

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

**Validität tissue-microarray-basierter
Immunphänotypisierung
bei Hodgkin-Lymphomen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Katrin Anne Schnabel
aus Rosbach v. d. Höhe

Würzburg, Oktober 2009

Referent: Prof. Dr. med. H. K. Müller-Hermelink
Koreferent: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch
Mündlicher Zweitprüfer: Priv. Doz. Dr. med. Volker Kunzmann

Tag der mündlichen Prüfung: 05. März 2010

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen lieben Eltern

1	Einleitung	1
	1.1 Maligne Lymphome	1
	1.2 Hodgkin-Lymphome	2
	1.2.1 Epidemiologie	3
	1.2.2 Ätiologie	3
	1.3 Pathologie und die Immunphänotypisierung der H-/RS-Zellen des Hodgkin-Lymphoms	4
	1.4 Klinische Studien	6
	1.5 Untersuchung prognostischer Faktoren an einem großen Patientenkollektiv	7
	1.6 Tissue-Microarray-Technik (TMA-Technik)	8
	1.7 Theoretische Grundlagen zur Arraykonzeption	9
	1.8 Problemstellung	11
2	Material und Methode	12
	2.1 Untersuchungsgut	12
	2.2 Histopathologische Klassifikation	12
	2.3 Erstellung des Arrayblocks	14
	2.4 Herstellung der Arrayschnitte	15
	2.5 Validität der Blindstanz-Methode im Bezug auf den Gewebeverlust	15
	2.6 Immunhistochemie (IHC)	15
	2.7 Auswertung der Tissue-Microarrays	19
	2.7.1 Vorauswahl der Fälle	19
	2.7.2 Auswertungskriterien der Immunhistochemie	19
	2.7.3 Statistik	20
3	Ergebnisse	21
	3.1 Auswertbare Fälle und Gewebeverlust	21
	3.2 Immunphänotypisierung der H-/RS-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms und des nodulär lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphoms	23
	3.3 Unterschiede der Immunphänotypisierung des Hodgkin-Lymphoms unter und über 60 Jahre Lebensalter	28

4	Diskussion	31
4.1	Validität (und Grenzen) der Tissue-Microarray-(TMA-) Technik	31
4.2	Immunphäotypisierung des klassischen Hodgkin-Lymphoms und des nodulär lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphoms	34
4.3	Ist Hodgkin-Lymphom des Alters (≥ 60 Jahre) eine eigenständige Entität? Welche Rolle spielen EBV und Mikrosatelliten-Instabilität?	41
5	Zusammenfassung	46
6	Literaturverzeichnis	48

1 Einleitung

1.1 Maligne Lymphome

Maligne Lymphome sind autonome, neoplastische Proliferationen lymphatischer Zellen, die von verschiedenen Entwicklungsstadien der B- und T-/NK-Zellen ausgehen. Nach der Klassifikation der WHO 2001, in Anlehnung an die Kiel- und REAL-Klassifikation (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms), erfolgt eine Einteilung der malignen Lymphome in Hodgkin-Lymphome und Non-Hodgkin-Lymphome [1, 2].

In den letzten Jahren erkannte man eine Ähnlichkeit zwischen beiden Gruppen, da die Tumorzellen des Hodgkin-Lymphoms auch überwiegend von B-Lymphozyten abstammen. Aus historischen und klinisch-praktischen Gründen wird die Unterteilung jedoch beibehalten und ist wegen der unterschiedlichen klinischen Präsentation der Lymphome und ihrer verschiedenen Therapieansätze auch gerechtfertigt.

Hodgkin-Lymphome treten häufig zunächst lokal auf und breiten sich in axialer Richtung auf benachbarte Lymphknoten aus. Non-Hodgkin-Lymphome hingegen disseminieren auf unterschiedlich lokalisierte Lymphknoten und das Knochenmark oder manifestieren sich extranodal. Sonderformen der malignen Lymphome sind das Plasmozytom und die chronische lymphatische Leukämie (CLL).

Die Inzidenz der malignen Lymphome beträgt 5-7/100.000, was ca. 3% aller malignen Tumore entspricht. Es gibt etwa 12.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland, davon ca. 40% Hodgkin-Lymphome und 60% Non-Hodgkin-Lymphome. Insgesamt machen die B-Zell-Lymphome in Europa 80-85% aller malignen Lymphome aus. Nur ca. 15-20% sind T-zellulären Ursprungs. Die definierten Entitäten sind teilweise noch in Varianten und prognostische Faktoren unterteilt. Besondere Morphologie oder Klinik werden als Varianten

(z.B. T-Zell-reiches B-Zell-Lymphom) oder Subtypen (z.B. noduläre Sklerose des klassischen Hodgkin-Lymphoms) innerhalb der Entitäten beschrieben. Die quantitative Verteilung der beiden Lymphomgruppen und der Subentitäten zeigt geographische Unterschiede. So ist die Häufigkeit des Hodgkin-Lymphoms in Europa bis zu dreimal höher als in den USA und Japan. In den USA hingegen sind folliculäre B-Zell-Lymphome des Keimzentrums (zentroblastisch-zentrozytisch) häufiger, in Japan wiederum kommen T-Zell-Lymphome häufiger vor. Insgesamt sind in Europa eine Zunahme der Non-Hodgkin-Lymphome und eine gleich bleibende Inzidenz der Hodgkin-Lymphome zu verzeichnen [3].

Bei älteren Menschen ist in den letzten Jahren jedoch ein Zuwachs der Inzidenz auch bei Hodgkin-Lymphomen zu beobachten. Das ist erklärbar durch die höhere Lebenserwartung und die damit verbundenen häufigeren Immundefekte und Autoimmunerkrankungen. Auch latente Infektionen mit lymphotropen Viren wie Epstein-Barr-Virus oder HTLV-1 wirken prädisponierend [4].

1.2 Hodgkin-Lymphome

Der Begriff Hodgkin-Lymphom (Syn. Lymphogranulomatose, Morbus Hodgkin) ist eine Sammelbezeichnung für ätiologisch heterogene maligne Lymphome. 1832 beschrieb Sir Thomas Hodgkin das erste Mal diese neoplastische Erkrankung des lymphatischen Systems. Erst ca. 60 Jahre später entdeckten Dorothy Reed und Carl Sternberg die mehrkernige Tumorzelle, Reed-Sternberg-Zelle genannt, die das Hodgkin-Lymphom histologisch definiert.

Die Hodgkin-/Reed-Sternberg-Zellen (H-/RS-Zellen) machen insgesamt ca. 1% eines tumorösen Lymphknotens aus und sind von einem reaktiven Begleitinfiltrat umgeben. Für die Diagnose eines Hodgkin-Lymphoms sind neoplastische in Kombination mit inflammatorischen Komponenten ausschlaggebend, da H-/RS-Zellen auch bei anderen Erkrankungen wie der infektiösen Mononukleose, den Non-Hodgkin-Lymphomen oder anderen entdifferenzierten Karzinomen und Melanomen auftreten können.

Das Frühstadium des Hodgkin-Lymphoms ist eine lokalisierte Lymphknotenerkrankung. Im fortgeschrittenen Stadium entwickelt sie sich zu einer Systemerkrankung, die sich auch an extralymphatischen Organen wie Knochenmark oder Leber manifestiert [5, 6].

1.2.1 Epidemiologie

Jährlich erkranken in Deutschland 3/100.000 Personen pro Jahr. Das Verhältnis der Prävalenz von Männern zu Frauen beträgt ca. 3:2.

Hodgkin-Lymphome treten in den USA und in Europa mit einer zweigipfligen Häufigkeit um das 30. und das 60. Lebensjahr auf. Sie machen ca. 40% aller malignen Lymphome aus.

1.2.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Hodgkin-Lymphoms ist noch weitgehend ungeklärt. 30-50%, je nach Literaturangabe, der Hodgkin-Fälle sind Epstein-Barr-Virus-(EBV-)assoziiert. Es ist mittlerweile bekannt, dass mit EBV infizierte Zellen dem physiologischen Zelltod (Apoptose) durch erhöhte Expression des anti-apoptischen Proteins bcl-2 entgehen. Diese Immortalisierung der Zelle wird vor allem durch das virale latente Membranprotein LMP-1 in Gang gesetzt [7, 8]. Gleichzeitig kommt es zu einer Überexpression von Zytokinen wie IL-4, IL-5 und TGF- β , die das non-neoplastische Entzündungsinfiltrat begünstigt [4].

Die Erkrankungen an Hodgkin-Lymphomen, die im höheren Alter erstmalig diagnostiziert werden, sind häufig schwerer in ihrem klinischen Verlauf. Dies ist vor allem bedingt durch die im Alter abnehmende Immunkompetenz, die Verminderung der Immunadaptation/-toleranz [9, 10] und die erhöhte Komorbidität [11].

Durch andere Merkmale und auf Grund des ungünstigen Verlaufs des Hodgkin-Lymphoms im höheren Alter nahm man an, dass es sich bei diesen Patienten

um andere ätiologische Faktoren handelt [12]. Diese Annahme konnte bisher nicht bestätigt werden, doch wird die Hodgkin-Erkrankung des älteren Menschen ab dem 60. Lebensjahr immer wieder überdacht und hinterfragt. Man nennt diese auch age-related EBV-assoziertes Hodgkin-Lymphom [13].

Kofaktoren des Hodgkin-Lymphoms sind eine HI-Virus-Infektion und auch eine längere immunsuppressive Therapie, Holzschutzmittel- und Haarfärbemittelbelastungen [5]. Des Weiteren gibt es eine bekannte Assoziation zwischen Autoimmunerkrankungen in der Eigenanamnese sowie in der Familienanamnese, die ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Hodgkin-Lymphome aufweisen [14]. In den Zeiten vor der Umsetzung aggressiver Therapiestrategien war die Mortalitätsrate auch bei jungen Erwachsenen sehr hoch. Nach einer Modulation des Therapieansatzes konnte der Therapieerfolg wesentlich verbessert werden.

1.3 Pathologie und die Immunphänotypisierung der H-/RS-Zellen des Hodgkin-Lymphoms

Mittels der Immunhistochemie in der weiterführenden Diagnostik präsentiert sich eine Heterogenität des Phänotyps der H-/RS-Zellen. Histopathologisch und klinisch lassen sich zwei Entitäten unterscheiden: das nodulär lymphozytenprädominante Hodgkin-Lymphom (NLP-HL) (weniger als 5% aller Hodgkin-Lymphome) und das so genannte klassische Hodgkin-Lymphom (c-HL). Die Entität des klassischen Hodgkin-Lymphoms präsentiert sich in 4 Subtypen/-entitäten: der nodulären Sklerose (60 bis 70% der Fälle), dem Mischtyp (ca. 25%), dem lymphozytenreichen (5%) und dem lymphozytenarmen Typ (< 5%).

Immunhistochemisch sind die H-/RS-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms immer CD30- und häufig CD15-positiv, haben somatisch hypermutierte Ig-Gene und produzieren keine Antikörper. Die Lokalisation und der Immunphänotyp sprechen für postfollikuläre B-Lymphozyten. 20-50% der c-HL-Fälle sind EBV-assoziert.

Die Tumorzellen des nodulär lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphoms exprimieren immer CD20, Immunglobuline und epitheliales Membranantigen (EMA) und sind negativ für CD30 und CD15. Sie befinden sich im Zyklus der somatischen Hypermutation und entsprechen damit den blastären B-Lymphozyten der Keimzentrumsreaktion. Es besteht keine Assoziation mit EBV [15]. Beim NLP-HL ist eine zunehmende Frequenz von Rückfällen, aber eine bessere Überlebenschance verglichen mit c-HL (NS, LR, MC) zu verzeichnen [4, 6, 15, 16].

Die Hodgkin-Lymphome sind charakterisiert durch die neoplastische Proliferation von überwiegend atypischen B-Lymphozyten und zu 2-3% auch von T-Lymphozyten. Sie machen allerdings nur 1% des gesamten Tumorgewebes aus. Der größte Teil besteht aus reaktivem inflammatorischen Begleitinfiltrat aus B- und T-Lymphozyten, Histozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten und Plasmazellen. Die T-Lymphozyten sind teilweise rosettenartig um die Tumorzellen angeordnet.

Innerhalb der Reed-Sternberg-Zellen werden verschiedene Varianten unterschieden. Die klassischen RS-Zellen sind binukleär und erinnern im mikroskopischen Bild an Eulenaugen. Sie werden im Mischtyp und bei der nodulären Sklerose (Typ I) beobachtet. Die mononukleäre Variante der RS-Zellen kommt bei jedem Subtyp vor, vorwiegend beim Mischtyp. Sie werden auch Hodgkin-Zellen genannt. Pleomorphe RS-Zellen haben hyperchromatische große Kerne und sind größer. Sie treten vor allem bei den lymphozytenarmen und nodulär sklerotischen Formen (Typ II) auf. Die Lakunarzellen, mit ausgeprägtem Zytoplasma, welches bei der Formalinfixation schrumpft und dadurch die Zellkerne in einer Lücke erscheinen lassen, sind charakteristisch für die noduläre Sklerose (Typ I). Die lymphozytische histiozytäre Variante der RS-Zellen (L&H-Zellen), auch als Popcorn-Zellen bekannt, sind die charakteristischen Tumorzellen des nodulär lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphoms [4, 17].

Das Hodgkin-Lymphom beginnt in der Regel lokalisiert in einer Lymphknotengruppe, in 60% der Fälle im Kopf-Hals-Bereich. Die Ausbreitung erfolgt anfangs lymphogen oder per continuitatem, später aber auch hämatogen. Von entscheidender prognostischer Bedeutung ist das Ausbreitungsstadium bei Diagnosestellung. Die Stadieneinteilung erfolgt nach der Ann-Arbor-Klassifikation. Durch abgeschwächte zelluläre Immunität mit Funktionsstörung der T-Lymphozyten besteht eine erhöhte Anfälligkeit gegen Tbc, Pilz- und Virusinfektionen [5].

1.4 Klinische Studien

In einer klinischen Studie wird der Einfluss einer medizinischen Behandlung auf eine Krankheit oder ein Diagnoseverfahren in einem kontrollierten experimentellen Umfeld am Menschen untersucht. Im Rahmen der Entwicklung eines neuen Therapieansatzes stellen die klinischen Studien den letzten Schritt in der Entwicklung dar. Als wichtiger Bestandteil der pharmakologischen Forschung geht es dabei um die Verträglichkeit (Tolerability) und medizinische Wirksamkeit (Effectiveness) von Medikamenten.

In dieser Arbeit geht es dabei um die Validierung eines Diagnoseverfahrens, der immunhistochemischen Färbung zur Differenzierung des Tumorgewebes in der Pathologie als Grundlage für die effiziente Weiterbehandlung im Sinne einer Chemotherapie in der Inneren Medizin.

Vorgehensweise bei der Planung einer klinischen Studie sind erstens die Festlegung eines Studienprogramms mit der Zielrichtung und gegebenenfalls Planung der Abfolge mehrerer Studien hintereinander, zweitens das Erstellen eines Studienprotokolls (Planung einer einzelnen Studie innerhalb eines Programms).

Die German Hodgkin Lymphoma Study Group (GHSG) hat sich die Aufgabe gestellt, bei ständig fortgeführten und verbesserten Studienprotokollen die bestmöglichen Therapiestrategien für das frühe, intermittierende und fortgeschrittene Stadium der Hodgkin-Lymphome zu entwickeln [18].

Die Ziele und die zu überprüfende Hypothese, das Studiendesign, die Behandlung, die statistischen Auswertungsmethoden, die Einschluss- und Ausschlusskriterien für Patienten, die zu erhebenden Messwerte, die Visitenplanung und die Abbruchkriterien für einen Patienten sind wichtige Aspekte, die im Rahmen eines Studienprotokolls zu klären und festzulegen sind. Die Daten werden im Rahmen einer statistischen Analyse (Biostatistik) ausgewertet.

Diese Arbeit ist als eine deskriptiv-analytisch sowie retrospektiv-transversal beobachtete Studie angelegt. Sie beinhaltet Patientenfälle aus den Jahren 1998 bis 2003, insgesamt 1212 Fälle des Hodgkin-Lymphoms aus der GHSG.

1.5 Untersuchung prognostischer Faktoren an einem großen Patientenkollektiv

Das gesamte ärztliche Handeln zielt letztlich darauf ab, durch schnellere und sichere Diagnose die Therapie und damit die Prognose der betreffenden Krankheit zu verbessern. Oft wird vom Pathologen mit der Diagnose auch eine prognostische Aussage verlangt. Sie kann nur mit einer Wahrscheinlichkeit gestellt werden, da die Prognose einer Erkrankung auf statistischen Angaben beruht, die immer nur auf ein Kollektiv anwendbar sind [4].

Die Statistik stellt Methoden zur Verfügung, die es ermöglichen, basierend auf einer relativ kleinen Stichprobe allgemein gültige Aussagen über eine weitaus größere Grundgesamtheit zu treffen. Vollerhebungen sind auf Grund des hohen organisatorischen und zeitlichen Aufwandes die Ausnahme (Todesursachenstatistiken). Stichproben müssen repräsentativ und zufällig sein, d.h., sie müssen mit charakteristischen Eigenschaften der Grundgesamtheit übereinstimmen, und hinreichende absolute Häufigkeiten aufweisen. Bei einer zu knapp bemessenen Stichprobe könnten eventuell vorhandene Ausreißer die empirischen Kenngrößen wesentlich beeinflussen und damit die Eigenschaften der Grundgesamtheit verzerren. Allgemein gilt: Je

näher der Korrelationskoeffizient r bei 0 liegt und je kleiner der Stichprobenumfang n ist, umso weniger kann man auf einen real existierenden Zusammenhang schließen.

Die Methoden der induktiven Statistik dienen dazu, anhand von Stichproben Informationen bezüglich der Grundgesamtheit und der Zufallsvariablen zu gewinnen. Die Wahl des statistischen Modells ist zu Beginn einer klinischen Studie sehr wichtig [19]. Da es sich bei den Primärergebnissen der Befundung der Schnitte auf Expression eines Antigens (oder RNA) um kategoriale Variablen handelt (Expression ja oder nein), kommt in dieser Arbeit der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zur Anwendung.

1.6 Tissue-Microarray-Technik (TMA-Technik)

Durch die Möglichkeit der immunhistochemischen Analyse von malignen Lymphomen, basierend auf verschiedenen Antigen-Expressionen in Verbindung mit morphologischen, zytogenetischen, molekularbiologischen und klinischen Merkmalen, konnte die Klassifikation der Lymphome verbessert werden. Die Methode des Tissue-Microarrays ermöglicht es, in einem großen Patientenkollektiv charakteristische Merkmale und Phänotypen der Tumorzellen schnell zu ermitteln. Die von Kallioniemi et al. [20] entwickelte Tissue-Mikroarray-Technik (TMA-Technik) erlaubt eine parallele Analyse von mehreren 100 Gewebestücken in einem Empfängerblock, die geschnitten als Mikroarrays auf Objektträger auswertbar sind. Der Vorteil dieser Technik ist die Möglichkeit, viele Gewebeproben mit aussagekräftigem Gewebe kostengünstig und zeitsparend unter gleichen Färbebedingungen zu untersuchen. Außerdem kommt es bei der Probeentnahme nur zu einer minimalen Beschädigung des Spenderblocks.

Die Arrays sind mit herkömmlichen Methoden wie Immunhistochemie und der In-situ-Hybridisierung zu behandeln und unter einem Lichtmikroskop auswertbar [21]. Unter Immunhistochemie versteht man in der Regel die lokale Markierung

von Antigenen mittels Antikörpern im histologischen Präparat. Die In-situ-Hybridisierung erfüllt den gleichen Zweck auf der Ebene der Nukleinsäuren, indem die DNA- oder RNA-Abschnitte von Interesse mit komplementären markierten Oligonukleotiden zusammengebracht werden. Die Idee der Tumorarrays erlaubt es, eine breite Palette von potentiellen prognostischen und diagnostisch etablierten Faktoren schnell und effektiv testen zu können [22].

Im Falle der malignen Lymphome fanden Hedvat et al. [21] eine Übereinstimmung von 86% zwischen Gesamtgewebefunden und Mikroarray-Schnitten. Die Diskrepanz zwischen Gesamtschnitt und Mikroarray-Schnitt ist auf bis zu 70% ein falsch-negatives Ergebnis gewesen. Über die ausreichend hohe und damit repräsentative Anzahl der Stenzen existieren unterschiedliche Meinungen. Hoos et al. [23] propagieren, dass zur genaueren Auswertung drei Stenzen pro Fall verwendet werden sollen, während andere wiederum zwei Stenzen als ausreichend erachten [24]. Die Voraussetzung dafür seien aber jeweils die vorherige Beurteilung und Markierung des Tumorareals im Gesamtschnitt. Die Hauptlimitation der TMA-Technik besteht darin, dass kein auswertbares Tumorgewebe ausgestanzt wird. Insgesamt wird die Tissue-Microarray-Technik trotzdem als wertvolle Methode zur Analyse von großen Patientenkollektiven und zur Entdeckung wichtiger diagnostischer Faktoren bei Einsparung von Probenmaterial eingeschätzt [21].

1.7 Theoretische Grundlagen zur Arraykonzeption

Bewusst wurde in dieser Arbeit auf die lichtmikroskopische Selektion nach Tumorarealen in den Gesamtschnitten der Lymphomblöcke verzichtet. Bei dieser Form des „Blindstanzens“ erspart man sich die vorherige Beurteilung und Markierung des Tumorareals im Gesamtschnitt des Spenderblocks und damit einhergehenden Gewebeverlust und die möglichen morphologischen Veränderungen des Tumors in der Tiefe. Die fehlende Vorselektierung wird mit einer höheren Anzahl an Stenzen kompensiert.

Mit fünf Stenzen besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit, repräsentatives Tumormaterial zu gewinnen, als mit nur zwei oder drei Stenzen [25].

Es ist somit möglich mit weniger Aufwand die Arrays zu erstellen, was besonders bei groß angelegten retrospektiven Studien zur Zeiteinsparung beitragen kann.

Des Weiteren gibt es Tumorantigene, die nicht auf der gesamten Tumorzellmembran jeder Tumorzelle gleich stark ausgeprägt sind. Diese heterogene Expression der oberflächlichen Zellantigene kann ebenfalls an Stanzbiopsien mit Hilfe von Immunhistochemie nachgewiesen werden [26, 27].

Einer der wesentlichen Vorteile des Tissue-Microarrays besteht darin, dass sehr viele Fälle auf einem Paraffinblock vereint und unter gleichen Färbe- und Fixierungsbedingungen ausgewertet werden können. Auf Grund der Limitation der Stenzen pro Array geht die Erhöhung der Stenzenanzahl pro Fall zu Lasten der untersuchbaren Fälle, so dass die Arrays mit fünf Stenzen pro Fall konzipiert wurden. So konnten noch über 50 Fälle auf einem Block Platz finden (statt z.B. 25 bei 10 Stenzen pro Fall).

1.8 Problemstellung

Zielsetzung dieser Arbeit war zu untersuchen, ob die Tissue-Microarray-Methode für heterogene Lymphome wie Hodgkin-Lymphome auch mit der Blindstanz-Methode anwendbar und zur weiterführenden Diagnostik sowie zur Suche prognostischer Faktoren gut geeignet ist. Durch die dreidimensionalen Gegebenheiten einer Zelle im Paraffinblock ändert sich bei jeder Mikrotomie eines paraffinierten Gewebeblocks auch die Morphologie des Gewebes in der Tiefe. Es soll auch geklärt werden, ob es nach mehreren Schnitten oder durch den Färbeprozess zu Verlusten von Probematerial kommt.

Des Weiteren sollte die vorliegende Arbeit untersuchen, ob es eine unterschiedliche Verteilung der B- und T-/NK-Zell-Marker auf H-/RS-Zellen der zwei Entitäten des Hodgkin-Lymphoms, dem nodulär lymphozytenprädominanten und dem klassischen Hodgkin-Lymphom mit seinen Subtypen, gibt.

Zuletzt soll der Frage nachgegangen werden, inwieweit das Hodgkin-Lymphom in der Altersgruppe über 60 Jahre im Zusammenhang mit EBV im Sinne eines age-related EBV-assoziierten Hodgkin-Lymphoms eine eigenständige Entität darstellt. Dies soll die ätiologische Rolle einer latenten EBV-Infektion und eine Mikrosatelliten-Instabilität klären.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgut

Aus der Datenbank des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Würzburg wurden aus den Jahren 1998 bis 2003 1434 diagnostizierte Fälle von Hodgkin-Lymphomen der Hodgkin-Disease-Studie eingeschlossen. Davon waren 111 Fälle im Archiv unauffindbar, 60 Fälle waren für die angewendete Stanzmethode ungeeignet und 51 Fälle konnten auf Grund eines Risses im TMA-Block nicht ausgewertet werden. Somit wurden 1212 Fälle des Hodgkin-Lymphoms analysiert.

2.2 Histopathologische Klassifikation

Die hier verwendeten Fälle der Hodgkin-Lymphome wurden nach den Kriterien der REAL-Klassifikation (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms von 1994) diagnostiziert. Anhand der in dieser Studie verwendeten 18 immunhistochemischen Färbungen und In-situ-Hybridisierung, davon 3 immunhistochemischen Färbungen aus der Primärdiagnostik, wurden 5 phänotypbezogene Gruppen festgelegt.

Dabei ergab sich die in der Tabelle 1 zusammengestellte Subtypen-Verteilung innerhalb des gesamten Untersuchungsguts.

Anzahl [n]	[%]	Diagnose (REAL-Klassifikation)
65	5,4	Noduläre Sklerose
483	39,9%	Noduläre Sklerose Typ I
121	10%	Noduläre Sklerose Typ II
382	31,5%	Mischtyp
57	4,7%	Lymphozytenreiches Hodgkin-Lymphom
11	0,9%	Lymphozytenarmer Subtyp
27	2,2%	Non specific HL (cHL-NOS)
1	0,1%	Großzellig-anaplastisches Non-Hodgkin-Lymphom (ALC)
65	5,4%	Noduläres lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom

Tabelle 1: Verteilung der Entitäten des Hodgkin-Lymphoms wie noduläres lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom/Paragranulom (NLP-HL/PG) und klassisches Hodgkin-Lymphom (c-HL) mit seinen Subtypen: Noduläre Sklerose (cHL-NS), noduläre Sklerose Typ I (cHL-NS1), noduläre Sklerose Typ II (cHL-NS2), Mischtyp (cHL-MC), lymphozytenarmer Subtyp (cHL-LD), lymphozytenreiches Hodgkin-Lymphom (cHL-LR-n). Des Weiteren non specific Hodgkin-Lymphom (cHL-NOS) und großzellig-anaplastisches Non-Hodgkin-Lymphom (ALC).

2.3 Erstellung des Arrayblocks

Mit einem Manual tissue puncher/Arrayer der Firma Beecher Instruments (Silver Spring, Maryland, USA; siehe Abbildung 1) wurden pro Fall fünf Stenzen von je 0,6 mm Durchmesser aus dem in Paraffin eingebetteten Lymphomgewebe entnommen und in einen so genannten Empfängerblock im Abstand von 1 mm eingebracht. Der Übersicht halber wurden die Fälle in einem Abstand von 1,5 mm zueinander platziert. Die Fälle wurden ohne vorherige lichtmikroskopische Kontrolle von Tumorzellnestern gestanzt (Blindstanzung). Auf dem Empfängerblock (40 mm x 25 mm) fanden pro Reihe 5 Fälle zu je 5 Stenzen bei 10-11 Reihen Platz. So enthielten die Empfängerblöcke maximal 58 Patientenfälle (= 290 Stenzen). Insgesamt wurden 31 Empfängerblöcke erstellt. 2 zusätzliche Empfängerblöcke enthielten Wiederholungsstanzen, die durch Gewebeverlust, Binde- und Fettgewebe notwendig geworden waren.

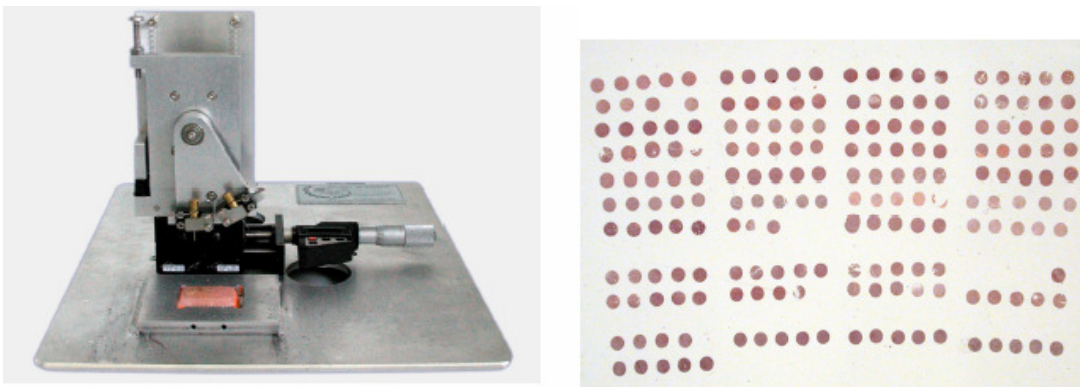


Abbildung 1: Manual tissue puncher (links), HE-Schnitt eines Tissue-Microarrays (rechts)

2.4 Herstellung der Arrayschnitte

Mit einem herkömmlichen Mikrotom wurden von den 31 Empfängerblöcken jeweils 20 Schnitte von 1-2 µm Dicke auf silanisierte Objektträger aufgebracht. Diese Präparate wurden für 3-4 Tage im Brutschrank bei 56 °C angetrocknet, um ein Abschwimmen der Stenzen beim anschließenden Färben zu verhindern.

2.5 Validität der Blindstanz-Methode im Bezug auf den Gewebeverlust

Vor den immunhistochemischen Färbungen wurde am HE-Schnitt eines jeden Arrayblocks ermittelt, ob repräsentatives Tumormaterial in den einzelnen Stenzen erfasst wurde. Bei Gewebeverlust aller Stenzen eines Falls oder einer Stanzung ausschließlich mit Binde- oder Fettgewebe wurde wiederholt gestanzt. Bei nur einer Stanze pro Fall mit auswertbaren Tumorzellen wurde nur diese eine Stanze ausgewertet. In der Gesamtaussage eines Falls wurde die höchste Bewertung aller Stenzen eines Falls angenommen.

2.6 Immunhistochemie (IHC)

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die monoklonalen Antikörper CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD56, Perforin, GranzymB, TIA-1, CD79a, PAX-5, MLH-1, MSH-2 und LMP-1 benutzt. Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit die aus der Primärdiagnostik der eingeschlossenen Fälle bekannten Daten der immunhistochemischen Färbung CD20, CD30 und CD15 verwendet.

Folgende Antikörper für Paraffinmaterial kommen in angegebener Verdünnung zur Anwendung:

Primärantigen	Hersteller	Klon	Vorbehandlung: Kochen im Dampfdrucktopf auf höchster Stufe für 4-8 min in folgenden Puffern	Verdünnung
LMP-1	Novocastra	CS 1-4	Target Retrieval pH 6,1 (Dako) oder Trypsin pH 7,8	1:100
CD79α	Dako Cytomation	JCB117	CS (Citronensäure) pH 5,5	1:100
PAX-5	BD Biosciences Pharmingingen	24	CS pH 5,5	1:50
CD20cy	Dako Cytomation	L26	CS pH 5,5	1:1000
Perforin	Novocastra	5B10	Tris pH 10,0	1:10
Granzym B	Monosan	GrB-7	CS pH 5,5	1:20
TIA-1	Immunotech	2G9	CS pH 5,5	1:200
CD56	Novocastra	1B6	CS pH 5,5	1:10
CD3	Novocastra	PS1	CS pH 5,5	1:20
CD4	Novocastra	1F6	CS pH 5,5	1:5
CD5	Novocastra	4C7	CS pH 5,5	1:40
CD7	Dako Cytomation	CBC.37	Target Retrieval pH 6,1 (Dako)	1:300
CD8	Dako Cytomation	C8/144B	CS pH 5,5	1:80
MLH1	PharMingen	G168-15	CS pH 5,5	1:200
MSH2	Oncogene	FE11	CS pH 5,5	1:10
CD30	Dako Cytomation	BerH2	CS pH 5,5	1:80
CD15	Dako Cytomation	C3D/C3D-1	CS pH 5,5	1:200

Tabelle 2: Verwendete Antikörper mit jeweiligem Hersteller, Klon, Vorbehandlung und benutzer Verdünnung

Entparaffinieren mit Xylen	2 x 5 min
Rehydrieren:	
Alkohol 99%	2 x 3 min
Alkohol 96%	2 x 3 min
Aqua dest.	3 x 3 min

Tabelle 3: Entparaffinieren zur Vorbehandlung der Schnitte

Die Vorbehandlung der Schnitte erfolgt nach Entparaffinieren mit Xylen und Rehydrierung mit absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest. (Tabelle 3) im Dampfdrucktopf. Der Puffer wie Target Retrieval pH 6,1 ist bei Dako Cytomation käuflich zu erwerben. Der Puffer Trypsin ist gemischt aus 100 mg Trypsin, 100 mg Kalziumchlorid, 100 ml PBS und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Citronensäure wurde in 10 Litern Wasser mit 42 g Zitronensäure (CS) angesetzt und mit 20,9 g Natriumhydroxid (NaOH) auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt. Die folgenden Schritte wurden mittels eines Färbeautomaten von Tecan-Genesis RSP200 durchgeführt: 10 min Blocking-Reagenz, 1 h Inkubation mit dem Primärantikörper (Verdünnungen siehe Tabelle 2), Spülung mit PBS, 20 min Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper. Spülung mit PBS, 20 min Inkubation mit Streptavidin-gekoppelter horseradish peroxidase (HRP), Spülung mit PBS, 10 min Inkubation mit dem Substrat Diaminobenzidin (DAB), Spülung mit Leitungswasser, 3 min Färbung mit Hämalaun nach Meyers, 10 min Spülung mit Leitungswasser. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte mit Xylen fixiert und mit Folie eingedeckt.

Nachweis von Epstein-Barr early RNA (EBER) mittels In-situ-Hybridisierung

Zur Markierung EBV-infizierter Zellen wurde eine Fluoreszeinisothiocyanat-(FITC-)konjugierte Peptidnucleinsäure-(PNA-)Sonde (DAKO Cytomation, Hamburg, Deutschland) zur Detektion von EBER eingesetzt. Der Vorgang der In-situ-Hybridisierung mit EBER ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

Entparaffinieren mit Xylen	2 x 5 min
Rehydrieren:	
Alkohol 99%	2 x 3 min
Alkohol 96%	2 x 3 min
Aqua dest.	3 x 3 min
Proteinkinase K (DAKO) + 200 ml TBS	5 min bei 37 C°
Aqua dest.	2 x 3 min
Alkohol 96%	10 sec
Trocknen	5 min
EBER-ISH (Fluoreszeinisothiocyanat-konjugierte PNA-Sonde)	1-2 Tropfen Sondenlösung mit Deckgläschen eingedeckt für 1,5 h bei 55C° in feuchter Kammer inkubiert
Stringent-Waschlösung 1:60	25 min bei 55C° im Wasserbad mit Rüttler
TBS	10 sec
Anti-FITC/AP	30 min Inkubieren in feuchter Kammer
TBS	2 x 3 min
Aqua dest.	2 x 1 min
Antibody Diluent	30-60 min Inkubieren
Leitungswasser	5 min
Dako Cytomation Faramount (wässriges Eindeckmedium) und Eindecken mit Deckgläschen	

Tabelle 4: In-situ-Hybridisierung mit Fluorescein-konjugierter PNA-Sonde zur Detektion von EBER

2.7 Auswertung der Tissue-Microarrays

2.7.1 Vorauswahl der Fälle

Anhand der HE-gefärbten Schnitte wird zunächst überprüft, inwieweit die Arraystanzen Tumorgewebe enthielten. Nur Hodgkinfälle mit morphologisch gut erhaltenen tumortragenden Stanzen gingen in die Auswertung ein.

2.7.2 Auswertungskriterien der Immunhistochemie

Die in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD56, CD 79a, Perforin, GranzymB, TIA-1, PAX-1, MLH-1, MSH-2, LMP-1 sowie die EBER wurden in ihrer Expression in den Tumorzellen lichtmikroskopisch mit den Ziffern 0-3 bewertet. Die entsprechende Auswertung der Expression von CD15, CD30 und CD20 wurde aus der Primärdiagnostik des Pathologischen Instituts übernommen. Die Ziffer 0 wurde gegeben, wenn keine der Tumorzellen angefärbt war, Ziffer 1 bezeichnete eine Anfärbung bis zu 25% der Tumorzellen, Ziffer 2 von 25 bis 75% und Ziffer 3 von mehr als 75%. In der Endauswertung wurden Fälle mit den Ziffern 2 und 3 als positiv, die Ziffern 0 und 1 als negativ in der Expression der jeweiligen Oberflächen- und zytoplasmatischen Antigene gewertet.

Die Auswertung wies die immunhistochemischen Färbungen und die In-situ-Hybridisierung fünf Gruppen zu:

B-Zell-Phänotyp, T-Zell- und zytotoxischer T-Zell-Phänotyp, Epstein-Barr-Virus (EBV) und Mikrosatelliten-Instabilität (MSI).

Die B-Zell-phänotypische Ausprägung der Tumorzellen wurde anhand der Positivität von CD30, CD15, CD20, CD79a und PAX5 untersucht. Als T-Zell-Marker wurden CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD56 verwendet. Für den

zytotoxischen T-Zell-Phänotyp waren Perforin, Granzym B und TIA-1 ausschlaggebend. Eine Infektion der Zellen mit Epstein-Barr-Virus (EBV) wurde durch die immunhistochemische Färbung LMP-1 und die In-situ-Hybridisierung mit EBER nachgewiesen. Die Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) wurde durch die immunhistochemischen Färbungen MLH-1 und MSH-2 untersucht (vergleiche auch Tabelle 5).

B-Zell-Phänotyp:	CD30, CD15, CD20, CD79a, PAX5
T-Zell-Phänotyp:	CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD56
Zytotoxischer T-Zell-Phänotyp:	Perforin, GranzymB, TIA-1
Epstein-Barr-Virus (EBV):	LMP-1, EBER (ISH)
Mikrosatelliten-Instabilität (MSI):	MLH-1, MSH-2

Tabelle 5: Fünf Gruppierungen, in die die immunhistochemischen Färbungen mit monoklonalen Antikörpern und In-situ-Hybridisierung zusammenfassend eingeteilt wurden

Alle fünf Stenzen des Falls eines Hodgkin-Lymphoms wurden mit einer Ziffer in der Auswertung zusammengefasst. Bei nur einer Stanze pro Fall mit auswertbaren Tumorzellen wurde dementsprechend nur diese eine Stanze ausgewertet. In der Gesamtaussage eines Falls wird die jeweils höchste Bewertung innerhalb der Stenzen eines Falls angenommen.

2.7.3 Statistik

Für die statistischen Analysen wurde die Software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 15.0 für Windows benutzt. Alle Ergebnisse sind auf Signifikanz mit $p = 0,05$ geprüft worden. Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zur Überprüfung der Unabhängigkeit zweier kategorialskalierten Variablen in einer Kontingenztafel kam in dieser Arbeit zur Anwendung. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertbare Fälle und Gewebeverlust

1212 gestanzte Fälle mit Hodgkin-Lymphomen ließen sich für diese Untersuchung nutzen. Bei 5 Stenzen pro Fall, gefärbt mit 15 verschiedenen immunhistochemisch verwendeten Antikörpern und der EBER-in-situ-Hybridisierung sind es insgesamt 18180 Stenzen für die Auswertung. In 27% der Fälle (4860 Stenzen) ist ein vollständiger Datensatz zu allen 5 Stenzen entstanden (siehe auch Tabelle 6). In 73% (13320 Stenzen) der Fälle besteht entweder ein Verlust von Gewebe in einer der immunhistochemischen Färbung/ISH, fehlendes Tumorgewebe oder es zeigte sich eine unzureichende Anfärbung. Diese Verlustquellen erklären die zwischen den Nachweismethoden abweichenden Fallzahlen.

	Stenzen x Färbung	
1212 Fälle à 5 Stenzen x 15 immunhistochem. Färbungen mit monoklonalen Antikörpern/ISH	18180	100%
Alle Ergebnisse in einem Datensatz auswertbar	4860	27%
Datensätze mit nicht auswertbaren Ergebnissen	13320	73%

Tabelle 6: Gesamtanzahl der Stenzen und Verlust durch verschiedene Arbeitsschritte

Zur Darstellung, durch welche Arbeitsvorgänge der Verlust des Gewebes zustande kommt und inwieweit die Methode des Blindstanzens eine Auswirkung auf die Gesamtzahl der nicht aussagefähigen Fälle hat, wurde modellhaft eine Stichprobe von 2696 Fällen an der immunhistochemischen Färbung (IHC) mit LMP-1 und EBER-in-situ-Hybridisierung (ISH) untersucht. Es wurden genau diese beiden Färbungen für die Stichprobe ausgewählt, da bei ihnen ein sehr hoher Verlust an auswertbaren Fällen zu verzeichnen war. Bei der mikroskopischen Bewertung der Schnitte wurden jene Fälle als Verlust bewertet, bei denen alle Stenzen eines Falls keine spezifische Anfärbung zeigten. Weitere Verluste entstanden durch das Abschwimmen großer Teile der

Stanzen oder Zusammenrollen der Stanzen, so dass kein ausreichendes Tumorgewebe zu erkennen war (siehe Tabelle 7). Von diesen 2696 Stanzen waren 1834 (68%) der Stanzen lichtmikroskopisch auswertbar. Von den verbliebenen 832 Stanzen (32%) waren 631 (24%) durch unspezifische oder unzureichende Anfärbung nicht auswertbar oder waren während des Färbvorgangs abgeschwommen. Bei 208 Stanzen (7,7%) fehlten die Gewebestanden durch Verlust beim Schneide- oder Färbvorgang komplett. 23 Stanzen (0,9%) der nicht auswertbaren Stanzen waren auf die Blindstanzung zurückzuführen, da sie keine Tumorzellen aufweisen, sondern nur Sklerose oder Fettgewebe.

	Anzahl der Stanzen	
Stichprobe	2696	100%
Unspezifische Färbung	631	23,4%
Kein Gewebe vorhanden	208	7,7%
Kein Tumorgewebe getroffen	23	0,9%
		32%
Auswertbare Stanzen	1834	68%

Tabelle 7: Stichprobe aus der immunhistochemischen Färbung LMP-1 und der EBER-in-situ-Hybridisierung zur Erläuterung des Gewebeverlustes bei Blindstanzung

3.2 Immunphänotypisierung der H-/RS-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms und des nodulär lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphoms

Zur Analyse der T-Zell-Phänotypisierung der Tumorzellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms (c-HL) (lymphozytenreicher Typ, noduläre Sklerose, Mischzell-Typ und lymphozytenarmer Typ) und des nodulär lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphoms (NLP-HL) wurden folgende monoklonale Antikörper für die Immunhistochemie verwendet: CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD56, Perforin, GranzymB und TIA-1 (siehe auch Tabelle 8).

Zur genaueren Darstellung der Tumorzellen mit immunhistochemischer Phänotypisierung durch B-Lymphozyten-Antigene kamen die Daten aus der Primärdiagnostik wie CD30, CD15 und CD20 zur Anwendung, zusätzlich wurden CD79a und PAX 5 gefärbt (Tabelle 8).

In den als c-HL klassifizierten Fällen waren 97% (988 Fälle) CD30-positiv. CD15 wurde dort in 63% der Fälle (640 von 1019 Fällen) exprimiert. In den 58 auswertbaren Fällen von NLP-HL exprimieren 4% (2 Fälle) CD30. In den 52 auswertbaren Fällen von NLP-HL findet sich keiner mit CD15-Positivität.

Die Expression von CD20 ist in beiden Entitäten genau in umgekehrter Häufigkeit zur Expression von CD30: In den NLP-HL-Fällen präsentieren 95% der Tumorzellen CD20, während bei c-HL nur 5% der 956 Fälle CD20 exprimieren. CD79a war ähnlich der Expression des CD20-Oberflächenantigens: H-/RS-Zellen des c-HL exprimierten zu 5% (42 von 935 Fällen) CD79a, H-/RS-Zellen des NLP-HL zu 54% (60 von 32 Fällen). PAX5 war bei c-HL in 66% der Fälle positiv (550 von 840 Fällen), während es bei NLP-HL in 90% der Fälle positiv war (49 von 55 auswertbaren Fällen).

monoklonale Antikörper	c-HL, n = 1147			NLP-HL, n = 65		
	auswertbar	positiv		auswertbar	positiv	
CD30	1025	988	97%	58	2	4%
CD15	1019	640	63%	52	0	0%
CD20	956	42	5%	57	54	95%
CD79a	935	42	5%	60	32	54%
PAX-5	840	550	66%	55	49	90%
CD3	966	21	2%	60	6	10%
CD4	961	52	6%	57	8	14%
CD5	972	25	3%	61	6	10%
CD7	1017	2	0,2%	62	0	0%
CD8	963	14	2%	60	5	9%
CD56	1007	0	0%	59	0	0%
Perforin	972	103	11%	61	11	18%
Granzym B	987	7	1%	59	1	2%
TIA1	992	6	1%	59	3	5%

Tabelle 8: Expression der B- und T-Zell-Marker im klassischen und nodulär lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphom. In 31 Fällen der c-HL und in 7 Fällen der NLP-HL waren unter den T-Zell-Markern Mehrfach-Expressionen auf den H-/RS-Zellen zu beobachten. In H-/RS-Zellen des c-HL kamen bis zu drei verschiedene T-Zell-Antigene, in Fällen der NLP-HL bis zu 4 T-Zell-Antigene vor.

Die T-Zell-Immunphänotypisierung der H-/RS-Zellen beider Entitäten wurde mit den Färbungen von CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD56, Perforin, GranzymB und TIA-1 dargestellt. Die Ergebnisse der Tissue-Microarray-basierten Immunphänotypisierung der H-/RS-Zellen zeigt die Tabelle 8. Bei Fällen des NLP-HL präsentierte sich im Allgemeinen eine stärkere Expression der T-Zell-Marker als in den Subtypen des klassischen Hodgkin-Lymphoms. In 31 Fällen der c-HL und in 7 Fällen der NLP-HL waren unter den T-Zell-Markern Mehrfach-Expressionen auf den H-/RS-Zellen zu beobachten. In H-/RS-Zellen des c-HL kamen bis zu 3 verschiedene T-Zell-Antigene, in Fällen der NLP-HL bis zu 4 T-Zell-Antigenen vor.

CD3 und CD5 waren in den c-HL-Fällen in 2% (21/966) und 3% (25/972) der Fälle positiv, während sie bei NLP-HL eine ca. 5-fach höhere Expressionshäufigkeit mit jeweils 10% (6/60) aufwiesen. CD7 war in 2 von 1017 c-HL-Fällen (0,2%) positiv, während unter den NLP-HL-Fällen keiner positiv war.

CD4 und CD8 sind Oberflächenantigene der reifen T-Lymphozyten. Unter den Fällen mit c-HL exprimierten 6% (52/961) der Fälle CD4 und 2% (14/963) CD8. In den NLP-HL-Fällen hingegen waren 14% (8/57) CD4- und 9% (5/60) CD-8-positiv. CD56 konnte weder bei c-HL noch bei NLP-HL nachgewiesen werden. Perforin war in dieser Arbeit bei 11% der c-HL-Fälle (103 von 972) und bei 18% der NLP-HL-Fälle (11 von 61) exprimiert. Die Protease GranzymB war in den Entitäten c-HL und NLP-HL zu 1% (7/987) und 2% (1/59) positiv. Der zytotoxische T-Zell-Marker TIA-1 wurde bei 1% der Fälle von c-HL (6 von 992 Fällen) und 5% (3/59) der NLP-HL-Fälle exprimiert.

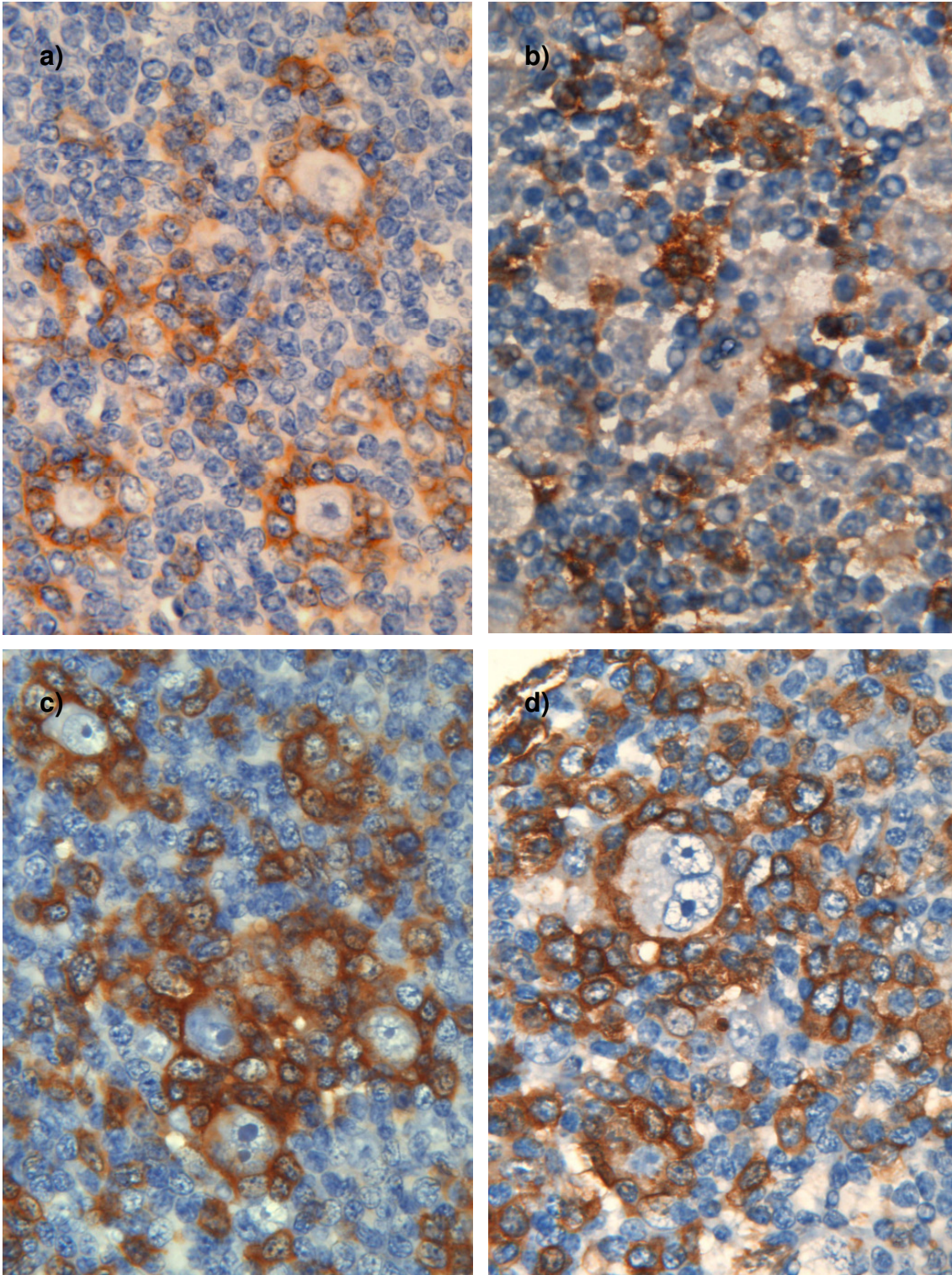


Abbildung 2 a-d: Phänotypisierung der H-/RS-Zellen in 1000-facher Vergrößerung abgebildet: (a) CD4, c-HL, (b) CD8, NLP-HL, (c) CD3, c-HL, (d) CD5, c-HL

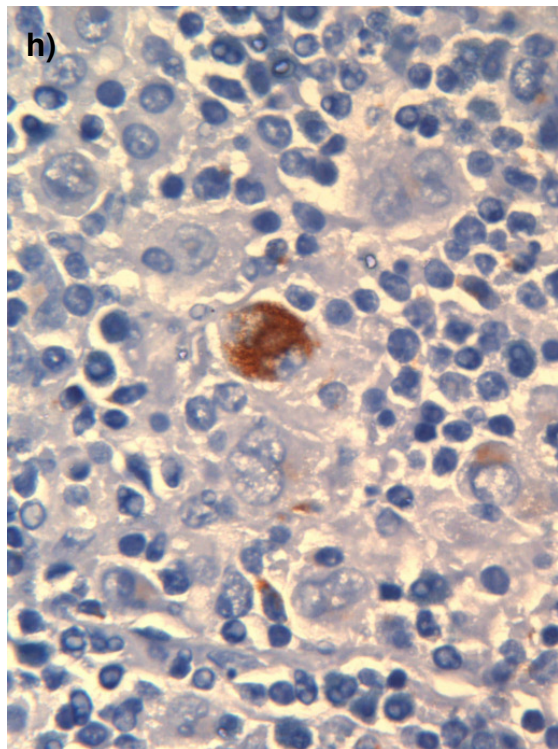
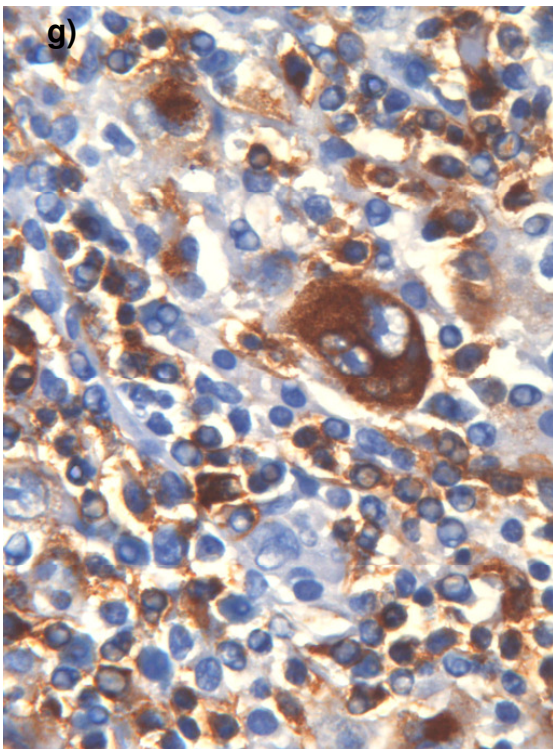
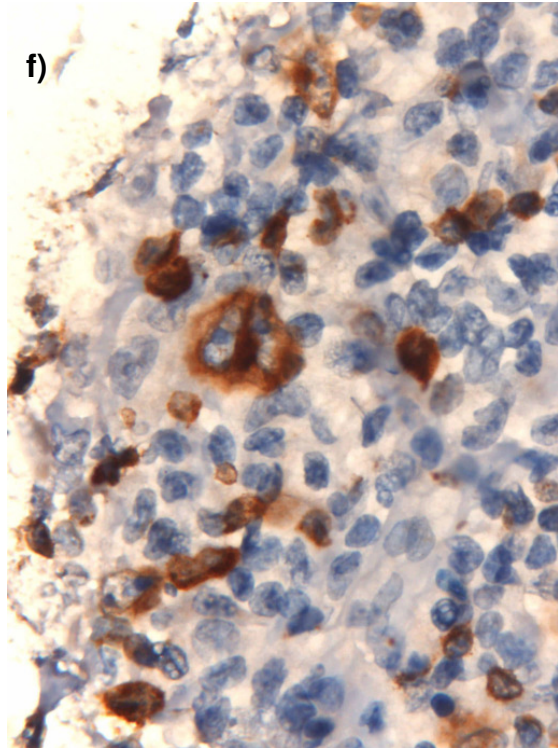
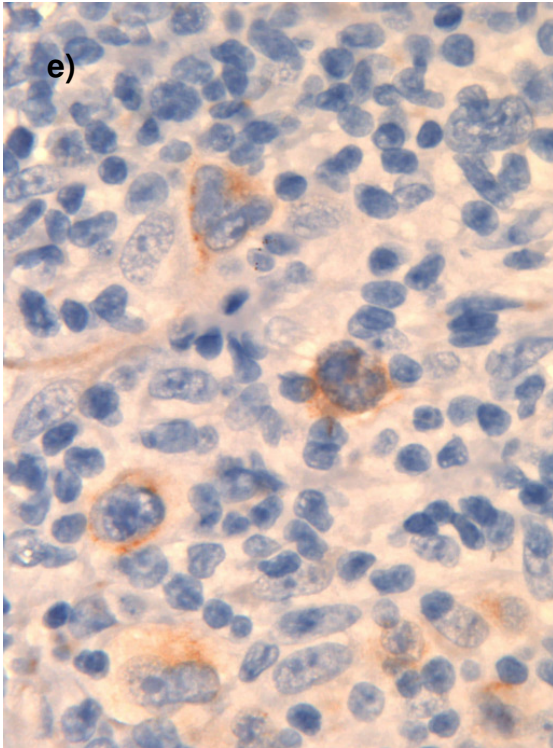


Abbildung 2 e-h: Phänotypisierung der H-/RS-Zellen in 1000-facher Vergrößerung abgebildet: (e) CD7, c-HL, (f) Perforin, c-HL, (g) GranzymB, c-HL, (h) TIA-1, c-HL

3.3 Unterschiede der Immunphänotypisierung des Hodgkin-Lymphoms unter und über 60 Jahre Lebensalter

Die Altersangaben bezogen sich in dieser Untersuchung auf den Zeitpunkt der Diagnosestellung. 1112 der Studienteilnehmer waren zum jeweiligen Zeitpunkt unter 60 Jahre, 100 Studienteilnehmer 60 Jahre und älter. Zusätzlich zur Immunphänotypisierung der Tumorzellen der Entitäten und Subtypen des Hodgkin-Lymphoms wurden altersabhängige Unterschiede in der Expression von B- und T-Zell-Markern der H-/RS-Zellen bei Studienteilnehmern unter und über 60 Jahre untersucht.

CD15, Perforin, GranzymB, EBER und LMP1 waren im Chi-Quadrat-Test zwischen den Altersgruppen unter und über 60 Jahre signifikant unterschiedlich (vergleiche Tabelle 9).

Mikrosatelliten-Instabilität sollte durch die immunhistochemischen Färbungen MLH1 und MSH2 dargestellt werden. Hier konnten keine Unterschiede zwischen den Altersgruppen festgestellt werden.

monoklonale Antikörper/ISH	< 60 Jahre, n = 1112			≥ 60 Jahre, n = 100			p-Wert
	positiv	auswertbar		positiv	auswertbar		Chi ² -Test
CD30	911	91,50%	994	85	8,50%	95	0,48
CD15	601	61,00%	985	45	47,90%	94	0,019
CD20	84	9,10%	924	12	13,50%	89	0,177
CD79a	64	7,00%	918	10	13,00%	77	0,053
PAX5	554	67,40%	822	45	61,60%	73	0,317
CD3	26	2,80%	945	1	1,20%	81	0,717
CD4	53	5,60%	939	7	8,90%	79	0,219
CD5	28	2,90%	955	3	3,80%	78	0,504
CD7	1	0,10%	998	1	1,20%	81	0,145
CD8	18	1,90%	942	1	1,20%	81	1,000
CD56	0		984	0		82	
Perforin	98	10,30%	951	16	19,50%	82	0,011
Granzym B	5	1,00%	967	3	3,80%	79	0,018
TIA1	8	0,80%	971	1	1,30%	80	0,511
EBER	198	19,40%	1018	28	31,80%	88	0,006
LMP1	143	27,20%	525	21	42,90%	49	0,021
MLH1	840	93,60%	897	74	97,40%	76	0,312
MSH2	831	93,20%	892	71	92,20%	77	0,752

Tabelle 9: Unterschiede der Immunphänotypisierung des Hodgkin-Lymphoms im Alter ≥ 60 Jahre und < 60 Jahre

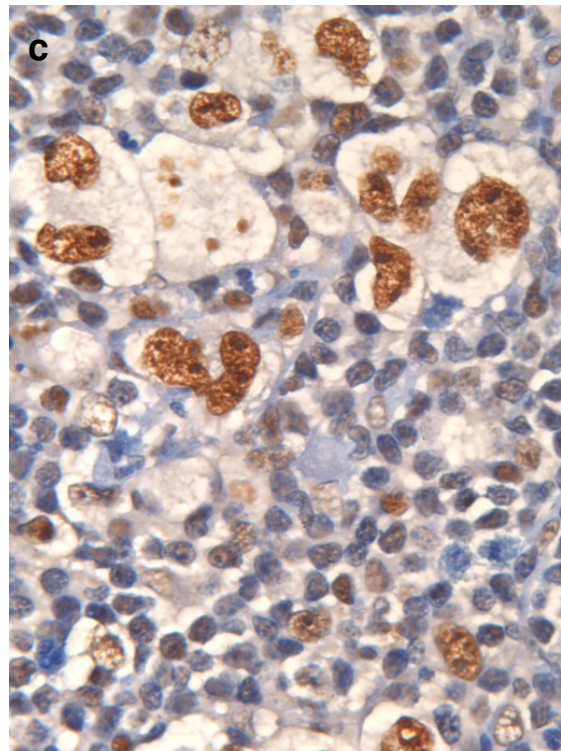
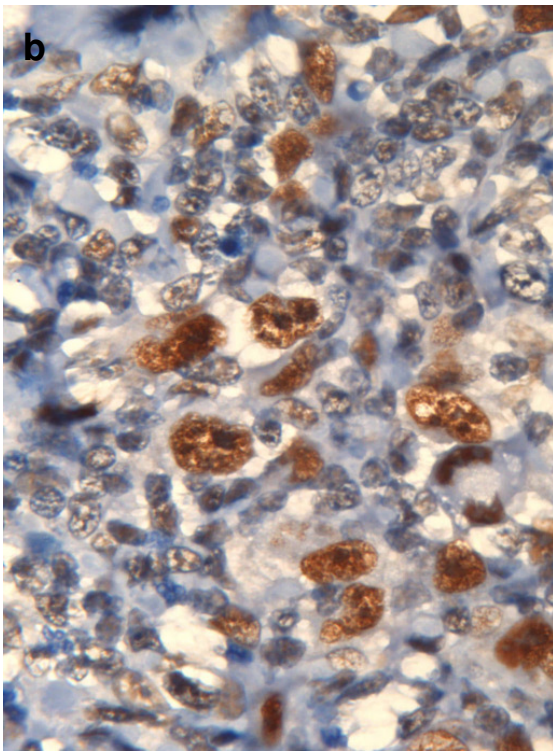
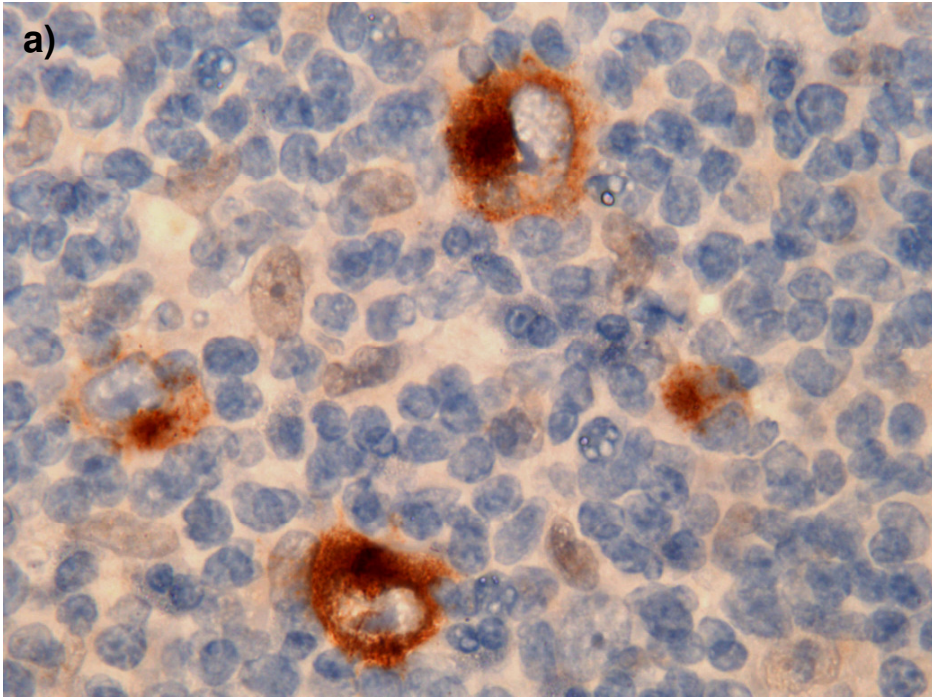


Abbildung 3 a-c: 1000x vergrößerte Stanzschnitte: (a) LMP-1, (b) MLH1-positiv, (c) MSH2-positiv

4 Diskussion

4.1 Validität (und Grenzen) der Tissue-Microarray-(TMA-)Technik

Mit der Technik des Gewebe-Microarrays ist der Nachweis einer veränderten Proteinexpression in Lymphomen deutlich vereinfacht worden [21, 22]. Nach Angaben von Kononen et al. können bis zu 1000 Gewebestanden in einen Paraffinblock eingebracht werden [22-24, 27]. Neben der Einsparung von Reagenzien im Vergleich zu herkömmlichen Präparaten wird durch die TMAs ein hoher Grad an Kohärenz der Ergebnisse durch einheitliche Färbebedingungen erreicht.

Eine Herausforderung in der Anwendung des Gewebe-Microarrays auf dem Gebiet der Lymphome stellt ihre Heterogenität dar. Beim Hodgkin-Lymphom machen die eigentlichen Tumorzellen nur einen kleinen Teil aus, ca. 1%. Der Rest des betroffenen Lymphknotens besteht aus inflammatorischem Begleitinfiltrat. Dies erklärt, warum nicht in jeder Stanzung von Lymphomgewebe H-/RS-Zellen erfasst werden. Dazu kommt die heterogene Verteilung der untersuchten Antigene im Tumor.

Tzankov et al. und andere Autoren [26, 28] konnten nachweisen, dass das TMA-Verfahren bei c-HL trotz der Heterogenität des c-HL Tumorgewebes zuverlässig für die Darstellung von Expressionsmustern fokaler und inkonstanter Marker anzuwenden ist.

Von den in dieser Studie eingeschlossenen 1434 Fällen mit Hodgkin-Lymphom wurden 1212 Fälle (85%) mit der Tissue-Microarray-Methode untersucht. Unter den verbleibenden Fällen waren 12% mit der verwendeten Stanzmethode nicht auswertbar, wobei 60 Fälle selbst nur in Form einer Stanzbiopsie im Archiv vorlagen, zu wenig Gewebe vorhanden war oder durch eine Verkalkung des Probenmaterials eine adäquate Stanzung nicht möglich war. 111 Fälle, also ca. 8%, waren unauffindbar. 51 Fälle (3,5%) mussten auf Grund des Risses einer

der Microarray-Blöcke aus der Wertung genommen werden. Von den insgesamt 18180 Stanzungen konnte nur in 27%, bei 4860 Stanzungen, ein kompletter aussagefähiger Datensatz aller Färbungen erstellt werden (vergleiche Tabelle 6).

In dieser Arbeit wurde beim Stanzen der Hodgkin-Lymphom-Fälle die Blindstanz-Methode verwendet. Bei vorangegangenen Arbeiten, die die TMA-Methode bei Lymphomen angewandt haben, wurde anhand eines HE-Schnitts des gesamten Lymphknotens ein repräsentatives Areal ausgesucht und aus diesem gestanzt. Auf diese visuelle Selektion wird bei der Blindstanzung verzichtet, was naturgemäß zu Stanzungen in Arealen ohne Tumorgewebe führen kann.

Anhand von 2696 Stanzungen wurden die Fehler durch die Blindstanzung und andere Ursachen der Nichtauswertbarkeit von Gewebestücken quantifiziert. Diese Stanzungen waren für die immunhistochemische Färbung mit LMP-1 und für die EBER-in-situ-Hybridisierung bestimmt.

Unter ihnen konnten 1834 Stanzungen (68%) ausgewertet werden, 862 (32%) Stanzungen gingen nicht in die Auswertung ein. In nur 23 (0,9% von 2696) Stanzungen war auf Grund des Stanzareals kein Tumorgewebe, sondern inflammatorisches Infiltrat, sklerotisches Gewebe oder Fettgewebe enthalten. Auch wenn LMP-1 und EBER nur exemplarisch für die Gesamtheit der untersuchten Parameter standen, bedeutet die überaus kleine Ausfallrate, die allein durch die Methode der Blindstanzung bedingt war, eine hohe Validität dieser Art der Stanzung. Die zeit- und arbeitsintensive Präselektion von Tumorarealen in extra angefertigten HE-Schnitten kann somit entfallen. In der Literatur ist beschrieben, dass die Vorauswahl am HE-Schnitt die Trefferquote beim Gewebestücken zwar leicht erhöht, aber auch nicht eine 100% -ige Trefferquote liefert [25].

Der Erfolg der Blindstanzung einerseits und die nur leicht erhöhte Trefferrate von Tumoren bei Präselektion am Probeschnitt andererseits lassen sich durch die Heterogenität des Tumorgewebes im Spenderblock erklären. Der Probeschnitt aus einer Ebene des Spenderblocks kann keine exakte Aussage über die Ausdehnung des Tumorareals in tiefere Schichten machen, die von der

Stanznadel erfasst werden. Gleichzeitig erhöht das tiefe Eindringen der Stanznadel ohnehin die Wahrscheinlichkeit, überhaupt Tumorgewebe zu erfassen.

Vor allem bei nur teilweise mit Lymphom infiltrierten Lymphknoten ändert sich die Tumordichte in den tieferen Schichten. Durch den Gewebeverlust beim Mikrotomieren des Spenderblocks können die tiefer liegenden Schichten dann tumorfrei sein, wobei daraufhin trotz vorheriger Auswahl auch nach mehrmaligem Mikrotomieren keine Tumorzellen mit der Stanznadel erkennbar sind.

Der Großteil der nicht auswertbaren Fälle (23,4%) war auf die unspezifische immunhistochemische Färbung oder ISH zurückzuführen. Zudem wurde ein Abschwimmen großer Stanzanteile beobachtet, so dass nur noch Reste von einem Begleitinfiltat erkennbar waren. Zum anderen hat das Mikrotomieren zum Teil ein Einrollen der Stanzen verursacht, das zu dichter Gewebeüberlagerung geführt und die lichtmikroskopische Auswertung unmöglich gemacht hat.

Es ist an dieser Stelle zu betonen, dass diese Fehler (Ablösen der Stanzen, unspezifische Färbung) vorwiegend in der quantifizierten Fehlerratenanalyse der Parameter LMP-1 und EBER auftraten und nicht im gleichen Maße für die übrigen Färbungen gelten. Dies spricht für Optimierungsbedarf im Protokoll für LMP-1 und EBER in TMAs. Der geringe Anteil von Gewebestücken ohne Tumorgewebe infolge der Blindstanzung mit nur 0,9% dürfte dagegen repräsentativ für die gesamte Stichprobe sein.

4.2 Immunphänotypisierung des klassischen Hodgkin-Lymphoms und des nodulär lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphoms

Für lange Zeit war es unklar, von welcher lymphatischen Zelle oder vielmehr in welchem Differenzierungsgrad einer lymphatischen Zelle die Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen in Hodgkin-Lymphomen abstammen und inwieweit diese mono- oder polyklonal sind. Grund dafür war die geringe Anzahl der Tumorzellen von teils unter 1% der Gesamtzellzahl, die zu Anwendungsschwierigkeiten der üblichen molekularbiologischen Techniken wie Southern-Blot-Hybridisierung oder der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) führte. Im Southern-Blot wird das DNA-Isolat elektrophoretisch aufgetrennt und mit einer markierten DNA-Sonde der Wahl hybridisiert. In der PCR wird der Genabschnitt von Interesse gezielt zwischen zwei hybridisierten Oligonukleotiden mit einer Polymerase amplifiziert. Beide Methoden stellen allerdings Ansprüche an die Menge und vor allem die Homogenität des Probenmaterials, die sich bei 1% Tumorzellen im Lymphom schwierig gestaltet. Zudem gab es unterschiedliche Befunde bei den Immunphänotypisierungen der H-/RS-Zellen, die nicht klar von einer hämatopoetischen Stammzelle abzuleiten waren.

Nur in nodulär lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphomen (NLP-HL) ist eine reguläre und konstante Expression von B-Zell-Markern zu erkennen, die auf eine Abstammung der H-/RS-Zellen von B-Lymphozyten schließen lässt. Aufklärung über eine klonale Herkunft der H-/RS-Zellen erhielt man durch die genetischen Untersuchungen sowie aus den vielen Studien über das Epstein-Barr-Virus-assoziierte Hodgkin-Lymphom.

Die Methode der Einzel-Zell-PCR ermöglichte es seit den neunziger Jahren, einzelne H-/RS-Zellen auf Immunglobuline, B- und T-Zell-Rezeptoren und eine Mono- oder Polyklonalität der Tumorzellen zu untersuchen [29]. Durch die PCR konnte man klonale Umlagerungen von Immunglobulinschwerkettengen (Ig-V_H) detektieren, die als Erkennungsmerkmal von B-Lymphozyten gelten. In den

meisten Fällen des Hodgkin-Lymphoms repräsentiert sich eine monoklonale, nur in einigen Fällen auch eine polyklonale Population der B-Lymphozyten-Stammreihe [15, 30-32].

Im Rahmen der immer genaueren Diagnostik von Hodgkin-Lymphomen erkannte man, dass sich eine Gruppe von HL molekularbiologisch und morphologisch anders verhielt als die meisten HL-Subtypen [33, 34]. Die Unterschiede im Immunphänotyp und im klinischen Verhalten veranlassten die European Task Force dazu die Klassifikation der Hodgkin-Lymphome zu überdenken und anzupassen. Somit wurde eine neue Entität, das nodulär lymphozyten-prädominante Hodgkin-Lymphom (NLP-HL), gegenüber dem klassischen Hodgkin-Lymphom (c-HL) abgegrenzt.

Wie wichtig die Erkenntnis durch die Immunphänotypisierung ist und von welchem Nutzen sie ist, verdeutlicht die Studie von R. von Wasielewski et al. [35]. Sie zeigt, dass allein durch die bisherige morphologische und klinische Diagnostik der Hodgkin-Lymphome Fehldiagnosen getroffen wurden. Mittlerweile fordert man daher immer eine Immunphänotypisierung.

Gerade bei Fällen, in denen der Pathologe bei einer Diagnose unsicher ist, besonders in klinisch unklaren Fällen, hilft diese Art der Diagnostik in besonderem Maße. Auch in histologischen Grenzfällen ist eine Immunphänotypisierung wichtig. Beispiele dafür sind Grenzfälle zwischen NLP- und c-HL, LP und MC und T-Zell/histiozytenreiches B-Zell-Lymphom [6, 36] oder lymphozytenarmes c-HL gegenüber dem Anaplastic Large Cell Lymphom (ALCL).

So ist es möglich auf Grund histologischer und phänotypischer Eigenschaften die zwei Hauptentitäten des HL in einen klassischen Typ mit vier Subtypen (LR, NS, MC, LD) und einen nodulär lymphozyten-prädominanten Typ zu unterteilen. Die jeweiligen Normalzellen entsprechen also B-Lymphozyten unterschiedlicher Entwicklungsstadien:

- Klassisches Hodgkin-Lymphom (c-HL) – H-/RS-Zellen haben somatisch hypermutierte Ig-Gene und produzieren keine Antikörper. Ihre Apoptoseresistenz ist noch nicht geklärt. Die Lokalisation und der Immunphänotyp sprechen für postfollikuläre B-Lymphozyten. Die H-/RS-Zellen exprimieren CD30 und CD15 als typische Antigene, in 20-50% sind sie assoziiert mit EBV. Es besteht eine zweigipflige Häufigkeit der Erkrankung, nämlich im Alter um das 30. und um das 60. Lebensjahr.
- NLP-HL – Die Tumorzellen produzieren Antikörper und befinden sich im Zyklus der somatischen Hypermutation und entsprechen damit den blastären B-Lymphozyten der Keimzentrumsreaktion. In diesem Stadium sorgt das Enzym „aktivierungsinduzierte (Cytidine-)Deaminase“ (AID) für eine gegenüber normalen somatischen Zellen drastisch erhöhte Mutationsrate der Immunglobulingene, um eine große Varianz an Antikörpern zu erzeugen. Auf diese Weise erhöht sich die Chance, Antikörper höchster Affinität zum Antigen zu erhalten [37]. Eben dieses Prinzip steht im Verdacht, durch deregulierte AID-Aktivität genomweite Mutationen zu erzeugen und Lymphome zu begünstigen. Die Tumorzellen des NLP-HL exprimieren kein CD30 und CD15, aber das B-Zell-typische Oberflächenantigen CD20, Immunglobuline und das epitheliale Membranantigen (EMA). Es besteht keine Assoziation mit EBV [15]. Das Alter der Patienten bei Erstdiagnose ist um die vierte Dekade. Patienten mit NLP-HL haben eine zunehmend höhere Frequenz von Rückfällen, aber bessere Überlebenschancen verglichen mit c-HL-Patienten (NS, LR, MC) [4, 6, 15, 16].

Im klassischen HL wie im NLP-HL stammen die H-/RS-Zellen von Keimzentrums-B-Zellen ab. Es bestehen Mutationen von antigen-spezifischen B-Zellen in Fällen des NLP-Hodgkin-Lymphoms und „verkrüppelte“ Keimzentrums-B-Zellen mit Verlust der Fähigkeit zur Expression von Antigen-Rezeptoren in Fällen des klassischen Hodgkin-Lymphoms.

Die Beobachtungen dieser Arbeit bestätigen die oben genannten Phänomene. Fälle mit klassischem Hodgkin-Lymphom zeigten starke Expressionen des

CD30- und des CD15-Antigens in 97% und 63%, während die Expression von CD30 bei NLP-Hodgkin-Lymphomen nur in 4% der Fälle zu erkennen war und eine CD15-Expression in keinem der 52 Fälle vorlag. Die CD20-Expression in NLP-HL verhielt sich dagegen reziprok. In 95% war eine Expression des CD20 in den insgesamt 57 Fällen detektiert worden, bei der Entität des c-HL dagegen nur in 5% der Fälle. Genauso verhielt es sich mit der Expression des CD79a-Antigens, das auch nur in 5% der c-HL-Fälle zu erkennen war, beim NLP-HL jedoch zu 54% (vergleiche auch Tabelle 8).

Pax-5 codiert das B-Zell-spezifische Aktivierungsprotein (BSAP), beeinflusst die Expression von CD20 und kommt in beiden Entitäten vor. Pax-5 ist ein essentieller Transkriptionsfaktor für die B-Zell-Entwicklung in frühen Entwicklungsstadien und hat eine Schlüsselfunktion bei der Reifung der B-Zelle und ihrer Identität als B-Lymphozyt [38, 39]. Die meisten H-/RS-Zellen der Hodgkin-Lymphome exprimieren Pax-5, wobei die von Pax-5 regulierten Gene wie zum Beispiel CD79a, CD20 etc. in diesen Zellen auch downreguliert sein können.

Die Expression von Pax-5 im NLP-Hodgkin-Lymphom betrug 90% bei einer CD20-Expression von 95%. Im c-HL lag die Expression von Pax-5 66%, die von CD20 nur bei 5% (Tabelle 8).

Man nimmt an, dass durch Zusammentreffen von verminderter Expression der Oberflächenmarker [40], verkrüppelter Genexpression und das Vorkommen von somatischen Deletionsmutationen in Immunglobulin-Genen („crippling“) die H-/RS-Zellen von präapoptotischen B-Zellen aus dem Keimzentrum abstammen [8, 31, 41, 42].

Trotz der mittlerweile sehr gut bekannten histologischen und klinischen Merkmale der Erkrankung konnte erst durch die Phänotypisierung und die molekulare Charakterisierung ein genaueres Bild über die Tumorgenese entstehen [33]. Dazu trugen methodisch die vielseitigen

Verwendungsmöglichkeiten der Immunhistochemie [15], der PCR und der In-situ-Hybridisierung bei. Effektiv ausschöpfbar sind diese Verfahren in Kombination mit der kosten- und zeitsparenden Technik der Erstellung der Tissue-Microarrays, bei der bis zu 1000 Gewebestanden in gleicher Weise behandelt werden können.

Es sind auch einige wenige Fälle beschrieben worden, in denen nachweislich die Tumorzellen von T-Lymphozyten abstammen. Man konnte durch die PCR-Technik eine typische DNA-Sequenz von T-Zell-Rezeptoren feststellen [43, 44].

Inhalt dieser Arbeit war es auch, die Verteilung der T-Zell-typischen Antigene auf den Tumorzellen des Hodgkin-Lymphoms zu erfassen. Trotz einer zu 98%igen B-Zell-Abstammung der H-/RS-Zellen und einer nur 2%igen T-Zell-Abstammung exprimieren die Tumorzellen in beiden Entitäten T-Zell-typische Antigene [34, 43, 45].

Diese ist bisher die größte Untersuchung von T-Zell-Markern auf Tumorzellen des klassischen und erstmalig auch des nodulär lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphoms. Übereinstimmend zu vorherigen Studien [45, 46] ist die Expression von T-Zell-Markern im klassischen Hodgkin-Lymphom selten. Das lymphozyten-prädominante Hodgkin-Lymphom hingegen zeigt eine bis zu 6-fach gesteigerte T-Zell-Marker-Expression auf seinen Tumorzellen, trotz deutlicher Expression von B-Zell-Markern. Tzankov et al. [45] sprechen in ihrer Untersuchungsserie mit 259 c-HL von 5%iger T-Zell-Marker-Expression, NLP-HL wurden nicht untersucht. Im Gegensatz dazu findet sich in den 1147 hier untersuchten c-HL-Fällen sogar eine T-Zell-Marker-Expression von insgesamt 20% (230 Fälle). Die von Tzankov et al. gefundene Rangordnung der Expressionshäufigkeit im c-HL (CD2 > CD4 > CD3 > CD5 > CD8) weicht von der hier entdeckten Häufigkeit nur in den Antikörpern CD3 und CD5 ab: Perforin >> CD4 > CD5 > CD3 > CD8 > GranzymB > TIA-1 > CD7.

Von 65 untersuchten Fällen mit NLP-HL wurde eine T-Zell-Marker-Expression von 62% gefunden mit einer Ausprägungshäufigkeit von Perforin > CD4 > CD3

> CD 5 > CD8 > TIA-1 > GranzymB. Hier war die weit größere Häufigkeitsverteilung von CD3 und CD5 mit jeweils 10% umgekehrt zu der Häufigkeit des c-HL mit CD3 von nur 2% und CD5 3%. In 2 c-HL-Fällen (0,2%) waren CD7-positiv zu erkennen, während Tzankov et al. diese Immunfärbung nicht benutzten. In 31 Fällen der c-HL und in 7 Fällen der NLP-HL sind Mehrfach-Expression von T-Zell-Marker auf den H-/RS-Zellen zu beobachten. In klassischen Hodgkin-Lymphomen können sich bis zu drei verschiedene T-Zell-Antigene auf einer H-/RS-Zelle präsentieren. In Fällen der NLP-HL zeigten sich auch bis zu vier T-Zell-Antigene in den H-/RS-Zellen.

Antikörper wie Perforin, GranzymB, TIA-1 wurden zur Darstellung zytotoxischer T-Zell-Marker in dieser Arbeit verwendet. Gerade Perforin zeigte sich beim c-HL in 11% und im NLP-HL sogar in 18%, was den größten Teil der Gesamtexpression aller T-Zell-Marker ausmacht. Die Frequenz von GranzymB- und der TIA-1-Expression war in den beiden Entitäten umgekehrt und betrug 2% GranzymB bei NLP-HL und 1% GranzymB bei c-HL sowie 5% in TIA-1 bei NLP-HL, während beim c-HL nur ca. 1% eine TIA-1-Expression aufwiesen.

Perforine, die dem Komplementfaktor C9 entsprechen, sind in den Granula der NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen gespeichert. Im Rahmen der unspezifischen Abwehr kommt es zur Aktivierung der Kaskade des Komplementsystems, an deren Ende ein Membranangriffskomplex (C5-C9) steht. Bei Erkennung eines MHC-I-gebundenen körperfremden Antigens auf einer Zielzelle wird dieser Komplex freigesetzt. Dieser veranlasst eine Porenbildung in die Zellmembran der Zielzelle, durch die Proteasen wie GranzymB ins Zellinnere gelangen und, vermutlich durch die Spaltung des in sämtlichen Zellen vorhandenen Enzyms CPP-32, eine Zytolyse und nachfolgend die Apoptose auslösen [47]. Die Tatsache, dass GranzymB und/oder Perforin in einer H-/RS-Zelle gespeichert ist, könnte einen Selektionsvorteil für die Tumorzelle darstellen, was noch zu untersuchen bleibt.

Die deutlich gesteigerte Expression der T-Zell-phänotypischen Antigene im NLP-HL ist derzeit ungeklärt, obwohl oder gerade weil durch die vermehrte B-Zell-Marker-Expression und Antikörperproduktion der H-/RS-Zellen des NLP-HL diese dadurch den B-Zellen aus dem Keimzentren am nächsten stehen.

Es ist auch weiterhin unklar, durch welchen pathophysiologischen Mechanismus diese T-Zell-Marker entstehen. Die Diskrepanz zwischen der genotypischen Herkunft und der phänotypischen Ausprägung von T- und B-Zell-Markern kann eigentlich nur durch Defekte in der Genexpression der Zelllinie der H-/RS-Zellen im Sinne einer Dedifferenzierung erklärt werden [39, 40, 45]. Die Dedifferenzierung einer Tumorzelle befähigt eine eigentlich schon ausgereifte Zelle Zellantigene aus unreiferen Stadien des Zelltyps zu exprimieren. Diese Zellmarker können aus einer gemeinsamen oligo-/pluripotenten lymphozytären Stammzelle oder aus anderen Vorstadien entstehen. Die Annahme, dass die H-/RS-Zellen aus einer Zellfusion von B- und T-Zellen entstehen, konnte durch eine unterschiedliche Präsenz der Ig loci auf der DNA dieser Zellen widerlegt werden [41].

Diese „Untreue der Zelllinien-Abstammung“, wie es Tzankov et al. [45] beschreiben, skizziert vermutlich ein häufiges Phänomen, das bei der Lymphomgenese nicht nur bei Hodgkin-Lymphomen, sondern auch in anderen Non-Hodgkin-Lymphomen zu beobachten ist.

Asano et al. [48] überprüften eine Assoziation zwischen der Immunphänotypisierung der H-/RS-Zellen und dem klinischen Verlauf der Erkrankung. Sie befanden, dass die Präsenz von T-Zell- und/oder zytotoxischen Antigenen in H-/RS-Zellen des c-HL ein signifikantes und damit unabhängiges prognostisches Zeichen für einen ungünstigeren Krankheitsverlauf des klassischen Hodgkin-Lymphoms darstellt. Daher wird im Rahmen der pathologischen Routinediagnostik des klassischen Hodgkin-Lymphoms empfohlen, eine immunhistochemische Untersuchung der T-Zell-Marker zu veranlassen.

Der biologische Hintergrund für die Expression von T-Zell-Markern auf H-/RS-Zellen mag der Versuch der Tumorzellen sein, die fehlende Signalkaskade zu umgehen, um einen alternativen Weg der Signalkaskade über T-Zell-typische Rezeptoren wie CD3, CD4, CD5 und CD8, die ebenfalls Tyrosinkinasen aktivieren, einen Zellzyklus aufrechtzuhalten [33, 41, 45, 49].

Letzten Endes besteht noch die Frage in der Pathogenese des HL, welche Rolle die zelluläre Interaktion mit den Nachbarzellen, den Bystander-Zellen im inflammatorischen Begleitinfiltrat, im Bezug zu einem Selektionsvorteil spielt, da die H-/RS-Zellen einer Apoptose entkommen [28, 29]. Inwieweit eine Expression der T-Zell-Marker in H-/RS-Zellen durch Zytokine im Zellmilieu der verschiedenen Subtypen unterstützt wird und inwieweit das inflammatorische Begleitinfiltrat bei der Pathogenese eine Rolle spielt, wäre noch ein wichtiger Aspekt zur Klärung der Pathogenese und zum besseren Verständnis der Hodgkin-Lymphome [50-54].

4.3 Ist Hodgkin-Lymphom des Alters (≥ 60 Jahre) eine eigenständige Entität? Welche Rolle spielen EBV und Mikrosatelliten-Instabilität?

Die WHO-Klassifikation der Tumore des hämatolymphoiden Gewebes basierend auf der Kiel- und REAL-Klassifikation gliedert sich hierarchisch in Krankheitsentitäten, d.h. diagnostizierbare Erkrankungen auf Grund morphologischer, immunphänotypischer und genotypischer Eigenschaften, sowie ihrer klinischen Erscheinungsbilder. Ätiologie und Pathogenetik als Konzept der Entitäten sind relevant für die klinische Vorgehensweise [2, 34]. Die definierten Entitäten sind teilweise noch in Varianten und prognostische Faktoren unterteilt. Besondere Morphologie oder Klinik werden als Varianten (z.B. T-Zell-reiches B-Zell-Lymphom) oder Subtypen (z.B. noduläre Sklerose des c-HL) innerhalb der Entitäten beschrieben.

Die WHO klassifiziert Immundefizienz-assoziierte lymphoproliferative Erkrankungen (LPDs) und unterteilt diese in vier Hauptgruppen:

- 1) LPDs assoziiert mit primären Immundefizienz-Syndromen und anderen primären Immunerkrankungen
- 2) Lymphome assoziiert mit HIV-Infektion
- 3) Posttransplantierte LPDs nach Organ- oder Stammzell-Transplantationen [55]
- 4) Methotrexat-assoziierte LPDs meist bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen [1, 14]

Said [56] teilt die c-HL zusätzlich in eine fünfte Gruppe ein, die Hodgkin-ähnlichen Lymphozytenproliferationen inklusive der Epstein-Barr-Virus-positiven B-Zell-lymphoproliferativen Erkrankungen, wie es Oyama et al. beschreiben [9]. EBV-assoziierte LPDs ohne Immundefizienz kämen vor allem bei älteren Patienten vor. Aus diesem Grund schlagen Oyama et al. eine Umbenennung der Hodgkin-ähnlichen Lymphome ohne Immundefizite des höheren Alters vor. Die Bezeichnung „senile“- oder „age-related“- EBV-assoziierte B-Zell-lymphoproliferative Erkrankung (LPD) solle ebenfalls als eigenständige Erkrankung angesehen werden [9, 13].

Nach der oben erwähnten Definition der Einteilung von Varianten, Subtypen und der Entitäten gemäß der WHO-Klassifikation besteht keine Möglichkeit, die Umbenennung oder genauer gesagt die Hodgkin-Lymphome des Alters als eigenständige Erkrankung anzuerkennen, da keine eigene Morphologie, Immunphäno- oder Genotypen oder klinischen Erscheinungsbilder im Unterschied zu den klassifizierten Immundefizienz-assoziierten LPDs erkennbar sind. Die Hodgkin-Lymphome des Alters als einen neuen Subtyp des klassischen Hodgkin-Lymphoms zu bezeichnen, ist nach den Ergebnissen in dieser Studie auch nicht angebracht. Bei insgesamt 100 untersuchten Patientenfällen im Alter von ≥ 60 Jahren sind beide Entitäten des Hodgkin-Lymphoms (8 Fälle (8%) des nodulär lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphoms) sowie auch alle Subtypen des klassischen Hodgkin-Lymphoms vertreten. Dieser Befund spricht daher gegen die Überlegung, das Hodgkin-

Lymphom des Alters als age-related LPD, eine eigene Entität oder Subtyp ist [9, 13].

EBV-assoziierte LPDs haben eine zunehmende Tendenz im Alter und äußern sich häufig charakteristisch mit einem extranodalen Befall [13]. Es wird vermutet, dass diese Erkrankungen durch eine im Alter abnehmende Immunkompetenz entstehen [10, 57, 58]. In Anbetracht des inflammatorischen Begleitinfiltrats, was den größten Teil des Hodgkin-Lymphoms ausmacht, stellt sich die Frage, inwieweit die Tumorzellen an sich sowie mit zusätzlicher T-Zell-Marker-Expression in H-/RS-Zellen durch Zytokine des Entzündungsinfiltrats unterstützt werden. Bekannt ist, dass eine dauerhaft latente Entzündung, ausgelöst durch Mikroben, Schadstoffe oder einen genetischen Defekt im Gewebe, Tumorerkrankungen begünstigt [52-54].

30-50% aller Hodgkin-Lymphome zeigen eine EBV-Positivität. Das Virus ist klonal in den malignen Zellen lokalisiert. EBV-positive Hodgkin-Lymphome kommen häufiger im Kindesalter, bei älteren Erwachsenen (> 45 Jahre) und im Mischtyp vor. Die Überlebensrate der Hodgkin-Lymphome im höheren Alter mit einer EBV-Positivität und bei immunsupprimierten Patienten ist deutlich geringer [11, 56, 58, 59]. Seit vielen Jahren ist bekannt, dass EBV eine pathogene Rolle bei EBV-positiven Hodgkin-Lymphom-Fällen spielt. Es gibt Hinweise darauf, dass EBV-positive H-/RS-Zellen der Apoptose entkommen [7, 57, 60-62].

Übereinstimmend mit der oben genannten Literatur findet sich in dieser Arbeit ebenfalls im Alter von ≥ 60 Jahren ein erhöhtes Auftreten EBV-positiver Fälle. Zytotoxische T-Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle in der Limitierung vom proliferativen Potential der EBV-infizierten Zellen. Studien an gesunden Virusträgern zeigen, dass EBV-spezifische Gedächtniszellen über HLA Klasse I EBV-infizierte Zellen registrieren und direkt Antikörper gegen virale Proteine exprimieren [63].

In der vorliegenden Studie war zu beobachten, dass gerade die zytotoxischen Antigene im Zytosol der H-/RS-Zellen, wie Perforin und GranzymB, bei Patienten über 60 Jahren eine signifikant höhere Häufigkeit aufweisen. Auch das Oberflächenantigen CD15, ein Molekül, das auf Monozyten und natürlichen Killerzellen vorkommt, war bei diesen Studienteilnehmern signifikant häufiger. Von Wasielewski et al. [35] berichten von schlechteren Prognosen bei Hodgkin-Patienten mit CD15-Negativität, so dass die in dieser Arbeit beobachtete CD15-Positivität im Alter als ein positives immunphänotypisches Merkmal der H-/RS-Zellen gewertet werden kann.

Ob die Mikrosatelliten-Instabilität in der Ätiologie des Hodgkin-Lymphoms eine Rolle spielt, wurde mit den immunhistochemischen Färbungen der DNA-Reparaturenzyme MLH1 und MSH2 untersucht [64]. Diese Enzyme und entsprechend deren „mismatch repair“-Gene zeigen beim Ausfall einen 1000-fachen Anstieg der Mutationsrate im Tumor wie z.B. beim hereditären Kolorektalkarzinom sowie eine genetische Instabilität des Tumors. Das mikroskopische Screening-Verfahren mit der immunhistochemischen Färbung der DNA-Reparaturenzyme wird vor allem beim Darm-Karzinom erfolgreich eingesetzt. Für eine Rolle der Mikrosatelliten-Instabilität in der Ätiologie des Hodgkin-Lymphoms finden sich in dieser Arbeit keine Hinweise. Die immunhistochemische Färbung zeigte in 95 Fällen eine Negativität einer der Reparaturenzyme und in 21 Fällen eine Negativität von beiden. Die fehlende Expression dieser Reparaturenzyme wird als Zeichen für die Mikrosatelliten-Instabilität gewertet. Unterschiede zwischen den Altersgruppen fanden sich in dieser Arbeit nicht. Die nachträgliche Sichtung der 95 Fälle ergab keine Auffälligkeiten, so dass sie als Zufallsbefunde oder Fehlinterpretationen infolge unzureichender Anfärbung der Gewebestanzungen interpretiert werden. Nach Re et al. ist unzureichende Reparatur von Basenfehlpaarungen ohnehin kein Prädiktor für Hodgkin-Lymphome [65].

Die Untersuchung von Engert et al. [66] findet eine häufigere Ausprägung des Mischtyps bei älteren Patienten, was in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden

konnte. Des Weiteren finden sich eine häufigere B-Symptomatik, eine erhöhte Erythrozyten-Sedimentationsrate und ein niedrigerer Karnofsky-Score.

Die Frage ist nun, wodurch die schlechtere Prognose bei älteren Patienten mit Hodgkin-Lymphomen begründet sein mag. In retrospektiven Studien wurden eine schlechtere Therapieantwort und Verträglichkeit bei älteren Patienten mit Hodgkin-Lymphomen dokumentiert [66-68]. Die gebräuchlichen Chemotherapien wie ABVD oder BEACOPP sind aggressive Therapiemaßnahmen, die sich bei jüngeren Hodgkin-Lymphom-Patienten bewährt haben, aber von älteren Patienten unzureichend vertragen werden [68-73]. Wegen einer erhöhten Komorbidität und der häufig labileren physischen Verfassung erhalten laut Erdkamp nur 2% der über 50-jährigen Patienten eine komplette Therapie (34% bei den unter 50-Jährigen) [67]. Die erhöhte Sterblichkeit bei älteren Patienten wird auch nach einer angepassten Überlebenskurve von Guinee nachgewiesen [73], allerdings ohne Berücksichtigung von Todesursachen außerhalb des Lymphoms und seiner Therapiefolgen.

Die höhere Mortalität im Verlauf der Therapie in Verbindung mit der ohnehin verringerten Intensität sei der Hauptgrund der ungünstigen Therapiebilanz im Alter [11, 66].

Belege für eine verringerte Immunkompetenz fanden Fagnoni et al. [10], die die T-Zell-Populationen untersuchten. Im höheren Alter sei die Population der nativen CD4-T-Lymphozyten weit geringer als die der nativen CD4-T-Lymphozyten jüngerer Menschen. Die Population der CD8-T-Lymphozyten sei sogar noch geringer und ginge im hohen Alter gar ganz verloren. Auch andere Autoren berichten von einer herabgesetzten Immunkompetenz im höheren Alter und damit einer unflexibleren Immunadaptation [63, 74].

5 Zusammenfassung

Die histologische Technik der Tissue-Microarrays ist eine sehr effiziente Methode, um eine große Anzahl auch heterogener Lymphome wie des Hodgkin-Lymphoms bei hohem Durchsatz unter homogenen Färbebedingungen zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass ein Probeschnitt zur vorherigen Auswahl stanzwürdigen Tumorareals nicht nötig ist. Die so genannte Blindstanzung trug weniger als einen Prozentpunkt (0,9%) zum Verlust der auswertbaren Fälle bei.

Dennoch war bei einzelnen Parametern (LMP1 und EBER) ein hoher Gewebeverlust zu beobachten. In einer Stichprobe von 2696 Stanzen waren es 24% (631 Stanzen) bedingt durch die Färbetechnik, aber auch durch unterschiedliche Vorbehandlungen und Originalfixationen des Probematerials.

In dieser Studie wurden 1212 Fälle zur Immuntypisierung von Tumorzellen des klassischen und nodulär lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphoms untersucht.

Die Fälle von c-HL wiesen eine häufige Expression von CD30- und CD15-Oberflächenmarkern und kaum B-Zell-Marker auf, während im NLP-HL die Expression in umgekehrter Häufigkeit vorlag.

Diese bisher größte Untersuchung von T-Zell-Markern an H-/RS-Zellen, erstmalig auch an NLP-HL, ergab eine bis zu 6-fach höhere Frequenz in der NLP-HL bei häufigerer B-Zell-Marker-Expression. Die in der Literatur beschriebene Rangordnung der Expressionshäufigkeit von Oberflächenantigenen im c-HL (CD2 > CD4 > CD3 > CD5 > CD8) wurde bestätigt und wich nur in den Markern CD3 und CD5 ab: Perforin >> CD4 > CD5 > CD3 > CD8 > GranzymB > TIA-1 > CD7.

Tzankov et al. [45] fanden in ihrer Untersuchung mit 259 c-HL-Fällen eine Häufigkeit von 5% T-Zell-Marker-Expression. Die vorliegende Arbeit mit 1147 untersuchten c-HL-Fällen kam zum Ergebnis einer deutlich höheren T-Zell-Marker-Expressionshäufigkeit von 20,1%.

Der pathophysiologische Mechanismus der T-Zell-Marker-Expression ist bis heute noch unklar, könnte aber als eine alternative Signalkaskade zur Aufrechterhaltung des Zellzyklus unter geändertem Zellmilieu gedeutet werden.

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit betraf die Gruppe der Studienteilnehmer 60 Jahre und älter, um Hinweisen auf das „age-related“ EBV-associated Lymphom und der Rolle der Mikrosatelliten-Instabilität nachzugehen. So fand sich eine signifikante Häufung von Markern für eine EBV-Infektion (EBER, LMP1) in der Gruppe der über 60-Jährigen. Die Expression von DNA-Reparaturenzymen, deren Ausbleiben auf Mikrosatelliten-Instabilität gedeutet hätte, unterschied sich zwischen jüngeren und älteren Studienteilnehmern nicht.

6 Literaturverzeichnis

1. Jaffe ES, H.N., Stein H, Vardiman JW, Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization Classification of Tumours. 2001, Lyon: IARC Press.
2. Rudiger, T. and H.K. Muller-Hermelink, [WHO-classification of malignant lymphomas]. Radiologe, 2002. 42(12): p. 936-42.
3. Boecker, W., Denk H., Heitz, Ph. U., Pathologie. Vol. 3. 2004, München: Elsevier GmbH.
4. Riede U.-N., B., L., Allgemeine und Spezielle Pathologie. Vol. 5. 2004, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
5. Herold, G.e.a., Innere Medizin, eine vorlesungsorientierte Darstellung. 2007, Köln.
6. Rüdiger, T., Diagnostik und Differentialdiagnose der Hodgkin-Lymphome Der Onkologe, 2000. 6(12): p. 1142-1150.
7. Kuppers, R., B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. Nat Rev Immunol, 2003. 3(10): p. 801-12.
8. Kanzler, H., et al., Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. J Exp Med, 1996. 184(4): p. 1495-505.
9. Oyama, T., et al., Senile EBV+ B-cell lymphoproliferative disorders: a clinicopathologic study of 22 patients. Am J Surg Pathol, 2003. 27(1): p. 16-26.
10. Fagnoni, F.F., et al., Shortage of circulating naive CD8(+) T cells provides new insights on immunodeficiency in aging. Blood, 2000. 95(9): p. 2860-8.
11. Stark, G.L., et al., Hodgkin's disease in the elderly: a population-based study. Br J Haematol, 2002. 119(2): p. 432-40.
12. Szekely, D.R. and J.A. Lee, Age-related differences in the trends of fatal Hodgkin's disease as a consequence of immune experience. Cancer Res, 1977. 37(12): p. 4568-71.

13. Oyama, T., et al., Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(17): p. 5124-32.
14. Landgren, O., et al., Autoimmunity and susceptibility to Hodgkin lymphoma: a population-based case-control study in Scandinavia. *J Natl Cancer Inst*, 2006. 98(18): p. 1321-30.
15. Harris, N.L., The many faces of Hodgkin's disease around the world: what have we learned from its pathology? *Ann Oncol*, 1998. 9 Suppl 5: p. S45-56.
16. Sextro, M., et al., Lymphocyte predominant Hodgkin's disease--a workshop report. European Task Force on Lymphoma. *Ann Oncol*, 1996. 7 Suppl 4: p. 61-5.
17. Stevens A., L.J., *Pathologie*. 1997, Berlin, Wiesbaden: Ullstein Mosby.
18. Hasenclever, D., The disappearance of prognostic factors in Hodgkin's disease. *Ann Oncol*, 2002. 13 Suppl 1: p. 75-8.
19. Weiss, L.E., *Basiswissen Medizinische Statistik*. Vol. 2. 2002, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
20. Kallioniemi, O.P., et al., Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*, 2001. 10(7): p. 657-62.
21. Hedvat, C.V., et al., Application of tissue microarray technology to the study of non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma. *Hum Pathol*, 2002. 33(10): p. 968-74.
22. Kononen, J., et al., Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 1998. 4(7): p. 844-7.
23. Hoos, A., et al., Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol*, 2001. 158(4): p. 1245-51.
24. Camp, R.L., L.A. Charette, and D.L. Rimm, Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*, 2000. 80(12): p. 1943-9.

25. Meister, S., Etablierung und Validierung eines Gewebemicroarrays für Non-Hodgkin-Lymphome 2003, Pathologie: Würzburg.
26. Tzankov, A., et al., High-throughput tissue microarray analysis of G1-cyclin alterations in classical Hodgkin's lymphoma indicates overexpression of cyclin E1. *J Pathol*, 2003. 199(2): p. 201-7.
27. Mucci, N.R., et al., Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression. *Hum Pathol*, 2000. 31(4): p. 406-14.
28. Garcia, J.F., et al., Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood*, 2003. 101(2): p. 681-9.
29. Kuppers, R., M.L. Hansmann, and K. Rajewsky, Clonality and germinal centre B-cell derivation of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Ann Oncol*, 1998. 9 Suppl 5: p. S17-20.
30. Hummel, M., et al., Hodgkin's disease with monoclonal and polyclonal populations of Reed-Sternberg cells. *N Engl J Med*, 1995. 333(14): p. 901-6.
31. Kuppers, R. and K. Rajewsky, The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol*, 1998. 16: p. 471-93.
32. Delabie, J., et al., Lymphocyte predominance Hodgkin's disease: lineage and clonality determination using a single-cell assay. *Blood*, 1994. 84(10): p. 3291-8.
33. Pileri, S.A., et al., Hodgkin's lymphoma: the pathologist's viewpoint. *J Clin Pathol*, 2002. 55(3): p. 162-76.
34. Harris, N.L., et al., World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol*, 1999. 17(12): p. 3835-49.
35. von Wasielewski, R., et al., Classical Hodgkin's disease. Clinical impact of the immunophenotype. *Am J Pathol*, 1997. 151(4): p. 1123-30.

36. Rudiger, T., et al., Differential diagnosis between classic Hodgkin's lymphoma, T-cell-rich B-cell lymphoma, and paragranuloma by paraffin immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*, 1998. 22(10): p. 1184-91.
37. Muramatsu, M., et al., Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, 2000. 102(5): p. 553-63.
38. Foss, H.D., et al., Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin. *Blood*, 1999. 94(9): p. 3108-13.
39. Schwering, I., et al., Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2003. 101(4): p. 1505-12.
40. Hertel, C.B., et al., Loss of B cell identity correlates with loss of B cell-specific transcription factors in Hodgkin/Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Oncogene*, 2002. 21(32): p. 4908-20.
41. Kuppers, R., et al., Biology of Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*, 2002. 13 Suppl 1: p. 11-8.
42. Kuppers, R., et al., Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. *J Clin Invest*, 2003. 111(4): p. 529-37.
43. Seitz, V., et al., Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood*, 2000. 95(10): p. 3020-4.
44. Muschen, M., et al., Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med*, 2000. 191(2): p. 387-94.
45. Tzankov, A., et al., Rare expression of T-cell markers in classical Hodgkin's lymphoma. *Mod Pathol*, 2005. 18(12): p. 1542-9.
46. Casey, T.T., et al., Immunophenotypes of Reed-Sternberg cells: a study of 19 cases of Hodgkin's disease in plastic-embedded sections. *Blood*, 1989. 74(8): p. 2624-8.
47. Silbernagl S., L.F., *Taschenatlas der Pathophysiologie*. 1998, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

48. Asano, N., et al., Prognostic significance of T-cell or cytotoxic molecules phenotype in classical Hodgkin's lymphoma: a clinicopathologic study. *J Clin Oncol*, 2006. 24(28): p. 4626-33.
49. Marafioti, T., et al., Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood*, 2000. 95(4): p. 1443-50.
50. Balkwill, F. and A. Mantovani, Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 2001. 357(9255): p. 539-45.
51. Balkwill, F. and L.M. Coussens, Cancer: an inflammatory link. *Nature*, 2004. 431(7007): p. 405-6.
52. Balkwill, F., K.A. Charles, and A. Mantovani, Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 2005. 7(3): p. 211-7.
53. de Visser, K.E., A. Eichten, and L.M. Coussens, Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(1): p. 24-37.
54. Stix, G., A malignant flame. Understanding chronic inflammation, which contributes to heart disease, Alzheimer's and a variety of other ailments, may be a key to unlocking the mysteries of cancer. *Sci Am*, 2007. 297(1): p. 60-7.
55. Muller-Hermelink, H.K., et al., [The spectrum of lymphoproliferations and malignant lymphoma after organ transplant]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 2004. 88: p. 63-8.
56. Said, J.W., Immunodeficiency-related Hodgkin lymphoma and its mimics. *Adv Anat Pathol*, 2007. 14(3): p. 189-94.
57. Jarrett, R.F., et al., Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study. *Blood*, 2005. 106(7): p. 2444-51.
58. Clarke, C.A., et al., Epstein-Barr virus and survival after Hodgkin disease in a population-based series of women. *Cancer*, 2001. 91(8): p. 1579-87.

59. Gandhi, M.K., J.T. Tellam, and R. Khanna, Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*, 2004. 125(3): p. 267-81.
60. Jarrett, R.F., et al., Detection of Epstein-Barr virus genomes in Hodgkin's disease: relation to age. *J Clin Pathol*, 1991. 44(10): p. 844-8.
61. Glaser, S.L., et al., Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer*, 1997. 70(4): p. 375-82.
62. Altmann, M. and W. Hammerschmidt, Epstein-Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis. *PLoS Biol*, 2005. 3(12): p. e404.
63. Frisan, T., et al., Local suppression of Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxicity in biopsies of EBV-positive Hodgkin's disease. *Blood*, 1995. 86(4): p. 1493-501.
64. Pinol, V., et al., Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA*, 2005. 293(16): p. 1986-94.
65. Re, D., et al., Proficient mismatch repair protein expression in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Int J Cancer*, 2002. 97(2): p. 205-10.
66. Engert, A., et al., Hodgkin's lymphoma in elderly patients: a comprehensive retrospective analysis from the German Hodgkin's Study Group. *J Clin Oncol*, 2005. 23(22): p. 5052-60.
67. Erdkamp, F.L., et al., Hodgkin disease in the elderly. A registry-based analysis. *Cancer*, 1992. 70(4): p. 830-4.
68. Enblad, G., B. Glimelius, and C. Sundstrom, Treatment outcome in Hodgkin's disease in patients above the age of 60: a population-based study. *Ann Oncol*, 1991. 2(4): p. 297-302.
69. Proctor, S.J., et al., Hodgkin's disease in the elderly: current status and future directions. *Ann Oncol*, 2002. 13 Suppl 1: p. 133-7.
70. Bosi, A., et al., Clinical data and therapeutic approach in elderly patients with Hodgkin's disease. *Haematologica*, 1989. 74(5): p. 463-73.

71. Diaz-Pavon, J.R., et al., Outcome of Hodgkin's disease in elderly patients. *Hematol Oncol*, 1995. 13(1): p. 19-27.
72. Eghbali, H., et al., Hodgkin's disease in the elderly. A series of 30 patients aged older than 70 years. *Cancer*, 1984. 53(10): p. 2191-3.
73. Guinee, V.F., et al., The prognosis of Hodgkin's disease in older adults. *J Clin Oncol*, 1991. 9(6): p. 947-53.
74. Armstrong, A.A., et al., Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: further evidence for the three disease hypothesis. *Leukemia*, 1998. 12(8): p. 1272-6.

Danksagung:

Herrn Professor Dr. Müller-Hermelink danke ich für die Überlassung dieses Themas und die gute Betreuung in der Endphase dieser Arbeit.

Ein Dank gilt Herrn Professor Dr. Rüdiger für die Betreuung in der Entstehungsphase und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Martina Hartmann bedanken, die mir bei der Einarbeitung in die notwendige Methodik zur Seite stand. Ebenfalls danken möchte ich Herrn Dr. Patrik Adam für seine Hilfe bei allen technischen und organisatorischen Fragen. Ein Dank geht auch an Prof. Suat-Cheng Peh, Malaysia, für die Einführung in die mikroskopische Arbeit. Für die freundliche Zusammenarbeit im Labor bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des hämatologischen Labors sowie bei Petra Stempfle.

Meinem Bruder, Philipp Müller, gilt mein Dank für die Geduld und große Hilfe bei allen Computerproblemen. Herrn Dr. Bernhard Puppe danke ich für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Meinen Eltern, Elke und Dr. Dieter Müller, danke ich für die Liebe, das Vertrauen und die Unterstützung, die ich in allen Phasen dieser Arbeit und darüber hinaus erleben durfte. Ein herzlicher Dank gilt auch meiner Familie.

Tabellarischer Lebenslauf:

Name: Schnabel, geb. Müller

Vorname: Katrin Anne

Geburtsdatum: 11.06.1974

Geburtsort: Lich/Hessen

Staatsbürgerschaft: deutsch

Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Bildungsweg:

1980 - 1985 Grundschule in Ober-Rosbach

1985 - 1994 Gymnasium St. Lioba - Schule in Bad Nauheim

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Beruflicher Werdegang:

1994 - 1997 Physiotherapie-Ausbildung in Konstanz

Abschluss: Staatsexamen

1997 - 2000 Beschäftigung als Physiotherapeutin in verschiedenen Kliniken und Praxen in München, Tettngang/Allgäu, Friedberg/Hessen

2000 - 2006 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg

07.06.2006 Ärztliche Prüfung

12.06.2006 Approbation

09/2006 - 04/2007 Klinik Porta Westfalica, Bad Oeynhausen, Zentrum für Konservative Orthopädie in der Fachabteilung für Orthopädie/Rheumatologie, Unfallchirurgische Rehabilitation/Sporttraumatologie,

01/2008 - 12/2009 Katholische Kliniken Essen Nord-West, St. Vincenz Krankenhaus, Innere Medizin, Fachabteilung für Kardiologie

Seit 01/2010 Hochtaunus-Kliniken Bad Homburg, Medizinische Klinik 2, Gastroenterologie

