

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität Würzburg

Vorstand:

Professor Dr. med. Andreas Rosenwald

**Untersuchungen zum Ausbreitungsweg folliculärer
Lymphome: Erhaltene reaktive Keimzentren sind ein
deutlicher Hinweis auf ein (noch) lokales
Erkrankungsstadium**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Miriam Stumpf

aus Würzburg

Würzburg, April 2016

Referent: Prof. Dr. Andreas Rosenwald

Korreferent: Prof. Dr. Stefan Knop

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27. August 2018

Die Promovendin ist Zahnärztin

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden im American Journal of Surgical Pathology publiziert (Am J Surg Pathol 2005; Vol 29 (12): p.1661-4; impact factor 2005: 4,377). Mein Anteil an dieser Studie besteht in der Erhebung der klinischen Daten (anatomische Tumorlokalisierung und Eingangsstaging) (100 %), der Dokumentation des Fall-Reviews (100 %), dem Heraussuchen und der Re-Archivierung der histologischen Präparate (100 %), der Mitarbeit an Hybridisierung und Auswertung der Fluoreszenz-in-Hybridisierungen (FISH) (50 %), dem Erstellen der Tabellen (80 %) und Abbildungen (50 %) und dem Abfassen des Manuskripts (30 %).

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	5
3. Ergebnisse	11
4. Diskussion	33
5. Zusammenfassung	39
6. Literatur	41
Danksagung	
Lebenslauf	

1. Einleitung

Maligne Lymphome sind neoplastische Erkrankungen einer Untergruppe der weißen Blutkörperchen, der Lymphozyten. Traditionell werden die Hodgkin-Lymphome als besondere Entität von den übrigen Lymphomen abgegrenzt, die dann als Non-Hodgkin-Lymphome bezeichnet werden (1). Diese können der B- oder der T-Zell-Reihe oder viel seltener auch anderen Zellpopulationen (z.B. den natürlichen Killerzellen) zugehören. Die histopathologische Klassifikation der malignen Lymphome war in den vergangenen Jahrzehnten Gegenstand vieler Diskussionen und Modifikationen. So wurde in früheren Klassifikationen zum Beispiel zwischen „hoch- und niedrigmalignen“ oder „zytischen“ und „blastischen“ Lymphomen unterschieden, während die aktuell international akzeptierte WHO-Klassifikation die Lymphomentitäten der B-Zell-Reihe nach der jeweiligen korrespondierenden nicht-neoplastischen Zelle in der physiologischen Zellreifung einteilt (1). Da die T-Zell-Entwicklung nicht ebenso gut verstanden ist wie die Keimzentrums Passage bei der B-Zell-Reihe und T-Zell-Lymphome insgesamt auch deutlich seltener auftreten als B-Zell-Lymphome, gestaltet sich die Klassifikation der T-Zell-Lymphome weiter schwierig.

Die folliculären Lymphome (FL) stellen eine der größten Untergruppen der Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zell-Reihe dar (1). Ihr physiologisches Gegenstück sind der Zentrozyt und der Zentroblast als charakteristische Zellpopulation des Keimzentrums in lymphatischen Organen. Histo- und molekulargenetisch ist das FL somit ein maligner Tumor der Keimzentrumszellen.

In der WHO-Klassifikation der FL werden drei Grade (1, 2 und 3) sowie bei Grad 3 zwei Untergruppen (3A und 3B) mit unterschiedlichem Immunphänotyp, genetischem Profil und biologischem Verhalten unterschieden (2-3). Prognostisch bedeutsam ist dabei vor allem die Abgrenzung der FL Grad 1 und 2 von den höhergradigen Fällen. Die FL Grad 1 / 2 gehören zu den indolenten Lymphomen (früher als „niedrigmaligne“ Lymphome bezeichnet). Das klinische Verhalten ist typischerweise nicht aggressiv und durch einen sich über Jahre

erstreckenden Verlauf, häufig mit Auftreten von Tumorrezidiven gekennzeichnet. Die durchschnittliche Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt 5 - 10 Jahre (1).

Mitbedingt durch die indolente Symptomatik liegt bei der Mehrzahl (ungefähr 70 %) der Patienten bei Diagnosestellung bereits ein klinisches Stadium III/IV nach Ann-Arbor (4) vor (*Stadium III*: Zwei oder mehr Lymphommanifestationen beidseits des Zwerchfells. *Stadium IV*: Disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit/ohne Lymphknotenbefall). Diese Patienten leiden somit unter einer *systemischen* Erkrankung. In bis zu 50 % der Fälle ist auch das Knochenmark befallen.

Auch der genetische Hintergrund des FL ist gut bekannt: Bei der Mehrzahl (70 - 95%) der Fälle mit FL 1, 2 und 3A ist eine charakteristische rekurrente chromosomale Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ nachweisbar (5). Durch diese genetische Aberration wird das BCL2-Gen (auf dem langen Arm von Chromosom 18) unter die regulatorische Kontrolle des Enhancer-Elementes des Immunglobulin-Schwerkettengen-Promotors (auf dem langen Arm von Chromosom 14) gebracht. Als Folge kommt es zu einer konstitutionellen Überexpression des BCL2-Proteins, das eine antiapoptotische Wirkung hat und so zu einem Langzeitüberleben der Tumorzellen führt (6). Dieser Pathomechanismus erklärt teilweise auch das beschriebene klinische Verhalten des Tumors: Das FL weist keine exzessiv gesteigerte Proliferation auf, die dann einen aggressiven klinischen Verlauf bedingen würde. Das Tumorstadium ist vielmehr durch die fehlende Zellmauserung (Apoptose) bedingt, so dass alle neugebildeten Zellen die Tumorzellpopulation weiter vermehren.

Eine weitere Folge dieses pathogenetischen Expansionsweges ist die weitgehende Unangreifbarkeit des Tumors durch Therapien, die vorwiegend auf die proliferierende Zellfraktion wirken (Strahlung, Chemotherapie). Dieser Sachverhalt, dass ein „niedrigmalignes“ Lymphom im Regelfall nicht heilbar ist, wird auch als „onkologisches Paradoxon“ bezeichnet und ist ein Grund dafür, warum die histopathologischen Bezeichnungen „hochmaligne“ und „niedrigmaligne“ oft für die klinische Prognose nicht (mehr) zutreffen.

Bei der histologischen Untersuchung von Lymphknoten, die von einem FL befallen sind, finden sich gelegentlich einzelne nur teilweise durch den Tumor infiltrierte oder sogar vollständig erhaltene („reaktive“) hyperplastische Follikel. Es handelt sich somit um einen nur „partiellen Befall“ des Lymphknotens. In solchen Fällen schien die Tumorerkrankung bei einer substantiellen Zahl von Patienten noch lokal auf eine oder nur wenige benachbarte Lymphknotenstationen beschränkt zu sein. Die Identifikation von Patienten mit einer solchen (noch) umschriebenen Tumorausbreitung könnte bezüglich des Behandlungskonzepts von erheblicher Bedeutung sein: Gemäß den Standard-Behandlungsprotokollen kann das FL im klinischen Stadium I/II nach Ann-Arbor (*Stadium I*: Befall nur einer Lymphknotenregion, *Stadium II*: Befall von zwei nicht benachbarten oder mehr als zwei benachbarten Lymphknotenregionen nur auf einer Seite des Zwerchfells) durch eine Strahlentherapie allein ausreichend behandelt werden (7), wohingegen ein systemischer Befall bei entsprechender Klinik mit Chemotherapie behandelt wird.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher, die Inzidenz solcher Fälle von FL, bei denen eine nur partielle Tumordinfiltration in den diagnostischen Biopsien vorliegt, zu bestimmen und diese morphologischen Ergebnisse mit den klinischen Daten, speziell dem klinischen Stadium bei Erstdiagnose in Beziehung zu setzen, um die klinische Bedeutung einer solchen nur partiellen Lymphknoteninfiltration zu erfassen.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchtes Gewebe

Für die durchgeführten Untersuchungen an Archivmaterial des Pathologischen Instituts liegt ein entsprechendes Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg vor. Die limitierte Korrelation mit klinischen Basisdaten (Tumorlokalisierung und Ergebnisse des Eingangsstaging) erfolgte anonymisiert.

Die **Fall-Kohorte** des ersten Studienteils bestand aus 53 Lymphknotenbiopsien, die in den Jahren 1996-2003 im Referenzzentrum für Lymphknotenerkrankungen am Institut für Pathologie der Universität Würzburg als FL diagnostiziert worden waren und nur eine partielle Lymphknoteninfiltration aufwiesen. Während in den meisten Fällen eines FL die ursprüngliche Lymphknotenarchitektur vollständig durch das neoplastische Tumordinfiltrat zerstört ist, fanden sich in den für diese Studie identifizierten Fällen entweder vollständig erhaltene reaktive oder teilinfiltrierte Keimzentren mit sektorähnlichen Follikelresten. Im Gegensatz zu neoplastischen Follikeln wiesen diese follikulären Strukturen kohäsive Rasen von Zentroblasten auf, meist mit einem erhaltenen „Sternenhimmelbild“.

Der dokumentierte klinische Nachbeobachtungszeitraum dieser Kohorte betrug 2 bis 45 Monate (durchschnittlich 11 Monate). Während dieser Zeit verstarb keiner der Patienten.

Als **Kontroll-Kohorte** diente eine weitere Gruppe von 49 Patienten (22 männliche, 27 weibliche Patienten; Alter zwischen 36 und 81 Jahre, Durchschnittsalter 60,4 Jahre) mit vollständig tumorinfiltrierten Lymphknotenbiopsien, die zwischen 1991 und 1998 diagnostiziert worden waren (s. Tab. 1).

Um die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurden alle 321 FL, die in dem exemplarisch herausgegriffenen Jahr 2001 im Referenzzentrum diagnostiziert

worden waren, als **Validierungs-Kohorte** erneut angesehen. Dabei wurden weitere 24 Fälle eines FL mit partieller Infiltration identifiziert (siehe Tabelle 1).

	Studien-Kohorte	Kontroll-Kohorte	Validierungs-Kohorte
Patientenzahl n	53	49	24
Geschlecht m/w	21/32	22/27	12/12
Alter in Jahren	37-84	36-81	37-78
Durchschnittsalter in Jahren	57.5	60.4	57.6

Tabelle 1: Klinische Daten der Patienten aus Studien-, Kontroll- und Validierungs-Kohorte

	Studien-Kohorte	Kontroll-Kohorte	Validierungs-Kohorte
FL Grad 1	30	20	6
FL Grad 2	17 (1 Fall mit zusätzlichem Hodgkin-Lymphom)	22	17
FL Grad 3A	6	7	1
gesamt	53	49	24

Tabelle 2: Histopathologisches Grading der Fälle aus Studien-, Kontroll- und Validierungs-Kohorte

2.2 Immunhistochemische Färbungen

Alle FL Fälle wurden in den hämatologischen Standardfärbungen (Hämatoxylin-Eosin, Giemsa, PAS) reevaluiert und nach Antigen-Demaskierung mit den relevanten Antikörpern gegen CD3/CD5, CD10 (alle von Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne/Großbritannien) CD20, CD23, BCL2 und Ki67 (alle von DakoCytomation, Hamburg/Deutschland) immunhistochemisch gefärbt.

Diagnostik und Graduierung der Lymphome erfolgten gemäß den Kriterien der WHO-Klassifikation. FL Grad 3B wurden in diese Studie nicht einbezogen, da aus der Literatur bekannt ist, dass sie ein anderes biologisches Verhalten als FL Grad 1-3A zeigen können. Dies spiegelt sich z.B. auch in der Abwesenheit der charakteristischen Translokation t(14;18) in der Mehrzahl der FL Grad 3B wider (8).

Nach Herstellung der Schnitte aus den Paraffinblöcken wurden diese auf mit (3-Aminopropyl-) Triethoxysilan (mind. 98 %) beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Daraufhin wurden die Schnitte entparaffiniert, rehydriert und zur Antigen-Demaskierung im Dampfdrucktopf mit Zitronensäure (10 mM, pH 5,5) für 5 Minuten bei 125°C gekocht.

Im Anschluss daran wurden die Schnitte in Phosphatpuffer (PBS) überführt. Die eigentliche Färbung erfolgte mit dem Histostain[®]-PLUS Bulk Kit (Broad Spectrum) (Zymed Laboratories, Inc., S. San Francisco, California, USA). Dazu wurden die Schnitte zunächst 15 Minuten mit Blockerlösung behandelt, um dann für eine Stunde mit dem primären Antikörper (AK) überschichtet zu werden, bevor die überschüssigen, nicht gebundenen AK mit PBS (pH 7,4) abgespült wurden. Anschließend erfolgte die Überschichtung mit dem biotinylierten sekundären AK für 20 Minuten, woraufhin ebenfalls mit PBS (pH 7,4) gespült wurde, um die überschüssigen AK abzuwaschen. Daraufhin wurden die Schnitte für 20 Minuten mit Streptavidin-POX (an Streptavidin konjugierte Peroxidase) behandelt und anschließend ein weiteres Mal mit PBS (pH 7,4) gespült. Der Färbung mit 3,3'-Diaminobenzidin DAB für 10 Minuten

folgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun. Im histologischen Schnittpräparat erschien die durch den Antikörper erkannte Zielstruktur dunkelbraun, bei Negativität blau durch die Gegenfärbung. Die nach dieser Methode im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Färbungen und ihre jeweiligen Zielstrukturen waren:

- **CD20** (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Germany): **B-Zellen**
- **CD23** (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Germany):
Netzwerke folliculärer dendritischer Zellen
- **BCL2** (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Germany):
antiapoptotisches Protein
- **Ki67** (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Germany): **Proliferation**
- **CD3/CD5** (Novocastra Laboratories Ltd, Dossenheim, Germany):
T-Zellen
- **CD10** (Novocastra Laboratories Ltd, Dossenheim, Germany):
Keimzentrums-Strukturen

Reaktive Keimzentren und -reste zeigten in der konventionellen HE-Morphologie eine erhaltene Schichtengliederung und eine scharf abgegrenzte Mantelzone. In der BCL2-Färbung blieben diese Keimzentren im Gegensatz zu den neoplastischen Follikeln negativ (bis auf einzelne folliculäre T-Zellen, die in der CD3/CD5-Färbung als solche identifiziert werden konnten). In der Proliferationsdarstellung (Ki67) zeigten sie eine hohe proliferative Aktivität mit kohäsiven Blastenrasen, während die neoplastischen Follikel deutlich niedriger proliferierten und keine Polarisierung in eine dunkle (zentroblastenreiche) und eine helle (zentrozyten- und dendritenreiche) Zone aufwiesen.

2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

In 12 exemplarischen FL Fällen wurde der Status des BCL2 Genlokus mit einem Zweifarben-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisations (FISH) - basierten Detektionssystem untersucht. Normales lymphatisches Gewebe und ein FL mit bekannter Translokation t(14;18) wurden als Negativ- bzw. Positivkontrolle mit analysiert.

Die Interphase-FISH und die Signal-Evaluation wurden gemäß etablierter Protokolle durchgeführt (8): 5µm starke Serienschnitte aus den Paraffinblöcken wurden mit Xylol deparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Dann erfolgte die Antigen-Demaskierung mittels Erhitzen in einem Mikrowellen-Ofen bei 350 W für 40 Minuten in Zitratpuffer (pH 6.0).

Anschließend wurde die DNA für 15 Minuten bei 75°C in 70% Formamid/2xSSC denaturiert und die Schnitte nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe zur Trockne gebracht. Die Sonde, eine Vysis *BCL2* (18q21) dual colour break-apart rearrangement Sonde (Abbott Molecular, Wiesbaden, Germany), die einen etwa 260 Basenpaaren großen Chromosomenabschnitt um das BCL2-Gen auf Chromosom 18 flankiert, wurde separat für 5 Minuten bei 75°C denaturiert und auf die vorbereiteten Schnitte gegeben. Die Schnitte wurden dann mit Deckgläschen eingedeckt, mit Flüssiggummi versiegelt und über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach erfolgter In-situ-Hybridisierung wurden die Schnitte in 2x SSC/0.1% NP - 40 (pH 7.4) für 2 Minuten bei 73°C gewaschen und mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol; Sigma, Hannover) gegen gefärbt.

In jedem untersuchten Fall wurden 100 Zellen bezüglich eines Auseinanderweichens der physiologischerweise kolokalisierten Signale, als Hinweis auf eine chromosomale Translokation t(14;18) analysiert. Der Grenzwert für ein positives Testergebnis (6,5%) ist vorher an 10 reaktiven Tonsillen bestimmt worden (Mittelwert + 3 x Standardabweichung [SD]).

2.4 Klinische Stagingdaten

Die klinischen Daten wurden von den jeweiligen überweisenden Klinikärzten zur Verfügung gestellt.

2.5 Statistische Analyse

Unterschiede zwischen den einzelnen Studienkohorten wurden mit Hilfe des χ^2 -Tests auf ihre statistische Signifikanz hin untersucht.

3. Ergebnisse

3.1.1 Histologie der folliculären Lymphome

Bei allen 53 Fällen der Studien-Kohorte war die Lymphknotenarchitektur weitgehend durch eine fast vollständige Infiltration atypischer folliculärer Strukturen zerstört (Abb.1). Sinusstrukturen waren überwiegend nicht mehr zu erkennen, die neoplastischen Follikel standen dicht an dicht und konfluieren teils untereinander. Im Gegensatz zu reaktiven Follikeln waren die Mantelzonen unscharf von den Keimzentren abgegrenzt. Die Follikel selbst wiesen keine Polarisation in eine dunkle (zentroblastenreiche) und helle (zentrozyten- und dendritenreiche) Zone auf und ein „Sternenhimmelbild“ intrafolliculärer Makrophagen fehlte zumeist.

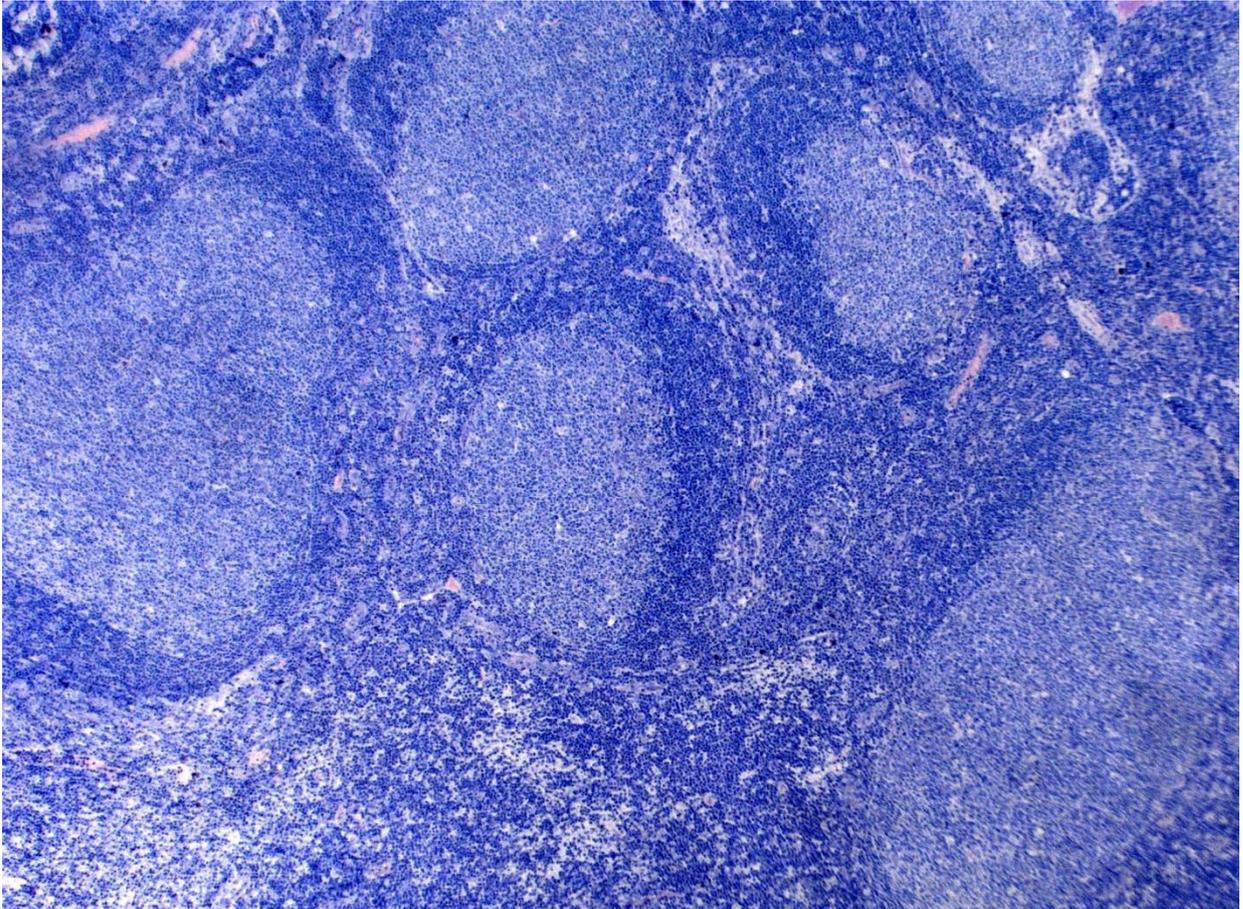


Abb.1: Die Lymphknotenarchitektur ist durch eine neoplastische lymphoide Proliferation zerstört. Das Infiltrat zeigt eine folliculäre Konfiguration, wobei die Follikel aber unphysiologisch dicht aneinandergedrängt sind. Eine Schichtengliederung der Follikel ist nicht zu erkennen und die Mantelzonen sind unscharf gegen die Follikelzentren abgegrenzt (Giemsa 50x).

Zytologisch bestanden die neoplastischen Follikel überwiegend aus Zellen, die größer waren als kleine Lymphozyten und einen gekerbten Kern aufwiesen (Zentrozyten) (Abb.2). In wechselnder Zahl untermischt fanden sich deutlich größere, blastäre Zellen (Zentroblasten).

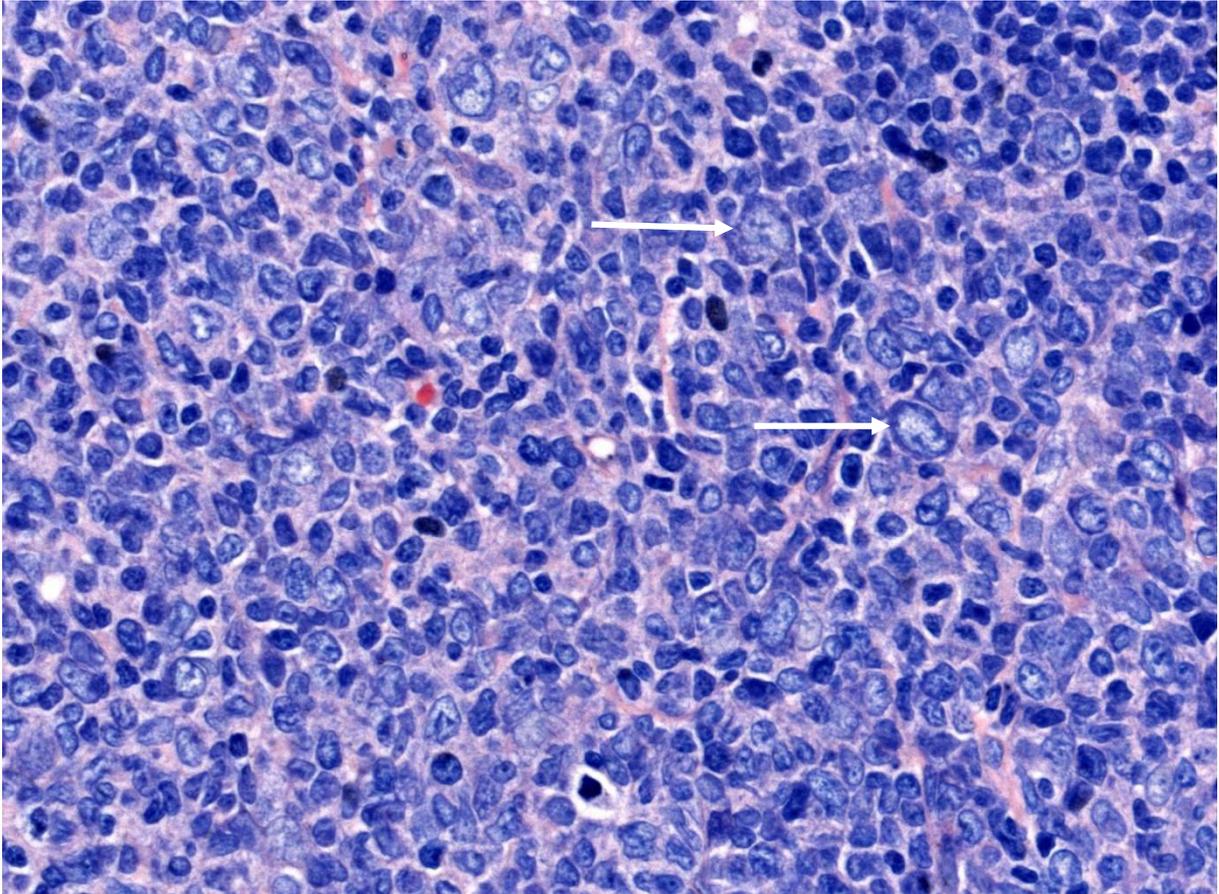


Abb.2: Zytologisch bestanden die neoplastischen Infiltrate überwiegend aus kleinen lymphoiden Zellen mit gekerbtem Kern (zentrozytenähnliche Zellen). Untermischt fand sich ein wechselnder Gehalt an größeren, blastären (zentroblastenähnlichen, Pfeile) Zellen mit gebuchtetem Kern, mehreren peripheren Nukleolen und einem basophilen Zytoplasmasaum (Giemsa 400x).

In der immunhistochemischen Analyse zeigte sich als Folge der chromosomalen Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ eine kräftige Expression des antiapoptotischen Proteins BCL2, auch in den neoplastischen Keimzentrumszellen (Abb.3). Durch die konstitutionelle Überexpression von BCL2 sind die Zellen des FL vor dem Zelltod geschützt. In reaktiven Keimzentren wird BCL2 von den B-Zellen nicht exprimiert, da während der B-Zell-Reifung in autoreaktiven und nicht funktionellen B-Zellen der programmierte Zelltod (Apoptose) ausgelöst wird. Physiologischerweise exprimieren innerhalb der Follikelstrukturen nur (regulatorische) T-Zellen BCL2.

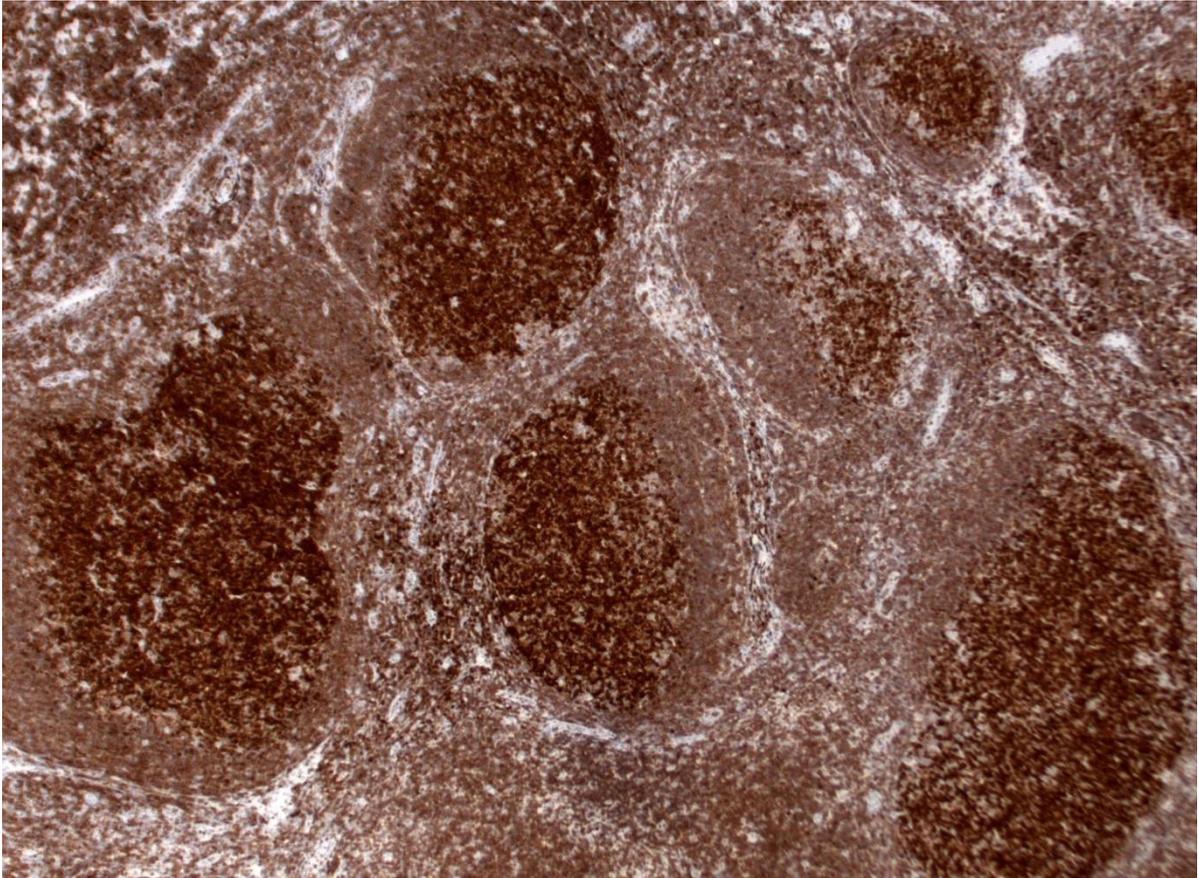


Abb.3: In der immunhistochemischen Darstellung des BCL2-Proteins zeigt sich eine kräftige Expression dieses antiapoptotischen Proteins auch in den Keimzentrumzellen, bei denen unter physiologischen Bedingungen während der B-Zell-Reifung in den zu eliminierenden Zellen der programmierte Zelltod (Apoptose) ausgelöst werden sollte. Durch die konstitutionelle Überexpression des BCL2-Proteins sind die neoplastischen B-Zellen vor dem Zelltod geschützt (BCL2 Immunperoxidase, 50x).

Der Proliferationsindex der neoplastischen Follikel im FL lag in der immunhistochemischen Färbung für Ki67 weit unter der kräftigen proliferativen Aktivität reaktiver Follikel (Abb.4). In dieser Färbung war auch keine erhaltene Polarisierung der Follikel (zonale Schichtgliederung) zu erkennen.

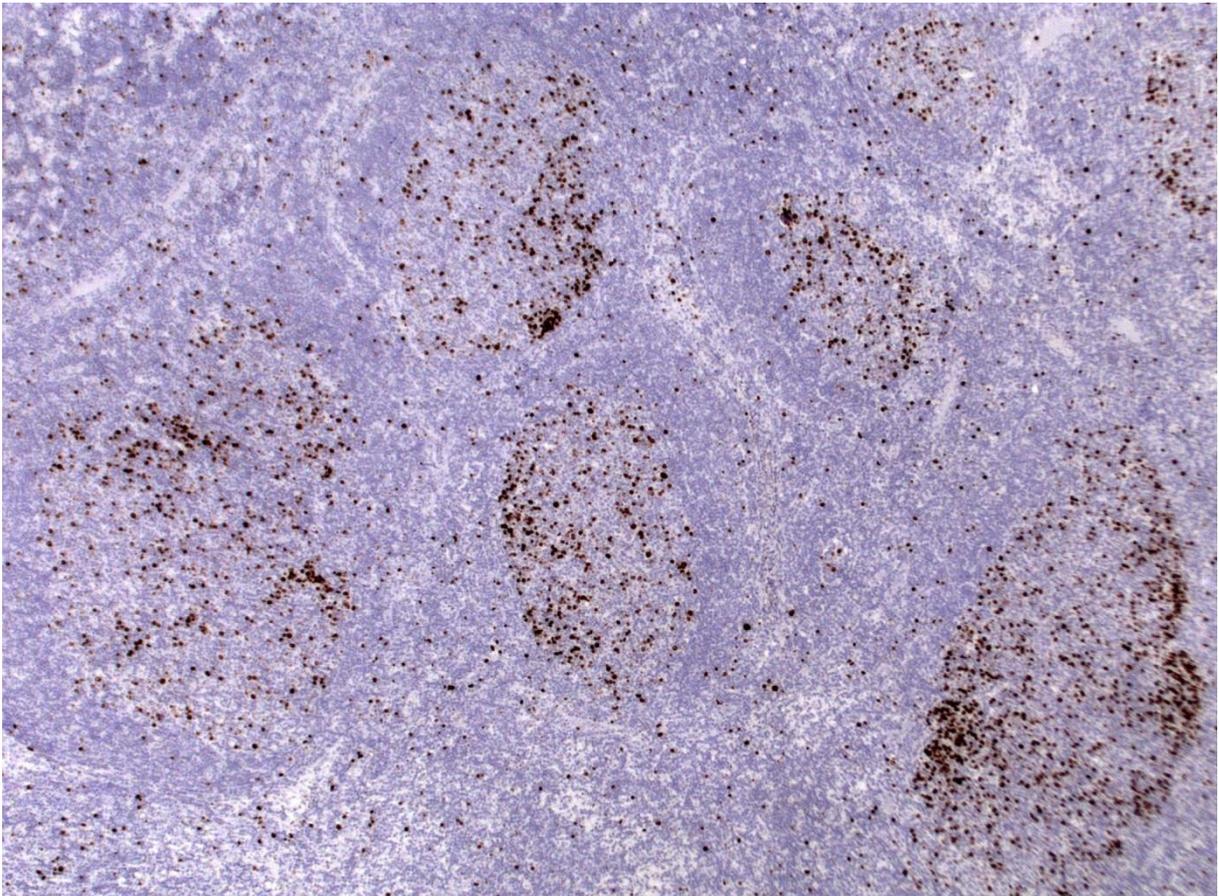


Abb.4: In der Proliferationsdarstellung wird deutlich, dass die neoplastischen Keimzentren deutlich weniger proliferieren als reaktive Keimzentren. In Zusammenschau mit der konstitutionellen Überexpression des BCL2-Proteins wird verständlich, dass das FL im Wesentlichen nicht durch eine besonders starke Proliferation expandiert, sondern die Tumorzellen durch die Antiapoptose akkumulieren (Ki67 Immunperoxidase, 50x).

3.1.2 Histologie der partiellen Infiltration

In 49 der 53 Fälle waren zusätzlich ein bzw. einzelne reaktive Keimzentren oder Reste von Keimzentren erhalten. Nur in 4 Fällen waren mehr als 30 % der Follikel reaktiver Natur. Im Unterschied zu den neoplastischen Follikeln wiesen diese reaktiven Keimzentrumsstrukturen eine erhaltene zonale Schichtengliederung mit gut abgrenzbarer heller und dunkler Zone, kohäsive Zentroblastenrasen und häufig Sternenhimmel- Makrophagen auf (Abb.5). In der immunhistochemischen Analyse der Expression des BCL2-Proteins waren die in Resten oder vollständig erhaltenen Keimzentren (physiologisch) negativ (Abb.6) und wiesen hohe Ki67-Indizes (Abb.7) auf. Der Nachweis von kohäsiven BCL2-negativen Blastenrasen war für die Einordnung der Keimzentrumsstrukturen als reaktiv ein wesentliches Kriterium. Daher wurden neoplastische Follikel mit nur einzelnen oder kleinen Gruppen von eingestreuten BCL2-negativen Zellen nicht als partiell infiltrierte reaktive Keimzentren gewertet.

Die Expression des Keimzentrumsmarkers CD10 erschien in den neoplastischen Follikeln häufig kräftiger als in den erhaltenen reaktiven Keimzentrumsstrukturen.

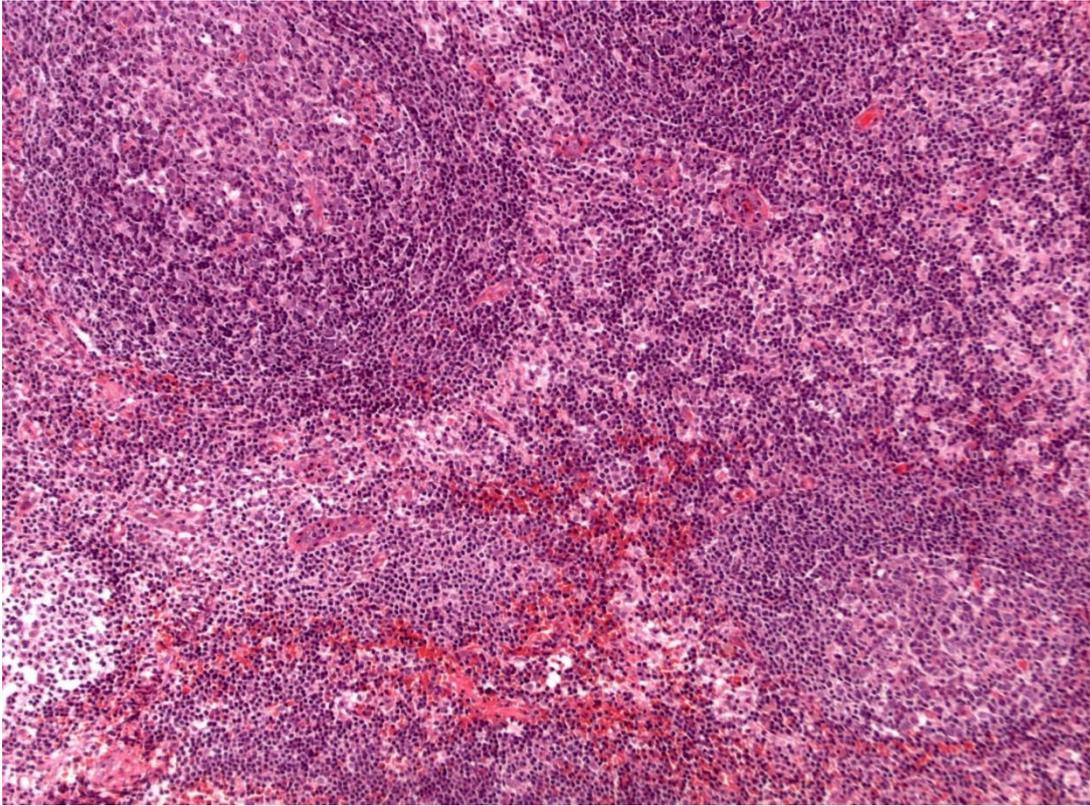


Abb.5: Reaktive Keimzentren (rechts unten) zeigen eine erhaltene Schichtgliederung in eine dunkle und eine helle Zone, ein „Sternenhimmelbild“ und eine scharf abgrenzbare Mantelzone. Der partiell durch das FL infiltrierte Follikel (links oben) weist eine verwischte Grenze zwischen Follikelzentrum und Mantelzone und eine gestörte Schichtgliederung auf (Hämatoxylin-Eosin, 100x).

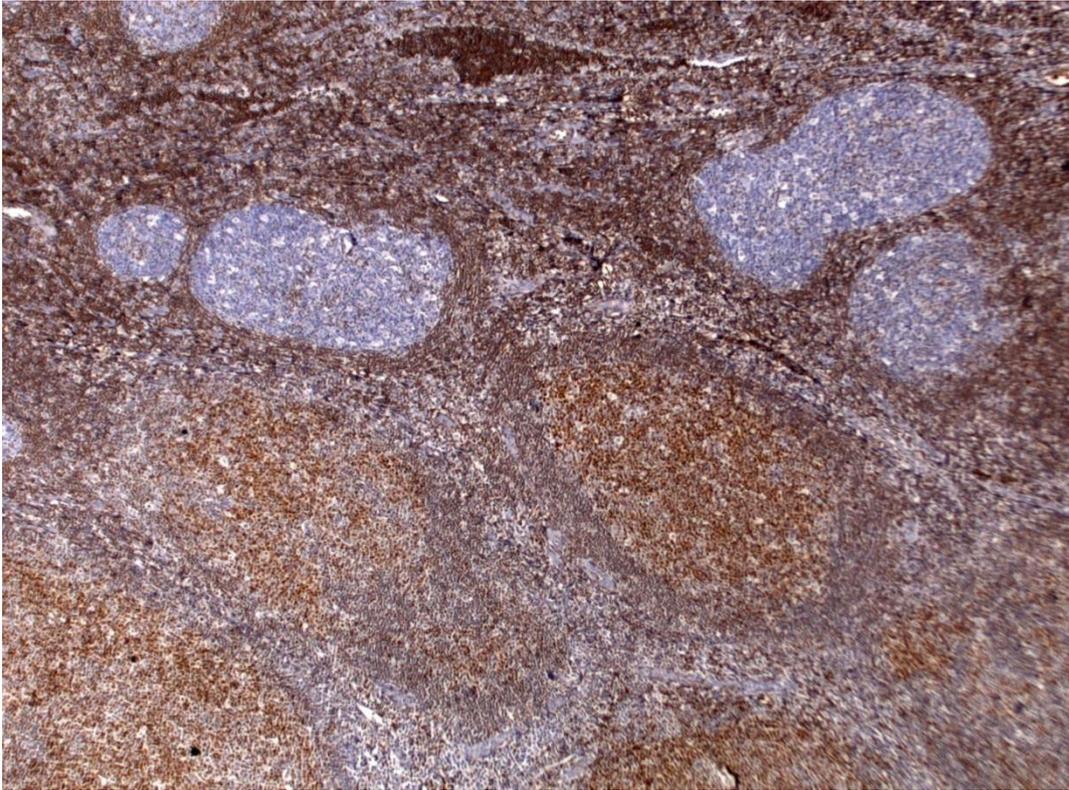


Abb.6: Erhaltene reaktive Keimzentren (obere Bildhälfte) bleiben in der immunhistochemischen Darstellung des antiapoptotischen Proteins BCL2 negativ, während die neoplastischen Keimzentren (untere Bildhälfte) eine kräftige Expression zeigen (BCL2 Immunperoxidase, 50x).

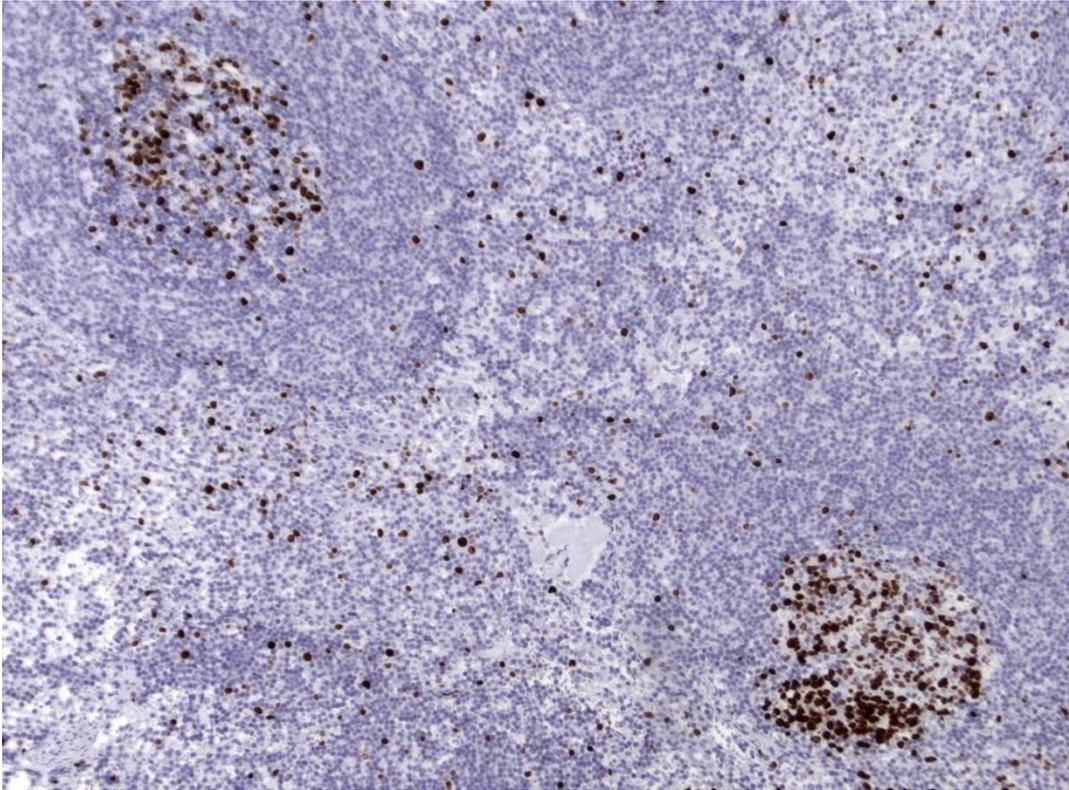


Abb.7: In der Proliferationsdarstellung ist die erhaltene Schichtgliederung im reaktiven Follikel (rechts unten) gut zu erkennen, während der durch das FL infiltrierte Follikel (links oben) deutlich niedriger proliferiert, als ein reaktiver Follikel (Ki67 Immunperoxidase, 100x).

3.2.1 Studien-Kohorte

Die 53 Tumore waren in zervikalen (22 Fälle), inguinalen (20), axillären (7), mediastinalen (3) und intramammären (1) Lymphknoten lokalisiert.

Die Staginguntersuchungen zur Ausbreitung der Erkrankung hatten folgende Ann-Arbor-Stadien ergeben: Stadium I in 33 Fällen, Stadium II in 11 Fällen, Stadium III in 6 Fällen und Stadium IV in 3 Fällen. Somit lag in 44 der 53 Fälle (83 %) eine noch lokale Erkrankung in den klinischen Stadien I/II vor (vgl. Tab.3).

In 2 der 3 Fälle, die in das Stadium IV eingeordnet worden waren, war nur eine einzige Lymphknotenregion betroffen und die Einstufung als Stadium IV war aufgrund des Knochenmarkbefalls erfolgt.

In 40 der 53 Fälle (75%) wurde mindestens ein vollständig erhaltenes reaktives Keimzentrum nachgewiesen, wohingegen in 13 Fällen nur segmentartige Reste von präexistenten Keimzentren gefunden wurden (Abb.8 und 9).

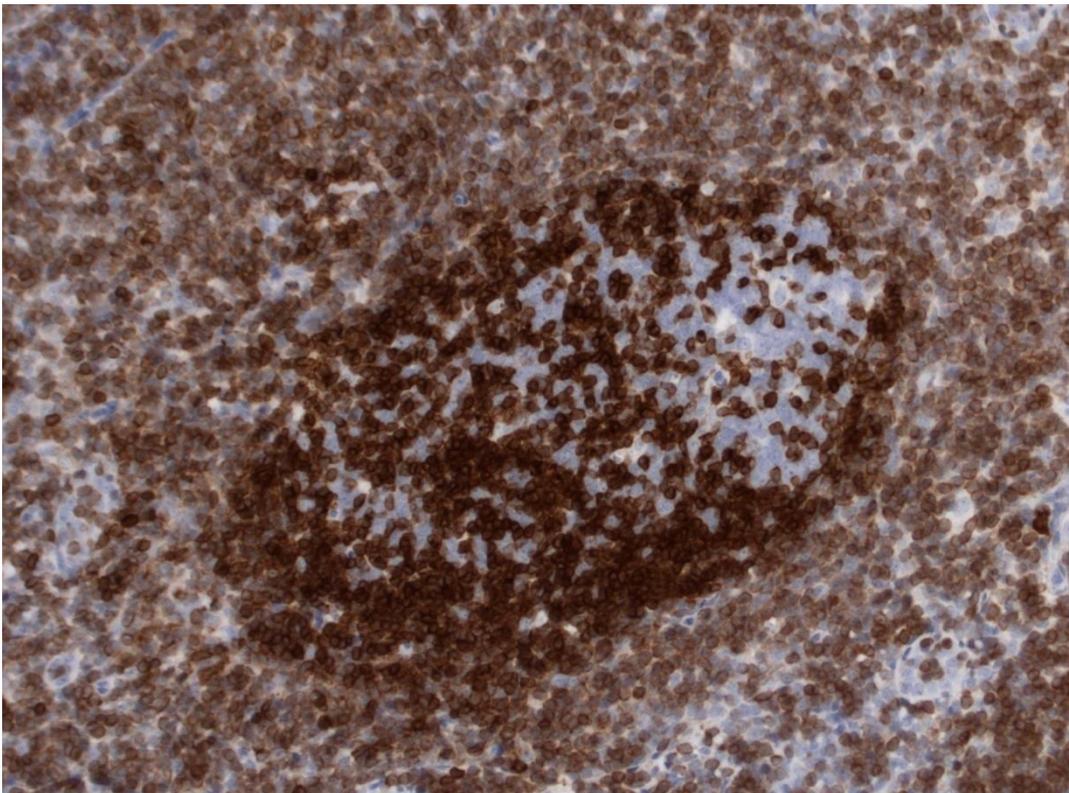
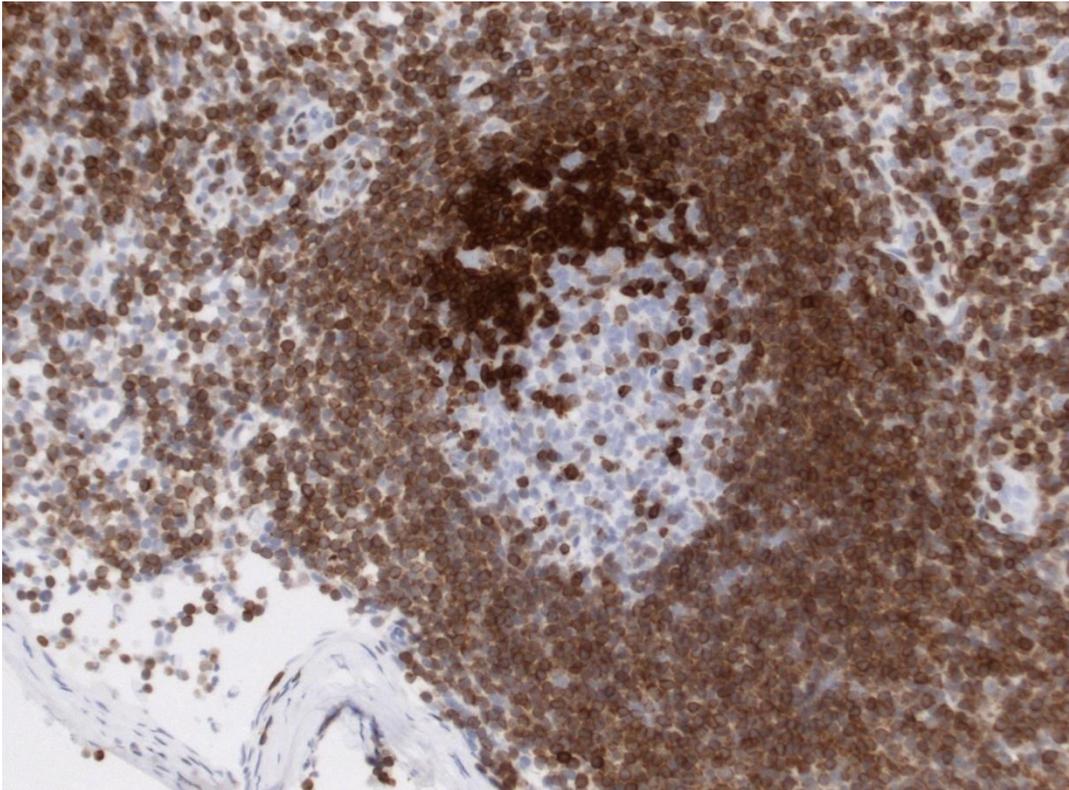


Abb.8 und 9: In vielen Fällen waren nur noch segmentartige Reste von reaktiven (in der BCL2-Darstellung negativen) Keimzentrumsstrukturen nachweisbar (BCL2 Immunperoxidase; 100x).

Betrachtet man diese 40 Fälle mit zumindest einem vollständig erhaltenen Follikel separat, so lag bei 38 dieser 40 Patienten (95 %) ein lokales Erkrankungsstadium (Stadium I/II) und bei nur 2 Patienten (5 %) eine Systemerkrankung (Stadium III/IV) vor. Bei einem dieser beiden Fälle war der Tumor auf die mesenterialen Lymphknoten beschränkt und wurde aufgrund des Knochenmarkbefalls dem Stadium IV zugeordnet.

3.2.2 Kontroll-Kohorte

Die klinischen Staginguntersuchungen der Kontroll-Kohorte von 49 Patienten mit kompletter Infiltration der Lymphknoten waren wie folgt: Stadium I (3 Fälle), II (7 Fälle), III (16 Fälle) und IV (23 Fälle). Somit wurden 39 der 49 Fälle (80 %) in einem fortgeschrittenen (Stadien III bzw. IV), und nur 10 Patienten (20%) in einem noch lokalen klinischen Stadium diagnostiziert. Der Stadien-Unterschied zwischen der Studien-Kohorte mit partieller Lymphknoteninfiltration und der Kontroll-Kohorte mit vollständiger Infiltration war statistisch hoch signifikant ($p < 0.001$).

3.2.3 Validierungs-Kohorte

Um die im ersten Studienteil erhaltenen Ergebnisse zu validieren, wurden alle 321 FL, die im exemplarischen Jahr 2001 im Referenzzentrum Würzburg diagnostiziert worden waren, bezüglich einer nur partiellen Lymphknoteninfiltration reevaluiert. Dabei wurden 24 weitere Fälle mit partieller Infiltration (18 Lymphknotenbiopsien mit vollständig erhaltenen reaktiven Follikeln und 6 mit nur teilweise erhaltenen follikulären Strukturen) identifiziert. Zusammen mit den 10 Fällen des Jahres, die bereits in der Test-Kohorte enthalten waren, betrug die Gesamthäufigkeit des Auftretens einer partiellen Infiltration beim FL 10,6 % (34 von 321 Fällen). Für alle Patienten konnten die

klinischen Daten bezüglich der Stagingergebnisse erhoben werden, wobei sich folgende Erkrankungsstadien ergaben (s. Tab.3):

	Kontroll-Kohorte (vollständige Infiltration) n=49	Studien-Kohorte (partielle Infiltration) n=53	Studien-Kohorte (Fälle mit wenigstens einem tumorfreien Follikel) n=40	Validierungs-Kohorte (alle Fälle mit partieller Infiltration im Jahr 2001) n=34	Validierungs-Kohorte (Fälle mit wenigstens einem tumorfreien Follikel) n=16
Stadium I	3 (6)	33(62)	32(80)	15(44)	10(63)
Stadium II	7(14)	11(21)	6(15)	11(32)	6(37)
Stadium I/II	10(20)	44(83)	38(95)	26(76)	16(100)
Stadium III	16(33)	6(11)	0(0)	5(15)	0(0)
Stadium IV	23(47)	3(6)	2(5)	3(9)	0(0)
Stadium III/IV	39(80)	9(17)	2(5)	8(24)	0(0)
p		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Tabelle 3: Klinische Stagingergebnisse der verschiedenen Fallgruppen

15 Fälle (44 %) wurden in das Stadium I, 11 Fälle (32 %) in das Stadium II, 5 Fälle (15 %) in das Stadium III und 3 Fälle (9 %) in das Stadium IV eingeordnet. In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen lag bei allen 16 Fällen mit mindestens einem vollständig erhaltenen reaktiven Follikel ein nur lokales Erkrankungsstadium (I/II) vor.

3.2.4 In-situ-Hybridisierung der chromosomalen Translokation t(14;18)

Zum Nachweis der für das FL charakteristischen chromosomalen Translokation t(14;18)(q32;q21) führten wir in 12 exemplarischen Fällen mit zumindest einem vollständig erhaltenen Follikel eine Zweifarben-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)-basierte Analyse des Translokationsereignisses durch. In 9 der 10 Fälle mit auswertbaren Ergebnissen fanden sich zwischen 37 und 60% t(14;18) positive Zellen, was deutlich über dem Schwellenwert von 16 % liegt, der das Vorliegen der Translokation anzeigt (Abb.10).

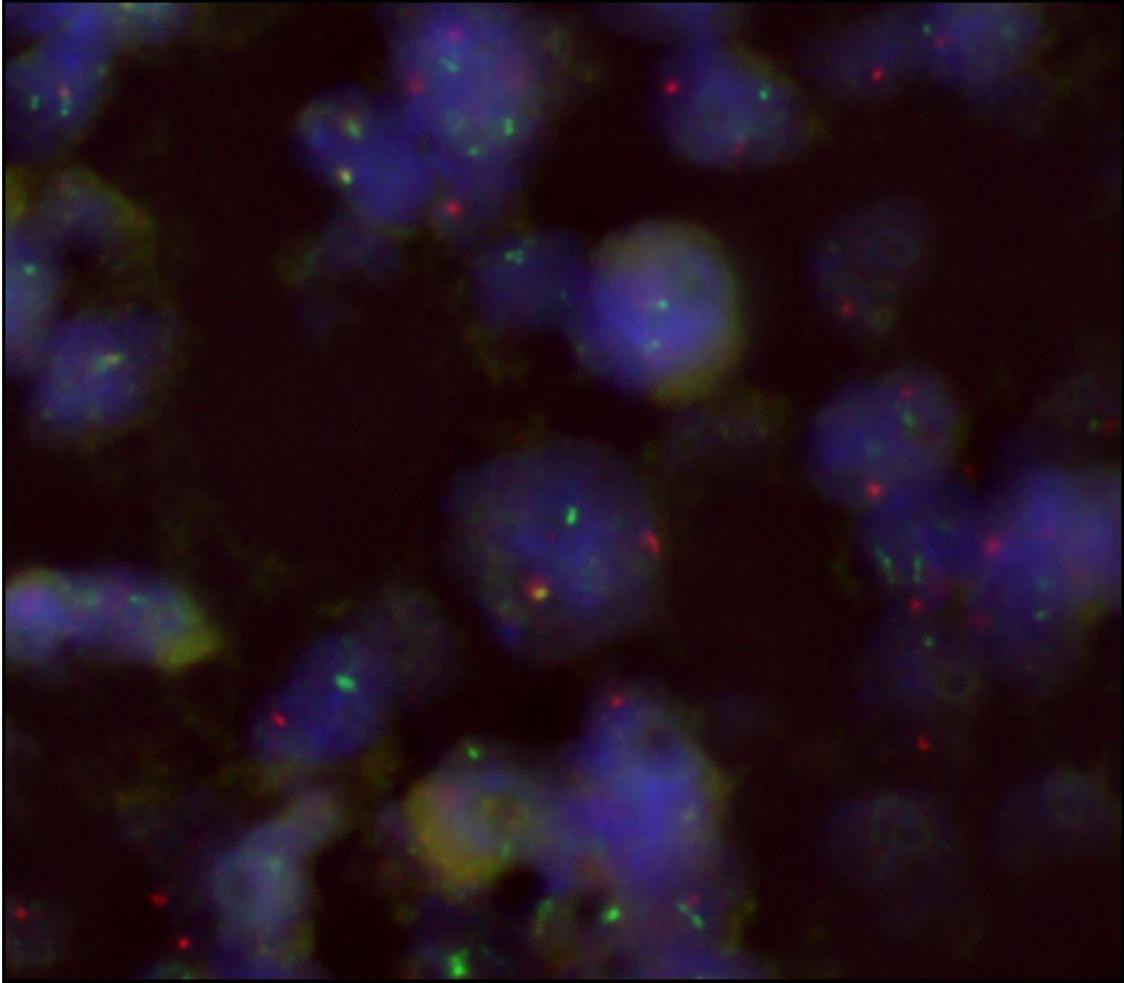


Abb.10: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zum Nachweis einer chromosomalen Translokation t(14;18) mit resultierender Umlagerung des bcl2-Gens (rotes Signal) an den Immunglobulin-Schwerkettenlokus (grünes Signal). Im Falle einer Translokation ist ein gelbes Fusionssignal (z.B. Zelle in der Mitte der Abbildung) nachweisbar. (FISH, 1000x). In neun der untersuchten zehn Fälle mit auswertbaren Ergebnissen zeigten zwischen 37 und 60% der Zellen eine solche Signalfusion als Nachweis der Translokation t(14;18).

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde die klinische Bedeutung des Vorhandenseins von (üblicherweise einzelnen) reaktiven Keimzentren oder Keimzentrumsanteilen in folliculären Lymphomen (FL) Grad 1-3A, eines Non-Hodgkin-Lymphoms der B-Zell-Reihe untersucht. Im Vergleich der initialen Studien-Kohorte von 53 Lymphknotenbiopsien mit dem Nachweis von erhaltenen reaktiven Keimzentren oder Keimzentrumsresten mit der Kontroll-Kohorte von 49 Fällen, bei denen keine erhaltenen Keimzentren nachweisbar waren, ergibt sich ein hochsignifikanter Unterschied in der Verteilung der klinischen Stadien:

So ergaben die klinischen Staginguntersuchungen bei 44 von 53 Patienten (83 %) mit erhaltenen reaktiven Keimzentren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein (noch) **lokales Krankheitsstadium** (Stadium I/II), wohingegen nur bei 9 Patienten (17 %) ein bereits **fortgeschrittenes Krankheitsstadium** (Stadium III/IV) diagnostiziert wurde.

Betrachtet man die 40 Fälle mit zumindest einem **vollständig** erhaltenen Keimzentrum separat, so wird offensichtlich, dass dieser Befund von besonderer Bedeutung ist: 38 (95 %) dieser 40 Patienten zeigten ein lokales Krankheitsstadium (I/II) und nur 2 Patienten (5 %) hatten eine generalisierte Tumorerkrankung. Bei einem der beiden Fälle war das Lymphom auch auf eine einzelne Region (mesenteriale Lymphknoten) begrenzt und wurde aufgrund des Knochenmarkbefalls als Stadium IV eingestuft.

Im Gegensatz dazu lag in der Kontrollgruppe ohne Nachweis erhaltener Keimzentren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei 39 von 49 Patienten (80 %) ein bereits fortgeschrittenes Krankheitsstadium (III/IV) und nur bei 10 Patienten (20 %) ein (noch) lokales Krankheitsstadium vor (Tabelle 1). Diese Daten stimmen gut mit Angaben aus der Literatur überein, denen zufolge ein folliculäres Lymphom in 70 % der Fälle bei Diagnosestellung bereits in einem generalisierten Stadium vorliegt (4).

Die Daten dieses ersten Teils der Studie wurden durch eine anschließend durchgeführte Untersuchung einer Testgruppe validiert: Bei der systematischen

Nachuntersuchung aller 321 FL Grad 1 3A Fälle, die am Referenzzentrum für Lymphknotenerkrankungen am Institut für Pathologie der Universität Würzburg in dem exemplarisch ausgewählten Jahr 2001 diagnostiziert worden waren, wurden diese Ergebnisse bestätigt.

Die Gesamthäufigkeit einer partiellen Infiltration beim FL betrug 10,6 % (34 von 321 Fällen). In Übereinstimmung mit den aus der initialen Studiengruppe erhaltenen Daten lag in allen 18 Fällen mit mindestens einem vollständig erhaltenen reaktiven Keimzentrum ein lokales Krankheitsstadium (Stadium I/II) vor ($p \leq 0,001$).

Als zentrale Aussage der vorliegenden Studie ergibt sich daher, dass der Nachweis vollständig erhaltener reaktiver Keimzentren in folliculären Lymphomen einen starken histopathologischen Indikator für ein (noch) begrenztes Krankheitsstadium darstellt.

Diese Ergebnisse können in Bezug zu einem Bericht von Cong et al. (9) gesehen werden, in dem die histopathologischen und klinischen Eigenschaften von 23 Lymphknotenbiopsien mit folliculärer Hyperplasie beschrieben wurden, bei denen einzelne Keimzentren BCL2-positive Zentrozyten aufwiesen. Für dieses Phänomen wurde die Bezeichnung „In situ-Lokalisation“ eines folliculären Lymphoms vorgeschlagen. In klarem Gegensatz zu den Fällen in der hier vorliegenden Arbeit waren diese Fälle definitionsgemäß frei von eindeutigen Lymphominfiltrationen.

Insgesamt wurden in dieser Studie 23 Fälle mit immunhistochemisch stark BCL2 positiven Zellen in morphologisch unauffälligen Keimzentren identifiziert. In vier von fünf exemplarisch untersuchten Fällen ergab die molekularpathologische IgH-Klonalitätsanalyse ein monoklonales Amplifikat, so dass es sich bei der beschriebenen Läsion um die früheste nachweisbare Manifestation eines FL handeln dürfte.

In der Nachbeobachtung dieser Fälle zeigte sich in 3 von 13 Patienten ein manifestes FL während des Beobachtungszeitraums (jeweils innerhalb von 12, 13 bzw. 72 Monaten). In 10 Fällen fand sich kein Hinweis auf ein Lymphom während des Beobachtungszeitraums zwischen 2 und 96 Monaten (durchschnittlich 15,5 Monate).

In einer aktuellen Studie, in der bei Patienten mit bekanntem FL **retrospektiv** das Vorhandensein von FL in situ-Läsionen in Lymphknoten, die im Rahmen von Staginguntersuchungen bei Tumorerkrankungen entnommen worden waren, konnten bei vier von insgesamt 150 Patienten (2,7%) solche FL in situ-Manifestationen nachgewiesen werden. Molekulargenetisch konnte eine klonale Identität mit dem später diagnostizierten manifesten FL belegt werden. Die Zeit zwischen der Lymphadenektomie bis zur Diagnose des manifesten Tumors betrug zwischen 23 und 150 Monaten (10).

Offenbar besitzen die FL in situ-Zellen (noch) nicht die entscheidenden (genetischen?) Veränderungen, die für eine Expansion des malignen Klons und das Auftreten eines manifesten Lymphoms notwendig sind (11).

Interessanterweise konnten B-Lymphozyten, die die chromosomale Translokation t(14;18) besitzen, auch im peripheren Blut gesunder Probanden nachgewiesen werden (12-13). In einer Studie von Liu et al. (14) wurde die Translokation in peripheren B-Lymphozyten von 55% gesunden Probanden in einer Häufigkeit zwischen weniger als 1 bis 853 Translokationen pro 1 Million Zellen gefunden. Die Inzidenz t(14;18)-positiver Zellen stieg mit dem Lebensalter an und zeigte einen parallelen Verlauf mit der Inzidenz manifester FL. Die durchschnittliche Häufigkeit translozierter Zellen im peripheren Blut war in den ältesten Individuen (≥ 61 Jahre) 13 mal häufiger als in der jüngsten Altersgruppe (≤ 20 Jahre). Einzelne t(14;18)-positive Klone persistierten über 5 Monate in zwei Probanden. Diese Daten zeigen eindrucksvoll, dass B-Zell-Klone die die onkogene Translokation t(14;18) besitzen, häufig auch in gesunden Individuen nachweisbar sein können, ohne dass sich ein FL manifestiert, dass diese Klone über längere Zeiträume persistieren können und dass ihre Inzidenz mit zunehmendem Alter ansteigt.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die t(14;18)-positiven B-Zellen im peripheren Blut gesunder Probanden nicht naive B-Zellen sind, die physiologischerweise BCL2 exprimieren, sondern Zellen, die bereits einen Immunglobulin-Klassenwechsel als ein wesentliches Kennzeichen der Keimzentrumsreaktion durchgeführt haben (15).

Roulland et al. konnten zeigen, dass die t(14;18)-positiven B-Zellen in den meisten Individuen eine Tendenz zum langsamen Ansteigen und einer konstanten Persistenz auch über mehrere Jahre zeigen (16).

In einer weiteren Studie mit 56 Individuen, die verstärkt Pestiziden exponiert waren, konnte festgestellt werden, dass sowohl die Inzidenz der t(14; 18), als auch die Anzahl t(14;18)-positiver B-Zellen im peripheren Blut gegenüber einer Vergleichspopulation zunahm (17). Diese Beobachtung kann als Ausdruck einer erworbenen verstärkten genetischen Instabilität durch Exposition zu einer genotoxischen Substanz gewertet werden.

Ob und gegebenenfalls mit welcher Inzidenz t(14;18)-positive B-Zellen nicht nur im peripheren Blut, sondern auch in reaktiven Lymphknoten beobachtet werden können, konnte in einer Studie von Henopp et al. (18) geklärt werden: In dieser Studie wurden in 22 von 1294 reaktiven Lymphknoten in drei von 132 Individuen (=2,3%) ohne FL in der Anamnese kräftig BCL2-positive B-Zellen in morphologisch reaktiven Keimzentrumsstrukturen gefunden. Der Unterschied der in dieser Studie gefundenen Inzidenz gegenüber der in der Literatur berichteten Inzidenz der t(14;18)-positiven Zellen im peripheren Blut ergibt sich in erster Linie aus der Tatsache, dass nicht alle Lymphknoten eines Individuums für eine entsprechende Untersuchung zur Verfügung stehen und daher die tatsächliche Inzidenz solcher Lymphknotenmanifestationen deutlich über dem gefundenen Wert liegen dürfte.

Diese Daten unterstützen die Theorie, dass die neoplastischen Keimzentrumszellen des FL zu Beginn der Tumorerkrankung eher dazu neigen, bestehende reaktive Follikel zu besiedeln, als neue Follikelstrukturen zu erzeugen.

Oeschger et al. (19) wiesen in einer Analyse der intraklonalen Sequenzdiversität in mikrodissezierten Follikelstrukturen von FL eine intensive interfollikuläre Zellmigration der Tumorzellen nach und Adam et al. (20) konnten zeigen, dass die intraklonale Diversität während der Progression eines FL abnimmt.

Diese Daten stehen gut im Einklang mit dem Modell einer „metastasierenden“ Ausbreitung neoplastischer Zellen über vorbestehende Follikelstrukturen. Die

Ergebnisse der vorliegenden Studie untermauern dieses Modell und legen den Schluss nahe, dass der systemische Befall anderer, entfernterer Lymphknotenregionen möglicherweise ein späteres Phänomen ist, das erst nach vollständiger Infiltration der Lymphknotenregion auftritt, in der die Expansion des malignen Klons ihren Anfang genommen hat.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass es sich bei unserer Studienkohorte um eine Untergruppe von follikulären Lymphomen handelt, in der möglicherweise die charakteristische Translokation t(14;18) nicht vorliegt und die möglicherweise tumorbiologisch zu einer nur lokalisierten Erkrankung neigt, führten wir in 12 exemplarischen Fällen mit vollständig erhaltenen reaktiven Keimzentren eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zum Nachweis der Translokation t(14;18) durch.

In 9 von 10 auswertbaren Fällen war die Translokation t(14;18) in der zufällig ausgewählten Untergruppe nachweisbar.

Diese Rate steht in guter Übereinstimmung mit der Häufigkeit, wie sie in großen Studien über das FL beschrieben wird (70 - 95 %) (21).

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass der Nachweis von erhaltenen reaktiven Keimzentrumsstrukturen im follikulären Lymphom und insbesondere das Auftreten reaktiver Follikel in einem signifikanten Zusammenhang mit einem (noch) lokalen Erkrankungsstadium (klinische Stadien I/II) stehen. Dieses Ergebnis ist von besonderer Bedeutung, da FL in einem noch lokalisierten klinischen Stadium oft durch Radiotherapie allein behandelt werden kann (7). In einer Studie von Advani et al. (22) konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Patienten mit FL in den Krankheitsstadien I und II, die bis zu einem Rezidiv unbehandelt blieben, ein vergleichbares Überleben zeigten, wie die Patienten, die unmittelbar eine Strahlentherapie erhielten. In solchen noch lokalisierten klinischen Stadien könnte daher ein Aufschub der Behandlung („watchfull waiting“) in Betracht gezogen werden.

5. Zusammenfassung

Follikuläre Lymphome (FL) zählen zu den Non-Hodgkin-Lymphomen und stellen die größte Untergruppe der B-Zell-Lymphome dar. Bedingt durch ihren meist indolenten Verlauf werden sie oft erst in einem fortgeschrittenen klinischen Stadium III/IV diagnostiziert und stellen dann eine systemische Erkrankung dar.

Gelegentlich wird in der histopathologischen Untersuchung eines befallenen Lymphknotens eine nur partielle Infiltration beobachtet, die häufig auch in den angeschlossenen Stagingmaßnahmen mit einer nur lokalen Tumorausbreitung (klinisches Stadium I/II) assoziiert ist. Ein solches lokal begrenztes Stadium kann gemäß den Standard-Behandlungsprotokollen mit einer alleinigen Strahlentherapie ausreichend kontrolliert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum einen, eine mögliche **Assoziation** einer nur partiellen Lymphknoteninfiltration beim FL mit einem lokal begrenzten klinischen Stadium zu untersuchen. Zum anderen sollte die **Inzidenz** einer nur partiellen Lymphknoteninfiltration beim FL bestimmt werden.

Der Vergleich der Studienkohorte mit einer **nur** partiellen Lymphknoteninfiltration definiert als zumindest ein **vollständig** erhaltener Lymphfollikel mit der Kontrollkohorte zeigte einen hochsignifikanten Unterschied:

In der Studienkohorte befanden sich 38 von 40 Fälle (95%) in einem lokalen Stadium, wohingegen die Kontrollkohorte mit vollständiger Lymphknoteninfiltration nur bei 10 von 49 Patienten (20%) ein lokales Krankheitsstadium ($p < 0.001$) aufwies.

Um die erhaltenen Ergebnisse zu validieren, wurden alle FL Grad 1-3A aus dem exemplarischen Jahr 2001 untersucht. Hier zeigte sich in 34 Fällen (11%) eine nur partielle Infiltration. In allen 18 Fällen mit mindestens einem vollständig erhaltenen reaktiven Keimzentrum lag in Übereinstimmung mit der initialen Studienkohorte ein lokales Krankheitsstadium I/II vor ($p < 0.001$).

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen eindrücklich, dass folliculäre Lymphome mit einem **nur** partiellen Befall der Lymphknoten **häufig** mit einem (noch) lokalen klinischen Stadium assoziiert sind. In diesen Fällen käme eine alleinige Bestrahlung als Therapieoption in Betracht.

6. Literatur

1. Swerdlow S.H. CE, Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. (Eds.). World Health Organization Classification of Tumors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2008.
2. Horn H, Schmelter C, Leich E, Salaverria I, Katzenberger T, Ott MM, et al. Follicular lymphoma grade 3B is a distinct neoplasm according to cytogenetic and immunohistochemical profiles. *Haematologica*. 2011 Sep;96(9):1327-34.
3. Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rudiger T, Wilhelm M, et al. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood*. 2002 May 15; 99(10):3806-12.
4. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997 Jun 1; 89(11):3909-18.
5. Rowley JD. Chromosome studies in the non-Hodgkin's lymphomas: the role of the 14; 18 translocation. *J Clin Oncol*. 1988 May; 6(5):919-25.
6. Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood*. 2003 Feb 15; 101(4):1220-35.
7. Ganti AK, Bociek RG, Bierman PJ, Enke CA, Vose JM, Armitage JO. Follicular lymphoma: expanding therapeutic options. *Oncology (Huntingt)*. 2005 Feb;19(2):213-28; discussion 28, 33-6, 39.
8. Katzenberger T, Ott G, Klein T, Kalla J, Muller-Hermelink HK, Ott MM. Cytogenetic alterations affecting BCL6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a diffuse large B-cell component. *Am J Pathol*. 2004 Aug; 165 (2):481-90.
9. Cong P, Raffeld M, Teruya-Feldstein J, Sorbara L, Pittaluga S, Jaffe ES. In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood*. 2002 May 1; 99(9):3376-82.

10. Morita K, Nakamine H, Nakai T, Takano M, Takeda M, Enomoto Y, et al. A retrospective study of patients with follicular lymphoma (FL): identification of in situ FL or FL-like B cells of uncertain significance in lymph nodes resected at the time of previous surgery for carcinomas. *J Clin Pathol*. 2015 Jul; 68(7):541-6.
11. Tellier J, Menard C, Roulland S, Martin N, Monvoisin C, Chasson L, et al. Human t(14;18)positive germinal center B cells: a new step in follicular lymphoma pathogenesis? *Blood*. 2014 May 29; 123(22):3462-5.
12. Dolken G, Illerhaus G, Hirt C, Mertelsmann R. BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. *J Clin Oncol*. 1996 Apr; 14(4):1333-44.
13. Schuler F, Hirt C, Dolken G. Chromosomal translocation t (14;18) in healthy individuals. *Semin Cancer Biol*. 2003 Jun; 13(3):203-9.
14. Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, Cortopassi GA. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Sep 13; 91(19):8910-4.
15. Roulland S, Navarro JM, Grenot P, Milili M, Agopian J, Montpellier B, et al. Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J Exp Med*. 2006 Oct 30; 203(11):2425-31.
16. Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, Heutte N, Nadel B, Gauduchon P. Long-term clonal persistence and evolution of t(14;18)-bearing B cells in healthy individuals. *Leukemia*. 2006 Jan; 20(1):158-62.
17. Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, Briand M, Pottier D, Gauduchon P. Characterization of the t (14;18) BCL2-IGH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides. *Cancer Res*. 2004 Mar 15; 64(6):2264-9.
18. Henopp T, Quintanilla-Martinez L, Fend F, Adam P. Prevalence of follicular lymphoma in situ in consecutively analysed reactive lymph nodes. *Histopathology*. 2011 Jul; 59(1):139-42.
19. Oeschger S, Brauninger A, Kuppers R, Hansmann ML. Tumor cell dissemination in follicular lymphoma. *Blood*. 2002 Mar 15; 99(6):2192-8.

20. Adam P, Schoof J, Hartmann M, Schwarz S, Puppe B, Ott M, et al. Cell migration patterns and ongoing somatic mutations in the progression of follicular lymphoma. *Cytogenet Genome Res.* 2007; 118(2-4):328-36.
21. Horsman DE, Gascoyne RD, Coupland RW, Coldman AJ, Adomat SA. Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t (14; 18) in follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 1995 Apr; 103(4):472-8.
22. Advani R, Rosenberg SA, Horning SJ. Stage I and II follicular non-Hodgkin's lymphoma: long-term follow-up of no initial therapy. *J Clin Oncol.* 2004 Apr 15;22(8):1454-9.

Danksagung

Herrn Professor Dr. Andreas Rosenwald möchte ich ganz herzlich für das entgegengebrachte Vertrauen, seine Unterstützung sowie seine Bereitschaft das Manuskript vor der Medizinischen Fakultät zu vertreten, danken.

Herrn Professor Dr. German Ott danke ich für die Überlassung des Themas, die Hinführung zur Fragestellung und viele wichtige Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Patrick Adam für die Überlassung des Themas, für die vielen Anregungen und die immerwährende Bereitschaft, anstehende Probleme und Fragen sehr ausführlich und geduldig zu besprechen.

Lebenslauf

Schulischer Werdegang

1979-83	Grundschule Bechtolsheimer Hof in Würzburg
1983-90	Städtisches Schönborngymnasium in Würzburg
1990-92	Städtisches Mozartgymnasium in Würzburg
Mai 1992	Allgemeine Hochschulreife

Studium

1993	Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Oktober 1994	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
August-Oktober 1997	Zahnärztliche Vorprüfung
April-Juni 2000	Zahnärztliche Prüfung
August 2000	Erhalt der Approbation

Beruflicher Werdegang

November 2000	Beginn der Vorbereitungsassistenzzzeit in der Zahnarztpraxis Bruno Stumpf in Tauberbischofsheim
Juli 2004	Niederlassung als Zahnärztin in der Gemeinschaftspraxis Dr. med. dent. Bruno Stumpf und Miriam Stumpf in Tauberbischofsheim

