

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Würzburg
Leitung: Prof. Dr. med. Hans Konrad Müller- Hermelink

**Morphologische und immunhistochemische
Charakterisierung Centroblastischer Lymphome vom
multilobulierten Subtyp**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Kristin Dziewior
aus Würzburg

Augsburg, Juni 2006

Referent: Priv. Doz. Dr. med. German Ott

Korreferent: Prof. Dr. med. Hans Konrad Müller- Hermelink

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 02.11.2006

Die Promovendin ist Ärztin

Referent: Priv. Doz. Dr. med. German Ott

Korreferent: Prof. Dr. med. Hans Konrad Müller- Hermelink

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Einleitung</u>	1
1.1.	Maligne Lymphome	1
1.1.1.	Hodgkin- und Non- Hodgkin Lymphome	1
1.1.2.	Überblick über die Klassifikationen	1
1.1.2.1.	Die Kiel Klassifikation	1
1.1.2.2.	Die Working Formulation (WF)	2
1.1.2.3.	Die Real Klassifikation	2
1.1.2.4.	Die WHO Klassifikation	3
1.2.	Prognostische Faktoren	3
1.2.1.	Der „ International Prognostic Index“ (IPI)	3
1.2.2.	Bcl-2 Expression	4
1.2.3.	Genexpressions-Untersuchungen: Unterscheidung in Keimzentrumszell-ähnliche (Germinal Center B-cell like (GCB)) und Aktivierte B-Zellen- ähnliche (Activated B-cell- like (ABC)) diffuse großzellige B-Zell Lymphome	4
1.3.	Das multilobulierte centroblastische Lymphom	5
1.4.	Tissue Microarrays (TMA)	7
1.5.	Fragestellung	7
2.	<u>Material und Methoden</u>	8
2.1.	Fallauswahl	8
2.2.	Kriterien der Auswertung	8

2.3.	Erstellung der Gewebe- Arrays (TMA)	8
2.4.	Immunhistochemische Färbungen	9
2.5.	Verwendete Antikörper	10
2.6.	Klinische Daten	11
2.7.	Vergleichsgruppe	12
3.	<u>Ergebnisse</u>	13
3.1.	Diagnosestellung	13
3.2.	Wachstumsmuster und Zytomorphologie	13
3.3.	Vergleichsgruppe	15
3.4.	Immunhistochemische Untersuchungen	15
3.4.1.	Expression von CD 10	16
3.4.2.	Expression von BCL-2	17
3.4.3.	Expression von p53 und p21	17
3.4.4.	Expression von CD 23	18
3.4.5.	Reaktivität für MIB1 (Ki67)	19
3.4.6.	Expression von IRF4 (MUM1)	21
3.4.7.	Plasmozytoide Differenzierung	21
3.4.8.	BCL-6 Expression	22
3.5.	Einteilung in Keimzentrums- und non- Keimzentrumstypen	23
3.6.	Klinische Daten	24
4.	<u>Diskussion</u>	28
4.1.	Definition der multilobulierten centroblastischen Lymphome	28
4.2.	Morphologische Charakteristika	29

4.3.	Die Gewebe-Array- (Tissue- Mikroarray, TMA) Technik als Grundlage der Immunhistochemischen Untersuchung	29
4.4.	Die Unterteilung prognostisch relevanter Untergruppen von DLBCL durch Genexpressionsprofile und Immunhistochemie	30
4.5.	Immunhistochemische Markeranalyse zur Einteilung in GC und non-GC DLBCL	31
4.5.1.	CD 10	31
4.5.2.	BCL-6	32
4.5.3.	MUM1	33
4.5.4.	Die Zuordnung multilobulierter CB nach dem „Hans“- Klassifikator	33
4.5.5.	BCL-2	34
4.5.6.	TP53	35
4.5.7.	Ki67/MIB1	37
4.5.8.	CD5 und CD23	38
4.6.	Klinische Korrelationen	40
5.	<u>Zusammenfassung</u>	41
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	43

1. Einleitung

1.1. Maligne Lymphome

Maligne Lymphome stellen Neoplasien des lymphatischen Systems dar. Sie werden nach klinischen und histologischen Kriterien in zwei Gruppen unterteilt: Hodgkin-Lymphome (HL) und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). In erster Linie sind die lymphatischen Organe (Lymphknoten, Milz) betroffen, allerdings entstehen bis zu 30-40% der NHL auch primär extranodal bzw. extralymphatisch, am häufigsten im Bereich des Gastrointestinaltraktes (5).

1.1.1. Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome

Das Hodgkin Lymphom (HL) ist gekennzeichnet durch den histologischen Nachweis von ein- und mehrkernigen Riesenzellen (Hodgkin- bzw. Sternberg-Reed-Zellen). Alle malignen Lymphome, die nicht in die Gruppe der HL fallen, werden unter dem Oberbegriff Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) zusammengefasst. Die meisten NHL zeigen histologische und immunologische Charakteristika, die auf einen Ausgang von bestimmten Vorläuferzellen der normalen T- und B- Lymphozytenentwicklung schließen lassen. NHL der B-Zell Reihe entstehen also aus Zellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien der B- Lymphozytenentwicklung.

Weltweit stellen „hochmaligne“ diffuse großzellige B-Zell Lymphome (DLBCL) eine der häufigsten Lymphomerkrankungen überhaupt dar. Sie machen nach Knowles et al. (1a) ca. 40% der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) aus. In der westlichen Welt werden 30% aller Lymphomerkrankungen als DLBCL diagnostiziert (5).

1.1.2. Überblick über die Klassifikationen

1.1.2.1. Die Kiel Klassifikation

Lennert und Feller (3) teilen lymphoide Tumoren nach der Kiel Klassifikation in niedrig maligne NHL und hochmaligne NHL ein, wobei in beiden Gruppen B- und T-

Zell Neoplasien vorkommen. Die hochmalignen NHL vom B-Zell Typ werden histologisch in lymphoblastische, centroblastische, immunoblastische, anaplastische und Burkitt Lymphome unterschieden, wobei Lennert die centroblastischen Lymphome wiederum in die morphologischen Typen monomorph, polymorph, multilobuliert und centrozytoid unterteilt (3).

1.1.2.2. Die Working Formulation (WF)

Vom „National Cancer Institute“ wurden 1982 die Klassifikationsvorschläge verschiedener Autoren (Lukes und Collins, Rappaport u.a.) zur „Working Formulation“ zusammengefaßt. Sie kam vorwiegend im anglo-amerikanischen Raum zum Einsatz und teilt die NHL in einen niedrigen, intermediären und hohen Malignitätsgrad ein.

1.1.2.3. Die REAL- Klassifikation

Die „Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms“ (REAL) führte die Lymphomentität „DLBCL“ ein und definiert sie als Lymphome bestehend aus großen Zellen mit vergrößerten Zellkernen, prominenten Nukleoli, basophilem Cytoplasma und einer mäßig starken bis starken Proliferationsrate (2). Die REAL-Klassifikation – 1994 von der „International Lymphoma Study Group“ (ILSG) publiziert- faßt also unter dem Namen DLBCL die Lymphomtypen zusammen, die in der „Updated Kiel Classification“ von 1992 als centroblastisch, immunoblastisch und anaplastisch definiert wurden (8). Grund für diese Vereinfachung war einerseits die Schwierigkeit, unter den 19 an der REAL-Klassifikation beteiligten Pathologen übereinstimmende Subklassifikationen zu erzielen und andererseits die Tatsache, dass eine Subklassifikation bisher keine Auswirkungen auf die Therapie und somit keine klinische Relevanz hatte (2). Die beteiligten Pathologen - Mitglieder der „International Lymphoma Study Group“ - gaben damit den Anstoß für weitere Studien, welche morphologische, immunologische und genetische Parameter identifizieren sollen, die klinisch relevante Untergruppen definieren (2,4).

1.1.2.4. Die WHO-Klassifikation

Die „European Association for Hematopathology“ (EAHP) und die „Society for Hematopathology“ (SH) präsentierten 1997 die neue WHO- Klassifikation. Sie hält sich an das Prinzip der REAL-Klassifikation, die Tumoren anhand ihrer Morphologie und ihrer immunologischen und genetischen bzw. klinischen Parameter zu beschreiben (25) .

1.2. Prognostische Faktoren

Ebenso vielfältig wie die Klassifikationsvorschläge für NHL sind auch die Bemühungen, relevante Faktoren zu finden, welche eine Aussage über die Überlebenswahrscheinlichkeiten der Tumorpatienten erlauben. DLBCL sind klinisch heterogen. Seit Einführung der Kombinations-Chemotherapie sind sie in etwa 30-40% der Fälle heilbar geworden. Es gibt also nach wie vor viele Patienten, die nicht oder nur wenig von der Therapie profitieren und letztlich an der Neoplasie versterben. Die Einteilung in verschiedene Risikogruppen wird in Zukunft die Therapieschemata verändern.

1.2.1. Der „International Prognostic Index“ (IPI)

1993 veröffentlichte eine zum „The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project“ zusammengeschlossene Gruppe von Hämatologen um Shipp eine Arbeit zum Thema der prognostischen Einteilung hochmaligner Non-Hodgkin Lymphome (6). Ziel des Projektes war es, ein Modell zu entwickeln, welches den Krankheitsverlauf von Patienten mit aggressiven NHL anhand von klinischen Parametern vor Therapiebeginn vorherzusagen vermag. Durch die Bestimmung von Alter, Tumorstadium, Serum-LDH, Allgemeinzustand des Patienten und Anzahl der extranodalen Manifestationen konnten vier Risikogruppen (low, low intermediate, high intermediate and high risk) abgegrenzt werden. Für Patienten unter 60 Jahren wurde der Alters-angepaßte Prognostic Index entwickelt, der Tumorstadium, LDH- Wert und den Allgemeinzustand berücksichtigt. Das Tumorstadium wird dabei nach der Ann-Arbor Klassifikation bestimmt, die den Lymphknotenbefall in verschiedenen Körperregionen beschreibt. Sie wurde

ursprünglich für HL entwickelt und ist bei NHL als alleiniger Faktor weniger aussagekräftig im Hinblick auf die Prognose. Unterschieden wird gewöhnlich zwischen den Tumorstadien I/II und III/IV bzw. zwischen lokalisierten und generalisierten Tumoren. Der Allgemeinzustand der Patienten wurde nach der Skala der „Eastern Cooperative Oncology Group“ (ECOG) bewertet, welche die Patienten in 0 (symptomfrei) bis 4 (auf ständige Pflege angewiesen) einteilt. Für den IPI wurde eine Unterteilung in ambulante (0 und 1) und nicht ambulante (2-4) Patienten getroffen.

1.2.2. Bcl-2 Expression

Verschiedene Autoren beschäftigten sich mit der prognostischen Aussagekraft von Translokationen oder Mutationen des *BCL2* Gens bzw. immunhistochemisch bestimmter (Über-)Expression des BCL-2 Proteins. Grundlage ist die Erkenntnis, dass eine Überexpression von BCL-2 die Apoptose von Zellen hemmt (32).

Gascoyne et al. (26) weisen Patienten mit DLBCL, deren Lymphome eine immunhistochemische (Über-)Expression von BCL-2 zeigen, eine ungünstigere Prognose in Bezug auf Überlebenszeit und Rezidivfreiheit zu. Eine hohe BCL-2 Expression wird häufiger bei Tumoren im Stadium III und IV gefunden (27) und ist mit schlechterem Ansprechen auf Chemotherapie assoziiert (16).

Häufiger Kritikpunkt der Einteilung nach IPI ist, dass dieser nur bei den als hoch und den als niedrig einzustufenden Risikogruppen aussagekräftig zu sein scheint, nicht aber in den mittleren Risikogruppen. In diesen kann die BCL-2 Expression auf eine Überlebenszeit hinweisen, die vergleichbar mit dem hohen Risikotyp des IPI ist (17). Dabei gelten IPI und BCL-2 Expression als unabhängige Risikofaktoren.

1.2.3. Genexpressions-Untersuchungen: Unterscheidung in Keimzentrumzell-ähnliche (Germinal Center B-cell like (GCB)) und Aktivierte B-Zellen-ähnliche (Activated B-cell-like (ABC)) diffuse großzellige B-Zell Lymphome.

Alizadeh et al. (33) untersuchten mit Hilfe des „Lymphochips“ die Expression von über 17.000 Genen in NHL. Sie konnten zwei Gruppen von DLBCL identifizieren, die eine unterschiedliche Prognose zeigten. Die Untergruppe, die vorwiegend Gene

exprimierte, die typisch für normale B-Zellen des Keimzentrums sind (GC B-cell like), zeigte einen günstigeren Verlauf. Dagegen war die Gruppe, die Gene exprimierte, welche typisch für aktivierte periphere B-Zellen sind, mit einem schlechten Krankheitsverlauf assoziiert. Rosenwald et al. (34) unterschieden mittels der cDNA-Microarray Technik drei Genexpressionstypen: er definierte zusätzlich zum GCB- Typ und zum ABC- Typ noch die Risikogruppe Typ 3 (unklassifiziert), der kein eigenes Gen-Set eindeutig zugeordnet werden konnte. Er grenzte darüber hinaus 17 Gene ab, die für eine Risikobewertung ausreichten. Auch diese Arbeit bestätigt den günstigeren Verlauf der GC-B-Zell Lymphome im Vergleich mit beiden anderen Gruppen. Um in der klinischen Routine die Einteilung in GCB und Non-GCB Lymphome zu ermöglichen, entwickelten Hans et al. (35) ein Modell, DLBCL mit Hilfe der Immunhistochemie (und der „Tissue microarray“ (TMA) Technik) in prognostische Gruppen einzuteilen. In dieser Arbeit gelang eine Zuteilung zur GCB bzw. non-GCB Gruppe mittels der immunhistochemischen Marker CD10, BCL-6 und MUM1. Mit dem ermittelten Algorithmus konnten etwa 80% der untersuchten DLBCL am Paraffinmaterial korrekt, d.h. entsprechend der Ergebnisse des Lymphochips, klassifiziert werden. CD10 und BCL-6 zeigen dabei die Abstammung von Keimzentrums-Zellen an; MUM1, ein Antigen des Interferon-Stoffwechsels, wird in normalen Plasmazellen exprimiert und kann als Marker für den non-GC B-Zell Typ verwendet werden. Die BCL-2 Expression alleine hatte in dieser Studie keine prognostische Aussagekraft im Hinblick auf die Überlebenszeit, war allerdings in der Gruppe der non-GCB Lymphome mit einem signifikant schlechteren klinischen Verlauf assoziiert.

1.3. Das multilobulierte centroblastische Lymphom

„Multilobulierte“ Lymphome wurden erstmalig 1979 von Pinkus et al. als T-Zell Lymphome beschrieben. Wie Baroni et al. 1987 zusammenfassen, entdeckten in den 80er Jahren verschiedene Autoren ähnliche Zellen in Lymphomen, die mittels der Immunhistochemie eindeutig als B-Zell Typen identifiziert wurden. (14) Wie auch andere Autoren waren Baroni et al.(14) der Meinung, dass multilobulierte B-Zell NHL eine heterogene morphologische Gruppe mit ähnlichen klinischen

Eigenschaften darstellen könnten. O'Hara et al. (15) kamen in einer Studie 1986 zu dem Schluss, dass sich multilobulierte B-Zell-NHL aus folliculären Lymphomen entwickeln. Das Auftreten von folliculären Lymphomen mit vereinzelt multilobulierten Zellen in Biopsien, die viele Monate vor der Tumorentfernung entnommen und untersucht worden waren und das Vorhandensein eines typischen Keimzentrumsmarkers, des PNA- Rezeptors (Peanut lectin), wiesen ihrer Meinung nach auf den Keimzentrumsursprung der Tumoren hin. Auch van Baarlen et al. (7) postulierten, dass multilobulierte B-Zell NHL im Keimzentrum entstünden und die Tumorzellen als Variationen von Centroblasten und Centrozyten angesehen werden müssten.

Nach der Definition in der Kiel-Klassifikation wachsen centroblastische Lymphome (CB) in den meisten Fällen diffus, doch auch folliculäre und gemischte Wachstumsmuster kommen vor. Bei dem monomorphen Subtyp entsteht durch eine hohe Anzahl an Centroblasten (>90%) ein gleichmäßiges Bild. Die Zellen haben ein schmales basophiles Cytoplasma, große, blasse, meist rundliche Kerne und mehrere randständige Nukleolen. Sind mehr als 10% Immunoblasten vorhanden, wird der polymorphe Subtyp des centroblastischen Lymphoms diagnostiziert. Hier entsteht ein „buntes“ Muster mit vielen eingestreuten Immunoblasten, die durch große zentrale Nukleolen und ein breites basophiles Zytoplasma ins Auge fallen. Vom immunoblastischen Lymphom (IB) unterscheidet sich das polymorphe CB Lymphom durch die Anwesenheit von typischen Centroblasten in >10% der Zellen.

Wenn auf den ersten Blick Kernlappungen der Blasten auffällig sind (>20% der Gesamtzell- bzw. der Blastenzahl), handelt es sich um den multilobulierten Subtyp. Die mittelgroßen Zellen haben wie die typischen Centroblasten ein schmales basophiles Cytoplasma bei meist 3-4 Kernlappungen und schlecht sichtbaren Nukleolen. Andere Zellen des Keimzentrums sind in unterschiedlichem Mischverhältnis eingestreut. (Centroblasten, Immunoblasten, Centrocyten). Eine morphologisch ähnliche Variante des T-Zell Lymphoms lässt sich immunologisch abgrenzen.

1.4. Tissue Mikroarrays (TMA)

Um viele Tumoren besser immunhistochemisch auswerten und vergleichen zu können, wendet man seit einiger Zeit die Methode der Gewebe-Mikroarray-Gewinnung (Tissue Mikroarray = TMA) an. Dadurch wird es möglich, verschiedene Tumoren immunhistochemisch direkt miteinander zu vergleichen, indem man bis zu 1000 verschiedene Tumorgewebe in Stanzenform auf einen Objektträger bringt. Die Tissue Mikroarray Technik wurde von Mitarbeitern des Pathologischen Institutes Basel entwickelt (38). In einer Arbeit aus dem Pathologischen Institut in Würzburg (36) wurde die Aussagekraft verschiedener immunhistochemischer Marker, die in der TM Technik gefärbt wurden, überprüft, indem sie mit Ergebnissen konventionell angefarbter Paraffinschnitte verglichen wurde. Die Autoren fanden für eine Reihe von Markern (CD20, CD3, CD5 und BCL-2) eine genaue Übereinstimmung der Ergebnisse im TMA und in konventioneller Färbetechnik. Bei anderen Markern (CD10, CD23, p53, kappa bzw. lamda Produktion und Ki67) lag die Übereinstimmung zwischen 90 und 100 Prozent. Aufgrund dieser guten Ergebnisse und der guten Vergleichbarkeit der Färbungen auf einem Objektträger wurde auch für diese Arbeit als Methode die immunhistochemische Untersuchung mittels TMA gewählt.

1.5. Fragestellung

Multilobulierte centroblastische Lymphome stellen in der Kiel- Klassifikation eine besondere morphologische Untergruppe der hochmalignen centroblastischen Lymphome (CB) dar. In der vorliegenden Arbeit sollte verglichen werden, inwieweit sich multilobulierte Lymphome in Bezug auf immunhistochemische und klinische Parameter von anderen NHL der B-Zell Reihe unterscheiden. Es interessierte insbesondere, ob großzellige, multilobulierte B-Zell Lymphome eher eine Keimzentrums „Signatur“ aufweisen, also der Differenzierungsstufe des Keimzentrums entsprechen, und ob ein besonderer (prognostisch günstiger?) Verlauf der Erkrankung vorliegt.

2. Material und Methoden

2.1. Fallauswahl

Aus der Datenbank des Würzburger Referenzzentrums für Lymphknotenpathologie wurden alle zwischen 1989 und 2001 eingegangenen und als „DLBCL centroblastisch multilobuliert“ klassifizierten Lymphome ermittelt. Von insgesamt 110 Fällen wurden die Schnittpräparate und Blöcke aus dem Archiv herausgesucht und einem Reviewprozess unterzogen. Die Diagnose wurde unabhängig vom Wachstumsmuster bestätigt, wenn Zellen mit typischen multilobulierten Kernen in mindestens 5-10% nachweisbar waren.

2.2. Kriterien der Auswertung

Anhand der konventionellen Schnittpräparate wurde das Wachstumsmuster bestimmt und die CB multilobuliert in ausschließlich diffus wachsende Tumoren und in solche mit diffusem und follikulärem Wachstumsmuster untergliedert. Der follikuläre Anteil wurde in Prozent der infiltrierten Fläche angegeben. Zusätzlich wurde erfasst, ob die Tumoren eine vollständige oder eine partielle Infiltration des lymphatischen Parenchyms aufwiesen. Außerdem wurde beachtet, ob der Tumor zellarmes, sklerosiertes Fasergewebe (eine Sklerose) aufwies.

2.3. Erstellung der Gewebe- Arrays (TMA)

Anhand der Giemsa bzw. HE gefärbten konventionellen Schnitte wurden stanzfähige Areale herausgesucht, die den Tumor möglichst gut repräsentieren sollten. Außer auf die gute Fixierung des Präparates wurde darauf geachtet, dass Tumorgewebe und nicht umgebendes Bindegewebe gestanzt wurde und die Tumoranteile nekrosefrei waren.

Wie im Institut etabliert (36) wurden mit einem Manual Tissue Puncher/Arrayer der Firma Beecher Instruments, Silver Spring, Maryland, USA, pro Fall jeweils fünf Stanzen aus dem in Paraffin eingebetteten Lymphomgewebe entnommen und direkt

in einen Paraffin-Empfängerblock eingebracht. Die Stanzen hatten einen Durchmesser von 0,6 mm und wurden im Abstand von 1mm angeordnet. Die insgesamt 72 gestanzten Fälle wurden auf zwei Paraffinblöcke verteilt.

Von den Arrayblöcken wurden mit einem herkömmlichen Mikrotom 3-5µm dicke Schnittpräparate hergestellt, die auf silanisierte Objektträger aufgezogen und für ca. eine Woche im Brutschrank bei 56°C getrocknet wurden, um das Abschwimmen der Stanzen beim anschließenden Färbevorgang zu vermeiden.

2.4. Immunhistochemische Färbungen

Für alle Färbungen wurde die im Institut übliche indirekte Immunperoxidasetechnik mittels eines Färbeautomaten angewandt. Vor den immunhistochemischen Färbungen wurde von jedem Block je eine HE-Färbung angefertigt, um eine bessere morphologische Kontrolle darüber zu haben, ob in den jeweiligen Stanzen repräsentatives Tumormaterial erfasst worden war. Wenn dieses in mindestens einer der 5 Stanzen der Fall war, wurden die Färbungen ausgewertet.

Verwendete Antikörper und jeweilige Verdünnung:

CD20cy (L26): DAKO, clone: L26	1:1000
CD5: NOVOCASTRA, clone: CD5/4C7	1:40
CD10: NOVOCASTRA, clone: 56C6	1:5
BCL-6 DAKO, clone PG-B6p	1:5
CD23: NOVOCASTRA, clone: 1B12	1:10
Ki67: NOVOCASTRA, clone: MM1	1:30
BCL-2: DAKO, clone:124	1:50
p53: DAKO, clone:DO-7	1:50
p21: CALBIOCHEM, clone: EA10	1:10
Kappa: DAKO, code No. A191	1:40000
Lambda: DAKO, code No. A193	1:20000

2.5. Verwendete Antikörper

Immunhistochemische Marker färben als Antikörper nukleäre, zytoplasmatische oder membranständige Antigene. Diese Proteinstrukturen stellen z.B. Genprodukte dar, die eine Zelle charakterisieren. Weitgehend homogen exprimierte Marker wie CD20, CD5, CD10, CD23 und BCL-2 wurden bei Vorhandensein einer Expression in den Tumorzellen über der Hintergrundfärbung hinaus als positiv gewertet.

Der Antikörper CD20 färbt ein Oberflächen-Antigen an, welches sich auf der Membran von Zellen der B-Zell-Reihe befindet. Da es sich bei DLBCL definitionsgemäß um entartete B- Zellen handelt, sollte CD20 bis auf wenige Ausnahmen (plasmoblastische Lymphome) auf den Tumorzellen positiv sein.

Für den Marker CD23 wurde sowohl die Positivität der Tumorzellen vermerkt, als auch die der folliculären dendritischen Retikulumzellen (FDC), die Hinweis auf einen folliculären Ursprung des Tumors geben.

Sowohl nach Anzahl als auch nach Intensität der angefärbten Zellen wurde bei dem zytoplasmatischen Antigen BCL-2 unterschieden. Tumoren mit weniger als 50% positiven Tumorzellen bezeichneten wir als Score 1, solche mit mehr als 50% Tumorzellen als Score 2. Die Intensität variierte von schwach über mittel bis stark (+/++/+++). Dieses Ergebnis wurde zusammengefasst zu keiner, schwacher (1 und 2+) und starker (2++/2+++) BCL-2 Expression.

Die nukleäre Reaktivität für p53 wurde in Zehnerschritten in Prozent angegeben, aufgeteilt in starke bzw. schwache Intensität der Färbung. Als positiv galten alle Fälle, in denen stark nukleär positive Zellen in über 25% vertreten waren.

p53 induziert die Aktivierung des Cyclin-Kinase Inhibitors p21, was normalerweise zur Arretierung des Zellzyklus führt. Ist das Genprodukt von p53 mutiert, wird es zwar vom entsprechenden Antikörper verstärkt angefärbt, da es sich auf Grund der verlängerten Halbwertszeit im Zellkern anhäuft, kann aber p21 nicht mehr (trans-) aktivieren. Die Reaktivität für p21 wurde unabhängig von der Expressionsstärke in Schritten von 10% angegeben.

Die Expression des Keimzentrumszell-Markers BCL-6 wurde in Zehnerprozentsschritten angegeben, wobei nach Hans et al (35) eine Expression in über 30% der Zellen als positiv gewertet wurde.

Die Zahl der Ki 67 positiven Zellen, die durch den Proliferationsmarker MIB1 angefärbt werden, wurde ebenfalls in Zehnprozentsschritten angegeben, wobei jeweils der Bereich der Stanzen mit der höchsten Proliferation gewählt wurde. Auch für den Post- Keimzentrums- Marker MUM1, der den Interferon regulator factor 4 (IRF4) erkennt, wurden Zehnerschritt-Prozentangaben gewählt. Er färbt Plasmazellen an und sollte im normalen Keimzentrum nahezu negativ sein.

Um eine plasmazytoide Differenzierung nachzuweisen, wurden Antikörper gegen die Leichtketten der Immunglobulingene bzw. -genprodukte (kappa bzw. lamda) gefärbt. Die monotypische zytoplasmatische Positivität für einen dieser beiden Marker definierte einen Fall als sekretorisch differenziert (cIg+).

Eine immunhistochemischen Auswertung der o.g. Parameter war in 71 in TMAs eingebrachten Fällen möglich. Zusätzlich wurden 6 weitere Lymphome in die Studie integriert, deren Färbungen anhand der ursprünglichen Präparate ausgewertet worden waren.

2.6. Klinische Daten

Von allen Patienten wurde versucht, anhand kurzer Fragebögen klinische Daten zu erfahren. Dies waren das Diagnosedatum sowie der Zeitpunkt des Todes bzw. der letzten Untersuchung. Auch das Tumorstadium, das Vorliegen einer B-Symptomatik, die Anzahl extranodaler Tumormanifestationen und der LDH-Wert zum Diagnosezeitpunkt wurden erfragt. Ebenfalls relevant erschienen das Therapieschema und ein eventuelles Tumorrezidiv. Innerhalb eines Jahres gelang es, von 46 Patienten klinische Daten zu erhalten. Von diesen Patienten waren 24 weiblichen und 22 männlichen Geschlechts. Die Altersverteilung bei Diagnosestellung lag zwischen 29 und 88 Jahren, wobei der Altersdurchschnitt 60,2 Jahre betrug. 25 Patienten waren älter als 60 Jahre, 21 bis zu 60 Jahre alt.

Anhand der durch Fragebögen ermittelten Daten der Patienten wurden die Überlebenszeiten der Patienten nach Kaplan und Meier (22,23) errechnet. Die Gesamtüberlebenszeit (Overall-Survival = OS) wurde bestimmt und zwischen verschiedenen Diagnosegruppen verglichen. Das OS wurde vom Zeitpunkt der Diagnosestellung bis zum Tod bzw. dem letzten Follow-up gemessen. Wie auch in anderen Studien wurden die prognostisch wichtigen Daten zum so genannten IPI (International Prognostic Index) zusammengefasst. Dazu gehören nach Shipp et al. (6) das Tumorstadium nach der Ann-Arbor Klassifikation, das Alter des Patienten (unter bzw. über 60 Jahre), der LDH (Laktat-Dehydrogenase) Wert bei Diagnosestellung, die Anzahl der extranodalen Manifestationen und der „Performance“ Status.

2.7. Vergleichsgruppe

Zum Vergleich mit den oben genannten Daten wurden entsprechende Daten unterschiedlicher Typen großzelliger B-Zell Tumoren herangezogen, die auf die gleiche Weise gestanz und immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet worden waren (36). Sie entsprachen 18 centroblastischen monomorphen und 39 polymorphen Lymphomen sowie 7 immunoblastischen Lymphomen. Daneben wurden Vergleichsdaten einer Gruppe von 22 FL Grad 3B±DLBCL (6 FL 3B; 16 FL 3B+DLBCL) und 11 FL 3A herangezogen. Insgesamt standen zur immunhistochemischen Markeranalyse 64 DLBCL, 22 FL 3B±DLBCL sowie 11 FL 3A zur Verfügung.

Es konnten bei 14 centroblastisch monomorphen, bei 21 polymorphen und bei 5 immunoblastischen Lymphomen klinische Daten der Tumorpatienten zum Vergleich herangezogen werden. Aus der Gruppe der FL 3B lagen bei 4, aus der Gruppe der FL 3B+DLBCL bei 10 Patienten klinische Daten vor. Zusätzlich zu den oben angegebenen Entitäten wurden auch Daten eines Kollektivs von 14 Plasmoblastischen Lymphompatienten sowie von 47 mit FL Grad 1-3 berücksichtigt. Insgesamt standen somit 54 DLBCL, 47 FL 1-3A sowie 14 FL 3B±DLBCL zum Vergleich der klinischen Daten zur Verfügung.

3. Ergebnisse

3.1. Diagnosestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Diagnosen von 120 malignen Lymphomen, bei denen die Diagnose „centroblastisches Lymphom, multilobulierter Subtyp“ (CB multilobuliert) gestellt worden war, re-evaluiert und das Paraffinmaterial auf ausreichendes Material hin geprüft. In 72 Fällen wurde die Diagnose bestätigt und es lag genügend Material für weitere Untersuchungen vor.

3.2. Wachstumsmuster und Zytomorphologie

In allen 72 Fällen zeigten sich Zellen mit multilobulierten Kernen, deren Zahl bei mindestens 5-10% der Zellen lag (vgl. Definition). Zusätzlich lagen in den Tumoren typische Centroblasten, Immunoblasten und (zumeist große) Centrozyten-ähnliche Zellen vor (Abbildung 1).

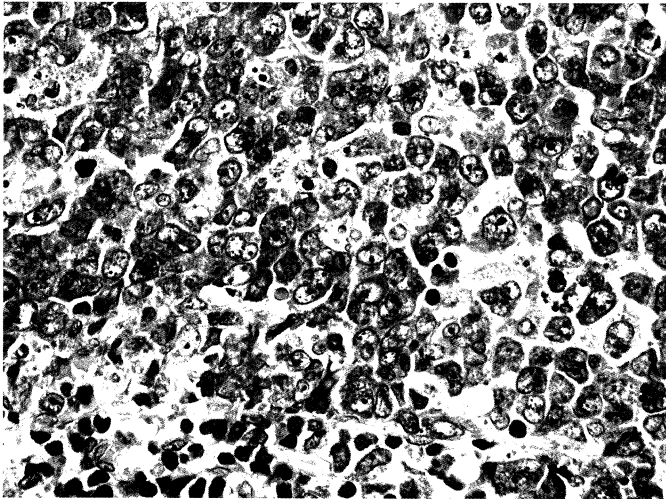


Abbildung 1: Centroblastisches Lymphom vom multilobulierten Subtyp (Giemsa x1000).

46 Lymphome zeigten ein rein diffuses Wachstumsmuster ohne folliculäre Wachstumsabschnitte. In 26 von 72 in die Studie integrierten multilobulierten CB waren neben diffusen auch folliculäre Anteile zwischen 5% und 80% (Median: 40%) der Fläche auszumachen. Sie wurden im Folgenden als CB multilobuliert mit teilweise folliculärem Wachstumsmuster klassifiziert.

Von 46 rein diffus wachsenden CB multilobuliert wiesen 20 Tumoren zumindest herdförmige Sklerosierungen auf. (43,5%). Es handelte sich dabei um zellarmes Fasergewebe, welches mindestens 5% der Fläche einnahm. Bei den teilweise folliculär entwickelten CB multilobuliert lag der Anteil partiell sklerosierter Tumoren bei nur 7 von 26 (27%).

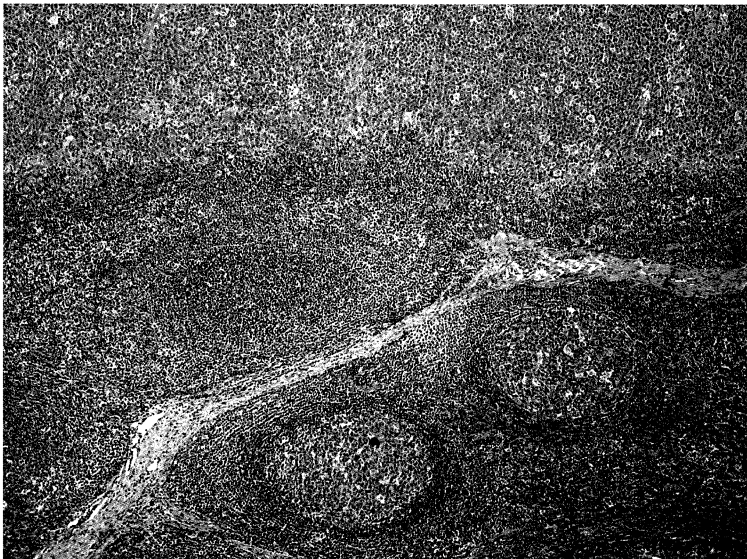


Abbildung 2: Erhaltener Randsaum reaktiven Parenchyms mit einzelnen Sekundärfollikeln in einem Lymphknoten mit Infiltraten eines multilobulierten CB (HE x100).

Auffällig war, dass der Tumor in vielen Fällen nicht das gesamte Parenchym des Lymphknotens infiltrierte, sondern dass häufig inselartig gelegenes oder als Randsaum sichtbar erhaltenes, reaktives Lymphknotengewebe nachweisbar war (siehe Abbildung 2). Alle 26 (100%) CB multilobuliert mit einem folliculären Wachstumsanteil zeigten ein solches partielles Infiltrationsmuster. Bei 7 von diesen 26 Fällen (27%) konnte der auffällige erhaltene, reaktive Randsaum beobachtet werden. In 32 von 46 nodalen CB multilobuliert mit rein diffusem Infiltrationsmuster war das lymphatische Parenchym komplett infiltriert (70%). In 11 (24%) Tumoren war erhaltenes lymphatisches Parenchym nachweisbar, davon in 10 Fällen in Form eines reaktiven Randsaums. 3 CB multilobuliert diffus konnten nicht ausgewertet werden. Insgesamt war also der auffällige Randsaum in 17 von 69 auswertbaren Tumoren (25%) nachweisbar.

3.3. Vergleichsgruppe

Als Vergleichsgruppe für die immunhistochemischen Färbungen diente eine Serie von 11 Follikulären Lymphomen Grad 3A, 6 FL 3B, 16 FL 3B mit zusätzlichen Anteilen eines DLBCL und 64 diffusen großzelligen (nicht multilobulierten) B-Zell Lymphomen (Tabelle 1).

3.4. Immunhistochemische Untersuchungen

In die immunhistochemischen Auswertungen gingen zusätzlich zu 46 im TMA vorliegenden diffus wachsenden und 26 teilweise folliculär wachsenden CB multilobuliert sechs diffus wachsende Tumoren in die Auswertung mit ein, deren Immunhistochemie anhand von vorhandenen Schnittpräparaten ausgewertet wurde. Bei insgesamt 72 gestanzten Tumoren wurden alle Fälle ausgewertet, in denen mindestens eine der eingebrachten fünf Stenzen repräsentatives Tumormaterial aufwies. In einem Fall konnte die Immunhistochemie wegen zu hoher Nekroseanteile nicht bewertet werden. Somit gingen insgesamt 71 Tumoren im TMA und 6 Schnittpräparate von CB multilobuliert in die Auswertung ein. Dabei handelte es sich um 51 CB multilobuliert diffus und um 26 CB multilobuliert, teilweise folliculär.

Durch die Positivität für den B-Zell Marker **CD20** wurden alle Fälle der Untersuchungs- und der Kontrollgruppe als Lymphome der B-Zell- Reihe verifiziert. Nur drei der 77 CB multilobuliert exprimierten das Oberflächenprotein **CD5**, welches typischerweise auf T- Zellen zu finden ist (4%). In der Vergleichsgruppe zeigten 10 der 64 DLBCL (16%) und ein FL3B+DLBCL (4,5%) eine CD5 Positivität.

3.4.1. Expression von CD10

Der Keimzentrumszell-Marker **CD10** war in insgesamt 49% der CB multilobuliert positiv. Alle FL 3A der Vergleichsgruppe exprimierten CD10. Auffällig war der Unterschied zwischen Immunoblastischen Lymphomen und CB polymorph (28% bzw. 29%) und allen anderen Gruppen in der Reaktivität für CD10, die kaum Immunoblasten zwischen den Tumorzellen aufweisen (CB multilobuliert: 49%, FL 3B+/- DLBCL: 55%).

Tabelle 1: CD10 Reaktivität in der Gruppe der CB multilobuliert und der Vergleichsgruppe

Diagnose und Fallzahl	CD10 positiv	Prozentangabe
CB multilobuliert, diffus (51)	26	51%
CB multilobuliert, follikulär + diffus (26)	12	46%
CB multilobuliert (77)	38	49%
FL 3B (6)	4	67%
FL 3B + DLBCL (16)	8	50%
FL 3B +/- DLBCL (22)	12	55%
CB monomorph (18)	9	50%
IB (7)	2	29%
CB polymorph (39)	11	28%
DLBCL (64)	22	34%
FL 3A (11)	11	100%

3.4.2. Expression von BCL-2

Nur 18 von 77 CB multilobuliert (23%) wiesen eine hohe BCL-2 Expression auf. Diese war definiert als Expression in >50% der Tumorzellen in mittlerer bis starker Intensität. Im Gegensatz zu den 45% stark BCL-2 positiven DLBCL der Vergleichsgruppe sind in der Gruppe der diffus wachsenden CB multilobuliert nur 18% positiv. Bei den teilweise follikulär wachsenden CB multilobuliert korreliert die starke Expression mit der bei FL 3B+/-DLBCL (35 bzw. 36%). Alle Immunoblastischen Tumoren waren positiv für BCL-2. Bezüglich der Gesamtreaktivität ergibt sich jedoch kein signifikanter Unterschied in den Gruppen (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2: BCL-2 Reaktivität bei CB multilobuliert und in der Vergleichsgruppe

Diagnose und Fallzahl	BCL-2 stark		BCL-2 schwach		BCL-2 total	
	Fallzahl	Prozent	Fallzahl	Prozent	Fallzahl	Prozent
CB multilobuliert, diffus (51)	9	18%	26	51%	35	69%
CB multilobuliert, follikulär + diffus (26)	9	35%	9	35%	18	69%
CB multilobuliert (77)	18	23%	35	45%	53	69%
FL 3B (6)	2	33%	2	33%	4	66%
FL 3B + DLBCL (16)	6	38%	8	50%	14	88%
FL 3B +/- DLBCL (22)	8	36%	10	45%	18	82%
CB monomorph (18)	7	39%	5	28%	12	67%
IB (7)	3	43%	4	57%	7	100%
CB polymorph (39)	19	49%	11	28%	30	77%
DLBCL (64)	29	45%	20	31%	49	77%
FL 3A (11)	4	36%	4	36%	8	73%

3.4.3. Expression von p53 und p21

6 von 26 (23%) teilweise follikulär wachsenden und 14 von 51 (27%) rein diffus infiltrierenden CB multilobuliert zeigten eine hohe **p53** Expression. Diese war dagegen bei nur 6 von 64 (9%) der DLBCL nachzuweisen. Am häufigsten zeigten

FL 3B +/- DLBCL eine Überexpression von p53, in 8 von 22 (36%) Fällen. Das durch p53 transaktivierte p21-Protein wurde bei 25 von 77 (32%) CB multilobuliert als positiv gewertet, in allen anderen Gruppen wiesen 29 von 97 Tumoren (30%) eine p21 Expression auf.

Tabelle 3: Expression von p53 und p21

Diagnose und Fallzahl	P53 >25%		P21 +		P53+/ P21+	P53+/ P21-
CB multilobuliert, diffus (51)	14	27%	16	31%	7	7
CB multilobuliert, follikulär + diffus (26)	6	23%	9	35%	3	3
CB multilobuliert (77)	20	26%	25	32%		
FL 3B (6)	2	33%	1	17%		3
FL 3B + DLBCL (16)	6	38%	9	56%	5	
FL 3B +/- DLBCL (22)	8	36%	10	45%		
CB monomorph (18)	2	11%	1	6%		2
IB (7)	0	0%	1	14%		
CB polymorph (39)	4	10%	13	33%	3	1
DLBCL (64)	6	9%	15	23%		
FL 3A (11)	1	9%	4	36%		1

3.4.4. Expression von CD23

Die Expression von **CD23**, das einerseits auf follikulären dendritischen Retikulumzellen (FDC), andererseits aber auch auf Tumorzellen exprimiert werden kann, wurde jeweils gesondert bewertet. In 16% der diffus wachsenden CB multilobuliert waren Reste von Netzwerken der FDCs vorhanden. Unter den teilweise follikulär wachsenden CB multilobuliert konnten diese –anders als erwartet- nur in 31% gefunden werden, was auf die begrenzte Beurteilbarkeit von Netzwerkstrukturen in den Stanzen und die reduzierte Reaktivität von FDC für diesen Marker zurückgeführt werden kann. Unter den DLBCL lag eine FDC-Reaktivität in 9 von 64 (14%) Fällen vor. Alle FL 3B +/- DLBCL zeigten Reste dieser Netzwerke.

Die Tumorzellen zeigten in 14 von 77 CB multilobuliert eine CD23 Expression (18%). In der Vergleichsgruppe der DLBCL lagen in 8% der Lymphome CD23+ Tumorzellen vor (8 von 97), bei FL 3B+/- DLBCL kein Fall. Unter den FL 3A waren drei Fälle (27%) CD23 positiv.

Tabelle 4: Reaktivität für CD23

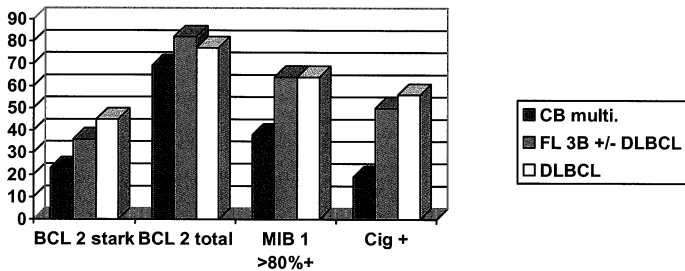
Diagnose und Fallzahl	CD 23 Tumorzellen		CD23 FDC	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
CB multilobuliert, diffus (51)	7	14%	8	16%
CB multilobuliert, follikulär + diffus (26)	7	27%	8	31%
CB multilobuliert (77)	14	18%	16	21%
FL 3B (6)	0		6	100%
FL 3B + DLBCL (16)	0		16	100%
FL 3B +/- DLBCL (22)	0	0	22	100%
CB monomorph (18)	3	17%	5	28%
IB (7)	0		1	14%
CB polymorph (39)	2	5%	3	8%
DLBCL (64)	5	8%	9	14%
FL 3A (11)	3	27%	11	100%

3.4.5. Reaktivität für MIB1 (Ki67)

Unter den CB multilobuliert lag der Proliferationsindex bei 22 von 51 (43%) diffus und bei 7 von 26 (27%) teilweise follikulär wachsenden Lymphomen bei mindestens 80% der Tumorzellen. Sowohl bei DLBCL wie auch bei FL 3B+/- DLBCL wiesen 64% der Tumoren diese hohe Proliferationsrate auf. Der Mittelwert der Proliferation lag bei CB monomorph und CB polymorph bei über 80%. Die CB multilobuliert erreichen einen Mittelwert zwischen 60 und 70%.

Tabelle 5: Expression von MIB1 (Ki67-Antigen)

Diagnose und Fallzahl	Proliferation >80%		Durchschnitt Ki67-positiver Zellen
	Fälle	Prozent	
CB multilobuliert, diffus (51)	22	43%	70%
CB multilobuliert, follikulär + diffus (26)	7	27%	57%
CB multilobuliert (77)	29	38%	67%
FL 3B (6)	5	83%	77%
FL 3B + DLBCL (16)	9	56%	79%
FL 3B +/- DLBCL (22)	14	64%	78%
CB monomorph (18)	11	61%	84%
IB (7)	1	14%	61%
CB polymorph (39)	29	74%	84%
DLBCL (64)	41	64%	83%
FL 3A (11)	3	27%	67%



3.4.6. Expression von IRF4 (MUM1)

Mit diesem Antikörper wird ein Antigen nachgewiesen, das von Zellen exprimiert wird, welche die Reifung im Keimzentrum schon durchlaufen haben. Bei der Auswertung wurden drei Gruppen mit einer Reaktivität von 0-20%, 30-50% und >50% gebildet. Auffällig war, dass der Marker bei CB multilobuliert in geringerem Maße exprimiert wird als bei DLBCL und FL 3B+/-DLBCL, mit einer hohen Expression bei 10 % der CB multilobuliert versus 41% der FL 3B+/-DLBCL und 45% der DLBCL.

Tabelle 6: Reaktivität der Tumorzellen für MUM1

Diagnose und Fallzahl	0-20 %		30-50 %		>50%	
CB multilobuliert, diffus (51)	32	63%	13	25%	6	12%
CB multilobuliert, folliculär + diffus (26)	17	65%	7	27%	2	8%
CB multilobuliert (77)	49	64%	20	26%	8	10%
FL 3B (6)	2	33%	1	17%	3	50%
FL 3B + DLBCL (16)	6	38%	4	25%	6	38%
FL 3B +/- DLBCL (22)	8	36%	5	23%	9	41%
CB monomorph (18)	8	44%	1	6%	9	50%
IB (7)	1	14%	1	14%	5	71%
CB polymorph (39)	19	49%	5	13%	15	38%
DLBCL (64)	28	44%	7	11%	29	45%

3.4.7. Plasmazytoide Differenzierung

Eine plasmazytoide (sekretorische) Differenzierung wurde angenommen, wenn in den Tumorzellen eine zweifelsfreie monotypische zytoplasmatische Reaktivität für eine Leichtkette nachzuweisen war. Aus Tabelle 7 lässt sich entnehmen, dass unter den CB multilobuliert eine sekretorische Differenzierung selten nachzuweisen war. Die häufigsten CIG+ Tumoren waren unter den CB polymorph/ IB und FL 3B+/-DLBCL zu finden.

Tabelle 7: Sekretorische Differenzierung

Diagnose und Fallzahl	C1g +		C1g -	
CB multilobuliert, diffus (51)	8	16%	43	84%
CB multilobuliert, follikulär + diffus (26)	7	27%	19	73%
CB multilobuliert (77)	15	19%	62	81%
FL 3B (6)	5	83%	1	17%
FL 3B + DLBCL (16)	6	38%	10	63%
FL 3B +/- DLBCL (22)	11	50%	11	50%
CB monomorph (17)	5	30%	12	70%
IB (7)	7	100%	0	
CB polymorph (37)	22	59%	15	41%
DLBCL (61)	34	56%	27	44%

3.4.8. BCL 6 Expression

Die Expression des Keimzentrumsmarkers BCL-6 wurde in Zehnprozentsschritten angegeben. In Bezug auf den Klassifikator nach Hans et al. (35) (siehe 3.5.) galt ein Lymphom als positiv, wenn >30% der Zellen eine Reaktivität aufwiesen.

Tabelle 8: BCL-6 Expression

Diagnose und Fallzahl	BCL-6 Expression >= 30%	
CB multilobuliert, diffus (41)	38	93%
CB multilobuliert, follikulär + diffus (23)	22	96%
CB multilobuliert (64)	60	94%
FL 3B (4)	4	100%
FL 3B + DLBCL (16)	13	81%
FL 3B +/- DLBCL (20)	17	85%
CB monomorph (18)	12	67%
IB (5)	3	60%
CB polymorph (38)	27	71%
DLBCL (61)	42	69%

Auffällig ist die häufige Expression von BCL-6 in CB multilobuliert (94%) im Gegensatz zu den übrigen DLBCL (69% BCL-6 Positivität).

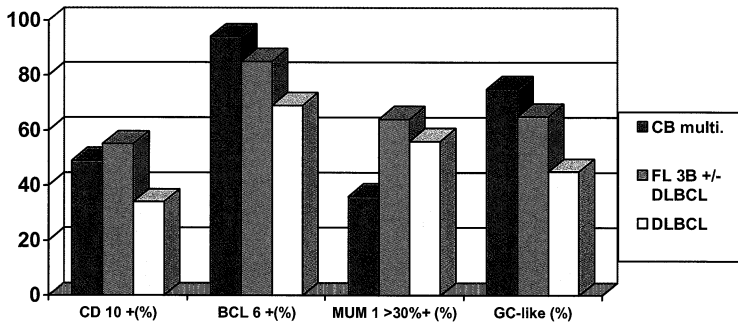
3.5. Einteilung in Keimzentrums- und non-Keimzentrumstypen

Nach Hans et al. (35) kann die Zuordnung von DLBCL zu „Keimzentrumsähnlichen“ (Germinal center B-cell like - GC) oder zu „nicht-Keimzentrumsähnlichen“ (non-GC) DLBCL durch die immunhistochemischen Auswertung der drei Marker CD10, BCL-6 und MUM1 erfolgen.

Danach gelten alle Tumoren, die eine CD 10-Positivität alleine oder in Kombination mit einer Expression von BCL-6 zeigen als GC DLBCL. Ist ein Lymphom negativ für CD 10, aber positiv für BCL-6, so entscheidet die MUM1 Expression. Wenn diese nicht mit $\geq 30\%$ nachweisbar ist, liegt ein GC DLBCL, sonst ein non-GC DLBCL vor. Über 75% der CB multilobuliert zeigten einen „Keimzentrumsähnlichen“ (GC-) DLBCL Subtyp.

Tabelle 9: Einteilung der untersuchten Fälle nach GC und non-GC Typ

Diagnose und Fallzahl	GC-Typ		Non-GC-Typ	
	Fälle	Prozent	Fälle	Prozent
CB multilobuliert, diffus (49)	37	76%	12	24%
CB multilobuliert, follikulär + diffus (24)	18	75%	6	25%
CB multilobuliert (73)	55	75%	18	25%
FL 3B (4)	3	75%	1	25%
FL 3B + DLBCL (16)	10	63%	6	38%
FL 3B +/- DLBCL (20)	13	65%	7	35%
CB monomorph (18)	11	61%	7	39%
IB (7)	3	43%	4	57%
CB polymorph (39)	15	38%	24	62%
DLBCL (64)	29	45%	35	55%
FL 3A (11)	11	100%	-	-



3.6. Klinische Daten

Klinische Daten konnten von insgesamt 46 Patienten mit CB multilobuliert erhoben werden.

Bei Erstdiagnose wiesen 9 Patienten aus der Gruppe der CB multilobuliert (diffus) Tumorstadium I bzw. II nach Ann-Arbor auf, 21 Tumorstadium III bzw. IV. Bei den Patienten der Gruppe CB multilobuliert mit follikulären Anteilen konnten 9 den Tumorstadien I/II und 7 den Stadien III/IV zugeteilt werden.

23 Patienten wiesen keine extranodalen Tumormanifestationen auf, bei 11 wurde eine und bei 10 Patienten 2 oder mehr extranodale Lymphommanifestationen nachgewiesen. Bei 2 Patienten lagen hierzu keine Daten vor.

Der LDH Wert bei Diagnosestellung lag für 11 Patienten nicht vor. Bei 22 befand er sich im Normbereich, bei 13 war er erhöht. 10 Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eine Knochenmarksbeteiligung auf. Bei 33 Patienten konnte diese ausgeschlossen werden. Für 3 Patienten gab es hierzu keine Angaben.

Eine B- Symptomatik wiesen 9 Patienten bei Diagnosestellung auf, 31 waren frei von B- Symptomen und für 6 Patienten wurden keine Angaben gemacht. Eine Aussage zum Performance Status ließ sich über die Fragebögen nicht ermitteln.

Der IPI wurde durch Alter, Tumorstadium, LDH-Wert sowie Extranodalmanifestationen definiert.

8 Patienten befanden sich bei Diagnosestellung in der IPI prognostischen Gruppe 0, 10 in der Gruppe 1, 7 in der Gruppe 2, 11 in der Gruppe 3 und 2 Patienten in der Gruppe 4. Wegen der fehlenden Angabe des LDH Wertes konnten 7 Patienten nicht eindeutig einer Prognosegruppe zugeordnet werden. 2 Patienten wären entweder der Gruppe 1 oder 2, 3 Patienten der Gruppe 2 oder 3, 1 Patient der Gruppe 3 oder 4, ein Patient wegen zusätzlich fehlender Angabe über eventuelle Extranodalmanifestationen der Gruppe 2, 3 oder 4 zugewiesen worden. Ein Patient konnte wegen fehlender Angabe über eventuelle Extranodalmanifestationen weder der Gruppe 2 noch 3 zugeordnet werden.

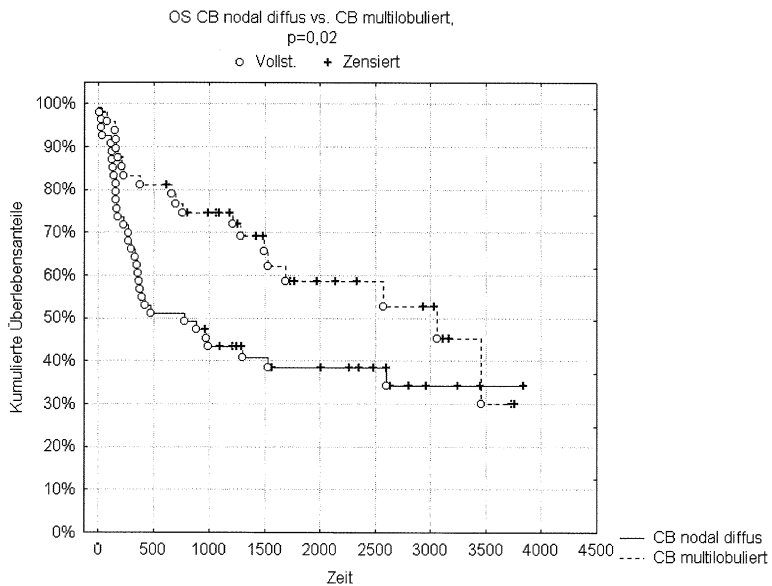
Weiterhin verglichen wir für die CB multilobuliert unserer Studie die Expression von BCL-2 mit den klinischen Daten der Tumorstadien nach IPI. Der Vergleich erfolgte zwischen den Risikogruppen IPI 0 und 1 bzw. den Risikogruppen 2, 3 und 4. 5 Patienten mit BCL-2 high (positive Tumorzellen in >50%) waren den IPI Gruppen 0 und 1 zuzuordnen, 9 Patienten den Gruppen 2, 3 und 4. Somit besteht ein Verhältnis IPI 0 /1 zu IPI 2/3/4 von 0,55. Von den Patienten mit BCL-2 low positiven CB multilobuliert wiesen 6 die geringeren IPI Risikogruppen 0 bzw. 1 auf und 11 die höheren (2, 3 und 4). Das Verhältnis IPI 0 /1 zu IPI 2/ 3 /4 liegt hier ebenfalls bei 0,55.

Patienten mit CB multilobuliert und einem BCL-2 negativ Status fanden sich klinisch auffällig häufig in den low-risk Gruppen nach IPI 0 und 1. 7 Patienten konnten diesen Risikogruppen, 5 den Gruppen nach IPI 2, 3 und 4 zugeordnet werden. Das Verhältnis lag somit bei 1,4. Die beiden Patienten, bei denen auf Grund unvollständiger Daten eine Zuteilung zu IPI 1 bzw. 2 nicht möglich war, wurden bei den Berechnungen nicht berücksichtigt.

Tabelle 10. Vergleich der Überlebensdaten der Patienten

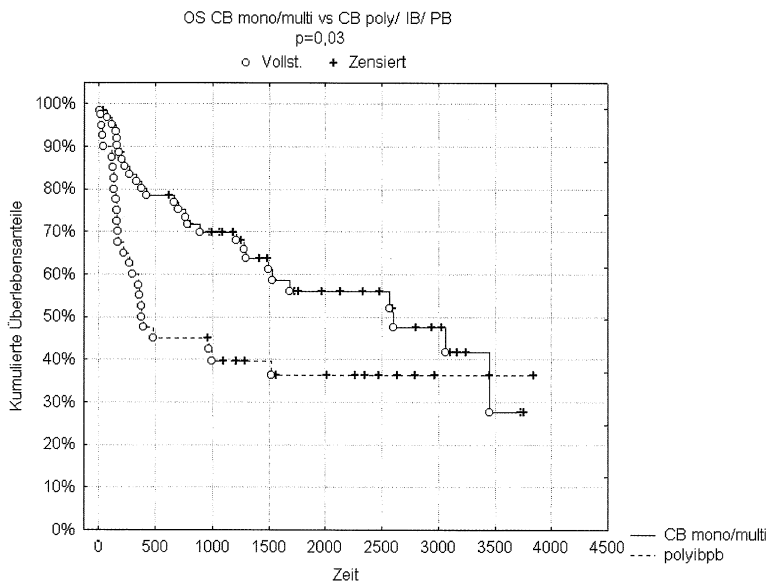
Overall survival	P (log rank)	Verlauf <i>besser</i> für:
CB multi vs IB	0,66	
CB multi vs CB poly	0,04	CB multi
CB multi vs CB mono	0,29	
CB multi vs FL1-3A	0,29	
CB multi vs FL3B	0,94	
CB multi vs FL3B±DLBCL	0,90	
CB mono/multi vs CB poly/IB/PB	0,03	CB mono/multi
CB multi vs. DLBCL nodal diffus	0,02	CB multi

Abbildung 3: Kaplan-Meier Kurve DLBCL nodal diffus vs. CB multilobuliert



In den Kontrollgruppen standen Daten von 54 nodalen DLBCL (monomorph=14, CB polymorph=21, IB/PB=19), 14 FL 3B ± DLBCL und 47 FL 1-3A zur Verfügung. Die Analysen der Überlebensdaten der Patienten (Zusammenfassung in Tabelle 10) zeigten ein signifikant besseres Gesamtüberleben der Patienten (Overall Survival = OS) der Patienten mit CB multilobuliert im Vergleich zu den nodalen „non-multilobuliert“ Lymphomen (CB monomorph, polymorph, IB, PB) (Abbildung 3). Bemerkenswert ist auch das signifikant bessere Überleben der Patienten mit „reifen“ CB (ohne Immunoblasten, d.h. CB multilobuliert/monomorph) vs. den „unreifen“ DLBCL (mit Immunoblasten, d.h. CB polymorph und IB/PB, Abbildung 4). Keine Unterschiede zeigten die Vergleiche der Überlebenskurven von CB multilobuliert versus FL 3B±DLBCL und FL1-3A.

Abbildung 4: Kaplan-Meier Kurve DLBCL mono/multi vs. CB poly/IB/PB



4. Diskussion

4.1. Definition der multilobulierten centroblastischen Lymphome

Multilobulierte centroblastische Lymphome (CB multilobuliert) sind eine zytomorphologisch definierte Untergruppe großzelliger B- Zell Lymphome (DLBCL) vom centroblastischen Typ (CB), die durch das Vorhandensein typischer Kernlappungen der Centroblasten des Tumors definiert sind. Von Lennert (3) werden diese als mittelgroße Zellen mit für Centroblasten typischem schmalem, gering basophilem Zytoplasma und auf den „ersten Blick“ sichtbaren Kernlappungen beschrieben. Meist sind die Kerne drei- bis vierfach gelappt und die Nukleolen kaum erkennbar. Nach Lennert sollten diese morphologisch auffälligen Zellen neben anderen Blasten (Centroblasten, Immunoblasten) ohne Kernlappungen mindestens 20% der Tumorzellen ausmachen. In der vorliegenden Studie wurde dieses Kriterium insofern modifiziert, als dass entsprechende Tumoren schon bei einem Gehalt von etwa 5-10% (klar erkennbarer) multilobulierter Kerne aufgenommen wurden.

Die Erstbeschreibung gelapptkerniger maligner Lymphome erfolgte 1979 von Pinkus et al. (37). Sie hatten solche Zellkerne in T-Zell Lymphomen nachgewiesen. In den achtziger Jahren wurden multilobulierte Kerne dann mehrfach bei Lymphomen gesehen, die immunologisch eindeutig der B-Zell Reihe zuzuordnen waren. Viele Autoren waren der Meinung, dass es sich um eine nicht nur morphologisch, sondern auch klinisch sowie immunhistochemisch von anderen DLBCL zu unterscheidende Lymphomart handeln könnte (14,7,15).

In der vorliegenden Arbeit wurden multilobulierte CB sowohl anhand klinischer als auch immunhistochemischer Parameter mit anderen in der Kiel-Klassifikation ursprünglich definierten Untergruppen von DLBCL verglichen. Zusätzlich sollte eine Zuordnung zum „Keimzentrums-ähnlichen Typ“(GCB) bzw. zum „aktivierten B-Zell ähnlichen Typ“ (ABC) des DLBCL vorgenommen werden.

4.2. Morphologische Charakteristika

Insgesamt lagen in der vorliegenden Studie 72 CB multilobuliert vor, von denen 46 (64%) ein rein diffuses Wachstumsmuster aufwiesen. In 26 Tumoren (36%) zeigte sich ein zumindest partiell follikuläres Wachstumsmuster, das nach den Kriterien der WHO aufgrund des charakteristischen Nachweises einer hohen Blastenzahl einem FL Grad 3 entsprach. Zusätzlich dazu fiel auf, dass in einem multilobulierten CB sehr häufig eine partielle Lymphknoteninfiltration zu beobachten ist, die zum Teil als ein subkapsulärer, erhaltener Randsaum lymphatischen Parenchyms imponierte. Alle multilobulierten CB mit follikulärem Wachstumsanteil und 24% derer mit rein diffusem Wachstumsmuster zeigten dieses partielle Infiltrationsmuster. Die wahrscheinlichste Ursache dieses Phänomens ist wohl die Kolonisierung reaktiver Follikel durch das Lymphom zumindest in frühen Stadien (46, 47). Im Rahmen der Tumorprogression kommt es dann zu einer sekundären Konfluenz der Follikel mit diffusem Wachstum und residuellen, ausgesparten T-Zonen des lymphatischen Parenchyms. Adam et al. (47) konnten zeigen, dass FL mit nur partieller Lymphknoteninfiltration häufig in niedrigeren Tumorstadien (I und II nach Ann Arbor) vorliegen.

Ebenfalls morphologisch auffällig war eine relativ hohe Zahl von Fällen mit Nachweis einer Sklerosierung im Bereich der Tumorinfiltrate, die ein relativ typisches Phänomen bei follikulären Lymphomen darstellt (1a). Sklerosierte Lymphknotenabschnitte waren in 20 von 46 diffus wachsenden (43,5%) und 7 von 26 (27%) zum Teil follikulär wachsenden CB multilobuliert nachzuweisen.

4.3. Die Gewebe-Array- (Tissue-microarray, TMA) Technik als Grundlage immunhistochemischer Untersuchungen

Durch das Einbringen von Stanzeln verschiedener Tumoren in einen Paraffinblock wird es möglich, die Morphologie und die Anfärbarkeit für verschiedene immunhistochemische Marker zwischen den unterschiedlichen Tumoren direkt zu vergleichen. Diese Methode ist im Vergleich zur herkömmlichen Färbung der

Paraffinschnitte sowohl kostengünstiger, da weniger Verbrauchsmaterial benötigt wird (Objektträger, Chemikalien) als auch arbeitssparend, da viele Tumorproben gleichzeitig beurteilt werden können. Selten vorkommende Tumoren, die zur Erstdiagnose in verschiedenste Institute gelangen, werden dort auf unterschiedliche Art und Weise in Paraffin eingebettet, geschnitten und gefärbt. Um eine optimale Vergleichbarkeit der Untersuchung gewährleisten zu können, ist es wichtig, dass die Fälle in der gleichen Art und Weise den immunhistochemischen Reagenzien ausgesetzt werden. Dies ist durch die Technik der „Tissue Microarrays“ (TMAs) gewährleistet. Auch genügt es meist, die Proteinexpression in einem kleinen Areal von Tumorzellen zu beurteilen.

Wie in der Arbeit von Zettl (36) beschrieben, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, beim Stanzvorgang repräsentatives und gut beurteilbares Tumorgewebe zu treffen, mit steigender Stanzenzahl exponentiell. Durch die vorherige optische Kontrolle mittels HE- oder Giemsa-gefärbter Schnitte kann der Erfolg noch optimiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden wie bereits beschrieben (36) fünf Stenzen von den einzelnen Fällen entnommen.

4.4. Die Unterteilung prognostisch relevanter Untergruppen von DLBCL durch Genexpressionsprofile und Immunhistochemie

Alizadeh et al. (2000) untersuchten das Gen-Expressionsmuster verschiedener DLBCL (33) mittels der cDNA-Array Technik. Sie konnten zwei Formen von DLBCL, die durch unterschiedliche Genexpressions-Profile charakterisiert sind, unterscheiden. Der so genannte „Germinal center“-like Typ (GC) exprimiert Gene, die typisch für normale B-Zellen im Keimzentrumsstadium sind, der „Activated B-Cell“-like Typ (ABC) solche, die von in-vitro aktivierten peripheren B-Zellen exprimiert werden. In dieser ersten, wie auch in folgenden Arbeiten von Rosenwald et al. (34) und Hans et al. (35) zeigte sich auch eine prognostische Bedeutung einer solchen Unterscheidung: Patienten mit großzelligen Lymphomen des GC-Typs wiesen im Mittel eine signifikant längere Überlebenszeit als Patienten mit „non-GC“ Genexpressionsmuster auf. Rosenwald et al. (34) modifizierten die Auswahl der

analysierten Gene und konnten so einen molekularen „Prädiktor“ der Überlebenswahrscheinlichkeit konstruieren (34). Von über 5000 primär auf dem „Lymphochip“ vorhandenen Genen reichte eine Auswahl von nur 17 Genen für eine zuverlässige genetische Risikobewertung aus.

Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass die durch unterschiedliche Genexpressionsprofile charakterisierten DLBCL nicht nur unterschiedlichen Reifungsstufen von B-Zellen entsprachen, sondern offenbar auch unterschiedliche Transformationswege aufwiesen. Die t(14;18) Translokation, durch die das *BCL2* Gen dereguliert wird, wurde nur in der GC Gruppe gefunden, wie auch Amplifikationen von *cREL* in 2p, während ABC-ähnliche DLBCL durch eine konstitutive Aktivierung von *NFkB* sowie durch (partielle) Trisomien der Chromosomen 3 und 18 gekennzeichnet sind.

Die Methode der cDNA-Array Technik ist allerdings sowohl teuer, wie auch technisch anspruchsvoll und nicht überall verfügbar; zudem setzt sie das Vorhandensein von Frischmaterial voraus. Daher wurde im Rahmen des „Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling“ Projektes (LLMPP) auch untersucht, inwiefern die Zuteilung von DLBCL zur GC bzw. non-GC Gruppe mittels immunhistochemischer Marker auch am Paraffinmaterial möglich sei. Hans et al. (35) konnten zeigen, dass eine Unterteilung von DLBCL mittels Definition eines GC- und eines non-GC Immunphänotyps an Paraffingewebe mit Antikörpern gegen CD10, BCL-6 und MUM1 prinzipiell möglich ist. Die Übereinstimmung zum Expressionsdefinierten Phänotyp lag in dieser Arbeit (35) bei 71% (bei GC-) und 88% (bei non-GC). Allerdings blieben diese Ergebnisse nicht unwidersprochen (42).

4.5. Immunhistochemische Markeranalyse zur Einteilung in GC und non- GC DLBCL

4.5.1. CD10

CD10 oder auch CALLA (common acute lymphoblastic leukemia antigen) ist ein Antigen, welches von prä-B-Zellen und von (reaktiven) Keimzentrumszellen

exprimiert wird. Die Tumorzellen der Follikulären Lymphome Grad 1-3A sind typischerweise CD10-positiv. Eine Expression von CD10 weist auch bei DLBCL auf das Vorliegen eines GC- Typs hin (11). CD10 war sowohl in Genexpressionsstudien mit dem Lymphochip wie auch immunhistochemisch konsistent in GCB-Typ Lymphomen exprimiert (34, 35, 42). Die prognostische Bedeutung einer CD10-Expression am Paraffinmaterial ist allerdings nicht gesichert (12,13). In der Arbeit von Colomo et al. (42) wiesen Patienten mit CD10 positiven DLBCL aber ein signifikant günstigeres Tumorstadium auf, und auch Hans et al. (35) fanden bei ihren Patienten eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit bei CD10 Expression.

In der vorliegenden Studie reagierte knapp die Hälfte der multilobulierten CB mit dem CD10-Antikörper (49%). Dieser Prozentsatz ist mit der Expression von CD10 in FL3B±DLBCL (55%) und CB monomorph (50%) vergleichbar. Polymorphe CB und immunoblastische Lymphome (IB) zeigten eine geringere CD10 Expression von nur 28% bzw. 29%. Unterteilt man blastäre B-Zell Neoplasien (mit oder ohne partiell follikuläres Infiltrationsmuster, also unter Einschluss der FL3B) in einen „reiferen“ (FL3B, monomorphe CB) und einen „unreifen“ (CB polymorph und IB) Typ und korreliert die CD10-Expression zu dieser Unterteilung, so stehen CB multilobuliert den „hochdifferenzierten“ DLBCL deutlich näher.

4.5.2. BCL-6

BCL-6 ist ein transkriptioneller Regulator bzw. Repressor und wird normalerweise in Keimzentrumzellen exprimiert (35). Es gilt daher ebenfalls wie CD10 als Keimzentrumsmarker (34, 17). In dem Algorithmus von Hans et al. (35) definiert BCL-6 bei Negativität von CD 10 und des Post-Keimzentrumsmarker MUM1 (siehe 4.5.3.) ebenfalls einen GCB-Typ.

In der vorliegenden Arbeit wurde BCL-6 von 94% der CB multilobuliert exprimiert. Die Reaktivität von BCL-6 in diesen Tumoren übertrifft damit die der FL3B±DLBCL (85%) und liegt auch im Vergleich zur Gesamtgruppe nodaler DLBCL (69%) deutlich höher.

4.5.3. MUM1

MUM1 wird normalerweise nicht in Keimzentrumzellen, sondern in post-GC Zellen, insbesondere in Plasmazellen exprimiert (35) und gilt daher als immunhistochemischer Marker für den non-GC DLBCL-Typ. In der Untersuchung von Hans et al. (35) konnte in der univariaten Analyse gezeigt werden, dass eine signifikante Expression von MUM1 (in mindestens 30% der Tumorzellen) mit einer schlechteren Überlebensrate assoziiert war (35).

In der vorliegenden Studie lag eine hohe MUM1 Expression (über 30% der Tumorzellen) nur in 36% der Fälle vor. Dagegen war eine MUM1-Reaktivität von >30% in 64% von FL3B±DLBCL und 56% in der Gruppe der diffusen nodalen DLBCL (CB monomorph, CB polymorph und IB) nachzuweisen. Die Auswertung der MUM1-Expression in allen CD10-negativen DLBCL ließ bemerkenswerterweise ebenfalls niedrigere Frequenzen in CB multilobuliert (23%) im Vergleich zu „nicht-multilobulierten“ DLBCL-Typen (47%) oder bei FL3B±DLBCL (36%) erkennen.

4.5.4. Die Zuordnung multilobulierter CB nach dem „Hans“-Klassifikator

Die oben dargestellten Daten zur Expression von CD10, BCL-6 und MUM1 in CB multilobuliert legen bereits nahe, dass es sich bei diesem Tumortyp in der Mehrzahl der Fälle eher um ein DLBCL mit Keimzentrum-spezifischen Eigenschaften handelt. In der Arbeit von Hans und Kollegen (35) wird die Zugehörigkeit zum Keimzentrum (GC) Typ entweder durch eine CD10-Positivität alleine, CD10 und BCL-6 Positivität, bzw., bei Negativität von CD10, durch BCL-6 Positivität und gleichzeitige Negativität für MUM1 definiert. Folgt man diesem Algorithmus, so werden CB multilobuliert zu etwa 75% den GC- ähnlichen DLBCL zugeordnet. Eine ähnlich hohe Prävalenz GC-typischer immunhistochemischer Profile liegen nur noch in FL3B±DLBCL (65%) sowie in CB vom monomorphen Subtyp vor (61%). CB polymorph hingegen zeigen nur in 38 % der Fälle ein GC-typisches Antikörperspektrum.

Zusammenfassend legen die o.g. Ergebnisse also nahe, dass multilobulierte CB in der Regel – in etwa 75% der Fälle – ein Keimzentrumstypisches Genexpressionsmuster aufweisen. Sie stehen damit eher den CB monomorph sowie auch den FL3b±DLBCL

nahe, die ebenfalls häufig GC-spezifische Merkmale aufweisen. Unterschiedliche morphologische Eigenschaften großzelliger B-Zell Lymphome lassen also durchaus auch einen Rückschluss auf ein bestimmtes Genexpressionsmuster zu.

4.5.5. BCL-2

Die Expression des BCL-2 Proteins verhindert den programmierten Zelltod, die Apoptose. Es wird daher in langlebigen, naiven (präfollikulären) und postfollikulären B-Zellen exprimiert, nicht aber im reaktiven Keimzentrum. Nach der Reifung zu Keimzentrumszellen muss die BCL-2 Expression herunterreguliert werden, da nur so „falsche“ Mutationen durch Apoptose der Zellen korrigiert werden können (16). In normalen lymphatischen Zellen des Keimzentrums ist eine BCL-2 Reaktivität also nicht nachweisbar. Sie ist jedoch insbesondere in Lymphomzellen nachzuweisen, die eine t(14;18)(q32;q21) Translokation aufweisen, da durch dieses Rearrangement das in der Bande 18q21 gelegene *BCL2* Onkogen mit dem Enhancermolekül des Immunglobulinschwerkettengens in Bande 14q32 gekoppelt wird (16). Dadurch wird das Gen aktiviert. Unter den DLBCL weisen nach Knowles bzw. Anagnostopoulos et al. (1b) bzw. Katzenberger et al. 2004 (28,31) ca. 15-20% diese Translokation auf. Ihr Nachweis ist – neben einer Reaktivität der Tumorzellen für BCL-6 und CD 10 – ein Hinweis auf einen Keimzentrumsursprung des Lymphoms (10). Ein anderer Mechanismus, der zu einer gesteigerten BCL-2 Expression führt, ist eine Amplifikation des Gens, die nach Untersuchungen von Rao PH et al. (48) in der „komparativen genomischen Untersuchung“ – CGH - in einem Teil von malignen großzelligen B-Zell Lymphomen nachgewiesen werden kann.

Es ist somit wahrscheinlich, dass in einem größeren Teil von DLBCL eine BCL-2-Expression vorliegt, ohne dass eine t(14;18) besteht. Rantanen et al. (16) fanden nur bei 15% ihrer untersuchten Fälle die Translokation, während jedoch 52% der DLBCL BCL-2 in der Immunhistochemie überexprimierten. Multilobulierte CB zeigten in der vorliegenden Studie nur in 18/77 Fällen (23%) eine „signifikante“ (>50%) BCL-2 Überexpression. Von den Tumoren der Vergleichsgruppe zeigten 8/22 FL3B+/- DLBCL (36%) und 29/64 DLBCL (45%) eine BCL-2 Reaktivität in >50% der Tumorzellen. Unter den monomorphen CB waren 7/18 (39 %) BCL-2 positiv. Auch diese relativ geringe Assoziation zu BCL-2 passt zu einem Tumor, der dem

(reaktiven) Keimzentrum nahe steht. Daten über eine Assoziation der t(14;18) zu CB multilobuliert liegen aber in der Literatur leider nicht vor.

Die prognostische Relevanz einer BCL-2 Expression bei DLBCL wird kontrovers diskutiert. Viele Studien weisen auf ein schlechteres Ansprechen auf die Therapie und eine kürzere Überlebenszeit von Patienten mit einer BCL-2 Überexpression hin (16,17,26). Andere Autoren fanden jedoch keinen Unterschied bezüglich der Gesamtüberlebenszeit (18,43,44), dafür aber eine Korrelation der BCL-2 Expression mit einem kürzeren Ereignis-freien Überleben (definiert als die Zeit von Diagnosestellung bis zur Tumorprogression) (43,44). Hermine et al. (27) sehen in dem exprimierten Protein einen unabhängigen prognostischen Parameter, der bei der Einteilung in Risikogruppen hilfreich sein kann. Hans et al. (35) konnten in ihren Untersuchungen keinen signifikanten Unterschied bezüglich der BCL-2 Expression zwischen der GC- und der non-GC Gruppe feststellen. Auch in der vorliegenden Serie konnte bei multilobulierten CB kaum ein Unterschied in der gesamten BCL-2 Expression zwischen den 55 Fällen der GC-Gruppe (73%) und den 18 Fällen der non-GCB Lymphomen (67%) nachgewiesen werden. Eine starke BCL-2 Überexpression liegt aber nur in einem geringen Teil der CB multilobuliert vor. Allerdings war bei diesen Tumoren ein Zusammenhang zwischen der Expression von BCL-2 und einem höheren IPI-Grad erkennbar: Hier zeigte sich eine häufigere Zugehörigkeit zu den prognostisch günstigeren Gruppen 0 und 1 bei fehlender BCL-2 Expression. Patienten, deren Lymphom eine BCL-2 Expression aufweist, sind demnach etwa doppelt so häufig prognostisch schlechteren Gruppen zugeordnet, als Patienten mit BCL-2 negativen Tumoren.

4.5.6. TP53

Das TP53-Gen kodiert für ein Protein, welches die Transkription verschiedener Zellzyklus- assoziierter Gene reguliert. Das normale (Wildtyp) p53 Protein induziert einen Stopp des Zellzyklus durch Arretierung an der G1-S Grenze des Zellzyklus (45), wenn bestimmte zellinterne und/oder -externe Faktoren wie z.B. eine Hypoxie oder DNS Schäden auftreten. TP53 koordiniert also die Zellantwort auf Stressoren (19) und gilt daher als Tumorsuppressor- Gen. Die Funktion als G1 Checkpoint Molekül (45) ist abhängig von der Fähigkeit, die Transkription des Cyclin-

abhängigen Kinase- (CDK-) Inhibitors p21 zu induzieren (45). Ohne diese Aktivierung von p21 fehlt eine wichtige regulatorische Funktion des Zellzyklus. Mutationen von TP53 werden deswegen für die Entstehung von Tumoren mitverantwortlich gemacht. In der Immunhistochemie spricht eine p53-Überexpression entweder für eine Mutation des Gens, oder aber für eine „physiologische“ Überexpression auf Grund z.B. von endogenem Stress (19). Der Grund für die immunhistochemische Überexpression des Genproduktes bei Mutation ist eine Anhäufung des Proteins im Zellkern, da das Genprodukt des veränderten Gens nicht mehr abgebaut werden kann. Wenn das nicht mutierte TP53 (wildtyp p53, wt p53) in einer Zelle überexprimiert wird, akkumuliert p21 ebenfalls. Um eine Unterscheidung zwischen p53 *mutiert* und *überexprimiert* treffen zu können, kann zusätzlich das „Downstream“- Molekül p21 untersucht werden. Da p21 nicht von einem mutierten Genprodukt des p53 Gens aktiviert werden kann, ist eine Unterscheidung von immunhistochemisch p53 positiven Zellen in p53 mutiert und p53 überexprimiert anhand der p21-Färbung prinzipiell möglich. Wird eine Expression von p21 nachgewiesen, ist eine Transaktivierung des Gens offenbar möglich, und TP53 sollte im Wildtyp-Status vorliegen. Ist p21 hingegen negativ, spricht dies eher für eine Mutation des TP53 Gens (20). Die Fälle allerdings, bei denen die p53 Gen-Mutation in der Einführung eines Stopp-Codons in das Gen und damit zu einem Ableseabbruch führt, können durch die Immunhistochemie nicht detektiert werden (21). Das Vorhandensein einer p53-Überexpression in der Immunhistochemie per se wird bereits von einigen Autoren für eine schlechtere Prognose verantwortlich gemacht (17,18).

Koduru et al (41) zeigten, dass sowohl der Nachweis einer TP53-Mutation wie auch der alleinige immunhistochemische Nachweis einer p53 Überexpression einen negativen Einfluss auf die Überlebenszeit von Patienten mit verschiedenen Typen maligner Lymphome hat und so eine immunhistochemisch nachweisbare p53 Expression als (negativer) prognostischer Indikator gewertet werden kann. In der vorliegenden Studie war eine Überexpression (>25% der Tumorzellen p53+) von p53 in 20 von 77 (26%) von CB multilobuliert nachweisbar und damit in weniger Fällen als bei FL3B±DLBCL (36% p53+), jedoch in einem deutlich höheren Prozentsatz als in rein diffus wachsenden nodalen DLBCL (9%).

Maestro et al. (45) verglichen p53 und p21 Expression in NHL mit der Expression des Ki67 Antigens und fanden eine Co- Akkumulation dieser Marker. Diese Ergebnisse legen nahe, dass im Falle eines mutierten TP53 Gens der p53 induzierte und p21 abhängige Zellarrest in NHL Tumorzellen nicht mehr greift und die entartete Zelle daher einen hohen Proliferationsindex zeigt.

Oka et al. (40) fanden 1998 in einem Vergleich p53 exprimierender NHL mit der PCR Untersuchung eben jener Lymphome heraus, dass die immunhistochemische Reaktion in den meisten Fällen einer Überexpression als einer strukturellen Schädigung im Sinne einer Mutation zuzuschreiben ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde p53 Positivität bei den CB multilobuliert und den FL3b+/- DLBCL viel häufiger gefunden als in mono- und polymorphen CB und IB Lymphomen sowie Keimzentrumlymphomen. (CB multilobuliert: 26%, FL3b+/- DLBCL: 36%, DLBCL: 9%, KZL: 9%). Ki67 Aktivität in über 80% der Tumorzellen war allerdings bei den CB multilobulierten Lymphomen weniger häufig nachzuweisen (38% gegenüber 64% bei FL3b+/-DLBCL und 64% bei DLBCL).

Der häufige Nachweis von p53 Positivität aber geringere Proliferationsraten bei CB multilobuliert könnte dafür sprechen, dass p53 bei diesen Tumoren häufiger überexprimiert wird als dass eine Mutation vorliegt. Leider war auf Grund zu geringer Zahlenwerte für p53+/p21+ bzw. p53+/p21- in dieser Arbeit eine Immunhistochemische Zuordnung zu „p53 Überexprimiert“ bzw. „p53 Mutiert“ nicht aussagekräftig.

4.5.7. Ki67/MIB-1

Der monoklonale Antikörper MIB1 färbt ein proliferationsassoziiertes Antigen (Ki67) an, welches in allen Phasen des Zellzyklus außer G0 exprimiert wird (39). Miller et al. (29) beschrieben, dass die Gesamtüberlebenszeit (OS) von Patienten mit „intermediate“ und „high grade“ Lymphomen signifikant reduziert ist, wenn ein hoher Ki67-Index vorliegt. Diese Beobachtung steht insbesondere mit den Ergebnissen des LLMPP (34) in Einklang. In dieser Studie konnte ein negativer Einfluss der erhöhten Expression der „Proliferationssignatur“ auf die Prognose beobachtet werden. Llanos et al. (30) fanden einen Zusammenhang zwischen einem

hohen Proliferationsindex und einer häufigeren extranodalen Manifestation der Lymphome. Zettl et al. (36) fanden in einem Vergleich regulär immunhistochemisch gefärbter Schnittpräparate und der dazu gehörenden Tissue Mikroarrays (TMAs) heraus, dass die Auswertung von Ki67 mit letzterer Methode möglicherweise nur bedingt aussagekräftig ist, da in den TMA der unter Umständen relevante Proliferations- „Hot-spot“, d.h. das Areal mit der höchsten Markierungsdichte in der Ki67-Färbung, nur in 71% der verglichenen Tumoren mittels der TMA-Technik gefunden werden konnte (36). Da DLBCL oft heterogene Proliferations“zonen“ aufweisen, ist die Identifikation des Areals mit der höchsten Proliferationsrate („Hot spot“) möglicherweise nicht immer möglich. Der ermittelte durchschnittliche Ki67-Index am „Ganzschnitt“ und TMA war allerdings mit einer Übereinstimmung von 90% durchaus vergleichbar (36). In der vorliegenden Arbeit war eine hohe Ki67 Rate (>80% der Tumorzellen positiv) nur in 38% der Fälle eines CB multilobuliert nachweisbar. Der signifikante Unterschied zu den Kontrollfällen (64%) ist aber möglicherweise dadurch bedingt, dass die Kontrollfälle überwiegend als „Ganzschnitt“ gefärbt wurden.

4.5.8. CD5 und CD23

In lymphoiden Zellen färbt anti-CD5 ein Oberflächen-Glycoprotein, welches normalerweise von T Zellen exprimiert wird. CD5 positive B-Zellen machen den Großteil der fetalen B-Zellen in der Milz und im Nabelschnurblut aus; sie haben jedoch nach Yamaguchi et al. (24) unter den adulten peripheren B-Zellen nur einen Anteil von 10-20%. In reaktivem lymphatischem Gewebe sind CD5- positive B-Zellen in der perifollikulären Mantelzone nachweisbar. Die genaue Funktion des CD5 Antigens auf B Zellen ist bisher unklar, es scheint jedoch eine Rolle in der primären Abwehr eindringender Erreger zu spielen (9).

Unter den B-Zell Neoplasien wird CD5 vor allem bei der B-CLL und im Mantelzell-Lymphom exprimiert. Daneben ist es in ca. 5-10% der diffusen großzelligen B- Zell Lymphome nachweisbar und auch beim Burkitt-Lymphom wurde seine Expression beschrieben (24). In follikulären Lymphomen wird es normalerweise nicht exprimiert. Yamaguchi et al. (24) publizierten, dass de-novo entstandene CD5- positive DLBCL eher mit ungünstigen klinischen Parametern assoziiert sind. So

zeigten die Patienten ihrer Studiengruppe ein höheres Alter, einen schlechteren Performance- Status, höhere LDH-Werte und höhere Tumorstadien im Vergleich mit Patienten der CD5-negativen Kontrollgruppe. Die 5-Jahres Überlebensrate war bei Patienten mit CD5 positiven Tumoren signifikant niedriger. In der vorliegenden Studie exprimierten lediglich 2/51 (4%) diffus wachsende multilobulierte CB das CD5-Antigen; ein weiteres CD5+ multilobuliertes CB zeigte ein folliculäres und diffuses Tumorwachstum, so dass auch die Gesamtfrequenz der CD5-Reaktivität bei diesen Tumoren bei 4% liegt (3/77). FL3B±DLBCL zeigten eine ähnliche CD5-Reaktivität (4,5%). Unter den rein diffus wachsenden DLBCL aller anderen morphologischen Gruppen zeigten dagegen 16% eine Reaktivität für CD5. Auch bezüglich der Expression dieses Markers sind CB multilobuliert offenbar eher dem Spektrum von Keimzentrums-Neoplasien zugehörig.

Follikuläre dendritische Retikulumzellen (FDC), die einen integralen Bestandteil des Follikels darstellen (die Antigen-präsentierenden Zellen) sind neben ihrem konstanten Vorhandensein in folliculären Lymphomen gelegentlich in zumindest rudimentärer Form auch bei rein diffus wachsenden Lymphomen vorhanden und durch geeignete Antikörper nachweisbar. In dieser Studie zeigten die (ausschließlich diffus wachsenden) CB multilobuliert in einer in TMAs analysierten Serie eine vergleichbare Rate nachweisbarer FDC wie in der Kontrollgruppe (14 bzw. 16% der Fälle). FDC waren erwartungsgemäß in allen FL3B nachweisbar. Der Nachweis von FDC in CB multilobuliert mit simultan folliculärem und diffusem Wachstumsmuster in nur 31% ist wahrscheinlich Folge der verwendeten TMA-Technik.

Nach Lennert (3) ist eine CD23 Expression in Tumorzellen von DLBCL nur in Ausnahmefällen nachweisbar. Die vorliegende Studie ergab Hinweise auf eine höhere Rate von CD 23 positiven CB multilobuliert im Vergleich zu der Gesamtgruppe der DLBCL (18% versus 8%).

4.6. Klinische Korrelationen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es möglich, klinische Verlaufsdaten einer relativ großen Fallzahl von CB multilobuliert zusammenzutragen. Die Beobachtungszeit der Patienten war in manchen Gruppen eher noch etwas kurz, trotzdem fanden sich einige bemerkenswerte Korrelationen. So zeigten Patienten mit einem CB multilobuliert im Vergleich zu einer Gruppe „nicht-multilobulierter“ diffus wachsender DLBCL ein signifikant günstigeres Gesamtüberleben (Overall survival; $p < 0,05$). Im Vergleich zu den definierten Untergruppen lag aber ein inhomogenes Bild vor. So konnte gegenüber CB monomorph und FL3B±DLBCL ein Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit nicht gesehen werden, wohl aber gegenüber der Gruppe der Patienten mit polymorphen CB ($p = 0,04$). Diese Relationen dürften aber aller Wahrscheinlichkeit nach nicht in der Definition der morphologischen Tumorgruppe bedingt sein, sondern in der signifikant höheren Zahl von Tumoren mit einem – prognostisch günstigeren – GC-Profil unter den CB multilobuliert (im Vergleich zu z.B. CB polymorph). Zu diesem Konzept passt auch der Befund, dass auch die gemeinsame Gruppe der CB multilobuliert und CB monomorph (mit einer hohen Fallzahl an GCB-Typen) ein signifikant besseres Gesamtüberleben im Vergleich zu (nodalen) CB polymorph und Immunoblastischen Lymphomen aufweist.

5. Zusammenfassung

Diffuse großzellige B-Zell Non-Hodgkin Lymphome (DLBCL) stellen eine heterogene Kategorie maligner Lymphome dar. In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob sich die morphologische Variante der multilobulierten centroblastischen Lymphome (CB multilobuliert) von anderen in der Kiel-Klassifikation definierten morphologischen Untergruppen großzelliger B-Zell Lymphome hinsichtlich ihres Immunphänotyps und des klinischen Verlaufs unterscheiden. Insbesondere ergab sich die Frage nach einem möglichen Keimzentrumsursprung der Tumoren.

Insgesamt wurden 72 Fälle aus dem Referenzzentrum für Lymphknotenpathologie untersucht.

46 Lymphome zeigten ein rein diffuses Wachstumsmuster und 26 CB multilobuliert wiesen ein partiell folliculäres Wachstumsmuster auf. Bemerkenswert war die Tatsache, dass in 37 Fällen ein nur partielles Infiltrationsmuster vorlag, in allen 26 folliculär und diffus wachsenden Tumoren und in 11 von 46 diffusen CB multilobuliert, häufig mit einem subkapsulären Randsaum in 17 von 69 diesbezüglich auswertbaren Tumoren (25%) nachweisbar.

Dieser Befund legt nahe, dass im Rahmen der Tumorausbreitung reaktive Follikel kolonisiert werden, die in der Weiterentwicklung des Tumors konfluieren.

Die Auswertung der in der Technik der „Tissue Microarray“-Stanzen (TMA) hergestellten Schnittpräparate zeigte, dass CB multilobuliert weitaus häufiger als andere Entitäten von DLBCL den (prognostisch günstigeren) Keimzentrums-ähnlichen (GC-like) Lymphomen zugeordnet werden können.

Klinische Daten konnten von insgesamt 46 Patienten mit CB multilobuliert erhoben werden. Sie wurden mit einer Kontrollgruppe von 54 nodalen DLBCL, 14 FL 3B und 47 FL 1-3A korreliert. Die Analysen der Überlebensdaten der Patienten zeigten ein signifikant besseres Gesamtüberleben der Patienten mit CB multilobuliert im Vergleich zu nodalen DLBCL anderer Differenzierung. Bemerkenswert war auch das

signifikant bessere Überleben der Patienten mit CB ohne Immunblasten (CB multilobuliert/monomorph) vs. DLBCL mit Immunblasten (CB polymorph und IB/PB).

In der Zusammenschau der Daten legen diese Befunde nahe, dass CB multilobuliert eine dem Keimzentrum nahe stehende Differenzierungsstufe großzelliger B-Zell Lymphome repräsentieren. Die relativ gesehen bessere Prognose dieser Tumoren gegenüber insbesondere den centroblastischen Lymphomen vom polymorphen Subtyp ist offenbar in ihrer sehr häufigen Keimzentrums-ähnlichen Differenzierung begründet. 75% der in der vorliegenden Serie untersuchten Tumoren ließen ein „GCB-like“ Proteinexpressionsmuster nachweisen.

Aus Genexpressionsuntersuchungen größerer Serien von DLBCL ist die „Keimzentrums-Signatur“ in der Regel mit einer besseren Prognose assoziiert.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Knowles DM, et al. Neoplastic Hematopathologie. Lippincott, Williams and Wilkins, 2001 Philadelphia. Sec. Edition.
- 1a Harris NL, Ferry JA. Follicular Lymphoma. Chapter 24
- 1b Anagnostopoulos I, Dallenbach F, et al. Diffuse Large Cell Lymphomas. Chapter 25
- 2 Harris NL, Jaffe ES, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the international lymphoma study group. Blood 1994;84:1361-92
- 3 Lennert K, Feller AC. Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas. Berlin: Springer-Verlag 1992
- 4 Pileri SA, Dirnhofer S, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: one or more entities? Present controversies and possible tools for its subclassification. Histopathologie 2002;41:482-509
- 5 A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. Blood 1997;89(11):3909-18
- 6 A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. N Engl J Med 1993;329(14):987-994
- 7 Joop van Baarlen, MD, Henk-Jan Schuurman, PhD, Jan A.M. van Unnik, MD. Multilobated Non-Hodgkin's Lymphoma: A Clinicopathologic Entity. Cancer 1988;61:1371-1376
- 8 Stansfeld, AG, Diebold J, et al. Updated Kiel classification for lymphomas. Lancet 1988;1:292-3
- 9 Barry TS, Jaffe ES, et al. CD5+ follicular lymphoma: a clinicopathologic study of three cases. Am J Clin Pathol 2002;118(4):589-98
- 10 King BE, Chen C, et al. Immunophenotypic and genotypic markers of follicular center cell neoplasia in diffuse large B-cell lymphoma. Mod Pathol 2000;13:1219-31

- 11 McCluggage WG, Alexander HD, et al. Immunohistochemical expression of CD10 and t(14;18) chromosomal translocation may be indicators of follicle centre cell origin in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Histopathology* 2002;41(5):414-20
- 12 Ohshima K, Kawasaki C, et al. CD10 and Bcl10 expression in diffuse large B-cell lymphoma: CD10 is a marker of improved prognosis. *Histopathology* 2001;39(2):156-62
- 13 Xu Y, McKenna RW, et al. Clinicopathologic analysis of CD10+ and CD10- diffuse large B-cell lymphoma. Identification of a high-risk subset with coexpression of CD10 and bcl2. *Am J Clin Pathol* 2001;116(2):183-90
- 14 Baroni CD, Pescarmona E, et al. B- and T-cell non-Hodgkin's lymphomas with large multilobated cells: morphological, phenotypical and clinical heterogeneity. *Histopathologie* 1987;11(11):1121-32
- 15 O'Hara D, Said J, et al. Non-Hodgkin's lymphoma, multilobated B cell type. *Hum Pathol* 1986;17:593-99
- 16 Rantanen S, Monni O, et al. Causes and consequences of bcl2 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2001;42(5):1089-98
- 17 Barrans SL, Carter I et al. Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2002;99(4):1136-43
- 18 Piris MA, Pezzella F, et al. P53 and bcl2 expression in high-grade-B-cell lymphomas: correlation with survival time. *Br J Cancer* 1994;69(2):337-41
- 19 Levine AJ. P53: the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88(3):323-31
- 20 Leroy K, Haioun C, et al. P53 gene mutations are associated with poor survival in low an low-intermediate risk diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol* 2002;13(7):1108-15
- 21 Villuendas R, Pezzella F, et al. p21 WAF/CIP1 and MDM2 Expression in Non-Hodgkin's Lymphoma and their relationship to p53 status: A p53+, MDM2- p21- immunophenotype associated with missense p53 mutations. *J of Pathology* 1997;181:51-61

- 22 Kaplan EL, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-81
- 23 Cox D. Regression models and life-tables. *J R Stat Soc* 1972;34:187-220
- 24 Yamaguchi M, Seto M, et al. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood* 2002;99(3):815-21
- 25 Jaffe ES, Harris NL, et al. World Health organization Classification of lymphomas: a work in progress. *Ann Oncol* 1998;9 Suppl 5:25-30
- 26 Gascoyne, RD, Adomat, SA, et al. Prognostic significance of Bcl2 protein expression and Bcl2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90:244-51
- 27 Hermine O, et al. Prognostic significance of bcl2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood* 1996;87:265-72
- 28 Ott G, Katzenberger T, et al. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood*, 2002;99(10):3806-12
- 29 Miller TP, Grogan TM, et al. Prognostic significance of the Ki67 associated proliferate antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group Trial. *Blood* 1994;83:1460-66
- 30 Llanos M, Alvarez-Arguelles H, et al. Prognostic significance of Ki-67 nuclear proliferative antigen, bcl-2 protein, and p53 expression in follicular and diffuse large B-cell lymphoma. *Med Oncol* 2001;18(1):15-22
- 31 Katzenberger T, Ott G, et al. Cytogenetic alterations affecting BCL6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a diffuse large B-cell component. *AM J Pathol.* 2004;165:481-490
- 32 Hockenbery D, Nunez G, et al. Bcl2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334-6
- 33 Alizadeh AA, Eisen MB, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403(6769):503-11
- 34 Rosenwald A, Wright G, et al. The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:1937-1947

- 35 Hans CP, Weisenburger D, et al. Confirmation of the Molecular Classification of Diffuse Large B-Cell Lymphoma by Immunohistochemistry using a Tissue Microarray. *Blood* 2004;103:275-282
- 36 Zettl A, Meister S, et al. Immunohistochemical analysis of B-cell lymphoma using tissue microarrays identifies particular phenotypic profiles of B-cell lymphomas. *Histopathology* 2003;43:209-19
- 37 Pinkus G, Said J, et al. Malignant lymphoma, T-cell type: A distinct morphologic variant with large multilobated nuclei, with a report of four cases. *Am J Clin Pathol* 1979;72:540-550
- 38 Bubendorf L, Nocito A, et al. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 2001;195:72-79
- 39 Hall PA, Richards MA, et al. The prognostic value of Ki67 immunostaging in non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol* 1988;154:223-235
- 40 Oka T, Sarker AB, et al. p53 protein expression in non-Hodgkin's lymphomas is infrequently related to p53 gene mutations. *Pathol Int* 1998;48(1):15-21
- 41 Koduru PRK, Raju K, et al. Correlation between mutation in p53, p53 expression, cytogenetics, histologic type, and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90:4078-91
- 42 Kolomo L, Lopez-Guillermo A, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003;101:78-84
- 43 Kramer MHH, Hermans J, et al. Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma; a population based study. *J Clin Oncol* 1996;14:2131-38
- 44 Sanchez E, Chacon I, et al. Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. *J Clin Oncol* 1998;16(5):1931-9
- 45 Maestro R, Ghoghini A, et al. Human non-Hodgkin's lymphomas overexpress a wild-type form of p53 which is a functional transcriptional activator of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Blood* 1997;89(7):2523-8

- 46 Oeschger S, Brauninger A, et al. Tumor cell dissemination in follicular lymphoma. *Blood* 2002;99(6):2192-8
- 47 Adam P, Katzenberger T, et al. Presence of preserved reactive germinal centers in follicular lymphoma is a strong histopathologic indicator of limited disease stage. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(12):1661-4
- 48 Rao PH, Houldsworth J, et al. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 1998;92:234-240

Danksagung

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. med. German Ott für das interessante Thema und die langjährige sehr gute Betreuung.

Frau Sylvia Meister danke ich für die freundliche Hilfe beim Erstellen der Stanzzylinder und Blöcke; Herrn Andreas Lohr für die großzügige Unterstützung zu statistischen Berechnungen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Pathologischen Institutes für die freundliche Unterstützung und Hilfe.

Bei meinen Eltern, Schwiegereltern und meinem Mann bedanke ich mich herzlich für zahlreiche motivierende Gespräche.

Diese Arbeit ist meinem Sohn Marc gewidmet.

Lebenslauf

Angela Kristin Dziewior, geb. Reimann, geboren am 13.07.1977 in Würzburg.
Vater: Lutz-Michael Reimann, Facharzt für Urologie
Mutter: Carmen Reimann- Autsch, geb. Autsch, Lehrerin
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: seit 07.08.2004 verheiratet mit Dr. med. Frank Dziewior, Arzt
21.01.2006 Geburt des Sohnes Marc Henning

Schulbildung:

1983- 1988: Volks- und Teilhauptschule Lengfeld
1988- 1997: Matthias- Grünewald- Gymnasium Würzburg
Abschluss: allgemeine Hochschulreife 05/1997

Hochschulbildung:

09/1997- 03/2003: Studium der Medizin an der Julius- Maximilians- Universität
Würzburg
08/1999 Ärztliche Vorprüfung
08/2000 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2001 Beginn der Dissertation am Pathologischen Institut
08/2002 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2003 Wechsel an die Ludwigs- Maximilians- Universität München
2003-2004: Praktisches Jahr
04/2004 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

06/2004- 09/2004 Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Innere Medizin im
Kreiskrankenhaus Wertingen

seit 10/2004 Arztin in der Abteilung für Innere Medizin im Kreiskrankenhaus
Wertingen

Augsburg, den 28.06.2006



Kristin Dziewior

