven T-Zellen (CD5) innerhalb des Gesamtinfiltrates verglichen. Es wurden hierfür drei Kategorien (gering < 20 %, intermediär 20-50 %, hoch > 50 %) festgelegt. Hier zeigten die IgM-positiven Fälle einen signifikant geringeren T-Zell-Gehalt als die IgA-, IgG<sub>1-3</sub>- und IgG<sub>4</sub>-positiven PCMZL (p-value < 0,05), wobei die drei letztgenannten Gruppen untereinander keinen signifikanten Unterschied erkennen ließen (vgl. Abbildung 19).

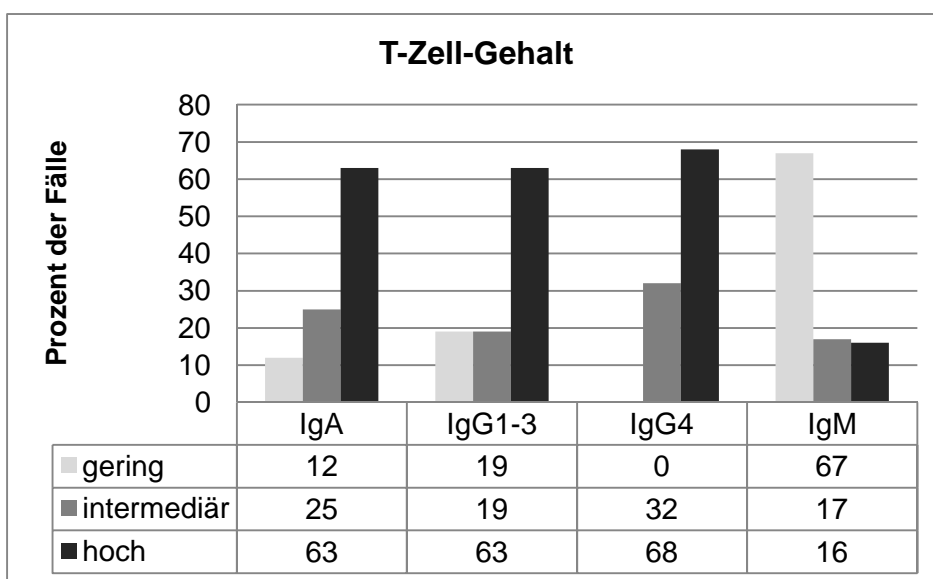
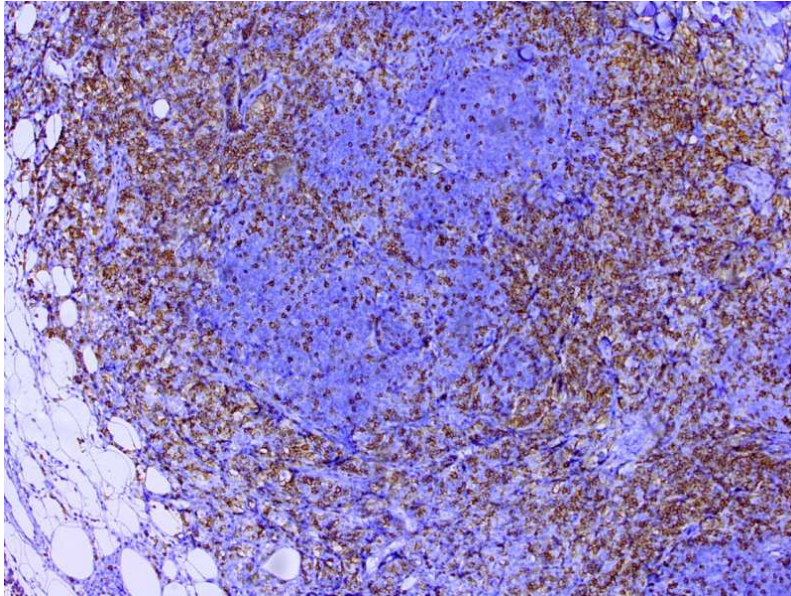


Abbildung 19: T-Zell-Gehalt der verschiedenen PCMZL-Schwereketten-subgruppen



*Abbildung 20: PCMZL mit einem intermediären Gehalt an T-Zellen. Die prädominant knotig aggregierten B-Zellen (hier die ungefärbten Zellen) werden von T-Zellen umgeben (CD5-Färbung für T-Zellen).*

Das Verhältnis von CD4/CD8-positiven, reaktiven T-Zellen in den PCMZL-Infiltraten wurde in zwei Kategorien eingeteilt ( $> 3:1$ ,  $< 3:1$ ). Es konnten erneut Unterschiede zwischen den einzelnen Schwereketten-subgruppen gefunden werden. Auch hier zeigten die IgM-positiven PCMZL eine signifikant andere Verteilung als die übrigen drei Schwereketten-gruppen ( $p$ -value  $< 0,05$ ). Die IgA-, IgG<sub>1-3</sub>- und IgG<sub>4</sub>-positiven PCMZL zeigten generell eine niedrigere CD4/CD8-Ratio ( $< 3:1$ ) als die IgM-positiven Fällen ( $> 3:1$ ) (siehe Abbildung 21 und 22).

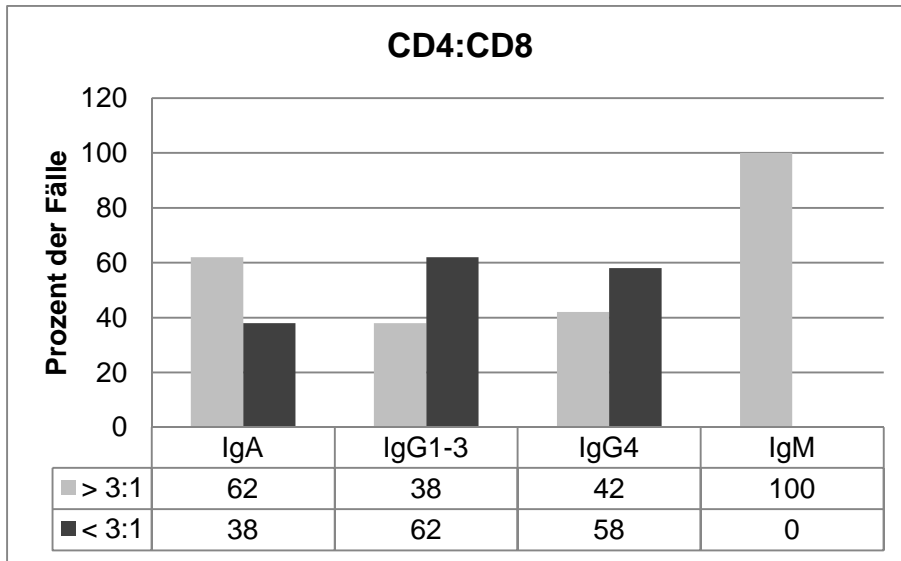


Abbildung 21: CD4/CD8-Ratio in den verschiedenen PCMZL-Schwerkettensubgruppen

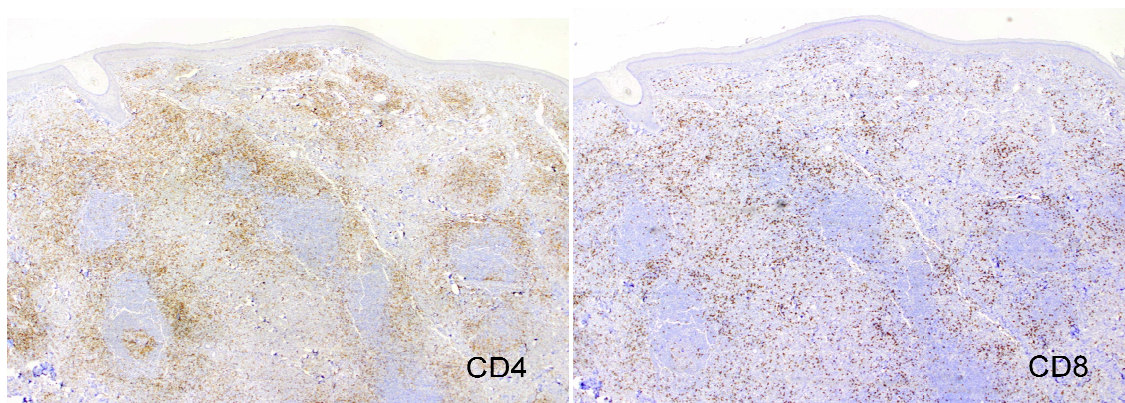


Abbildung 22: IgM-positives PCMZL mit einem CD4/CD8-T-Zell-Verhältnis von > 3:1.

Regulatorische T-Zellen (FoxP3-positiv) konnten in PCMZL generell nur in geringerer Anzahl und diffus verteilt nachgewiesen werden, wobei deren Gesamtanteil an allen CD5-positiven T-Zellen generell bei < 10 % lag. Der Anteil an regulatorischen T-Zellen am gesamten T-Zell-Infiltrat wurde in drei Kategorien eingeteilt (< 1 %, 1-5 %, 5-10 %). Allerdings unterschieden sich die IgM-positiven PCMZL auch hinsichtlich ihres Gehaltes an regulatorischen T-Zellen signifikant von den anderen Schwerkettengruppen ( $p$ -value < 0,05), wobei 50 % der IgM-positiven Fälle eine sehr geringe Anzahl an regulatorischen T-Zellen (< 1 %) aufwiesen, während in der Mehrzahl der IgA-, IgG<sub>1-3</sub>- und IgG<sub>4</sub>-

positiven PCMZL ein signifikant höherer Gehalt an regulatorischen T-Zellen nachweisbar war (siehe Abbildung 23 und 24).

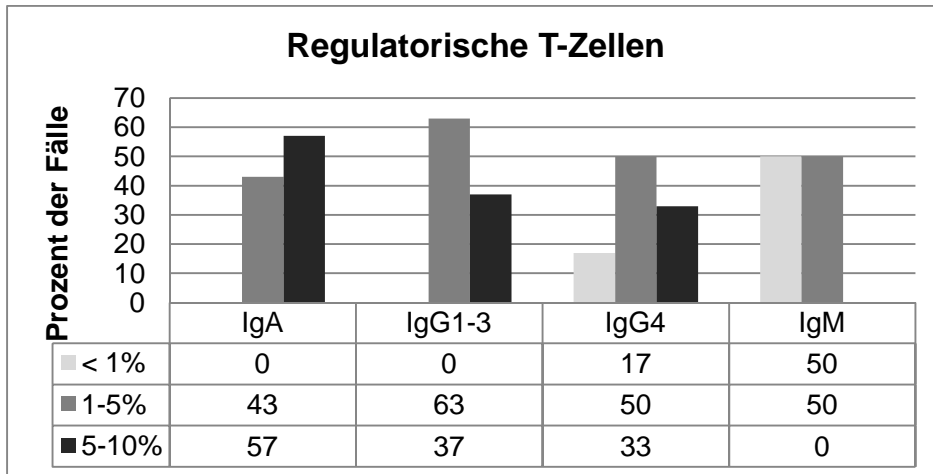


Abbildung 23: Anteil regulatorischer T-Zellen in den verschiedenen PCMZL-Schwerkettensubgruppen

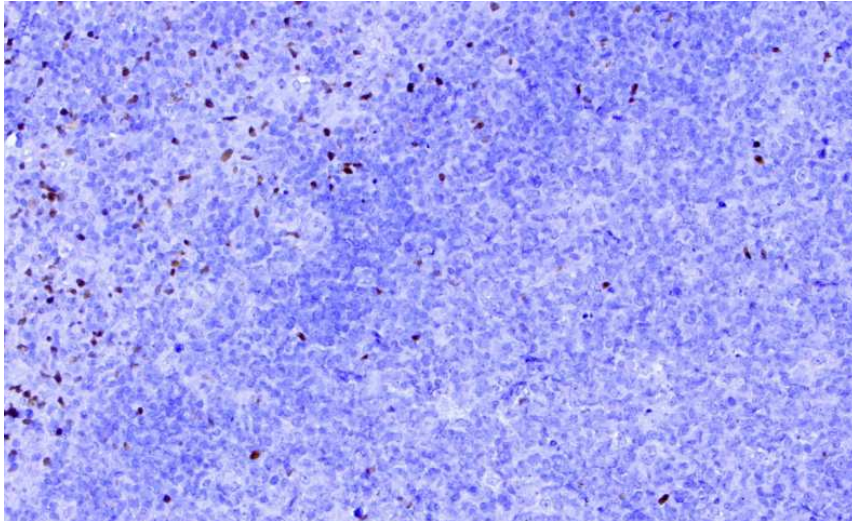


Abbildung 24: Regulatorische T-Zellen in einem IgG<sub>4</sub>-positiven PCMZL, markiert durch eine Kernfärbung für den Transkriptionsfaktor FoxP3.

Da PD1-positive folliculäre Helfer-T-Zellen physiologischerweise innerhalb von Lymphfollikeln vorkommen und die Ausbildung von Lymphfollikeln bereits im Hinblick auf das B-zelluläre Hintergrundinfiltrat bewertet worden war, wurden



nur PD1-positive T-Zellen außerhalb der Lymphfollikel in die Auswertung einbezogen. Es wurden hierfür vier Kategorien ausgewählt (< 1 %, 1-5 %, 5-10 %, > 10 %). Der Gehalt an diesen extrafollikulären Helfer-T-Zellen war im Mittel eher gering (in mehr als 50 % der PCMZL-Fälle nur 1-5 % des gesamten T-Zell-Infiltrates) und zeigte über die vier PCMZL-Schwerkettengruppen hinweg eine ähnliche Verteilung und somit keinen signifikanten Unterschied.

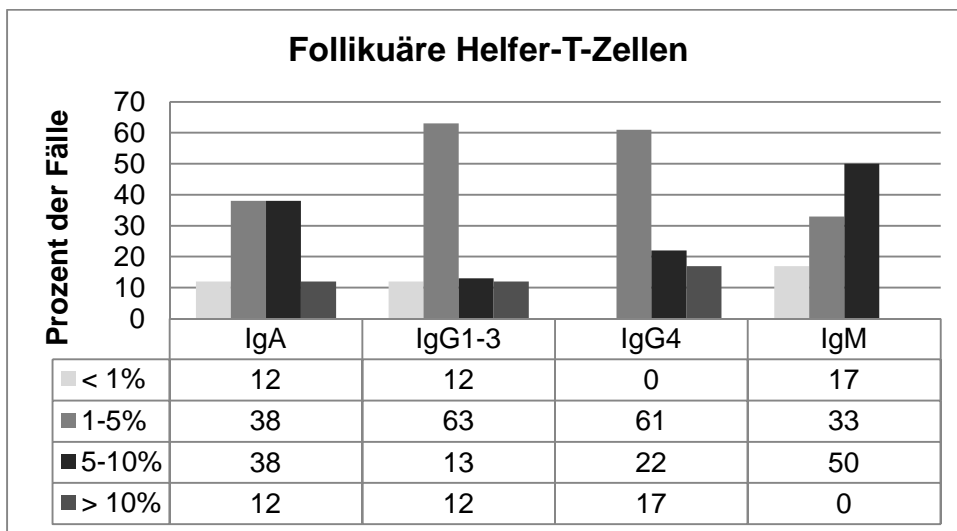


Abbildung 25: Anteil follikulärer Helfer-T-Zellen in den verschiedenen PCMZL-Schwerkettensubgruppen

### 3.2.3 Klinische Charakteristika der primär kutanen MZL:

Von allen Patienten unserer Fallserie lagen Angaben zu Alter und Geschlecht vor.

Das mittlere Alter der Patienten aller 169 MZL lag bei 66 Jahren (8-97 Jahre). Die 120 Patienten mit primär extrakutanen MZL (Mittelwert 66 Jahre) waren im Durchschnitt signifikant ( $p$ -value = 0,005) älter als die Patienten mit primär kutanen MZL (Mittelwert 51 Jahre). Hinsichtlich des Geschlechtes waren unter den primär extrakutanen MZL 58 % Frauen (69/120) und 42 % Männer (51/120) betroffen. Unter den primär kutanen MZL waren 61 % Männer (30/49) und 39 % Frauen (19/49), wobei dieser Unterschied statistisch nicht signifikant war.

Von den PCMZL wurden weitere klinische Daten ausgewertet, um mögliche besondere Charakteristika zu finden, die die IgG<sub>4</sub>-positiven PCMZL von den anderen Schwerkettensubgruppen unterscheiden.

Das durchschnittliche Alter der 49 Patienten mit einem PCMZL lag bei 51 Jahren und Männer waren etwas häufiger betroffen als Frauen. Betrachtet man diese Aspekte im Hinblick auf die jeweils exprimierte Schwerkette, so finden sich keine signifikanten Unterschiede (IgA: mean 49 Jahre (26-78 Jahre), IgG<sub>1-3</sub>: mean 48 Jahre (22-81 Jahre), IgG<sub>4</sub>: mean 52 Jahre (26-80 Jahre), IgM: mean 63 Jahre (51-74 Jahre)). Es zeigte sich lediglich, dass die Patienten mit einem IgM-positiven PCMZL im Durchschnitt etwas älter waren als die übrigen. Bei der Geschlechterverteilung war unter den IgG<sub>1-3</sub>-positiven PCMZL das weibliche Geschlecht etwas häufiger betroffen (1,3:1), wohingegen bei den anderen Schwerketten das männliche Geschlecht dominierte (IgA: 3:1, IgG<sub>4</sub> 2,2:1, IgM:2:1). Allerdings ergab sich auch hier keine statistische Signifikanz.

Im Hinblick auf die Primärmanifestationen der 45/49 PCMZL, zu denen entsprechende Angaben vorlagen, fanden sich durchaus unterschiedliche Lokalisationen, allerdings bestätigte sich eine Prädominanz der aus der Literatur bekannten, bevorzugt betroffenen Regionen wie Rücken, obere Extremität und Schulter (Rücken (n=15), obere Extremität (n=10), Schulterregion (n=9), Abdomen (n=3), Kopf (n=3), Halsbereich (n=2), untere Extremität (n=2) und Genitaltrakt (n=1)).<sup>53, 86</sup> Eine gesonderte Betrachtung der PCMZL-Schwerkettensubgruppen ergab hinsichtlich der Primärlokalisationen keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 26).

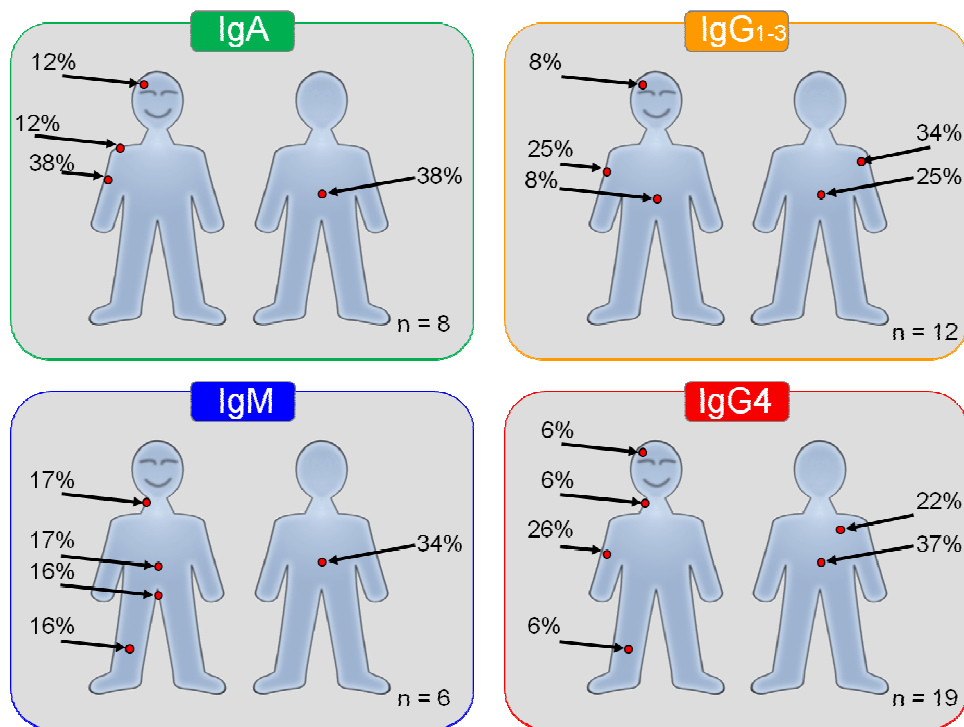


Abbildung 26: Primärlokalisationen der PCMZL, getrennt nach Schwereketten-subgruppen

Das klinische Erscheinungsbild der 49 PCMZL war mit druckindolenten, meist erhabenen, rötlichen und teils reizlosen Nodi, Papeln oder Plaques typisch für diese Entität. 9 der 49 PCMZL zeigten bereits primär multiple Manifestationen, während sich 40 von 49 der PCMZL als solitäre Knoten präsentierten.

Diesbezüglich fand sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied unter den vier verschiedenen PCMZL-Schwereketten-subgruppen.

Die Ergebnisse der Staginguntersuchungen waren von 30/49 PCMZL (6 IgA, 7 IgG<sub>1-3</sub>, 13 IgG<sub>4</sub>, 4 IgM) bekannt. Hierzu gehörten die Computertomographie des Thorax, die Computertomographie des Abdomens (oder die Sonographie des Abdomens) sowie eine Knochenmarkpunktion.

Lediglich ein IgG<sub>1-3</sub>-positives PCMZL zeigte eine sekundäre Lymphknotenbeteiligung, während sich bei den anderen 29 Fällen keine Hinweise auf extrakutane Manifestationen fanden. Auch eine sekundäre

Mitbeteiligung der Haut im Rahmen eines primär extrakutanen MZL konnte durch die Staginguntersuchungen ausgeschlossen werden.

Zum weiteren Verlauf, insbesondere zur Frage eines Rezidivs, lagen von 32/49 PCMZL (IgA: n=5, IgG<sub>1-3</sub>: n=8, IgG<sub>4</sub>: n=15, IgM: n=4) Informationen vor. Bei 21/32 Fällen kam es zu einem Rezidiv (65 %), wovon sich 28 % (n=9) an anderer und 19% (n=6) in gleicher Lokalisation wie beim Primärbefall manifestierten. Bei sechs Fällen gab es zur genauen Lokalisation des Rezidivs keine Angaben. Im Hinblick auf die PCMZL-Schwerkettensubgruppen entwickelten 25 % (n=2) der IgA-positiven, 75 % (n=6) der IgG<sub>1-3</sub>-positiven, 60 % (n=9) der IgG<sub>4</sub>-positiven und 100 % (n=4) der IgM-positiven PCMZL Rezidive, wobei diese Unterschiede statistisch nicht signifikant waren.

Von 9 PCMZL-Patienten lagen klinische Informationen zur Borrelienserologie vor. Hiervon hatten zwei Patienten einen positiven Borrelentiter und sieben zeigten eine negative Serologie. Bei den zwei positiven PCMZL handelte es sich um einen IgG<sub>1-3</sub>-positiven und einen IgG<sub>4</sub>-positiven Fall. Aufgrund der geringen Anzahl an Patienten sind weiterführende Aussagen zu einer Assoziation des PCMZL mit einer Borrelieninfektion oder auch eine statistische Auswertung innerhalb des von uns untersuchten Kollektivs nicht möglich.

Klinische Angaben zur Therapie lagen von insgesamt 31/49 PCMZL-Patienten unseres Kollektivs vor. Die meisten Läsionen wurden exzidiert, wobei sieben Fälle zusätzlich zur chirurgischen Therapie eine Bestrahlung erhielten. Drei Patienten erhielten Chemotherapie nach dem R-CHOP-Protokoll (Rituximab, Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin und Prednisolon). Zwei Patienten erhielten Chemotherapie nach dem R-CHOP-Protokoll und wurden zusätzlich bestrahlt. Die beiden Patienten mit positiver Borrelienserologie und ein weiterer Patient mit negativer Borrelienserologie erhielten zusätzlich zur Bestrahlung oder Chemotherapie das Antibiotikum Doxycyclin.

Im Hinblick auf weitere klinische Informationen wie Symptome oder Laborbefunden, die von 32/49 PCMZL vorlagen, fand sich kein Patient mit Juckreiz im Bereich der PCMZL-Infiltrate oder einer B-Symptomatik wie Fieber,

Gewichtsverlust oder Nachtschweiß. Ebenso ergaben die Laborwerte keine wegweisenden oder statistisch signifikanten Auffälligkeiten.

In der Zusammenschau der verfügbaren radiologischen Befunde und der Laborwerte ergaben sich bei den Patienten mit einem IgG<sub>4</sub>-positiven PCMZL auch keine Hinweise auf eine IgG<sub>4</sub>-assoziierte Erkrankung.

Von 15 der 49 PCMZL waren klinische Angaben zur Erstellung des sog. CLIP-Scores vorhanden (2 IgA-positiv, 2 IgG<sub>1-3</sub>-positiv, 9 IgG<sub>4</sub>-positiv und 2 IgM-positiv Fälle). Für diesen Prognose-Score sind die Parameter LDH (nicht erhöht versus erhöht), die Anzahl der Läsionen bei Primärmanifestation (1-2 versus > 2) und das klinische Erscheinungsbild der Primärmanifestation/en (andere versus knotig) relevant. Unter den 15 auswertbaren Fällen (vgl. Tabelle 26) hatte ein Patient einen Score von 0 (niedriges Risiko, IgG<sub>4</sub>-positiv), 9 Patienten den Score 1 (mittleres Risiko, 5 IgG<sub>4</sub>-positiv, 2 IgA-positiv, 1 IgG<sub>1-3</sub>-positiv und 1 IgM-positiv), 4 Patienten zeigten einen Score von 2 (hohes Risiko, 3 IgG<sub>4</sub>-positiv und 1 IgG<sub>1-3</sub>-positiv) und schließlich 1 Patient einen Score von 3 (hohes Risiko, IgM-positiv). Da nur von weniger als der Hälfte der untersuchten PCMZL die entsprechenden Daten zur Erhebung des CLIP-Scores und nur von einem Teil dieser Patienten auch Daten zum weiteren Verlauf zur Verfügung standen, war eine Auswertung im Hinblick auf die Validität dieses Prognosescores wie auch eine statistische Analyse hinsichtlich der verschiedenen PCMZL-Schwerkettensubgruppen leider nicht möglich.

### 3.3 Analyse der MyD88 (L265P)-Mutation in den PCMZL

Quantitativ und qualitativ ausreichende DNA konnte von 45 der 49 PCMZL extrahiert und in einer die relevante Region im Exon 5 des MyD88-Gens überspannenden PCR amplifiziert werden.

Nach Sequenzierung wurden die Daten mit Hilfe der ChromasPro Software analysiert. Die Sequenzanalysen aller 45 PCMZL waren auswertbar und

zeigten eine wildtypische bzw. unmutierte Sequenz des relevanten Codons an Position 265 des MyD88-Gens.

*Tabelle 26: CLIPI-Score*

Schwerkette	LDH	Klinisches Erscheinungsbild	Anzahl der Läsionen	CLIPI
IgA	Normal	Knotig	1	1
IgA	Normal	Knotig	1	1
IgG <sub>1-3</sub>	Normal	Knotig	>2	2
IgG <sub>1-3</sub>	Normal	Knotig	1	1
IgG <sub>4</sub>	Normal	Knotig	>2	2
IgG <sub>4</sub>	Erhöht	Knotig	1	2
IgG <sub>4</sub>	Normal	Andere	1	0
IgG <sub>4</sub>	Normal	Andere	>2	1
IgG <sub>4</sub>	Normal	Knotig	1	1
IgG <sub>4</sub>	Normal	Knotig	>2	2
IgG <sub>4</sub>	Normal	Knotig	1	1
IgG <sub>4</sub>	Normal	Knotig	1	1
IgG <sub>4</sub>	Normal	Knotig	1	1
IgM	Normal	Knotig	2	1
IgM	Erhöht	Knotig	>2	3

## 4 Diskussion

PCMZL gehören nach der WHO-Klassifikation zu den extranodalen Marginalzonen-Lymphomen vom MALT-Typ.<sup>53, 87</sup> Aus morphologischer Sicht haben PCMZL bestimmte Gemeinsamkeiten mit extrakutanen MZL. Hierzu gehören das typische Infiltrationsmuster, die Tumorzellzytologie sowie der Nachweis reaktiver Keimzentren und zahlreicher T-Zellen im Hintergrund.<sup>53, 87,</sup>  
127

Allerdings unterscheiden sich diese PCMZL auch von nicht kutanen MZL in verschiedenen Aspekten. Hierzu zählen vor allem immunphänotypische und molekulargenetische Merkmale sowie das biologische Verhalten. So exprimieren PCMZL vorzugweise die Schwereketten IgG, wohingegen nicht kutane MZL am häufigsten IgM exprimieren.<sup>99, 101</sup> Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei den IgG-positiven PCMZL überzufällig häufig um eine IgG<sub>4</sub>-Positivität handelt. Ferner konnte der Befund, dass IgG<sub>4</sub>-positive Fälle unter den extrakutanen MZL eine Rarität darstellen und der sich in der Literatur bereits abgezeichnet hatte, auch an dem hier untersuchten Kollektiv bestätigt werden.

Innerhalb der PCMZL wurden in der Literatur bisher zwei große, biologisch verschiedene, Gruppen postuliert. Zum einen PCMZL mit IgM-Schwerkettenexpression, die auf diese Weise den primär nicht kutanen MZL ähneln, aber eine Minderheit unter allen PCMZL darstellen. Zum anderen die PCMZL, die IgA, IgG oder IgE exprimieren und somit einen Klassenwechsel vollzogen haben. Letztere Gruppe ist unter den PCMZL am Häufigsten anzutreffen.<sup>99, 101</sup>

B-Zell-Lymphome entstehen aus unterschiedlichen B-Zell-Entwicklungsstufen, wobei das umgebende T-Zell-Milieu bei der B-Zell-Differenzierung eine wichtige Rolle spielt.<sup>53</sup> T-Zellen senden unter anderem Signale für die Keimzentrumsreaktion aus und sorgen durch bestimmte Signalmoleküle für den Immunglobulinklassenwechsel. Sie sind somit nicht nur essentiell für die

Entstehung und Aufrechterhaltung einer Immunantwort, sondern auch an der „Erscheinungsform“ der verschiedenen B-Zell-Lymphomentitäten beteiligt.<sup>4</sup>

So wurden beispielsweise Unterschiede im umgebenden T-Helferzellen-Milieu sowie im Zytokin- und Chemokinprofil beschrieben, was gut mit der Unterteilung der PCMZL in die oben genannten zwei Gruppen korreliert. IgM-positive PCMZL entstehen vorzugsweise in einem umgebenden Th1-Zellen-Milieu und zeigen eine erhöhte Expression des Chemokinrezeptors CXCR3. Auch in primär extrakutanen MZL wird dies häufig beobachtet. Im Gegensatz hierzu finden sich im Hintergrund der anderen PCMZL, die einen Klassenwechsel vollzogen haben, prädominant Th2-Zellen und somit keine Expression des Chemokinrezeptors CXCR3.<sup>99, 100</sup> Da Th1- und Th2-Zellen unter anderem durch ihre Zytokin-/Chemokinexpression definiert sind und eine Unterscheidung dieser T-Zell-Subpopulationen mit immunhistochemischen Methoden an formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten derzeit nicht verlässlich möglich ist, haben wir uns im Hinblick auf das T-zelluläre Hintergrundinfiltrat auf den Anteil am Gesamtinfiltrat sowie immunhistochemisch gut charakterisierbare Subpopulationen konzentriert. In den wenigen PCMZL mit IgM-Expression unseres Kollektivs war der Gehalt an begleitendem T-Zell-Infiltrat insgesamt eher niedrig. Im Gegensatz hierzu fand sich in den übrigen PCMZL mit IgA-, IgG<sub>1-3</sub>- oder IgG<sub>4</sub>-Schwerkettenexpression ein signifikant höherer Anteil an begleitenden T-Zellen. Dieser geringere Anteil an begleitendem T-Zell-Infiltrat in IgM-positiven PCMZL sowie erhöhte Anteile in den PCMZL der anderen Schwereketten-subgruppen wurde bereits in der Literatur beschrieben.<sup>99</sup> Dies bestätigt wiederum die bedeutende Rolle des begleitenden T-Zell-Infiltrates im Hinblick auf die B-Zell-Entwicklung und deren Differenzierung. Da in primär extrakutanen MZL vorzugsweise ein Th1-Milieu sowie ein geringerer T-Zell-Gehalt zu finden ist und diese häufig mit chronischen Infektionen assoziiert sind, wie beispielsweise HP-Infektion im Magen, könnte der hohe T-Zell-Gehalt in den PCMZL, die einen Klassenwechsel vollzogen haben, hinweisend auf einen anderen, bisher noch nicht bekannten Pathomechanismus sein.<sup>99, 128</sup>



Ferner war das Verhältnis an CD4/CD8-positiven T-Zellen in IgM-positiven PCMZL mit > 3:1 erhöht und lag in den übrigen PCMZL hingegen mehrheitlich bei < 3:1. Zu Gunsten der CD4-Subpopulation verschobene Verhältnisse von CD4/CD8-T-Zellen finden sich beispielsweise auch bei Autoimmunerkrankungen<sup>129</sup>, auf deren Boden bekanntlich MZL entstehen können.

Desweiteren spielen auch folliculäre Helfer-T-Zellen, die beispielsweise durch eine Expression von PD1 gekennzeichnet sind, bei der B-Zell-Entwicklung eine Rolle. Intrafolliculäre Helfer-T-Zellen finden sich in den Keimzentren der Sekundärfollikel und sind wichtig für die Differenzierung der B-Zellen in langlebige Gedächtniszellen oder Antikörper-produzierende Plasmazellen. Extrafolliculäre Helfer-T-Zellen können im Lymphknoten sowie in sekundär lymphatischen Organen auch außerhalb von Keimzentren vorkommen. Diese interagieren mit B-Zellen und unterstützen vermutlich die Antikörperproduktion außerhalb des Follikels.<sup>41, 42, 49</sup> Allerdings kommt den folliculären Helfer-T-Zellen auch eine wichtige Rolle im Mikromilieu und damit für die Persistenz und Progression bestimmter B-Zell-Lymphome zu, was insbesondere für das folliculäre Lymphom und das lymphozytenprädominante Hodgkin-Lymphom gezeigt werden konnte.<sup>50, 52, 130, 131</sup> Da sich folliculäre Lymphome von Keimzentrums-B-Zellen ableiten und meist in sog. atypischen Lymphfollikeln wachsen, wundert es nicht, dass diese Lymphome einen hohen Gehalt an PD1-positiven folliculären Helfer-T-Zellen aufweisen.<sup>50, 52, 130, 131</sup> Auch für extranodale MZL finden sich in der Literatur Berichte über einen erhöhten Gehalt an folliculären Helfer-T-Zellen<sup>50, 52, 130, 131</sup>, wenngleich bislang keine spezifischen Untersuchungen zu folliculären Helfer-T-Zellen in PCMZL zu finden sind. Aus diesem Grund wurde in der hier vorgelegten Arbeit der Gehalt an PD1-positiven folliculären Helfer-T-Zellen in PCMZL bestimmt, jedoch nur der extrafolliculäre Anteil bewertet, der im Hintergrund der neoplastischen B-Zell-Population selbst für diese relevant sein könnte. Die intrafolliculären Helfer-T-Zellen wurden hingegen nicht gewertet, da sie hier physiologischerweise vorkommen und die Ausbildung von Lymphfollikeln bereits im Hinblick auf den B-zellulären Infiltratanteil bewertet worden war. Da sich jedoch in der Mehrzahl der PCMZL

nur ein geringer Gehalt an extrafollikulär gelegenen follikulären Helfer-T-Zellen nachweisen ließ und sich diesbezüglich, aber auch im Hinblick auf die Ausbildung bzw. fehlende Ausbildung von Lymphfollikeln, keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den PCMZL-Schwerkettensubgruppen gezeigt hatte, kann diesen Bestandteilen des Hintergrundinfiltrates keine offensichtliche Relevanz, speziell hinsichtlich des Immunglobulinklassenwechsels und auch der klinischen Präsentation, zugeschrieben werden.

Regulatorische T-Zellen spielen physiologischerweise vor allem bei der Beendigung einer Immunantwort eine Rolle. Zum einen können sie T-Helferzellen und andere Immunzellen beispielsweise durch Apoptoseinduktion direkt supprimieren.<sup>132</sup> Zum anderen tragen sie bei langanhaltender, chronischer Antigenstimulation in B-Zellen zu einem IgG<sub>4</sub>-Klassenwechsel und deren Differenzierung zu IgG<sub>4</sub>-produzierenden Plasmazellen bei.<sup>26, 29, 133</sup> Hierfür verantwortlich ist die Ausschüttung von IL-21, IL-10 sowie TGF- $\beta$ . Es wird grundsätzlich auch bei IgG<sub>4</sub>-assoziierten Erkrankungen vermutet, dass Th2-Zellen und regulatorische T-Zellen über bestimmte Zytokine, unter anderem IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$ , die Plasmazellen zum IgG<sub>4</sub>-Klassenwechsel veranlassen. Ferner sollen die Zytokine IL-4 und TGF- $\beta$  unter anderem auch für die typische Fibrose der IgG<sub>4</sub>-assoziierten Erkrankungen verantwortlich sein.<sup>28, 113, 114</sup> Allerdings wird den regulatorischen T-Zellen zunehmend auch eine Bedeutung bei verschiedensten Malignomen zugesprochen. In soliden Tumoren, wie beispielsweise in hepatozellulären und kolorektalen Karzinomen, Plattenepithelkarzinomen sowie Mamma-, und Pankreaskarzinomen, wird den FoxP3-positiven regulatorischen T-Zellen eine für die Prognose ungünstige Bedeutung zugeschrieben,<sup>47, 48, 134, 135</sup> wobei spekuliert wird, dass diese über eine Eindämmung/Suppression des gegen die Tumorzellen gerichteten Entzündungsinfiltrates einen positiven Effekt auf die Tumorprogression haben könnten.<sup>136</sup> Die Rolle von regulatorischen T-Zellen in hämatologischen Neoplasien ist derzeit noch nicht abschließend geklärt, scheint jedoch sehr viel komplexer zu sein als bei nicht-hämatologischen Neoplasien. In einer Übersichtsarbeit beschreiben Lindqvist et al.<sup>132</sup> die allgemeine Funktion von

regulatorischen T-Zellen in verschiedenen B-Zell-Neoplasien. Regulatorische T-Zellen sollen nach deren Auffassung zwar einerseits, wie auch bei den soliden Tumoren, durch eine Hemmung des begleitenden Entzündungsinfiltrates das Wachstum der Tumorzellen fördern. Andererseits sollen sie aber auch die neoplastischen B-Zellen direkt unterdrücken bzw. deren Apoptose induzieren.<sup>132</sup> Weiterhin finden sich in der Literatur verschiedene Arbeiten, die die Anzahl an regulatorischen T-Zellen im Hinblick auf die Prognose untersucht haben. So gibt es vielfache Hinweise darauf, dass sich eine hohe Anzahl an FoxP3-positiven regulatorischen T-Zellen in hämatologischen Neoplasien mit einem günstigeren klinischen Outcome korrelieren lassen. Beispielsweise konnten bei follikulären Lymphomen, primär kutanen B-Zell-Lymphomen (PCMZL, primär kutane follikuläre Lymphomen und primär kutane diffuse großzellige B-Zell-Lymphome vom Bein-Typ) aber auch bei gastralen und orbitalen MALT-Lymphomen ein hoher Gehalt an FoxP3-positiven regulatorischen T-Zellen mit einer guten Prognose assoziiert werden.<sup>45, 137-139</sup> In dem von uns untersuchten PCMZL-Kollektiv konnten wir eine signifikant geringere Anzahl an FoxP3-positiven regulatorischen T-Zellen in IgM-positiven PCMZL im Vergleich zu allen anderen PCMZL-Schwerkettensubgruppen zeigen, der in der Zusammenschau mit der Arbeit von Edinger et al. durchaus eine Bedeutung zukommen könnte. In deren Arbeit zeigten die IgM-positiven PCMZL einen ungünstigeren klinischen Verlauf, wozu durchaus der geringere Anteil an regulatorischen T-Zellen beigetragen haben könnte.<sup>99</sup> Auch in unserem Kollektiv zeigten alle IgM-positiven PCMZL, von denen uns entsprechende klinische Angaben vorlagen, eine höhere Rate an Rezidiven als die anderen PCMZL und somit letztlich einen ungünstigeren Verlauf, wenngleich die Gesamtzahl an IgM-positiven PCMZL in unserem Kollektiv zu gering war, um hiervon mehr als eine Tendenz ableiten zu können. Weiterhin wäre aufgrund der Rolle dieser T-Zellen beim IgG<sub>4</sub>-Klassenwechsel zu spekulieren, dass die IgG<sub>4</sub>-positiven PCMZL eine höhere Anzahl an regulatorischen T-Zellen aufweisen könnten. Interessanterweise war der Anteil an regulatorischen T-Zellen zwar, wie oben schon beschrieben, in den IgM-positiven PCMZL signifikant geringer als in den PCMZL mit Klassenwechsel,

unter den PCMZL mit IgA-, IgG<sub>1-3</sub>- oder IgG<sub>4</sub>-Expression zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Gehalts an regulatorischen T-Zellen. Dieses Ergebnis lässt somit die Schlussfolgerung zu, dass regulatorische T-Zellen offenbar nicht in besonderer Weise für die Persistenz oder Progression der IgG<sub>4</sub>-positiven PCMZL verantwortlich sind. Inwiefern diese T-Zell-Population allerdings einen wesentlichen Beitrag zur Entstehung IgG<sub>4</sub>-positiver PCMZL geleistet haben könnte, lässt sich an diesen voll ausgebildeten Lymphominfiltraten, als „Endstadium“ eines Entwicklungsprozesses, nicht beantworten, zumal sich in keinem der IgG<sub>4</sub>-positiven PCMZL unseres Kollektivs Hinweise auf residuelle, polyklonale IgG<sub>4</sub>-produzierende Plasmazellen einer zugrundeliegenden IgG<sub>4</sub>-Immunantwort fanden.

Da neben den primär kutanen nur die primär duralen MZL einen signifikant hohen Gehalt an IgG<sub>4</sub>-positiven Fällen aufweisen<sup>118</sup>, wäre zu spekulieren, ob in diesen Lokalisationen überzufällig häufig initial polyklonale IgG<sub>4</sub>-Immunantworten vorkommen, aus denen sich im weiteren Verlauf monoklonale IgG<sub>4</sub>-positive B-Zell-Populationen und schließlich IgG<sub>4</sub>-positive MZL entwickeln. Diesbezüglich hatten wir orientierende Untersuchungen zur Immunglobulinschwerkettenexpression an einem Kollektiv von 20 Fällen einer sog. Lymphadenosis cutis benigna durchgeführt. Hierbei handelt es sich um den Prototyp eines kutanen Pseudolymphoms, das durch ein tumorbildendes, aber entzündliches Hautinfiltrat mit reaktiven Lymphfollikeln und polyklonaler Plasmazellvermehrung charakterisiert und häufig mit einer Borrelieninfektion assoziiert ist. Anhand unserer kleinen, unpublizierten Fallserie sahen wir in der polyklonalen Plasmazellpopulation in 9/20 (40%) Fällen eine Prädominanz von IgG<sub>4</sub>, in 6/20 (35%) eine Prädominanz von IgG<sub>1-3</sub> und in 5/20 (25 %) eine Prädominanz von IgM, während eine Prädominanz IgA-positiver Plasmazellen in keinem der Fälle nachweisbar war. Im Hinblick auf die vorrangige Expression von IgG<sub>4</sub> bzw. IgG<sub>1-3</sub> sehen wir in diesen kutanen entzündlichen Infiltraten somit eine Übereinstimmung mit den neoplastischen Infiltraten eines PCMZL. So könnte über ein hautspezifisches, immunologisches Reaktionsmuster, das diesen präferenziellen Klassenwechsel induziert, aber auch über eine immunologisch bedingte Vorläuferläsion eines PCMZL spekuliert werden.

Histologisch stellen die Lymphadenosis cutis benigna und das PCMZL aufgrund ihres gleichartigen Infiltratmusters eine wesentliche Differentialdiagnose dar, die sich im Primärexizidat mitunter auch nicht auflösen lässt und erst durch einen rezidierten Verlauf in Richtung eines PCMZL weist. In unserem PCMZL-Kollektiv gibt es allerdings keinen Fall mit einem histologisch gesicherten, reaktiven/entzündlichen Hautinfiltrat, das der Entwicklung des PCMZL vorausgegangen wäre. Über einen möglichen Übergang von einem kutanen Pseudolymphom in ein PCMZL wurde auch in der Literatur diskutiert, konnte aber bislang noch nicht geklärt werden.<sup>140</sup> Fälle mit einer solchen Progression sind zwar beschrieben<sup>141</sup>, allerdings wird spekuliert, ob diese Fällen nicht doch bereits initial ein PCMZL darstellten, das sich, wie oben bereits ausgeführt, bei Primärmanifestation aber noch nicht definitiv diagnostizieren ließ.<sup>140</sup> Diesbezüglich müsste an einem größeren, klinisch, anamnestisch und histologisch detailliert charakterisierten Kollektiv nach immunologischen Vorläuferläsionen eines PCMZL in Analogie zu einer chronischen HP-assoziierten Gastritis als Vorläufer eines MZL vom MALT-Typ des Magens, gefahndet werden, was allerdings den Rahmen der hier vorgelegten Arbeit bei weitem überschritten hätte.

In einem erst kürzlich erschienenen Übersichtsartikel von Zucca et al. wird der Zusammenhang von chronischen Entzündungen bzw. Infektionen und der Entstehung von MZL vom MALT-Typ verschiedenster Primärlokalisationen dargestellt. Wie *Helicobacter pylori* im Magen, kann auch eine *Borrelia burgdorferi*-Infektion in der Haut zur Entstehung von lymphatischem Gewebe führen, das weder im Magen noch in der Haut physiologischerweise vorkommt.<sup>74</sup> Für einen solchen Zusammenhang spricht auch, dass es in Analogie zu gastralen MZL vom MALT-Typ, bei einem Teil der PCMZL zu einer Regression unter Antibiotika-Therapie kommen kann.<sup>142-144</sup> In der Literatur ist die Entstehung eines PCMZL auf dem Boden einer chronischen Infektion mit *Borrelia burgdorferi* allerdings generell noch umstritten und kann anhand serologischer Daten nur für wenige Fälle mit einer ausreichend hohen Wahrscheinlichkeit angenommen werden.<sup>91, 101, 142</sup> Takino et al. untersuchten 60 Fälle aus verschiedenen Regionen der Welt (Asien, USA, Deutschland) und

fanden keinen Zusammenhang mit einer solchen Infektion und der Entstehung eines PCMZL.<sup>91</sup> Van Maldegem et al beschrieben zudem zwei Fälle von PCMZL mit einem molekularbiologischen Nachweis (PCR) von *Borrelia burgdorferi*.<sup>101</sup> Diese waren, wie schon ein weiterer Fall von Roggero et al beschrieben war<sup>142</sup>, positiv für die Schwereketten IgM. In unserem Kollektiv konnte nur in zwei von neun Patienten, zu denen uns klinische Informationen zur Borrelienserologie vorlagen, eine Infektion mit *Borrelia burgdorferi* nachgewiesen werden. Allerdings zeigten diese beiden PCMZL eine IgG- bzw. IgG<sub>4</sub>-Expression, jedoch keine IgM-Expression. Aufgrund der insgesamt geringen Zahl an Fällen mit entsprechenden klinischen Informationen, kann an unserem Kollektiv über die pathogenetische Bedeutung einer *Borrelia burgdorferi*-Infektion und eine mögliche Assoziation mit einer Schwerekettenprädominanz bei PCMZL leider nicht Stellung genommen werden.

Das wesentliche Ergebnis dieser Arbeit, einer signifikant erhöhten Rate IgG<sub>4</sub>-positiver primär kutaner MZL (39 %) im Vergleich zu allen anderen untersuchten Primärlokalisationen (< 1 %), wird auch durch die Daten aus der Literatur unterstützt, die mehrheitlich von Einzelfällen IgG<sub>4</sub>-positiver, extrakutaner MZL berichten, wobei primär kutane MZL diesbezüglich noch nicht untersucht worden waren. Lediglich in einer Serie von 19, allerdings für sich genommen sehr seltenen, duralen MZL lag die Anzahl an IgG<sub>4</sub>-positiven Fällen mit 6/19 bei 32 %<sup>118</sup>, erreicht jedoch auch in dieser Lokalisation nicht den Anteil von 39 %, den wir in unserem Kollektiv primär kutaner MZL nachweisen konnten. Im Hinblick auf Einzelfallberichte und wenige Fallserien findet sich eine gewisse Häufung unter den okulären MZL, wobei der prozentuale Anteil IgG<sub>4</sub>-positiver MZL auch in einer Serie von 114 Fällen nur bei sieben, entsprechend 6 % lag.<sup>113, 121, 122, 119, 145</sup>

Im Hinblick auf einen pathogenetischen Zusammenhang zwischen einer IgG<sub>4</sub>-assoziierten Erkrankung und einem IgG<sub>4</sub>-positiven MZL gibt es allerdings derzeit im Wesentlichen Hinweise bei primär okulären MZL, wobei die Tränendrüse auch zu den häufiger befallenen Regionen einer IgG<sub>4</sub>-assoziierten Erkrankung gehört. Diesbezüglich beschreiben Oles et al in einer kürzlich

veröffentlichten Fallserie in 10 von 19 orbitalen MZL Kriterien, die mit einer IgG<sub>4</sub>-assoziierten Erkrankung vereinbar sind, wie beispielsweise ein lymphoplasmazelluläres Infiltrat mit Vermehrung IgG<sub>4</sub>-positiver Plasmazellen, eine Fibrosklerose oder eine obliterative Phlebitis sowie eine Vermehrung eosinophiler Granulozyten.<sup>146</sup> Im Übrigen konnte nur in wenigen weiteren Einzelfällen okulärer IgG<sub>4</sub>-positiver MZL eine Assoziation zu einer vorausgegangenen IgG<sub>4</sub>-assoziierten Erkrankung postuliert werden, wohingegen in der Mehrzahl der Fälle ein solcher Zusammenhang nicht gesichert werden konnte.<sup>118, 119, 147, 148</sup> Unabhängig von IgG<sub>4</sub>-positiven MZL wurde immer wieder ein erhöhtes Malignomrisiko (maligne Lymphome und solide Tumore) bei Patienten mit IgG<sub>4</sub>-assoziiierter Erkrankung beschrieben, was durch die Immundysbalance bei chronischen Erkrankungen bzw. Autoimmunerkrankungen erklärt wird.<sup>149-151</sup> Yamamoto et al. berichten in 106 untersuchten Patienten mit IgG<sub>4</sub>-assoziiierter Erkrankung über ein 10,4% erhöhtes Malignomrisiko dieser Patienten. Sie beschreiben hierunter neben malignen Lymphomen auch solide Tumore, wie Kolon- oder Lungenkarzinome.<sup>150</sup> Bezüglich maligner Lymphome finden sich in der Literatur neben MZL auch Einzelfallberichte anderer B- und T-Zell-Lymphome (hierunter beispielsweise ein diffuses großzelliges B-Zell-Lymphome, ein follikuläres Lymphom, ein anaplastisches großzelliges Lymphom oder auch ein nicht weiter spezifiziertes peripheres T-Zell-Lymphom), wobei sich diese zum Teil in einer anderen Lokalisation als die IgG<sub>4</sub>-positive Erkrankung manifestierten.<sup>149, 151-153</sup>

Über IgG<sub>4</sub>-assoziierte Erkrankungen der Haut wurden in den vergangenen Jahren mehrfach berichtet.<sup>109, 154-159</sup> In einer veröffentlichten Fallserie untersuchten Sato et al. zehn Patienten mit IgG<sub>4</sub>-assoziiierter Erkrankung der Haut.<sup>154</sup> Hier waren 8/10 Patienten älter als 50 Jahre, während in unserem Kollektiv 9/19 der IgG<sub>4</sub>-positiven PCMZL jünger als 50 Jahre alt waren. Weiterhin zeigten acht der zehn Patienten für IgG<sub>4</sub>-assoziierte Erkrankungen typische systemische Manifestationen mit extrakutaner Beteiligung an Nieren, Lymphknoten, Speichel- oder Tränendrüsen und bei allen 10 Patienten konnten erhöhte Serum-IgG<sub>4</sub>-Level nachgewiesen werden. Im Hinblick auf die IgG<sub>4</sub>-positiven MZL in unserem Kollektiv ergaben die vorhandenen klinischen

Informationen keine Hinweise auf eine zugrundeliegende bzw. zusätzlich bestehende IgG<sub>4</sub>-assoziierte Erkrankung, wenngleich eine solche, aufgrund unvollständiger klinischer Daten sowie inkompletter Staginguntersuchungen, nicht sicher ausgeschlossen werden konnte, zumal bei diesen Patienten entsprechende relevante Laborparameter wie sIL-6 oder Serum-IgG<sub>4</sub> und IgE typischerweise nicht erhoben wurden. Allerdings ergeben sich bezüglich der typischen Lokalisationen durchaus Unterschiede, die einen Zusammenhang ebenfalls unwahrscheinlich machen. IgG<sub>4</sub>-assoziierte Erkrankungen der Haut manifestieren sich bevorzugt periaurikulär sowie in der Mandibularegion des Kopf- und Halsbereiches.<sup>154-159</sup> In unserem Kollektiv fanden sich als typische Lokalisationen der IgG<sub>4</sub>-positiven PCMZL der Rücken, die Schulter und die obere Extremität. Auch typische histomorphologische Charakteristika einer IgG<sub>4</sub>-assoziierten Erkrankung wie Fibrose, obliterative Phlebitis, vermehrte eosinophile Granulozyten oder eine erhöhte Anzahl polyklonaler IgG<sub>4</sub>-positiver Plasmazellen fanden sich in den IgG<sub>4</sub>-positiven PCMZL unseres Kollektivs nicht.<sup>154</sup> Eine Leichtkettenrestriktion und/oder eine molekularbiologisch nachweisbare klonale B-Zell-Population, wie sie für PCMZL charakteristisch sind, würden prinzipiell sogar gegen die Diagnose einer IgG<sub>4</sub>-assoziierten Erkrankungen der Haut sprechen, und wurden ganz entsprechend in den publizierten Fällen auch nicht nachgewiesen.<sup>154-156, 160</sup> In der Zusammenschau sämtlicher Befunde ergeben sich somit in unserem Kollektiv keine Hinweise auf einen (pathogenetischen) Zusammenhang zwischen einer IgG<sub>4</sub>-assoziierten Erkrankung und einem IgG<sub>4</sub>-positiven PCMZL.

Genetische Alterationen konnten bislang nur in Einzelfällen von PCMZL nachgewiesen werden, wobei sich hier insbesondere nur sehr selten MALT1-, BCL10- oder API2-Translokationen finden, die aber gehäuft bei bestimmten extrakutanen MALT-Lymphomen auftreten.<sup>53, 87</sup>

Erst in jüngster Zeit wurde eine bestimmte MyD88-Mutation (L265P) beschrieben, die in einem Großteil der lymphoplasmozytischen Lymphome (sog. Morbus Waldenström), aber auch in zahlreichen anderen B-Zell-Lymphom-Entitäten gefunden werden kann (vgl. Tabelle 10). Für die hier



vorgelegte Arbeit relevant ist der Nachweis einer MyD88-Mutation in knapp 10 % extranodaler Marginalzonen-Lymphome und knapp 70 % der primär kutanen diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome vom sog. Bein-Typ, während die bislang nur 5 untersuchten PCMZL-Fälle keine MyD88-Mutation aufwiesen.<sup>58, 64, 65, 68</sup> Aufgrund dieser Ergebnisse haben wir auch an unserem PCMZL-Kollektiv molekularbiologische Untersuchungen zur Frage einer MyD88-Mutation durchgeführt. Allerdings konnten wir in den 45/49 diesbezüglich auswertbaren Fällen diese MyD88 (L265P)-Mutation nicht nachweisen und somit an einem größeren Kollektiv die entsprechenden Daten aus der Literatur bestätigen.

Die Diskrepanz von knapp 10 % MyD88-mutierten extranodalen (extrakutanen) MZL zu 0 % MyD88-mutierten PCMZL stellt neben den stark divergenten Translokationsnachweisen somit einen weiteren molekulargenetischen Unterschied zwischen diesen Gruppen dar und deutet auf einen völlig anderen pathogenetischen Hintergrund der PCMZL hin.<sup>53, 87</sup> Bedenkt man allerdings, dass MyD88 (L265P)-Mutationen bevorzugt in IgM-positiven lymphoplasmozytischen Lymphomen sowie anderen B-Zell-Lymphomen mit IgM-Expression beschrieben wurden<sup>68</sup> und sich in der Literatur bislang nur einzelne MyD88-mutierte Fälle von nicht-IgM-positiven B-Zell-Lymphomen, hierunter vor allem IgA- und IgG-positiv lymphoplasmozytische Lymphome, finden,<sup>59, 161</sup> passt der fehlende Mutationsnachweis gut zu der Tatsache, dass die meisten PCMZL einen Klassenwechsel hin zu IgA, IgG<sub>1-3</sub> oder IgG<sub>4</sub> vollzogen haben und nur wenige Fälle die Schwere IgM exprimieren. Vor dem Hintergrund, dass MyD88 positiv zum Immunglobulinklassenwechsel in einem TIR-unabhängigen Signalweg beitragen kann,<sup>162</sup> ist allerdings nicht zu verstehen, warum diese gain-of-function Mutation bislang fast ausschließlich in IgM-positiven Lymphomen gefunden wurde, so dass die Aufklärung eines entsprechenden Zusammenhangs weiterer Untersuchungen bedarf. Der fehlende Nachweis einer MyD88-Mutation in PCMZL, die generell eine exzellente Prognose aufweisen<sup>53, 87</sup>, passt auch zu der Beobachtung, dass der Nachweis einer MyD88-Mutation, unabhängig von der jeweiligen Lymphom-Entität, mit einem erhöhten Risiko für eine Krankheitsprogression und somit mit

einer schlechteren Prognose assoziiert ist.<sup>64, 163</sup> Auch Transformationen von indolenten hin zu aggressiven Lymphomen sind in Assoziation zu einer MyD88 (L265P)-Mutation beschrieben.<sup>59, 69</sup>

Die Pathogenese der PCMZL ist somit sehr komplex und bislang noch unzureichend geklärt. Vor allem die Frage, ob PCMZL de novo oder auf dem Boden eines chronischen entzündlichen, eventuell infektiösen Prozesses entstehen, bleibt noch unklar. Durch chronische Antigenstimulation oder bisher noch unbekannte Stimuli kann es in der Haut zur Ausbildung von Sekundärfollikeln kommen. Im Zuge dessen kommt es in B-Zellen zu somatischen Hypermutationen und zum Klassenwechsel, wobei hierbei nur selten genetische Alterationen auftreten, die zu einem Antigen-unabhängigen, unkontrollierten weiteren B-Zell-Wachstum führen können.<sup>33, 127, 164</sup> Das Phänomen einer aberranten somatischen Hypermutation (ASHM), welches im Zuge eines solchen immunologischen Geschehens auftreten kann und als Ursache für eine genetische Instabilität in diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen beschrieben wurde<sup>165</sup>, haben Deutsch et al. an elf PCMZL untersucht. Anhand des Mutationsprofils einzelner Gene (PAX5, RhoH/TTF, cMYC und PIM1) konnten in 8/11 PCMZL insgesamt 17 Sequenzvarianten mit den typischen molekularen Merkmalen einer ASHM nachgewiesen werden. Wengleich nur zwei dieser Mutationen (eine im PIM1- und eine im MYC-Gen) zu einem Aminosäureaustausch mit einer potentiellen funktionellen Relevanz führen, postulieren die Autoren, dass ASHM eine Rolle bei der Pathogenese von PCMZL spielen könnten.<sup>166</sup> Angaben zur Schwerekettenexpression der PCMZL finden sich in dieser Arbeit allerdings nicht, so dass zu eventuellen Unterschieden, die für die Fragestellung der hier vorgelegten Arbeit relevant sein könnten, nicht Stellung genommen werden kann. Weiterhin finden sich in der Literatur auch Untersuchungen zu ASHM in follikulären Lymphomen und eine mögliche Assoziation zu einer Transformation in ein diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, was allerdings bislang so nicht eindeutig gezeigt werden konnte.<sup>167, 168</sup>

Genetische Alterationen infolge eines chronischen entzündlichen Prozesses bzw. einer chronischen immunologischen Stimulation liegen nach derzeitigem Verständnis vermutlich nicht nur der Entwicklung solider Tumoren (z. B. Kolonkarzinome bei Colitis ulcerosa<sup>169</sup>), sondern auch der Entwicklung extranodaler MZL zugrunde, wenngleich dies nur für bestimmte Primärlokalisationen, insbesondere die gastralen MZL vom MALT-Typ infolge einer chronischen HP-assoziierten Gastritis, schon hinreichend gut belegt werden konnte.<sup>75</sup> Prinzipiell wäre somit auch für PCMZL eine solche pathogenetisch relevante Assoziation zu postulieren, in Anbetracht der aufgezeigten genetischen, immunphänotypischen und klinischen Unterschiede zwischen PCMZL und extrakutanen MZL aber auch in Frage zu stellen.

Aufgrund der, trotz der Rezidivneigung, sehr guten Prognose sowie der nur extrem seltenen extrakutanen Manifestationen wird beispielsweise von manchen Experten diskutiert, das PCMZL als lymphoproliferative Erkrankung und nicht (stigmatisierend) als malignes Lymphom zu bezeichnen.<sup>127</sup>

Im klinischen Alltag werden allerdings bei Hautinfiltraten durch MZL derzeit häufig noch Staging-Untersuchungen wie bei anderen, prognostisch schlechteren Lymphomentitäten (z. B. Computertomographie und Knochenmarkbiopsie) durchgeführt, was für den Patienten, aber auch für das Gesundheitswesen eine Belastung darstellt. Diese Untersuchungen erfolgen zur Frage extrakutaner Manifestationen eines PCMZL, also zur Stadieneinteilung, aber auch zum Ausschluss einer kutanen Manifestation eines primär extrakutanen MZL. Auf dem Boden der Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit, könnten diese Untersuchungen zumindest für die Patienten mit kutanen Infiltraten IgG<sub>4</sub>-positiver MZL vermieden werden, da es sich bei diesen mit einer an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit um primär kutane MZL handelt, die zudem kein Risiko für extrakutane Manifestationen aufweisen. Im Hinblick auf tatsächlich primär kutane MZL finden sich in der Literatur bislang nur für IgM-positive Fälle extrakutane Manifestationen<sup>99</sup> Andersherum betrachtet kommt aufgrund der IgM-Prädominanz unter den extrakutanen MZL (in unserem Kollektiv 78 %) im Wesentlichen auch nur für IgM-positive kutane

Infiltrate eine kutane Manifestation eines primär extrakutanen MZL in Betracht, so dass für diese Patientengruppe entsprechende Staging-Untersuchungen gerechtfertigt erscheinen.

## 5 Zusammenfassung

Marginalzonen-Lymphome (MZL) gehören zur Gruppe der indolenten Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zell-Reihe und werden nach der aktuellen WHO-Klassifikation in das nodale MZL, das splenische MZL und das extranodale MZL des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT-Lymphom) unterteilt. Zu Letzterem zählt nach der aktuellen WHO-Klassifikation auch das primär kutane Marginalzonen-Lymphom (PCMZL).<sup>53, 87</sup>

Eine klonale Leicht- und Schwerekettenexpression kann immunhistochemisch speziell in MZL mit sekretorischer/plasmozytoider Differenzierung (unabhängig von ihrer Primärlokalisierung) nachgewiesen werden. In Voruntersuchungen war aufgefallen, dass von primär kutanen MZL ungewöhnlich häufig IgG bzw. IgG<sub>4</sub> exprimiert wird, während extrakutane MZL auch nach Literaturangaben eine präferentielle IgM-Expression aufweisen.<sup>88, 100</sup>

In der hier vorgelegten Arbeit wurde die Prävalenz einer IgG<sub>4</sub>-Expression an einer großen Kohorte von sekretorisch/plasmazellulär differenzierten MZL untersucht. Hierzu wurde die Immunglobulinschwerkettenexpression an 169 MZL unterschiedlicher Primärlokalisationen immunhistochemisch analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass PCMZL überzufällig häufig IgG exprimieren (78 %, 35/49), wobei der Anteil IgG<sub>4</sub>-positiver PCMZL mit 54 % (19 von 35) sogar über dem der anderen drei IgG-Subklassen lag (46 %, 16/35). Unter den 120 anderen, nicht kutanen MZL war lediglich ein okuläres MZL positiv für die Schwerekette IgG<sub>4</sub>. In der Literatur wurde bislang nur eine überzufällig häufige IgG<sub>4</sub>-Expression in einer kleinen Serie primär duraler MZL und in der Zusammenschau von Einzelfallberichten für MZL der okulären Adnexen dokumentiert.<sup>118-122</sup>

Extranodale MZL vom MALT-Typ können auf dem Boden chronisch entzündlicher Erkrankungen entstehen, ein Zusammenhang der insbesondere für die HP-assoziierte Gastritis und das MZL vom MALT-Typ des Magens seit vielen Jahren anerkannt ist. Bei der sog. IgG<sub>4</sub>-assoziierten Erkrankung handelt es sich um eine chronische, fibrosklerosierende, meist tumorbildende

Entzündung, die in praktisch jedem Organ vorkommen kann.

Histomorphologisches Merkmal ist unter anderem die Vermehrung IgG<sub>4</sub>-positiver Plasmazellen. Wir überprüften daher den Zusammenhang zwischen dieser sog. IgG<sub>4</sub>-assoziierten Erkrankung und der Entstehung von IgG<sub>4</sub>-positiven MZL auf dem Boden dieser Erkrankung. In Zusammenschau der histologischen und der verfügbaren klinischen Befunde ergaben sich jedoch bei den Patienten mit einem IgG<sub>4</sub>-positiven PCMZL keine Hinweise auf eine zugrundeliegende/zusätzlich bestehende IgG<sub>4</sub>-assoziierte Erkrankung. Für die Entstehung eines IgG<sub>4</sub>-positiven PCMZL auf dem Boden einer IgG<sub>4</sub>-assoziierten Erkrankung ergibt sich anhand der hier vorgelegten Arbeit kein Anhalt.

Um Aufschluss darüber zu erlangen, ob die für einen IgG<sub>4</sub>-Klassenwechsel mitverantwortlichen Subpopulationen des Immunsystems auch in einem manifesten Lymphominfiltrat in anderer Verteilung vorhanden sind als in den nicht-IgG<sub>4</sub>-rearrangierten MZL, wurde in den 49 PCMZL mit unterschiedlicher Schwerekettenexpression das begleitende B- und T-Zell-Infiltrat analysiert und verglichen. Bestimmt wurden der Gehalt an B-Zellen, reaktiven T-Zellen sowie der Anteil an CD4/CD8-positiven T-Zellen, an regulatorischen T-Zellen sowie an folliculären Helfer-T-Zellen. Im Zuge dieser Auswertung konnte jedoch kein signifikanter Unterschied, der die IgG<sub>4</sub>-positiven PCMZL von den IgA- und IgG<sub>1-3</sub>-positiven PCMZL differenziert, gezeigt werden. Allerdings zeigten die IgM-positiven PCMZL für einige der untersuchten Parameter (T-Zell-Gehalt, Anteil an CD4/CD8-positiven reaktiven T-Zellen sowie regulatorischen T-Zellen) signifikante Unterschiede zu den PCMZL, deren Tumorzellen einen Klassenwechsel vollzogen haben. Allerdings ist der Anteil IgM-positiver PCMZL am Gesamtkollektiv zu gering, als dass man hiervon eine pathogenetische Relevanz ableiten könnte.

Ferner wurden die verfügbaren klinischen Daten der 49 PCMZL ausgewertet, um gegebenenfalls Schwereketten-, speziell IgG<sub>4</sub>-assoziierte Unterschiede innerhalb dieses Kollektivs zu detektieren. Hinsichtlich Alter, Geschlecht, klinisches Erscheinungsbild und Symptome, Rezidivhäufigkeit und Borrelienserologie konnten zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen den

vier Schwereketten-subgruppen gezeigt werden, allerdings zeigten die IgM-positiven PCMZL eine höhere Rate an Rezidiven und somit letztlich einen ungünstigeren Verlauf.

Genetische Alterationen wie Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein (MALT)1-, B-cell lymphoma (BCL)10- oder Atrophin-1-interacting protein (API)2-Translokationen, die bei bestimmten extrakutanen MALT-Lymphomen beschrieben wurden, konnten bislang nur in Einzelfällen von PCMZL nachgewiesen werden.<sup>53, 87</sup>

Eine bestimmte Mutation im Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88-L265P-Mutation), die insbesondere das sog. lymphoplasmozytische Lymphom charakterisiert, nach Literaturangaben aber auch in bis zu 10 % der extrakutanen MZL und vielen anderen B-Zell-Lymphomen nachgewiesen werden kann, war in primär kutanen MZL bislang nur in Einzelfällen untersucht und nicht gefunden worden.<sup>65, 68</sup> Da es sich hierbei um eine pathogenetisch relevante gain-of-function Mutation handelt,<sup>4, 58-60</sup> haben wir an dem in dieser Arbeit näher charakterisierten Kollektiv der PCMZL molekularbiologische Untersuchungen zur Frage einer MyD88 (L265P)-Mutation durchgeführt. Wie auch schon in den fünf bislang publizierten PCMZL<sup>65, 68</sup>, konnten auch wir in keinem der diesbezüglich auswertbaren 45 PCMZL eine MyD88-L265P-Mutation nachweisen, so dass davon auszugehen ist, dass eine solche Mutation in dieser Entität tatsächlich nicht vorkommt. Bislang finden sich somit weder in der Literatur noch anhand unserer eigenen Untersuchungen Hinweise auf eine rekurrente genetische Alteration in PCMZL.

Die Bedeutung der präferenziellen IgG<sub>4</sub>-Expression in PCMZL kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit leider nicht abschließend geklärt werden. Hinsichtlich morphologischer, immunphänotypischer und klinischer Merkmale konnten zwischen den IgG<sub>4</sub>-positiven PCMZL und den übrigen PCMZL, die einen Klassenwechsel hin zu IgA oder IgG<sub>1-3</sub> vollzogen hatten, in unserem Kollektiv keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Die Frage bleibt, welche besonderen Antigene, Triggerfaktoren oder Umwelteinflüsse in der Haut vorkommen, die B-Zellen dazu veranlassen, sich präferentiell zu IgG<sub>4</sub>-

produzierenden Plasmazellen zu entwickeln. Ferner bleibt zu überlegen, ob sich ein IgG<sub>4</sub>-positives PCMZL de novo oder aus einem initial polyklonalen, IgG<sub>4</sub>-produzierenden B- bzw. Plasmazellinfiltrat entwickelt, in dem es durch bisher noch nicht bekannte Faktoren zur Ausbildung und Proliferation eines monoklonalen, autonomen bzw. neoplastischen B- bzw. Plasmazellsubklons kommt. Diesbezüglich konnten wir durch präliminäre Untersuchungen an 20 Fällen einer sog. Lymphadenosis cutis benigna, die das prototypische entzündliche Hautinfiltrat einer Infektion mit *Borrelia burgdorferi* darstellt, in 40 % der Fälle eine prädominante Expression von IgG<sub>4</sub> und in 35 % eine prädominante Expression von IgG<sub>1-3</sub> innerhalb der in diesen Läsionen polyklonalen Plasmazellpopulation nachweisen. So ist im Hinblick auf die vorrangige Expression von IgG<sub>4</sub> bzw. IgG<sub>1-3</sub> in diesen kutanen entzündlichen Infiltraten eine Übereinstimmung mit den neoplastischen Infiltraten eines PCMZL zu sehen. Es könnte also durchaus über ein hautspezifisches immunologisches Reaktionsmuster, das diesen präferenziellen Klassenwechsel induziert, aber auch über eine immunologisch bedingte Vorläuferläsion eines PCMZL spekuliert werden. Allerdings kann anhand unseres eigenen Kollektivs, aber auch anhand der Literatur nur in einem kleinen Teil der PCMZL-Patienten eine positive Borrelienserologie als Hinweis auf eine zugrundeliegende Borrelieninfektion nachgewiesen werden. Auch überzeugende Hinweise auf entzündliche Vorläuferläsionen bei Patienten mit PCMZL finden sich weder in unserem Kollektiv, noch in der Literatur, wobei diesbezüglich eine sehr viel detailliertere klinisch-anamnestische und histologische Korrelation an einem größeren Kollektiv nötig wäre.

Inwiefern auch in anderen primär kutanen B-Zell-Lymphomen eine präferentielle IgG<sub>4</sub>-Expression zu finden ist, wäre im Hinblick auf die postulierten Besonderheiten des Hautmikromilieus interessant, ist jedoch mit immunhistochemischen Methoden vermutlich nur anhand von Einzelfällen eines großen Kollektivs zu klären, da folliculäre Lymphome und diffuse großzellige B-Zell-Lymphome im Gegensatz zu Marginalzonen-Lymphome nur selten eine immunhistochemisch detektierbare sekretorische Differenzierung aufweisen.



Ein wesentliches, klinisch relevantes Ergebnis der hier vorgelegten Arbeit besteht darin, dass es sich bei IgG<sub>4</sub>-positiven kutanen MZL mit einer an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit um primär kutane MZL mit einer sehr guten Prognose handelt, die zudem kein Risiko für extrakutane Manifestationen aufweisen. So könnte im Falle eines solchen Befundes für den Patienten belastende und kostenintensive Staging-Untersuchungen wie eine Computertomographie, aber auch eine Knochenmarkbiopsie vermieden werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Werner Böcker HD, Philipp U Heitz, Holger Moch, Gerald Höfler, Hans Kreipe. *Pathologie*, 5. Auflage edn: Urban & Fischer in Elsevier, 2012.
2. Sokol CL, Luster AD. The Chemokine System in Innate Immunity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2015; 7(5).
3. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 2002; 20:197-216.
4. Murphy KP. *Janeway's immunobiology*, 8. edn: Garland Science, 2012.
5. Vazquez MI, Catalan-Dibene J, Zlotnik A. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine* 2015.
6. Melchers F. Checkpoints that control B cell development. *The Journal of clinical investigation* 2015; 125(6):2203-10.
7. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013; 131(4):959-71.
8. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008; 112(5):1570-80.
9. McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. *Annual review of immunology* 2005; 23:487-513.
10. Gatto D, Brink R. The germinal center reaction. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2010; 126(5):898-907; quiz 8-9.
11. Basso K, Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nature reviews Immunology* 2015; 15(3):172-84.
12. Shlomchik MJ, Weisel F. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunological reviews* 2012; 247(1):52-63.
13. McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L. Molecular programming of B cell memory. *Nature reviews Immunology* 2012; 12(1):24-34.
14. McHeyzer-Williams LJ, Malherbe LP, McHeyzer-Williams MG. Checkpoints in memory B-cell evolution. *Immunological reviews* 2006; 211:255-68.
15. Heesters BA, Myers RC, Carroll MC. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nature reviews Immunology* 2014; 14(7):495-504.
16. Matesanz-Isabel J, Sintes J, Llinas L, *et al.* New B-cell CD molecules. *Immunology letters* 2011; 134(2):104-12.

17. Narciso JE, Uy ID, Cabang AB, *et al.* Analysis of the antibody structure based on high-resolution crystallographic studies. *New biotechnology* 2011; 28(5):435-47.
18. Kaveri SV, Silverman GJ, Bayry J. Natural IgM in immune equilibrium and harnessing their therapeutic potential. *Journal of immunology* 2012; 188(3):939-45.
19. Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, Alt FW. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annual review of immunology* 2006; 24:541-70.
20. Mostoslavsky R, Alt FW, Rajewsky K. The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism. *Cell* 2004; 118(5):539-44.
21. Bruce Alberts AJ, Julian Lewis. *Molekularbiologie der Zelle*, Vol. 5: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011.
22. Chen K, Xu W, Wilson M, *et al.* Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nature immunology* 2009; 10(8):889-98.
23. Brandtzaeg P. Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. *Frontiers in immunology* 2013; 4:222.
24. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2010; 125(2 Suppl 2):S73-80.
25. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology* 2014; 5:520.
26. Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J, Rispens T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2009; 39(4):469-77.
27. Lighaam LC, Aalberse RC, Rispens T. IgG4-Related Fibrotic Diseases from an Immunological Perspective: Regulators out of Control? *International journal of rheumatology* 2012; 2012:789164.
28. Stone JH, Zen Y, Deshpande V. IgG4-related disease. *The New England journal of medicine* 2012; 366(6):539-51.
29. Nirula A, Glaser SM, Kalled SL, Taylor FR. What is IgG4? A review of the biology of a unique immunoglobulin subtype. *Current opinion in rheumatology* 2011; 23(1):119-24.
30. Rispens T, Meesters J, den Bleker TH, *et al.* Fc-Fc interactions of human IgG4 require dissociation of heavy chains and are formed predominantly by the intra-chain hinge isomer. *Molecular immunology* 2013; 53(1-2):35-42.

31. van der Neut Kolfschoten M, Schuurman J, Losen M, *et al.* Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* 2007; 317(5844):1554-7.
32. Akitake R, Watanabe T, Zaima C, *et al.* Possible involvement of T helper type 2 responses to Toll-like receptor ligands in IgG4-related sclerosing disease. *Gut* 2010; 59(4):542-5.
33. Frieder D, Larijani M, Tang E, *et al.* Antibody diversification: mutational mechanisms and oncogenesis. *Immunologic research* 2006; 35(1-2):75-88.
34. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Cogne M, Pinaud E, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis. *European journal of immunology* 2010; 40(12):3306-11.
35. Blombery PA, Wall M, Seymour JF. The molecular pathogenesis of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *European journal of haematology* 2015.
36. Schatz DG, Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nature reviews Immunology* 2011; 11(4):251-63.
37. Zhang YH, Shetty K, Surleac MD, Petrescu AJ, Schatz DG. Mapping and Quantitation of the Interaction between the Recombination Activating Gene Proteins RAG1 and RAG2. *The Journal of biological chemistry* 2015; 290(19):11802-17.
38. Maizels N. Immunoglobulin gene diversification. *Annual review of genetics* 2005; 39:23-46.
39. Kato L, Stanlie A, Begum NA, *et al.* An evolutionary view of the mechanism for immune and genome diversity. *Journal of immunology* 2012; 188(8):3559-66.
40. Sakaguchi N, Maeda K, Kuwahara K. Molecular mechanism of immunoglobulin V-region diversification regulated by transcription and RNA metabolism in antigen-driven B cells. *Scandinavian journal of immunology* 2011; 73(6):520-6.
41. Hall BM. T Cells: Soldiers and Spies-The Surveillance and Control of Effector T Cells by Regulatory T Cells. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2015.
42. Craft JE. Follicular helper T cells in immunity and systemic autoimmunity. *Nature reviews Rheumatology* 2012; 8(6):337-47.
43. Huehn J, Beyer M. Epigenetic and transcriptional control of Foxp3 regulatory T cells. *Seminars in immunology* 2015; 27(1):10-8.
44. Huynh A, Zhang R, Turka LA. Signals and pathways controlling regulatory T cells. *Immunological reviews* 2014; 258(1):117-31.

45. Felcht M, Heck M, Weiss C, *et al.* Expression of the T-cell regulatory marker FOXP3 in primary cutaneous large B-cell lymphoma tumour cells. *The British journal of dermatology* 2012; 167(2):348-58.
46. Kelley TW, Parker CJ. CD4 (+)CD25 (+)Foxp3 (+) regulatory T cells and hematologic malignancies. *Frontiers in bioscience* 2010; 2:980-92.
47. Bates GJ, Fox SB, Han C, *et al.* Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006; 24(34):5373-80.
48. Wang WL, Chang WL, Yang HB, *et al.* Quantification of tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T cells enables the identification of high-risk patients for developing synchronous cancers over upper aerodigestive tract. *Oral oncology* 2015; 51(7):698-703.
49. Linterman MA, Vinuesa CG. Signals that influence T follicular helper cell differentiation and function. *Seminars in immunopathology* 2010; 32(2):183-96.
50. Laurent C, Fazilleau N, Brousset P. A novel subset of T-helper cells: follicular T-helper cells and their markers. *Haematologica* 2010; 95(3):356-8.
51. Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, *et al.* PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nature immunology* 2010; 11(6):535-42.
52. Gaulard P, de Leval L. Follicular helper T cells: implications in neoplastic hematopathology. *Seminars in diagnostic pathology* 2011; 28(3):202-13.
53. Swerdlow SH, Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. (Eds.). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, Vol. 2: IARC: Lyon 2008, 2008.
54. Swerdlow S.H. CE, Harris N.L., *et al.* *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, Vol. 2: IARC: Lyon 2008, 2008.
55. C. Buske SM. *Indolente Lymphome*: Deutscher Ärzte-Verlag, 2011.
56. Wang SS, Vajdic CM, Linet MS, *et al.* Associations of non-Hodgkin Lymphoma (NHL) risk with autoimmune conditions according to putative NHL loci. *American journal of epidemiology* 2015; 181(6):406-21.
57. Zhang XM, Aguilera N. New immunohistochemistry for B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2014; 138(12):1666-72.
58. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, *et al.* Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011; 470(7332):115-9.

59. Treon SP, Xu L, Yang G, *et al.* MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *The New England journal of medicine* 2012; 367(9):826-33.
60. Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL, Horikawa K. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Frontiers in immunology* 2014; 5:367.
61. Jeelall YS, Horikawa K. Oncogenic MYD88 mutation drives Toll pathway to lymphoma. *Immunology and cell biology* 2011; 89(6):659-60.
62. Varettoni M, Arcaini L, Zibellini S, *et al.* Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms. *Blood* 2013; 121(13):2522-8.
63. Kraan W, Horlings HM, van Keimpema M, *et al.* High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites. *Blood cancer journal* 2013; 3:e139.
64. Pham-Ledard A, Beylot-Barry M, Barbe C, *et al.* High frequency and clinical prognostic value of MYD88 L265P mutation in primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg-type. *JAMA dermatology* 2014; 150(11):1173-9.
65. Pham-Ledard A, Cappellen D, Martinez F, *et al.* MYD88 somatic mutation is a genetic feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *The Journal of investigative dermatology* 2012; 132(8):2118-20.
66. Li ZM, Rinaldi A, Cavalli A, *et al.* MYD88 somatic mutations in MALT lymphomas. *British journal of haematology* 2012; 158(5):662-4.
67. Gonzalez-Aguilar A, Idbah A, Boisselier B, *et al.* Recurrent mutations of MYD88 and TBL1XR1 in primary central nervous system lymphomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012; 18(19):5203-11.
68. Gachard N, Parrens M, Soubeyran I, *et al.* IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenstrom macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 2013; 27(1):183-9.
69. Jimenez C, Sebastian E, Chillon MC, *et al.* MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenstrom's macroglobulinemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 2013; 27(8):1722-8.

70. Piris MA, Arribas A, Mollejo M. Marginal zone lymphoma. *Seminars in diagnostic pathology* 2011; 28(2):135-45.
71. Kahl B, Yang D. Marginal zone lymphomas: management of nodal, splenic, and MALT NHL. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program* 2008:359-64.
72. Peter Koch MB, Christian Buske, Martin Dreyling, Hans Theodor Eich, Wolfram Klapper, Markus Raderer, Gabriele Reinartz, Michael Steurer, Bernhard Josef Wörmann. Extranodales Marginalzonen-Lymphom (MZoL)
73. Sagaert X, Tousseyn T. Marginal zone B-cell lymphomas. *Discovery medicine* 2010; 10(50):79-86.
74. Zucca E, Bertoni F, Vannata B, Cavalli F. Emerging role of infectious etiologies in the pathogenesis of marginal zone B-cell lymphomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014; 20(20):5207-16.
75. Troppan K, Wenzl K, Neumeister P, Deutsch A. Molecular Pathogenesis of MALT Lymphoma. *Gastroenterology research and practice* 2015; 2015:102656.
76. Streubel B, Lamprecht A, Dierlamm J, et al. T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood* 2003; 101(6):2335-9.
77. Streubel B, Simonitsch-Klupp I, Mullauer L, et al. Variable frequencies of MALT lymphoma-associated genetic aberrations in MALT lymphomas of different sites. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 2004; 18(10):1722-6.
78. Streubel B, Vinatzer U, Lamprecht A, Raderer M, Chott A. T(3;14)(p14.1;q32) involving IGH and FOXP1 is a novel recurrent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 2005; 19(4):652-8.
79. Chanudet E, Ye H, Ferry J, et al. A20 deletion is associated with copy number gain at the TNFA/B/C locus and occurs preferentially in translocation-negative MALT lymphoma of the ocular adnexa and salivary glands. *The Journal of pathology* 2009; 217(3):420-30.
80. Honma K, Tsuzuki S, Nakagawa M, et al. TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2009; 114(12):2467-75.
81. Bachy E, Salles G. Are we nearing an era of chemotherapy-free management of indolent lymphoma? *Clinical cancer research : an official*

- journal of the American Association for Cancer Research* 2014; 20(20):5226-39.
82. Vannata B, Zucca E. Primary extranodal B-cell lymphoma: current concepts and treatment strategies. *Chinese clinical oncology* 2015; 4(1):10.
  83. Yahalom J, Illidge T, Specht L, *et al.* Modern radiation therapy for extranodal lymphomas: field and dose guidelines from the International Lymphoma Radiation Oncology Group. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2015; 92(1):11-31.
  84. Wundisch T, Thiede C, Morgner A, *et al.* Long-term follow-up of gastric MALT lymphoma after *Helicobacter pylori* eradication. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005; 23(31):8018-24.
  85. Mazloom A, Medeiros LJ, McLaughlin PW, *et al.* Marginal zone lymphomas: factors that affect the final outcome. *Cancer* 2010; 116(18):4291-8.
  86. Cerroni L. *Skin Lymphoma: The Illustrated Guide*, Vol. 4: Wiley-Blackwell, 2014.
  87. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, *et al.* WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005; 105(10):3768-85.
  88. Kempf W, Denisjuk N, Kerl K, Cozzio A, Sander C. Primary cutaneous B-cell lymphomas. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 2012; 10(1):12-22; quiz 3.
  89. Fink-Puches R, Chott A, Ardigo M, *et al.* The spectrum of cutaneous lymphomas in patients less than 20 years of age. *Pediatric dermatology* 2004; 21(5):525-33.
  90. Dalle S, Thomas L, Balme B, Dumontet C, Thieblemont C. Primary cutaneous marginal zone lymphoma. *Critical reviews in oncology/hematology* 2010; 74(3):156-62.
  91. Takino H, Li C, Hu S, *et al.* Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: a molecular and clinicopathological study of cases from Asia, Germany, and the United States. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2008; 21(12):1517-26.
  92. Ponzoni M, Ferreri AJ, Mappa S, *et al.* Prevalence of *Borrelia burgdorferi* infection in a series of 98 primary cutaneous lymphomas. *The oncologist* 2011; 16(11):1582-8.



93. de la Fouchardiere A, Vandenesch F, Berger F. Borrelia-associated primary cutaneous MALT lymphoma in a nonendemic region. *The American journal of surgical pathology* 2003; 27(5):702-3.
94. May SA, Netto G, Domiati-Saad R, Kasper C. Cutaneous lymphoid hyperplasia and marginal zone B-cell lymphoma following vaccination. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2005; 53(3):512-6.
95. Breton AL, Poulalhon N, Balme B, Thomas L, Dalle S. Primary cutaneous marginal zone lymphoma as a complication of radiation therapy: Case report and review. *Dermatology online journal* 2010; 16(12):6.
96. Gronbaek K, Ralfkiaer E, Kalla J, Skovgaard GL, Guldborg P. Infrequent somatic Fas mutations but no evidence of Bcl10 mutations or t(11;18) in primary cutaneous MALT-type lymphoma. *The Journal of pathology* 2003; 201(1):134-40.
97. Hallermann C, Kaune KM, Gesk S, *et al.* Molecular cytogenetic analysis of chromosomal breakpoints in the IGH, MYC, BCL6, and MALT1 gene loci in primary cutaneous B-cell lymphomas. *The Journal of investigative dermatology* 2004; 123(1):213-9.
98. Espinet B, Gallardo F, Pujol RM, *et al.* Absence of MALT1 translocations in primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma. *Haematologica* 2004; 89(9):ELT14.
99. Edinger JT, Kant JA, Swerdlow SH. Cutaneous marginal zone lymphomas have distinctive features and include 2 subsets. *The American journal of surgical pathology* 2010; 34(12):1830-41.
100. Ferenczi K. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphomas: are they different from other extranodal marginal zone B-cell lymphomas? *Journal of cutaneous pathology* 2009; 36(6):715-7.
101. van Maldegem F, van Dijk R, Wormhoudt TA, *et al.* The majority of cutaneous marginal zone B-cell lymphomas expresses class-switched immunoglobulins and develops in a T-helper type 2 inflammatory environment. *Blood* 2008; 112(8):3355-61.
102. Gomez-de la Fuente E, Villalon LB, Calzado-Villarreal L, Pinedo-Moraleda F, Lopez-Estebanz JL. [Splenic marginal zone B-cell lymphoma with epidermotropic skin involvement]. *Actas dermo-sifiliograficas* 2012; 103(5):427-31.
103. Wilcox RA. Cutaneous B-cell lymphomas: 2015 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American journal of hematology* 2015; 90(1):73-6.

104. Suarez AL, Querfeld C, Horwitz S, *et al.* Primary cutaneous B-cell lymphomas: part II. Therapy and future directions. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2013; 69(3):343 e1-11; quiz 55-6.
105. Kamisawa T, Funata N, Hayashi Y, *et al.* A new clinicopathological entity of IgG4-related autoimmune disease. *Journal of gastroenterology* 2003; 38(10):982-4.
106. Stone JH. IgG4-related disease: nomenclature, clinical features, and treatment. *Seminars in diagnostic pathology* 2012; 29(4):177-90.
107. Kleger A, Seufferlein T, Wagner M, *et al.* IgG4-related autoimmune diseases: Polymorphous presentation complicates diagnosis and treatment. *Deutsches Arzteblatt international* 2015; 112(8):128-35.
108. Mahajan VS, Mattoo H, Deshpande V, Pillai SS, Stone JH. IgG4-related disease. *Annual review of pathology* 2014; 9:315-47.
109. Tokura Y, Yagi H, Yanaguchi H, *et al.* IgG4-related skin disease. *The British journal of dermatology* 2014; 171(5):959-67.
110. Deshpande V. The pathology of IgG4-related disease: critical issues and challenges. *Seminars in diagnostic pathology* 2012; 29(4):191-6.
111. Okazaki K, Umehara H. Are Classification Criteria for IgG4-RD Now Possible? The Concept of IgG4-Related Disease and Proposal of Comprehensive Diagnostic Criteria in Japan. *International journal of rheumatology* 2012; 2012:357071.
112. Deshpande V, Zen Y, Chan JK, *et al.* Consensus statement on the pathology of IgG4-related disease. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2012; 25(9):1181-92.
113. Sato Y, Notohara K, Kojima M, *et al.* IgG4-related disease: historical overview and pathology of hematological disorders. *Pathology international* 2010; 60(4):247-58.
114. Zen Y, Nakanuma Y. Pathogenesis of IgG4-related disease. *Current opinion in rheumatology* 2011; 23(1):114-8.
115. Masaki Y, Shimizu H, Sato Nakamura T, *et al.* IgG4-related disease: diagnostic methods and therapeutic strategies in Japan. *Journal of clinical and experimental hematopathology : JCEH* 2014; 54(2):95-101.
116. Carruthers MN, Topazian MD, Khosroshahi A, *et al.* Rituximab for IgG4-related disease: a prospective, open-label trial. *Annals of the rheumatic diseases* 2015; 74(6):1171-7.
117. Khosroshahi A, Carruthers MN, Deshpande V, *et al.* Rituximab for the treatment of IgG4-related disease: lessons from 10 consecutive patients. *Medicine* 2012; 91(1):57-66.

118. Venkataraman G, Rizzo KA, Chavez JJ, *et al.* Marginal zone lymphomas involving meningeal dura: possible link to IgG4-related diseases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2011; 24(3):355-66.
119. Cheuk W, Yuen HK, Chan AC, *et al.* Ocular adnexal lymphoma associated with IgG4+ chronic sclerosing dacryoadenitis: a previously undescribed complication of IgG4-related sclerosing disease. *The American journal of surgical pathology* 2008; 32(8):1159-67.
120. Sato Y, Ohshima K, Ichimura K, *et al.* Ocular adnexal IgG4-related disease has uniform clinicopathology. *Pathology international* 2008; 58(8):465-70.
121. Sato Y, Ohshima K, Takata K, *et al.* Ocular adnexal IgG4-producing mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma mimicking IgG4-related disease. *Journal of clinical and experimental hematopathology : JCEH* 2012; 52(1):51-5.
122. Sato Y, Takata K, Ichimura K, *et al.* IgG4-producing marginal zone B-cell lymphoma. *International journal of hematology* 2008; 88(4):428-33.
123. W. Luttmann KB, M. Küpper, D. Myrtek. *Der Experimentator Immunologie*, Vol. 3: Spektrum Akademischer Verlag; Auflage: 3. Aufl. 2009 (28. Oktober 2008), 2009.
124. *Education Guide Immunohistochemical (IHC) Staining Methods, Fifth Edition*, Vol. 5: Dako North America, Carpinteria, California, 2009.
125. Mülhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*, Vol. 5, Spektrum Akademischer Verlag 2006.
126. Mian M, Marcheselli L, Luminari S, *et al.* CLIPI: a new prognostic index for indolent cutaneous B cell lymphoma proposed by the International Extranodal Lymphoma Study Group (IELSG 11). *Annals of hematology* 2011; 90(4):401-8.
127. Guitart J. Rethinking primary cutaneous marginal zone lymphoma: shifting the focus to the cause of the infiltrate. *Journal of cutaneous pathology* 2015.
128. Geyer JT, Ferry JA, Longtine JA, *et al.* Characteristics of cutaneous marginal zone lymphomas with marked plasmacytic differentiation and a T cell-rich background. *American journal of clinical pathology* 2010; 133(1):59-69.
129. Ursaciuc C, Surcel M, Ciotaru D, *et al.* Regulatory T cells and TH1/TH2 cytokines as immunodiagnosis keys in systemic autoimmune diseases. *Roumanian archives of microbiology and immunology* 2010; 69(2):79-84.

130. Muenst S, Hoeller S, Willi N, Dirnhofera S, Tzankov A. Diagnostic and prognostic utility of PD-1 in B cell lymphomas. *Disease markers* 2010; 29(1):47-53.
131. Xerri L, Chetaille B, Serriari N, *et al.* Programmed death 1 is a marker of angioimmunoblastic T-cell lymphoma and B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia. *Human pathology* 2008; 39(7):1050-8.
132. Lindqvist CA, Loskog AS. T regulatory cells in B-cell malignancy - tumour support or kiss of death? *Immunology* 2012; 135(4):255-60.
133. Chang JH, Chung Y. Regulatory T cells in B cell follicles. *Immune network* 2014; 14(5):227-36.
134. Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, *et al.* FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007; 13(3):902-11.
135. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006; 12(18):5423-34.
136. Whiteside TL. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? *Seminars in cancer biology* 2012; 22(4):327-34.
137. Iwaya Y, Kobayashi M, Momose M, *et al.* High levels of FOXP3(+) regulatory T cells in gastric MALT lymphoma predict responsiveness to Helicobacter pylori eradication. *Helicobacter* 2013; 18(5):356-62.
138. Kim KH, Kim TM, Go H, *et al.* Clinical significance of tumor-infiltrating FOXP3+ T cells in patients with ocular adnexal mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancer science* 2011; 102(11):1972-6.
139. Farinha P, Al-Tourah A, Gill K, *et al.* The architectural pattern of FOXP3-positive T cells in follicular lymphoma is an independent predictor of survival and histologic transformation. *Blood* 2010; 115(2):289-95.
140. Bergman R. Pseudolymphoma and cutaneous lymphoma: facts and controversies. *Clinics in dermatology* 2010; 28(5):568-74.
141. Kulow BF, Cualing H, Steele P, *et al.* Progression of cutaneous B-cell pseudolymphoma to cutaneous B-cell lymphoma. *Journal of cutaneous medicine and surgery* 2002; 6(6):519-28.
142. Roggero E, Zucca E, Mainetti C, *et al.* Eradication of Borrelia burgdorferi infection in primary marginal zone B-cell lymphoma of the skin. *Human pathology* 2000; 31(2):263-8.

143. Kiesewetter B, Raderer M. Antibiotic therapy in nongastrointestinal MALT lymphoma: a review of the literature. *Blood* 2013; 122(8):1350-7.
144. Hoefnagel JJ, Vermeer MH, Jansen PM, *et al.* Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: clinical and therapeutic features in 50 cases. *Archives of dermatology* 2005; 141(9):1139-45.
145. Kubota T, Moritani S, Yoshino T, Nagai H, Terasaki H. Ocular adnexal marginal zone B cell lymphoma infiltrated by IgG4-positive plasma cells. *J Clin Pathol* 2010; 63(12):1059-65.
146. Oles K, Skladzien J, Szczepanski W, *et al.* Immunoglobulin G4-related disease (IgG4-RD) in the orbit: mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type lymphomas. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 2015; 21:1043-50.
147. Cheuk W, Yuen HK, Chan JK. Complication of IgG4-related chronic sclerosing dacryoadenitis by lymphoma. *Archives of ophthalmology* 2008; 126(8):1170; author reply
148. Naresh KN, Barwick T, Karadimitris A. IgG4 positive mucosa associated lymphoid tissue lymphoma of the orbit - lesson of the month. *Histopathology* 2014; 65(5):718-21.
149. Ishida M, Hodohara K, Yoshida K, *et al.* Occurrence of anaplastic large cell lymphoma following IgG4-related autoimmune pancreatitis and cholecystitis and diffuse large B-cell lymphoma. *International journal of clinical and experimental pathology* 2013; 6(11):2560-8.
150. Yamamoto M, Takahashi H, Tabeya T, *et al.* Risk of malignancies in IgG4-related disease. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 2012; 22(3):414-8.
151. Takahashi N, Ghazale AH, Smyrk TC, Mandrekar JN, Chari ST. Possible association between IgG4-associated systemic disease with or without autoimmune pancreatitis and non-Hodgkin lymphoma. *Pancreas* 2009; 38(5):523-6.
152. Uehara T, Ikeda S, Hamano H, *et al.* A case of Mikulicz's disease complicated by malignant lymphoma: a postmortem histopathological finding. *Internal medicine* 2012; 51(4):419-23.
153. Kanda G, Ryu T, Shirai T, *et al.* Peripheral T-cell lymphoma that developed during the follow-up of IgG4-related disease. *Internal medicine* 2011; 50(2):155-60.
154. Sato Y, Takeuchi M, Takata K, *et al.* Clinicopathologic analysis of IgG4-related skin disease. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2013; 26(4):523-32.

155. Ikeda T, Oka M, Shimizu H, *et al.* IgG4-related skin manifestations in patients with IgG4-related disease. *European journal of dermatology : EJD* 2013.
156. Ingen-Housz-Oro S, Ortonne N, Elhai M, *et al.* IgG4-Related Skin Disease Successfully Treated by Thalidomide: A Report of 2 Cases With Emphasis on Pathological Aspects. *JAMA dermatology* 2013;1-6.
157. Kato K, Satoh T, Tanaka-Fujimoto T, Ueda N, Yokozeki H. IgG4-positive cells in skin lesions of cutaneous and systemic plasmacytosis. *European journal of dermatology : EJD* 2013.
158. Khosroshahi A, Carruthers MD, Deshpande V, *et al.* Cutaneous immunoglobulin G4-related systemic disease. *The American journal of medicine* 2011; 124(10):e7-8.
159. Cheuk W, Lee KC, Chong LY, Yuen ST, Chan JK. IgG4-related Sclerosing disease: a potential new etiology of cutaneous pseudolymphoma. *The American journal of surgical pathology* 2009; 33(11):1713-9.
160. J Godfrey Heathcote NMW, Evelyn D Sutton, Alejandra A Valenzuela. IgG4-related disease manifesting as sclerosing orbital inflammation and cutaneous pseudolymphoma with crystal-storing histiocytosis. *Diagnostic Pathology* 2013; 19:147-50.
161. Hamadeh F, MacNamara SP, Aguilera NS, Swerdlow SH, Cook JR. MYD88 L265P mutation analysis helps define nodal lymphoplasmacytic lymphoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2014.
162. He B, Santamaria R, Xu W, *et al.* The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nature immunology* 2010; 11(9):836-45.
163. Fernandez-Rodriguez C, Bellosillo B, Garcia-Garcia M, *et al.* MYD88 (L265P) mutation is an independent prognostic factor for outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 2014; 28(10):2104-6.
164. Kempf W, Kazakov DV, Mitteldorf C. Cutaneous lymphomas: an update. Part 2: B-cell lymphomas and related conditions. *The American Journal of dermatopathology* 2014; 36(3):197-208; quiz 9-10.
165. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, *et al.* Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001; 412(6844):341-6.
166. Deutsch AJ, Fruhwirth M, Aigelsreiter A, Cerroni L, Neumeister P. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphomas are targeted by

aberrant somatic hypermutation. *The Journal of investigative dermatology* 2009; 129(2):476-9.

167. Halldorsdottir AM, Fruhwirth M, Deutsch A, *et al.* Quantifying the role of aberrant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma. *Leukemia research* 2008; 32(7):1015-21.
168. Dijkman R, Tensen CP, Buettner M, *et al.* Primary cutaneous follicle center lymphoma and primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type, are both targeted by aberrant somatic hypermutation but demonstrate differential expression of AID. *Blood* 2006; 107(12):4926-9.
169. Cannon J. Colorectal Neoplasia and Inflammatory Bowel Disease. *The Surgical clinics of North America* 2015; 95(6):1261-9.

## 7 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Bestandteile des angeborenen Immunsystems</i> .....	2
<i>Tabelle 2: Bestandteile und Aufgaben des adaptiven Immunsystems</i> .....	3
<i>Tabelle 3: Lymphatisches Gewebe</i> .....	4
<i>Tabelle 4: B-Zell-Differenzierung und spezifischer Immunphänotyp</i> .....	9
<i>Tabelle 5: Immunglobulinklassen</i> .....	11
<i>Tabelle 6: Signalmoleküle und produzierte Immunglobuline</i> .....	21
<i>Tabelle 7: WHO-Klassifikation der wichtigsten unreifen und reifen lymphoiden Neoplasien</i> .....	26
<i>Tabelle 8: Ätiopathogenetisch relevante genetische Alterationen bzw. Erreger bei malignen Lymphomen</i> .....	27
<i>Tabelle 9: Ann-Arbor-Klassifikation</i> .....	28
<i>Tabelle 10: MyD88 (L265P)-Mutation in B-Zell-Lymphomen</i> .....	30
<i>Tabelle 11: Typische Vorerkrankungen bei extranodalen MZL</i> .....	32
<i>Tabelle 12: Genetische Veränderungen bei extranodalen MZL</i> .....	32
<i>Tabelle 13: IgG<sub>4</sub>-assoziierte Erkrankungen</i> .....	38
<i>Tabelle 14: 169 MZL verschiedener Primärlokalisationen</i> .....	43
<i>Tabelle 15: Primärantikörper</i> .....	46
<i>Tabelle 16: Immunfluoreszenz- Antikörper</i> .....	51
<i>Tabelle 17: Fluorchromkonjugierte Sekundärantikörper (Firma Dianova)</i> .....	51
<i>Tabelle 18: Analyse des B-Zell-Infiltrates</i> .....	55
<i>Tabelle 19: Analyse des T-Zell-Infiltrates</i> .....	56
<i>Tabelle 20: Verwendete Materialien</i> .....	57
<i>Tabelle 21: Primer</i> .....	57
<i>Tabelle 22: PCR-Protokoll</i> .....	59



<i>Tabelle 23: Sequenzierungs-PCR-Protokoll (35 Zyklen)</i> .....	60
<i>Tabelle 24: Klinische Daten</i> .....	62
<i>Tabelle 25: Leicht- und Schwerekettenexpression in den verschiedenen Lokalisationen</i> .....	66
<i>Tabelle 26: CLIP-Score</i> .....	80

## 8 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: B-Zell-Differenzierung und die verschiedenen Differenzierungsstufen, aus Janeway's immunobiology<sup>4</sup> .....</i>	6
<i>Abbildung 2: Aufbau eines Keimzentrums mit typisch dunkler und heller Zone, umgeben von einer Mantelzone, aus Janeway's immunobiology<sup>4</sup> .....</i>	8
<i>Abbildung 3: Keimzentrumsreaktion und die Differenzierung von aktivierten B-Zellen hin zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen, aus Heesters et al.<sup>15</sup> ...</i>	8
<i>Abbildung 4: Aufbau des B-Zell-Rezeptor-Komplexes (membrangebundene Form), modifiziert nach Janeway's immunobiology<sup>4</sup> .....</i>	10
<i>Abbildung 5: Aufbau eines Immunglobulinmoleküls am Beispiel von IgG, modifiziert nach Janeway's immunobiology<sup>4</sup> .....</i>	12
<i>Abbildung 6: Fab-arm-exchange-Reaktion mit Bildung von heterobivalenten, bispezifischen IgG<sub>4</sub>-Molekülen, modifiziert nach Nirula et al.<sup>29</sup> .....</i>	16
<i>Abbildung 7: Somatische Rekombination mit Verknüpfung von je einem VDJ-Gensegment (Schwerkette) bzw. je einem VJ-Gensegment (Leichtkette), aus Janeway's immunobiology<sup>4</sup> .....</i>	19
<i>Abbildung 8: Darstellung des Schwerketten (Chromosom 14)- und Leichtkettengens (Chromosom 2 für Kappa, Chromosom 22 für Lambda), aus Janeway's immunobiology<sup>4</sup> .....</i>	19
<i>Abbildung 9: Aufbau und Signalweg von MyD88, modifiziert nach Jeelall et al.<sup>61</sup> .....</i>	29
<i>Abbildung 10: Typisches Infiltrat eines PCMZL. Das Infiltrat durchsetzt hier, unter Aussparung einer infiltratfreien Grenzzone zur Epidermis, sämtliche Schichten der Dermis und reicht bis in die Subkutis.....</i>	36
<i>Abbildung 11: Ausschnitt eines PCMZL mit plasmazellulärer Differenzierung. Zu erkennen sind zahlreiche, plasmazellulär differenzierte Zellen mit exzentrisch gelegenen Zellkern und einem speziell, anhand der hier dargestellten Giemsa-Färbung, stark basophilen Zytoplasmasaum, das eine charakteristische Aufhellung in der Golgizone zeigt.....</i>	36

<i>Abbildung 12: Immunhistochemische Färbemethode, modifiziert nach Education Guide Immunohistochemical (IHC) Staining Methods<sup>124</sup></i> .....	45
<i>Abbildung 13: Duale Expression der beiden Leichtketten Kappa (links, rot) und Lambda (Mitte, grün). Das rechte Bild zeigt die Kappa- und Lambda-Färbung überlappend in einer gelblichen Farbe.</i> .....	64
<i>Abbildung 14: Verteilung der Schwerkettenexpression</i> .....	67
<i>Abbildung 15: Leicht- und Schwerkettenexpression in den beiden Gruppen</i> ...	68
<i>Abbildung 16: Typisches Infiltrat eines PCMZL. Das Inset zeigt die plasmazytoide Differenzierung (Giemsa-Färbung).</i> .....	69
<i>Abbildung 17: PCMZL mit Leichtkettenrestriktion für Lambda (B), wohingegen nur wenige Zellen Kappa exprimieren (A). Desweiteren sind auf dieser Abbildung das typische immunhistochemische Erscheinungsbild der IgG<sub>4</sub>-positiven Plasmazellen (D) dargestellt im Vergleich zur IgG-Expression (C).</i> .....	70
<i>Abbildung 18: Kolokalisation der IgG (links, rot)- und IgG<sub>4</sub> (Mitte, grün)-positiven Zellen in der Fluoreszenzfärbung mit gelblicher Farbe in der Überlagerung (rechts).</i> .....	70
<i>Abbildung 19: T-Zell-Gehalt der verschiedenen PCMZL-Schwerkettensubgruppen</i> .....	71
<i>Abbildung 20: PCMZL mit einem intermediären Gehalt an T-Zellen. Die prädominant knotig aggregierten B-Zellen (hier die ungefärbten Zellen) werden von T-Zellen umgeben (CD5-Färbung für T-Zellen).</i> .....	72
<i>Abbildung 21: CD4/CD8-Ratio in den verschiedenen PCMZL-Schwerkettensubgruppen</i> .....	73
<i>Abbildung 22: IgM-positives PCMZL mit einem CD4/CD8-T-Zell-Verhältnis von &gt; 3:1.</i> .....	73
<i>Abbildung 23: Anteil regulatorischer T-Zellen in den verschiedenen PCMZL-Schwerkettensubgruppen</i> .....	74

*Abbildung 24: Regulatorische T-Zellen in einem IgG<sub>4</sub>-positiven PCMZL, markiert durch eine Kernfärbung für den Transkriptionsfaktor FoxP3. .... 74*

*Abbildung 25: Anteil folliculärer Helfer-T-Zellen in den verschiedenen PCMZL-Schwerkettensubgruppen..... 75*

*Abbildung 26: Primärlokalisationen der PCMZL, getrennt nach Schwerkettensubgruppen..... 77*

## 9 Abkürzungsverzeichnis

ABC-like	activated B cell-like
AID	Activation Induced Cytidine Deaminase
AIP2	Atrophia-1-interacting protein 2
Aqua dest.	Aqua destillata
BAFF	B-Zell aktivierender Faktor
BCL-6, -2, -10	B-cell lymphoma-6, -2, -10
BCR	B-Zell-Rezeptor
bp	Basenpaare
BRAF	proto-oncogene B-Raf
C <sub>L,H</sub>	Konstante Domäne
CARD11	Caspase recruitment domain-containing protein 11
CCG	Codon für die Aminosäure Prolin
CCND1	Genlokus für Cyclin D1
CD	Cluster of Differentiation
CLIP1	Cutaneous lymphoma international prognostic index
CDR	complementary determining region
CTG	Codon für die Aminosäure Leucin
CVID	Common Variable Immunodeficiency
°C	Grad Celsius
CS	Citratpuffer
Cy <sup>5</sup>	Cyanin 5
DAB	Diaminobenzidin
DD	death-Domäne
DLBCL	Diffuse large B-Cell Lymphoma
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E2F	Transkriptionsfaktor
EBF	Early B-cell factor
F <sub>ab</sub>	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizable region
FoxP3	forkhead box transcription factor 3
FR	Framework region
g	Gramm
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HIV	human immunodeficiency virus
H-Kette	Schwerkette
HLA	Human Leukocyte Antigen
HP	Helicobacter pylori
HPF	High power field
HV	Hypervariable Region
IELSG 11	International Extranodal Lymphoma Study Group
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGH	Immunglobulinschwerkettenloкус
IL	Interleukin
IRF4/MUM1	Interferon regulatory factor 4
IRAK	IL-1Rezeptor-assoziierten-Kinase
JAK-STAT3	Januskinase- Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
J-Kette	Joining-Kette
JÜR	Jahres-Überlebens-Rate

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
l, ml, $\mu\text{l}$	Liter, Milliliter, Mikroliter
LDH	Laktatdehydrogenase
L-Kette	Leichtkette
M.	Morbus
mM	Millimolar
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MALT-1	Mukosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1
$\text{MgCl}_2$	Magnesiumchlorid
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MHC	Major Histocompatibility Complex
MYC	Myelocytomatose-Gen
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
MZL	Marginalzonen-Lymphom
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NF- $\kappa\text{B}$	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
nm	Nanometer
NPM/ALK	Nucleophosmin/Anaplastic lymphoma kinase
NOS	Not otherwise specified

Pax5	Paired box protein Pax-5
PBS	Phosphate buffered saline
PCMZL	Primär kutanes Marginalzonen-Lymphom
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD1	Programmed cell death-1
PD-L1,2	Programmed cell death-ligand 1, 2
pH	Potentia hydrogenii
PIM1	Pim-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase
PU.1	Transkriptionsfaktor, der an eine Purin-reiche DNA-Sequenz bindet (PU-Box)
p-value	probability-value
RAG-1, -2	recombination activating gene-1, -2
R-CHOP	Rituximab, Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin, Prednisolon
RhoH/TTF	Ras homologous/translocation three four
rpm	revolutions per minute
RSS	recombination signal sequence
sIL	lösliches Interleukin
sog.	sogenannt
S-Region	Switch-Region
t()	Translokation
T <sub>A</sub> °C	Schmelztemperatur
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TGF-β	Transforming growth factor beta
Th	T-Helferzelle



TIA-1	T-cell intracellular antigen-1
TIR	Toll-interleukin-1-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFA13/A20	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3/
TR	Target Retrieval
V	Volt
V <sub>L,H</sub>	Variable Region
VDJ	Variable-, Diversity, Joining-Gensegmente
WHO	World Health Organization
μm	Mikrometer
α	Alpha
β	Beta
κ	Kappa
λ	Lambda
δ	Delta
>, <	größer, kleiner

## 10 Danksagung

Als erstes möchte ich mich an dieser Stelle herzlichst bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Eva Geißinger, für die Bereitstellung des Dissertationsthemas sowie für die außergewöhnliche und hervorragende fachliche sowie menschliche Betreuung während meiner Arbeit danken. Weiterhin danke ich Ihr für die zahlreichen konstruktiven Gespräche sowie die bedingungslose Hilfsbereitschaft und Geduld während der Durchführung und Fertigstellung meiner Dissertation. Durch Sie habe ich große Begeisterung für die Forschungsarbeit erlangt.

Herrn Prof. Dr. Andreas Rosenwald, Leiter des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg, danke ich herzlich für die Unterstützung und Überarbeitungen der Publikationen sowie für die Möglichkeit, die Dissertation in seinem Institut durchführen zu können.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Sabine Roth herzlichst für die exzellente Anleitung und Hilfestellung bei der Durchführung der immunhistochemischen sowie der molekularbiologischen Methoden bedanken. Die Laborarbeit und die Zusammenarbeit mit Ihr haben mir sehr viel Freude bereitet.

Dem gesamten Team der Immunhistochemie danke ich für die sehr kollegiale und freundliche Atmosphäre während meiner Laborarbeiten.

Frau Dr. Lucia Floßbach und dem Team der Molekularbiologie danke ich für die Bereitstellung der MyD88-Primer sowie für die Unterstützung bei der Durchführung der molekularbiologischen Methoden.

Herrn Dr. Bernhard Puppe danke ich für die Anleitung und Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Frau Priv. Doz. Dr. Marion Wobser danke ich für die Diskussion der Ergebnisse, speziell im klinischen Kontext.

Zuletzt möchte ich noch meinen Eltern und meiner Schwester Anna für die bedingungslose Unterstützung, Motivation und den Rückhalt während meines gesamten Studiums von ganzem Herzen danken.

## 11 Lebenslauf

*Name* Isabel Katharina Brenner

*Geburtsdatum/-ort* 04.03.1984 in Crailsheim

*Familienstand* Ledig

### **Studium**

*04/2009 bis 06/2015* Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

*03/2011* Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung - M1 (Physikum)

*04/2014* Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung - M2 (Schriftliches Staatsexamen)

*05/2015* Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung - M3 (Mündliches Staatsexamen)  
  
Abschluss des Studiums der Humanmedizin,  
Gesamtnote 1,83  
  
Approbation als Ärztin

### **Famulaturen**

*09/2011* Ostalb-Klinikum Aalen  
  
Innere Medizin (Intensivstation)

*08/2012* Klinikum München Pasing  
  
Innere Medizin (Kardiologie)

*03/2013* Klinikum Crailsheim

Chirurgie

09/2013

Klinikum München Pasing

Innere Medizin (Kardiologie)

### **Praktisches Jahr**

05/2014 bis 09/2014

Klinik Rothenburg (Innere Medizin)

09/2014 bis 12/2014

Mayo General Hospital Castlebar, Irland (Chirurgie)

12/2014 bis 04/2015

Institut für Pathologie der Universität Würzburg  
(Wahlfach Pathologie)

### **Auslandsaufenthalt**

09/2014 bis 12/2014

Mayo General Hospital Castlebar, Irland

Praktisches Jahr (Chirurgie)

### **Beruflicher Werdegang**

2003 bis 2004

Praktikum im Diakonie-Klinikum Schwäbisch Hall

2004 bis 2007

Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin am  
Klinikum Crailsheim

2007 bis 2009

Klinikum München Pasing, Kardiologie  
(Herzkatheterlabor, Kardiale  
Magnetresonanztomographie)

seit Juli 2015

Assistenzärztin der Klinik Rothenburg, Abteilung Innere  
Medizin