

Aus dem Institut für Pathologie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. A. C. Feller

Das primäre gastrointestinale folliculäre Lymphom

Eine morphologische, immunhistochemische und molekulargenetische Analyse

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von

Torge Huckhagel

aus Husum

Lübeck 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Thorns

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Klinger

Tag der mündlichen Prüfung: 12.9.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.6.2013

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Einleitung	5
Fragestellung	13
Material und Methoden	14
- Morphologie	15
- Immunhistochemie	16
- Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	20
- Statistik und biometrische Beratung	22
Ergebnisse	23
- Allgemeine und morphologische Resultate	23
- Immunhistochemische Befunde	28
- FISH-Ergebnisse	46
Diskussion	53
- Morphologische Aspekte	55
- Kontext der immunhistochemischen Ergebnisse	57
- Aspekte der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	61
- Gesamtbetrachtung	63
Zusammenfassung	64
Literaturverzeichnis	65
Anhang	70
Danksagung	76
Tabellarischer Lebenslauf	77
Publikation	77

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung im Text	Vollständige Bezeichnung
AK	Antikörper
BLIMP	B-Lymphozyten-induziertes-Maturationsprotein
CD	Cluster of Differentiation
DLBCL	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
FDC	follikuläre dendritische Zelle
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FL	follikuläres Lymphom
FLIPI	internationaler Prognoseindex für folliculäre Lymphome
FLIS	follikuläres Lymphom in situ
GIFL	primär gastrointestinale folliculäre Lymphome
GLSG	deutsche Studiengruppe für niedriggradige Lymphome (German Lymphoma Study Group)
hpf	high power field (=0,159 mm ²)
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
ILSG	internationale Lymphomstudiengruppe (International Lymphoma Study Group)
IPI	internationaler Prognoseindex
KM	Knochenmark
LEL	lymphoepitheliale Läsionen
NFL	nodale folliculäre Lymphome
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
OS	Gesamtüberleben (Overall Survival)
p	P-Wert
REAL-Klassifikation	revidierte europäisch-amerikanische Lymphom-Klassifikation
UFL	unselektionierte folliculäre Lymphome
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Einleitung

Definition des Begriffes "Lymphom", Einordnung in den Kontext maligner Neoplasien und Inzidenzentwicklung

Unter einem Lymphom ist zunächst einmal ganz allgemein eine maligne Neoplasie aus dem Bereich des lymphatischen Systems zu verstehen. Es handelt sich dabei um einen malignen, autonom proliferierenden Zellklon der B- oder T-Zellreihe. Die einzelnen Entitäten unterscheiden sich dabei durch die Ursprungszelle, deren Derivat der entartete Zellklon ist. Je nach Differenzierungsstufe der Ausgangszelle werden primär niedrig maligne, indolente Prozesse von hochmalignen, aggressiven Prozessen abgegrenzt. Die niedrig malignen Tumoren des lymphatischen Systems weisen eine eher geringe Proliferationstendenz auf und setzen sich hauptsächlich aus differenzierten Zellen mit cytischem Charakter zusammen, während die hochmalignen und aggressiven Neoplasien demgegenüber vor allem aus eher undifferenzierten blastischen Zellen bestehen. Neben der den Tumor formierenden Zellreihe (B versus T) und dem Differenzierungsgrad steht als dritte Grundkomponente noch die primäre Manifestation zur Beschreibung des Lymphoms zur Verfügung. Hier unterscheidet man im wesentlichen nodale von extranodalen Lymphomen, wobei hiermit ausdrücklich die primäre und hauptsächlich Tumorkomponente beschrieben werden soll. Im Verlauf der Erkrankung können sowohl nodale Lymphome auf extranodale Strukturen übergreifen als auch vice versa. Dies ist insbesondere dadurch nachvollziehbar, dass maligne lymphatische Leiden hämatologische Systemerkrankungen darstellen.

Betrachtet man die heterogene Gruppe der Lymphome in Relation zu der Grundgesamtheit aller malignen Neoplasien, so ist der Anteil dieser lymphatischen bösartigen systemischen Erkrankungen mit etwa drei Prozent als eher gering einzustufen. Grundsätzlich lassen sich Lymphome in das Hodgkin-Lymphom und die große Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome unterteilen, die sich voneinander durch klinische, morphologische, immunologische und molekularbiologische Charakteristika abgrenzen lassen. In den letzten Jahrzehnten zeigten sich steigende Inzidenzen für Erkrankungen aus dem Spektrum der Non-Hodgkin-Lymphome. Nach statistischen Auswertungen des Zentrums für Krebsregisterdaten am Robert-Koch-Institut konnte für die Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome in dem Zeitraum von 1980 bis 1995 eine Steigerung der kumulativen Inzidenzen um 150 - 200% gezeigt werden. Hierfür wurden unterschiedliche Erklärungsansätze formuliert. Einerseits ist der Zusammenhang zwischen Infektionen mit dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV) und einem erhöhten Lymphomrisiko seit längerer Zeit bekannt, andererseits werden aus Gründen unterschiedlichster Art zunehmend mehr Patienten einer immunsuppressiven Therapie unterzogen. Hier sind in erster Linie die Prophylaxe von Transplantatabstoßungsreaktionen und die Behandlung von Erkrankungen des autoimmunologischen und rheumatischen Formenkreises zu nennen. Eine Immunsuppression stellt per se eine deutliche Erhöhung des Risikos dar, im Verlauf eine lymphoproliferative Erkrankung zu bekommen. Weiterhin wurden im Rahmen der Erforschung der Pathogenese und beteiligten Prozesse zunehmend neue Entitäten charakterisiert und diese anhand von differenzierteren und sensitiveren Diagnostika auch erkannt. Die jährliche kumulative Inzidenz der malignen Lymphome in den westlichen Industrienationen liegt damit je nach verwendeter Literatur bei aktuell 10-15/100000 Neuerkrankungen. Hierbei treten die Non-Hodgkin-Lymphome etwa viermal häufiger auf als der Morbus Hodgkin.

Abfolge und Evolution der Lymphom-Klassifikationssysteme

Lange Zeit gab es keine allgemeingültigen Kriterien zur Abgrenzung der einzelnen Entitäten und infolge dessen entbehrte man eine überregional akzeptierte und angewandte Klassifikation maligner lymphatischer Erkrankungen. Dies änderte sich jedoch im Jahre 1966, als erstmals mit der sogenannten Rappaport-Klassifikation der Versuch einer integrativen Einteilung unternommen wurde, welche auf einer morphologischen Deskription beruhte. Im folgenden Jahrzehnt kam es zur Konkurrenz zweier Klassifikationssysteme, die sich auch im zeitlichen Verlauf nicht miteinander fusionieren ließen. Es waren dies die Systematik nach Lukes - Collins in den Vereinigten Staaten und die Kiel-Klassifikation von Professor Lennert in Europa. Während das Klassifikationsschema nach Lukes und Collins hauptsächlich auf der nukleären Morphologie beruhte und weiterhin nach der Zugehörigkeit zur B- oder T-Zelllinie einteilte, wählte man in der Kiel-Klassifikation zur Abgrenzung das Prinzip, die einzelnen Lymphomentitäten als Derivate differenter und definierter noch nicht neoplastisch transformierter Ursprungszellen zu betrachten. Somit wurde für jeden Lymphomtypus eine spezifische lymphatische Ursprungszelle in einem bestimmten Stadium der Differenzierung postuliert. Der Antagonismus dieser zwei Systeme ließ sich erst im Jahre 1990 endgültig auflösen, als die „International Lymphoma Study Group“ (ILSG), die mit führenden europäischen und nordamerikanischen Experten besetzt war, die sogenannte REAL-Klassifikation (Revised European-American Classification of lymphoid neoplasms) entwickelte. Den jüngsten Meilenstein dieses Entwicklungsprozesses bildet schließlich die im Auftrage der WHO von der ILSG entwickelte WHO-Klassifikation, die zurzeit in der Version von 2008 allgemeine Verwendung und Akzeptanz findet. Beide letztgenannten Schemata (REAL-Klassifikation und WHO-Klassifikation) beruhen gleichermaßen zu einem wesentlichen Anteil auf den Erkenntnissen und Prinzipien der Kiel-Klassifikation von Professor Lennert. In der WHO-Klassifikation werden sowohl morphologische, als auch klinische, immunologische und nicht zuletzt auch genetische Parameter zur Charakterisierung und Differenzierung der heterogen zusammengesetzten Gruppe der Lymphome verwendet. Grundsätzlich wird hierbei zunächst zwischen Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen unterschieden. Weiterhin teilt man die Non-Hodgkin-Lymphome nach Linienzugehörigkeit in B-, T- oder NK-Zelllymphome ein, wobei sich hier wiederum je nach Reifungsstadium der Ursprungszelle differenzierte von unreifen Neoplasien abgrenzen lassen. Den Großteil der NHL bilden mit ungefähr 85% die NHL der B-Zell-Reihe. Gemäß dem natürlichen Entwicklungsprozess der B-Lymphozyten vom naiven Stadium über die Immigration und nachfolgende antigenabhängige Reifungs- und Proliferationsprozesse im Keimzentrum zum postgerminalen Status unterscheidet man prä-, intra- und postgerminale B-NHL.

Definition des folliculären Lymphoms

Bei dem in dieser Arbeit im Fokus stehenden folliculären Lymphom handelt es sich den oben beschriebenen Kategorien folgend um ein niedrig malignes und intragerminales B-NHL (Keimzentrumslymphom). Diese Neoplasie setzt sich nach der derzeit gültigen Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus Keimzentrums-B-Zellen zusammen, die das Wachstumsmuster des Follikels bezüglich seiner Struktur imitieren und daher zumindest einen partiellen folliculären Charakter in der Morphologie aufweisen (Harris et al. 2008).

Epidemiologie des folliculären Lymphoms

Das folliculäre Lymphom ist nach dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL), welches etwa 30% der NHL ausmacht, die zweithäufigste Art der Non-Hodgkin-Lymphome mit einem ungefähren Anteil von 20 - 25% (Harris et al. 2008; The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project 1997). Hierbei zeigen die Inzidenzen deutliche regionale Unterschiede. Die höchsten Erkrankungsraten treten in den Vereinigten Staaten und Westeuropa auf, während in Osteuropa, den Entwicklungsländern und dem asiatischen Raum ein deutlich geringeres Risiko für ein Keimzentrumslymphom besteht. Die Betroffenen befinden sich im Median in der sechsten Lebensdekade und sind mehrheitlich weiblichen Geschlechtes (Ratio: männlich / weiblich = 1/1,7). Pädiatrisches Patientengut findet sich in dieser Subgruppe der NHL nur selten .

Klinik und Verlauf des folliculären Lymphoms

Klinisch verhält sich das folliculäre Lymphom äußerst heterogen. Es lassen sich zumeist sehr lange und indolente Verläufe verfolgen, die durch häufige Remissionen und Rezidive gekennzeichnet sind. Die langsame Progredienz und die zumeist nur sehr geringfügig ausgeprägten Symptome führen zusammengenommen dazu, dass die Erkrankung in einem überwiegenden Teil der Fälle erst in den fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird und sich nur etwa jeder dritte Patient bei Diagnosestellung in den Stadien 1 oder 2 befindet. Hier lassen sich dann zumeist auch neben einer generalisierten Lymphadenopathie eine Splenomegalie und bei 40 - 70% der Erkrankten eine Knochenmarkinfiltration nachweisen. Weitere mögliche befallene Systeme sind das periphere Blut, der Waldeyer-Rachenring und extranodale Gewebe, hier unter anderem insbesondere der Gastrointestinaltrakt, die Haut, die Mamma oder der Hoden. Selten können diese extranodalen Strukturen auch primär befallen sein. Andererseits treten auch Fälle auf, bei denen es zu einer Transformation in ein diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL) kommt, welche dann wiederum die mittlere Überlebenszeit deutlich reduziert und durch einen rapid progressiven Verlauf charakterisiert ist. Das DLBCL ist eine eigenständige Erkrankung und darf keinesfalls mit dem folliculären Lymphom zusammengefasst werden. Es muss aufgrund seiner deutlich vom FL abweichenden Charakteristika eine separate Betrachtung erfolgen. Die Zeitspanne der möglichen Ausprägungen des FL ist äußerst weit gefasst, so dass einerseits Verläufe von über fünfzehn Jahren möglich sind, andererseits aber auch akzelerierte Prozesse von weniger als drei Jahren ab der Diagnosestellung bis zum Todeseintritt bei zehn bis fünfzehn Prozent der Patienten beobachtet werden können. Diese im zeitlichen Rahmen äußerst differierenden Manifestationen des folliculären Lymphoms verleiten zu der Annahme, dass es sich bei dieser Erkrankung nicht um ein einheitliches Geschehen, sondern vielmehr um zu einer Entität zusammengefasste Subgruppen handelt. Diese Subgruppen konnten in der jüngsten Vergangenheit auch bezüglich bestimmter Parameter voneinander abgegrenzt werden. So unterscheiden sich beispielsweise schnell in ein DLBCL transformierende Tumoren gegenüber langsam progredienten Verläufen durch verschiedene Entwicklungswege, die nach der gemeinsamen primär dem FL zugrundeliegenden Transformation (t14;18) (q32;q21) eingeschlagen werden. Die frühzeitig transformierenden Neoplasien sind mit einer signifikant schlechteren Prognose quoad vitam vergesellschaftet. Während der schnell progrediente Verlauf chromosomale Verluste von 6q und 1p aufweist, zeigt das längerfristig indolente FL chromosomale Zugewinne von der 18q, 7 und 8 (de Jong 2005) . Das mediane Überleben aller Fälle beträgt bei dieser lymphoproliferativen Neoplasie zwischen acht und zehn Jahren. Um den in klinischer Hinsicht variablen Verläufen bezüglich der Prognoseabschätzung gerechter zu werden, wurde ein Index

entwickelt. Dieser sogenannte Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) setzt sich aus 5 Komponenten zusammen. Im Vorfeld war bereits ein International Prognostic Index (IPI) entwickelt worden, der jedoch die aggressiven Non-Hodgkin-Lymphome fokussierte und für das folliculäre Lymphom einer entsprechenden Adaptation bedurfte. Für die Erfüllung jedes Charakteristikums erhält der Patient einen Punkt und durch Addition wird im Anschluss der Gesamtscore ermittelt. Die zugrundeliegenden Kategorien sind im Einzelnen:

1. Alter des Patienten über 60 Jahre
2. Befall von mehr als 4 Lymphknotenstationen
3. Hämoglobinwert unter 12 g/dl
4. fortgeschrittenes Stadium >2 nach Ann Arbor
5. Erhöhung der Laktatdehydrogenase im Serum

Der FLIPI wurde anhand einer großen Fallzahl von 4167 Patienten retrospektiv ausgearbeitet (Solal-Céligny et al. 2004) und im Nachhinein an 919 Patienten extern validiert. Hierbei ergab sich eine gute Reproduzierbarkeit der Einstufung von Fällen in die entsprechende Risikostratifikation. Je nach erreichtem Punktwert wird der Patient in eine von drei möglichen Kategorien eingestuft. Eine Zuordnung in die Niedrigrisikogruppe erfolgt bei maximal einem erfüllten Kriterium. Bei zwei positiven Kriterien liegt ein intermediäres Risiko vor. Drei oder mehr Punkte führen zur Einteilung des Falles in die Hochrisikogruppe. Die verschiedenen Bereiche differieren bezüglich der Langzeitprognose. Die Patienten weisen je nach Risikostufe ein 10-Jahres-Gesamtüberleben von 71% (niedriges Risiko), 51% (mittleres Risiko) und 36% (hohes Risiko) auf. Bei den untersuchten folliculären Lymphomen zeigte sich eine relativ gleichmäßige Verteilung der Fälle auf die drei prognostisch differenten Gruppen (niedriges Risiko: 36%, mittleres Risiko: 37%, hohes Risiko: 27%).

Therapie des folliculären Lymphoms

Das folliculäre Lymphom wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt keiner einheitlichen Therapie unterzogen. Der langfristig indolente Verlauf und die biologische und damit einhergehend auch prognostische Heterogenität dieser Entität erschweren die Konzeption von Studien, die sich mit einem Vergleich der therapeutischen Regime bezüglich ihrer Auswirkung auf die zentralen Endpunkte Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben befassen. Es werden verschiedene Chemotherapieschemata wie CHOP (Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin und Prednison) oder CVP (Cyclophosphamid, Vincristin, Prednison) zum Einsatz gebracht. Eine entscheidende Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten bringt zudem die Anwendung von Antikörpern gegen das CD20-Antigen (Rituximab) mit sich. Dieses Antigen ist als sogenannter Pan-B-Zell-Marker auf neoplastischen und nicht-neoplastischen B-Zellen exprimiert und stellt somit eine für Lymphozyten der B-Zell-Reihe spezifische und selektive Interventionsoption dar. Die Antikörpertherapie wird sowohl meist in Begleitung einer Chemotherapie als Erstlinienbehandlung angewandt, als auch bei einem Rückfall eingesetzt, obgleich es noch keine ausreichenden Daten für die Wirksamkeit einer wiederholten CD20-Antikörperexposition gibt. Bei lokalisierten Stadien, die insgesamt relativ selten diagnostiziert werden, kommt unter Umständen auch eine Radiatio des betroffenen Areals in Betracht. Inwieweit moderne Ansätze der gezielten Beeinflussung des Mikromilieus oder des Eingriffes in Signaltransduktionsketten Eingang in die Therapieregime finden

werden, ist bislang noch offen und Gegenstand der klinischen Forschung. Die autologe und allogene Stammzelltherapie ist aufgrund der verbesserten Überlebensraten infolge der antikörperbasierten Behandlungsschemata und erheblicher Nachteile und Risiken der Stammzelltherapie (Toxizität, hohe Letalität des allogenen Verfahrens, Kontaminationsgefahr bei autologer Stammzellübertragung aufgrund häufiger Tumordinfiltration des Knochenmarks) in letzter Zeit in den Hintergrund getreten und wird allgemein nur noch bei Nichtansprechen der Immunchemotherapie oder beim Rückfall erwogen (Hitz et al. 2011).

Histologische und immunhistochemische Aspekte des folliculären Lymphoms

Das zur Diagnostik verwendete Material besteht im Regelfall aus dem Gewebe eines pathologisch vergrößerten und indurierten Lymphknotens.

Histologisch imitiert das folliculäre Lymphom das Wachstumsmuster des normalen Lymphfollikels. Im Unterschied zu einem reaktiven Follikel im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens weist der neoplastische Follikel allerdings keine Polarisierung in eine helle, centrocytenreiche Zone und eine dunkle, stark proliferative blastenreiche Zone auf, sondern präsentiert sich in homogener Form. Weiterhin ist der neoplastische Follikel gegenüber seiner Umgebung nicht in der Form scharf abgrenzbar wie ein reaktiver Follikel im physiologischen lymphatischen Gewebe. Er ist außerdem dadurch gekennzeichnet, dass ihm die unter normalen Umständen präsenente Mantelzone entweder vollständig abhanden gekommen ist, oder aber diese insgesamt nur schwach ausgeprägt erscheint. Die einzelnen Tumoren unterscheiden sich zum einen hinsichtlich des Verhältnisses aus folliculär organisierten und diffusen Anteilen, zum anderen wurde eine Abgrenzung nach der Blastenanzahl etabliert, die sich auf die Einteilung in verschiedene histologische Grade auswirkt. Als Bemessungsgrundlage dient hierbei ein sogenanntes 'High-Power-Field' (hpf), das eine untersuchte Fläche von 0,159 mm² beschreibt.

Die Grade sind im Einzelnen wie folgt definiert:

Grad 1: 0 - 5 Centroblasten pro hpf

Grad 2: 6 - 15 Centroblasten pro hpf

Grad 3: > 15 Centroblasten pro hpf

Grad 3a: noch nachweisbare Centrozyten

Grad 3b: Blastenrasen ohne Nachweis von Centrozyten

Aufgrund klinischer Gesichtspunkte werden die Grade 1 und 2 zusammengefasst als niedrigmaligne betrachtet und dem FL vom Grad 3 gegenübergestellt, bei dem es sich um einen hochmalignen Tumor handelt. Nach allgemeiner Konvention wird ein hochmalignes Lymphom (Grad 3 a oder b) mit diffusen Anteilen als DLBCL klassifiziert. Es kommt hierbei nicht auf das Ausmaß der diffusen Anteile an (Harris et al 2008).

Das folliculäre Lymphom ist durch in der Vergangenheit erarbeitete Studien immunhistochemisch gut charakterisiert. Das wohl eindrücklichste und charakteristischste immunhistochemisch nachweisbare Kriterium ist die Bcl2-Expression dieser Tumoren (Freedman 2011). Während die Lymphome ersten und zweiten Grades eine durchschnittliche Positivität für Bcl2 von ca. 90% aufweisen, liegen die entsprechenden Expressionsraten für hochmaligne FL (Grad 3) bei ungefähr 50%. Es handelt sich hierbei um ein antiapoptotisch wirksames Protein, das aufgrund der für folliculäre Lymphome charakteristischen Translokation Bcl2-IgH (t14;18) (q32;q21) konstitutiv überexprimiert

wird. Konsekutiv wird die B-Zelle immortalisiert. Durch die Überexpression an Bcl2 in den Tumorzellen lassen sich neoplastische Follikel von reaktiven, nicht neoplastischen Follikeln abgrenzen, in denen Bcl2 regelmäßig von den B-Zellen nicht exprimiert wird. Man muss jedoch berücksichtigen, dass Primärfollikel und T-Zellen auch Bcl2-positiv sind. Eine Unterscheidung des Lymphomtyps ist anhand dieses Merkmals zudem nicht möglich, da auch andere niedrigmaligne Non-Hodgkin-Lymphome zu einer Bcl2-Überexpression neigen können. Hier lässt sich eine weitere Differenzierung durch eine zusätzliche immunphänotypische Diagnostik erreichen. Das typische immunhistochemische Profil des FL umfasst weiterhin die Expression von CD10 und CD20 (Freedman 2011; Harris et al. 2008), wobei CD10 gelegentlich bei hochmalignen FL (Grad 3b) nicht nachweisbar ist. Während CD10 ein sogenannter Keimzentrumsmarker ist, handelt es sich bei CD20 um einen Pan-B-Zellmarker, der konstitutiv auf allen B-Zellen (ab dem Prä-B-Zell-Stadium) zu finden ist, und damit die Zellinienzugehörigkeit definiert. Zudem lassen sich beim follikulären Lymphom lösliche monoklonale Immunglobuline (zumeist IgM, IgD oder IgG) und Bcl6 nachweisen. Bcl6 ist seiner Wirkung nach ein Inhibitor der lymphozytären Differenzierung. Die follikulären Formationen sind, wie es auch bei reaktiven Lymphfollikeln der Fall ist, durch ein Netzwerk aus follikulären dendritischen Retikulumzellen (FDC) gekennzeichnet. Diese exprimieren die Oberflächenmarker CD21 und CD23 und erlauben damit eine Abgrenzung großer follikulärer Strukturen von diffusen Arealen, die keine solchen Netzwerke enthalten. Der Proliferationsindex der FL (KI67; MIB) korreliert mit dem histologischen Grad. Für niedrigmaligne Tumoren liegt er zumeist unter 20%, die hochmalignen FL (Grad 3) fallen durch darüberliegende Werte auf (Harris et al. 2008).

Molekulargenetische Charakteristika des follikulären Lymphoms

Die grundlegende molekulargenetische Alteration des follikulären Lymphoms ist die Translokation t(14;18) (q32;q21), durch die das Bcl2-Gen unter die Kontrolle des Promotors der Immunglobulinschwerkette (IGH) gelangt und daher konstitutionell exprimiert wird. Diese Translokation findet sich bei etwa 90% der follikulären Lymphome vom Grad 1 und 2, beim FL Grad 3b hingegen deutlich seltener. Interessanterweise liegt ein derartiges genetisches Rearrangement auch bei einer nicht geringen Anzahl von gesunden Personen vor, so dass es sich um eine zwar wesentliche, nicht aber für die Tumorentwicklung hinreichende Alteration handelt. Bcl6-Rearrangements treten bei ca. 5 - 15% der follikulären Lymphome auf. Deutlich bevorzugt stehen hiermit die hochmalignen Neoplasien vom Grad 3b in Verbindung. Es sind bei ungefähr 90% der FL noch verschiedenste weitere genetische Aberrationen anzutreffen, die mit dem Anstieg des histologischen Grades positiv korrelieren und nach derzeitigem Kenntnisstand zum Transformationsprozess beitragen (Harris et al. 2008).

Das primär gastrointestinale follikuläre Lymphom und seine Besonderheiten

Diese Dissertation befasst sich im Besonderen mit einer Subgruppe des follikulären Lymphoms, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie primär den Gastrointestinaltrakt und damit einhergehend also nicht zuerst den Lymphknoten, wie es beim typischen follikulären Lymphom der Fall ist, betrifft. Der Gastrointestinaltrakt stellt das Organsystem dar, das von extranodalen Lymphomen insgesamt am häufigsten befallen ist (Cirillo et al. 1992; Damaj et al. 2003). Das Verhältnis von primär nodalen zu primär extranodalen Lymphomen beträgt 3 zu 2 (Fischbach 2000). Betrachtet man nur die primären

gastrointestinalen Lymphome, so stellt das primär gastrointestinale folliculäre Lymphom (GIFL) mit einem Anteil von 1 - 7% auch in dieser Gruppe eine relativ seltene Entität dar (Damaj et al. 2003; Yamamoto et al. 2010). Das Geschlechtsverhältnis der betroffenen Patienten wird in verschiedenen Studien unterschiedlich angegeben. Die Ratio reicht von einem ausgewogenen Verhältnis ohne Bevorzugung eines bestimmten Geschlechts (Shia et al. 2002; Tsujioka et al. 2007) bis zu einem deutlich höheren Erkrankungsrisiko für Frauen mit einem Verhältnis von 2:1 (w:m) (Damaj et al. 2003). Der Altersmedian variiert nur gering zwischen den einzelnen untersuchten Kollektiven und liegt bei etwa 54,5 – 59 Jahren (Damaj et al. 2003; Misdrabi et al. 2011; Shia et al. 2002). Beim primär nodalen folliculären Lymphom kommt es zunächst zum Befall der peripheren und zentralen (abdomino-thorakalen) Lymphknoten und erst sekundär zu einem Übergreifen der Erkrankung auf extranodales Gewebe wie beispielsweise den Gastrointestinaltrakt oder die Haut im Rahmen einer Generalisierung des Krankheitsprozesses (Harris et al. 2008). Dies ist bei der seltenen Variante des primär gastrointestinalen folliculären Lymphoms anders. Hier liegt definitionsgemäß ein Befall des digestiven Systems - zumeist des Duodenums - vor, ohne dass trotz eines adäquat durchgeführten Stagings gleichzeitig ein nodaler Befall nachweisbar ist. Das Duodenum muss aber nicht zwangsläufig Träger des Lymphoms sein. Es kann vielmehr jeder Bestandteil des Verdauungstraktes primärer Manifestationsort der Neoplasie sein, wobei nach einigen Untersuchungen im Duodenum der größte relative Anteil zu finden ist (Shia et al. 2002). In anderen Studien war hauptsächlich das Ileum befallen (Damaj et al. 2003; Huang et al. 2008), so dass sich hier bezüglich der häufigsten Lokalisation letztendlich noch keine abschließend konsistenten Daten präsentieren lassen. Insgesamt kann man jedoch zusammenfassend sagen, dass die meisten Fälle des GIFL im Dünndarm lokalisiert sind. Weiterhin ist die Studienlage bezüglich des Verhältnisses von singulären Läsionen und über den Verdauungstrakt disseminierten Prozessen nicht eindeutig. So wurden einerseits Serien mit hauptsächlich unifokalem Befall des Dünndarms beschrieben (Damaj et al. 2003) und in einer anderen retrospektiven Analyse mit 125 GIFL-Patienten bei 85% der im Duodenum lokalisierten primären folliculären Lymphome zusätzlich Läsionen im Jejunum oder Ileum endoskopisch nachgewiesen (Takata et al. 2011). Der endoskopische Aspekt der primär intestinalen Keimzentrumslymphome (FL) imponiert wie der einer lymphomatösen Polyposis und kann daher anhand von makroskopischen Kriterien nicht von dieser differenziert werden. Es müssen folglich immunhistochemische und molekularbiologische Methoden herangezogen werden, um eine Abgrenzung beider Entitäten vornehmen zu können (Damaj et al. 2003). Die mucosale Oberflächenstruktur zeigt ein deutlich noduläres Profil (Shia et al. 2002). Eine kürzlich erschienene Übersichtsarbeit gibt für 70% der primären GIFL einen polytopen Befall des Digestionstraktes an (Yamamoto et al. 2010). Die Tumoreindringtiefe in die Wandstrukturen des Dünndarms ist zumeist auf die Mucosa und Submucosa beschränkt. Dies belegen entsprechende endosonographische Untersuchungen (Schmatz et al. 2011). Histologisch zeigt das GIFL einige Besonderheiten. So werden in mehreren Studien nur oder fast ausschließlich die nach WHO klassifizierten Grade 1 und 2 diagnostiziert (Mori et al. 2010; Schmatz et al. 2011; Sentani et al. 2008). Somit sind für das primäre GIFL auch keine Transformationen in ein diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL) beschrieben. Hierin unterscheidet es sich von seinem nodalen Äquivalent (Schmatz et al. 2011), bei dem solche Transformationen keine Seltenheit darstellen. Auch bei der gastrointestinalen Variante zeigt sich in Analogie zum nodalen FL zumeist ein prädominant folliculäres Wachstumsmuster (Damaj et al. 2003; Hung et al. 2008). Das immunhistochemische Profil der neoplastischen Zellen des GIFL ist sehr konsistent mit einer Expression von CD20, CD10 und Bcl2 (Misdrabi et al. 2011; Sentani et al. 2008) und einer fehlenden Expression von CD5 (Damaj et al. 2003). Die für das

follikuläre Lymphom charakteristische molekulare Fusion von Bcl2 und IgH aufgrund einer Translokation (t14;18) [q32;q21] kann mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auch beim primären GIFL nachgewiesen werden. In verschiedenen Analysen ergaben sich schwankende Werte zwischen 75% (Sentani et al.2008) und 83% (Mori et al. 2010). Überwiegend ist bei der Translokation die Major Breakpoint Region (MBR) involviert (Damaj et al 2003). Klinisch verhält sich das primäre GIFL im Regelfall indolent und langsam progredient. Es weist damit tendenziell die Charakteristika des nodalen Keimzentrumslymphoms (FL) auf. Die häufigsten von den Patienten beklagten Symptome sind Bauchschmerzen und obstruktionsassoziierte Beschwerden (Damaj et al. 2003; Shia et al. 2002). Bei Diagnosestellung – oftmals im Rahmen einer Routineuntersuchung (Harris et al. 2008) oder bei entsprechender gastrointestinaler Symptomatik – sind die Fälle meist dem Stadium 1 nach Ann Arbor zuzuordnen (Shia et al. 2002; Tsujioka et al. 2007). Eine Dissemination des Prozesses zeigt sich auch im Verlauf nur selten. In einer retrospektiven Studie mit 63 an einem primär duodenalen follikulären Lymphom erkrankten Patienten konnten bei einem medianen Follow-Up von 77 Monaten nur bei 2 der 63 betroffenen Personen extraintestinale Manifestationen verifiziert werden. In der Stadienverteilung unterscheiden sich die primär gastrointestinalen FL nach der Studienlage deutlich von der primär nodalen Variante. In einer retrospektiv vergleichenden Analyse ließen sich 68% der GIFL den klinischen Stadien 1 und 2 zuordnen, während die nodale Referenzgruppe zu 83% den fortgeschrittenen Stadien 3 und 4 zugeteilt werden musste (Tari et al. 2011). Eine Progression im Sinne einer Transformation in ein DLBCL trat bei den GIFL überhaupt nicht auf (Schmatz et al. 2011). In Verbindung mit der schwach ausgeprägten Symptomatik rechtfertigt diese nur sehr langsame Progredienz des Verlaufes für mehrere Autoren eine abwartende Haltung bezüglich des therapeutischen Vorgehens im Sinne einer „Watch and Wait“-Strategie. Die verschiedenen therapeutischen Möglichkeiten der vollständigen chirurgischen Resektion, Strahlenbehandlung und Chemotherapie werden nach Empfehlung einiger Autoren erst bei der fortgeschrittenen Erkrankung mit intolerabler Symptomatik eingeleitet (Damaj et al. 2003; Schmatz et al. 2011). Hierzu liegt aber noch kein wissenschaftlicher Konsens vor. So werden als Behandlungsansätze auch eine CD20-antikörperbasierte Therapie in Verbindung mit CHOP (Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Oncovin = Vincristin, Prednison) (Tsujioka et al. 2007) oder alleinige chirurgische Exstirpation, alleinige Chemotherapie oder die Kombination aus Chemotherapie und Operation beziehungsweise Radiochemotherapie angewandt (Damaj et al. 2003; Shia et al. 2002). Signifikante Vorteile gegenüber einer zunächst abwartenden und beobachtenden Haltung konnten bislang nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache liegt in der geringen Teilnehmerzahl in den bis dato durchgeführten Studien begründet. Die Prognose des primären GIFL wird in der Literatur allgemein als sehr günstig beschrieben. Bei einem medianen Follow-Up von 34 Monaten starben von 26 an einem primären GIFL erkrankten Patienten zwei Personen einen lymphomassoziierten Tod (Damaj et al. 2003). Andere Studien mit einem medianen Verlaufskontrollzeitraum zwischen 27 und 77 Monaten verzeichneten keine direkt mit dem Lymphom in Verbindung stehenden Todesfälle (Na et al. 2011; Schmatz et al. 2011; Tsujioka et al. 2007; Yoshino et al. 2000). Die gute Prognose wird auch durch eine Einstufung in die niedrige Risikokategorie des Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) (zur Erläuterung siehe Abschnitt „Einleitung / Klinik und Verlauf des follikulären Lymphoms“) untermauert. Während beim GIFL die Mehrheit der Tumoren der Low-Risk-Gruppe zugeteilt wird (maximal 1 Punkt im FLIPI), imponiert bei den nodalen FL eine gleichmäßige Verteilung auf alle drei möglichen Risikostufen des Prognosescores (Tari et al. 2011). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das primäre GIFL einen indolenten Charakter mit einer für maligne Prozesse bemerkenswert günstigen Prognose aufweist.

Aufgrund der unzureichenden Datenlage, die sich sowohl aus einer geringen Anzahl an bislang durchgeführten Studien, als auch durch die zumeist niedrigen Fallzahlen der betreffenden Investigationen herleiten lässt, kann eine abschließende und umfassende Beurteilung des primär gastrointestinalen folliculären Lymphoms zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht erfolgen.

Fragestellung

Das primär gastrointestinale folliculäre Lymphom stellt als Variante des folliculären Lymphoms eine insgesamt seltene Erkrankung dar. Es liegen bislang für diese Spielart der malignen lymphatischen Neoplasien nur sehr wenige Studiendaten vor, die zum Teil widersprüchliche Ergebnisse präsentieren und damit noch keine abschließende Beurteilung dieser Variante erlauben. Es gibt deutliche Hinweise dafür, dass sich das primäre GIFL vom primären nodalen FL abgrenzen lässt. So wurden in der Vergangenheit beispielsweise Unterschiede im Hinblick auf die histologische Graduierung, die Transformationswahrscheinlichkeit in ein diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL), die Stadienverteilung und den Grad der Dissemination im zeitlichen Verlauf durch verschiedene Veröffentlichungen aufgezeigt. Diese Arbeit hat zum einen das Ziel, das primäre GIFL hinsichtlich histologischer, immunhistochemischer und molekulargenetischer Charakteristika zu beschreiben und dadurch die mangels größerer Fallzahlen noch unsichere Datenlage zu verbessern. Zum anderen soll das primäre GIFL mit nodalen FL anhand der erhobenen Parameter verglichen und auf mögliche Unterschiede geprüft werden. Als Referenzgruppe dient dieser Studie der bereits im Vorfeld publizierte Datensatz unserer Arbeitsgruppe (Gollub et al. 2009). Grundsätzlich sollen hierbei bereits in anderen Publikationen aufgedeckte Differenzen und Gemeinsamkeiten beider Kollektive nachvollzogen beziehungsweise abgesichert und gegebenenfalls neue Unterscheidungsmerkmale entwickelt werden.

Material und Methoden

Kriterien für den Einschluss in die Studiengruppe der primär gastrointestinalen follikulären Lymphome (im Folgenden als GIFL bezeichnet)

Es wurden aus der Gewebedatenbank des Institutes für Pathologie der Universität zu Lübeck Proben in die Studie eingeschlossen, die folgende Kriterien erfüllten:

1. Diagnose eines follikulären Lymphoms im Gastrointestinaltrakt
2. Zeitpunkt der Erstdiagnose zwischen 2001 und 2008
3. im Vorfeld keine Diagnose eines nodalen oder anderweitigen (= extranodalen und extraintestinalen) follikulären Lymphoms
4. Von der Materialmenge und von der Konservierung her adäquate Gewebeproben

Diese Eingangskriterien wurden von 31 Fällen erfüllt.

Kriterien für den Einschluss in die Referenzgruppe der nach ihrer primären Lokalisation nicht selektionierten follikulären Lymphome (UFL)

1. Erstdiagnose in den Jahren 2005 und 2006
2. vorhandenes Beckenkammbiopsat
3. ausreichende Gewebemenge

Diese Eingangskriterien erfüllten 102 Fälle.

Aus dieser Referenzgruppe wurden für den statistischen Vergleich und die Gegenüberstellung mit den primär gastrointestinalen follikulären Lymphomen diejenigen FL der Referenzgruppe ausgewählt, deren vorhandenes Material aus Lymphknotengewebe bestand. Dieses zusätzliche Charakteristikum betraf 78 der insgesamt 102 Fälle des unselektionierten Kollektivs. Sie werden im Folgenden als NFL (nodale follikuläre Lymphome) bezeichnet und stellen somit die Vergleichsgruppe der GIFL dar.

Als Ausgangsmaterial wurden für alle im weiteren Verlauf beschriebenen histologischen, immunhistochemischen und molekulargenetischen Verfahren in Paraffin eingebettete Gewebelöcke aus der Gewebedatenbank des Instituts für Pathologie der Universität zu Lübeck (Nationales Referenzzentrum für Hämatopathologie und Lymphknotendiagnostik) verwendet.

Charakteristika der GIFL-Patienten

Das Geschlechterverhältnis der Studienteilnehmer betrug 1,07:1 (Männer zu Frauen) und war damit annähernd ausgeglichen. Das durchschnittliche Alter (arithmetisches Mittel) zum Zeitpunkt der Probengewinnung lag bei 63,7 Jahren mit einer Altersspannweite von 39 bis zu 85 Lebensjahren. Die einzelnen Biopsate verteilten sich auf das Duodenum (14 Fälle), das Ileum (6 Fälle), das Jejunum (1 Fall) und in 6 Fällen auf den Dünndarm, ohne dass hier eine weitere Spezifizierung der genauen Entnahmestelle in der Datenbank des Institutes hinterlegt war. 4 Proben hatten ihren Ursprung außerhalb des Dünndarms

(Pharynx, Mundhöhle, Vallecula). Klinische Angaben wie zum Beispiel das Vorliegen einer B-Symptomatik oder Obstruktionsbeschwerden waren in keinem Fall dokumentiert worden, sodass hierzu keine Aussagen getroffen werden können.

Charakteristika der NFL-Patienten

Das Geschlechtsverhältnis des primär nodalen Vergleichskollektivs belief sich auf 0,9:1 (Männer zu Frauen) und zeigte damit wie bei den primär gastrointestinalen FL auch eine nahezu ausgeglichene Ratio an. Das durchschnittliche Alter der Patienten mit nodalen folliculären Lymphomen (NFL) betrug 56,3 Jahre und lag damit etwa 7 Jahre unter dem Durchschnittsalter der Patienten mit einem primär gastrointestinalen folliculären Lymphom. Die Spannweite der Altersverteilung in der nodalen Gruppe reichte von 25 Jahren im Minimum bis zu 86 Jahren im Maximum. Die insgesamt 78 Lymphknotenbiopsien verteilten sich hauptsächlich auf die Halsregion (29 Fälle), die Leistengegend (22 Fälle) und die Axilla (13 Fälle). Auch hier waren wie bei den Patienten mit primär gastrointestinalem folliculären Lymphom hinsichtlich der individuellen Krankheitsverläufe keine klinischen Daten verfügbar.

Kollektiv	GIFL	NFL
Alter in Jahren (arithmetisches Mittel)	63,7	56,3
Altersspannweite (Alter in Jahren)	39 - 85	25 - 86
Geschlechterverhältnis (Männer : Frauen)	1,07 : 1	0,90 : 1
Entnahmestelle der Biopsie	mehrheitlich Dünndarm	definitionsgemäß Lymphknoten

Tabelle 1: Tabellarischer Vergleich beider Studienkollektive.

Morphologie

Die Proben der GIFL wurden anhand konventioneller Schnitte (HE, Giemsa, PAS) von 2 Untersuchern (C. Thorns, T. Huckhagel) evaluiert. Die Anfertigung der Präparate erfolgte im Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck. Das Bewertungsschema ist im Folgenden tabellarisch dargestellt.

Morphologisches Merkmal	Bewertungsschema	Kommentar
Histologischer Grad	Grad 1 Grad 2 Grad 3 a/b Transformation	- es wurde das WHO-Schema zur Graduierung des FL zugrunde gelegt, das sich an der Blastenzahl pro high power field (0,159mm ²) orientiert - lagen unterschiedliche Grade parallel in einer Probe vor, so wurde der höchste Grad evaluiert -Transformation zumeist in ein DLBCL
Sklerose	Nicht existent gering ausgeprägt stark ausgeprägt	
Diffuser Anteil in Prozent der Tumorfläche	Prozentwert	diffuse und folliculäre Anteile ergänzen sich zu 100%

Tabelle 2: Morphologisches Auswertungsschema der GIFL und NFL. Darstellung der Parameter, die an konventionell gefärbten Schnitten (HE, Giemsa, PAS) von zwei Untersuchern (C. Thorns, T. Huckhagel) analysiert wurden.

Bezüglich dieser Charakteristika lagen für alle nodalen Referenzfälle ebenfalls die Daten vor, sodass ein direkter Vergleich der primär gastrointestinalen folliculären Lymphome (GIFL) mit den nodalen folliculären Lymphomen (NFL) hinsichtlich signifikanter Unterschiede durchgeführt werden konnte.

Immunhistochemie

Das Prinzip

Das zugrundeliegende Prinzip der angewandten Immunhistochemie besteht aus 2 differenten, sequentiellen Antikörperbindungen. Zunächst wird ein gegen das zu untersuchende Epitop gerichteter Primärantikörper angelagert. Darauf aufbauend bindet ein Sekundärantikörper, der im Verbund mit einem Enzym steht, an den Primärantikörper. Das Enzym bewirkt dann letztendlich den Farbumschlag durch seine Reaktion mit dem Chromogen. Als Chromogen verwendeten wir in dieser Studie Diaminobenzidin (DAB).

Sowohl die GIFL-Studiengruppe als auch das NFL-Referenzkollektiv wurden einem einheitlichen immunhistochemischen Färbungsprozess unterzogen. Es kam der "TechMate"-Automat der dänischen Firma DAKO (Glostrup) zum Einsatz. Die unterschiedlichen verwendeten Antikörper erforderten individuelle Vorbehandlungsprofile, die im Vorfeld zur Antigenfreilegung nach Protokoll angewandt wurden. Während die meisten Antikörper eine Hitzedemaskierung der Epitope mittels Mikrowelle (pH 6,0), Dampftopf (pH 6,0) oder Dampfgarer (pH 9,0) benötigten, wurde für die IgD-Antigenfreilegung ein enzymatisches Verfahren mit Trypsin gewählt. Die Einzelheiten zu den verwendeten Antikörpern, den dazugehörigen Klonen und Verdünnungsvorschriften

sowie auch die Verfahren zur Antigendemaskierung sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Antikörper	Hersteller	Klon	Verdünnung	Probenvorbereitung
CD20	Lab Vision	L26	1:200	Dampftopf pH 6,0
CD3	Lab Vision	SP7	1:200	Dampfgerar pH 9,0
CD4	Lab Vision	4B12	1:50	Dampfgerar pH 9,0
CD8	Lab Vision	BC/1A5	1:100	Dampfgerar pH 9,0
CD68	Dako	PGM-1	1:50	Mikrowelle pH 6,0
CD23	Lab Vision	SP23	1:100	Dampftopf pH 6,0
CD10	Novo	56C6	1:30	Dampfgerar pH 9,0
Bcl6	Dako	PG-B6p	1:25	Dampfgerar pH 8,0
Bcl2	Lab Vision	100/D5	1:100	Dampftopf pH 6,0
IgD	Dako	polyklonal	1:50	Enzymatisch (Trypsin)
MiB	Dako	MIB-1	1:200	Dampftopf pH 6,0
Kappa	Dako	Polyklonal	1:20 000	Dampfgerar pH 9,0
Lambda	Dako	Polyklonal	1:20 000	Dampfgerar pH 9,0

Tabelle 3: Antikörper der immunhistochemischen Evaluation.

Darstellung der Antikörper mit Hersteller- und Verdünnungsangaben, die zur immunhistochemischen Auswertung der Präparate verwendet wurden, sowie der notwendigen Vorbereitungsmaßnahmen der Proben.

Lab Vision: Lab Vision, Thermo Fisher Scientific Inc, Fremont, CA, USA

Dako: Dako, Glostrup, Dänemark

Novo: Novocastra, Leica Biosystems Newcastle ltd, Newcastle upon Tyne, UK

Erläuterungen zu den einzelnen Zielepitopen

CD20: Dieses Molekül ist ein sogenannter Pan-B-Zell-Marker und dient der Bestimmung der Linienzugehörigkeit. Es wird ab einem sehr frühen B-Zell-Stadium (Prä-B-Zelle) auf allen nachgeordneten B-Lymphozyten exprimiert

CD3: Dieses Molekül ist ein sogenannter Pan-T-Zellmarker und dient damit ebenfalls der Bestimmung der Linienzugehörigkeit

CD4 und CD8: Anhand dieser Clusters of Differentiation können Subpopulationen der T-Zellen weiter spezifiziert werden.

CD68: Ein Oberflächenmarker, der auf Makrophagen exprimiert wird.

CD23: Hierbei handelt es sich um ein für folliculäre dendritische Retikulumzellen typisches Oberflächenmerkmal. Außerdem weisen gelegentlich auch Lymphozyten der Mantelzone diesen Marker auf.

CD10 und Bcl6 sind Marker, die mit dem Keimzentrum assoziiert sind. Bcl6 wurde als Antagonist des BLIMP-1 (B-Lymphozyten-induziertes-Maturationsprotein) identifiziert und hemmt somit die lymphozytäre Differenzierung.

Bcl2: Hierbei handelt es sich um ein antiapoptotisches Protein, das FL-Zellen typischerweise aufgrund einer Translokation des Bcl2-Gens überexprimieren. Eine nicht-neoplastische Keimzentrumszelle ist im physiologischen Zustand nicht positiv für Bcl2. Auf T-Zellen hingegen lassen sich diese Moleküle regelmäßig nachweisen. Sie dienen daher auch als interne Referenz zur semiquantitativen Bewertung der Expression auf den Tumorzellen.

IgD: Das Immunglobulin D wird in der Mantelzone physiologischerweise exprimiert. Man kann also anhand dieses Parameters prüfen, inwieweit sich noch eine Mantelzone bei einem Follikel, der Teil eines follikulären Lymphoms ist, erhalten hat und damit nachgewiesen werden kann.

MIB: MIB gibt den Proliferationsstatus einer Zelle an. Es handelt sich dabei um einen Antikörper, der gegen das proliferationsassoziierte Protein ki67 gerichtet ist. Es lässt sich also der Anteil der proliferierenden Zellen an der Gesamtzellmasse bestimmen. Der MIB-Index korreliert beim FL mit dem histologischen Grad.

Kappa/Lambda: Die Immunglobulinleichtketten können zum einen auf die Existenz an sich, zum anderen aber auch bezüglich einer monotypischen oder polytypischen Expression evaluiert werden. Es wurde im Rahmen dieser Untersuchung nicht weiter differenziert, ob die Leichtketten cytoplasmatisch oder membranständig lokalisiert waren.

Schema der immunhistochemischen Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemischen Parameter erfolgte anhand des nachstehend dezidiert aufgeführten Verfahrens, das methodisch von vorausgegangenen Untersuchungen (de Jong 2007/2008, Thorns 2007/2008) etabliert worden ist. Alle Schnitte der Studiengruppe GIFL wurden von 2 Untersuchern mikroskopisch beurteilt (C. Thorns, T. Huckhagel).

Kriterium	Bewertungsmodus	Kommentar
CD20	positiv/negativ	
CD3	1. Anteil positiver Zellen in 10%-Stufen 2. Muster: diffus/perifollikulär/intrafollikulär	
CD4	1. Anteil positiver Zellen in 10%-Stufen 2. Muster: diffus/perifollikulär/intrafollikulär	
CD8	1. Anteil positiver Zellen in 10%-Stufen 2. Muster: diffus/perifollikulär/intrafollikulär	
CD68	1. Anteil positiver Zellen in 10%-Stufen 2. Muster: diffus/perifollikulär/intrafollikulär	
CD23 (FDC-Netze)	kräftig/mäßig/wenig/keine	Netzwerke aus follikulär dendritischen Retikulumzellen
CD23 (Tumorzellen)	Positiv: $X > 70\%$ Partiell: $30\% < X < 70\%$ Negativ: $X < 30\%$	
CD10	stark positiv/schwach positiv/negativ	
Bcl6	stark positiv/schwach positiv/negativ	
Bcl2	stark positiv/schwach positiv/negativ	
Erhaltene Mantelzone	Anteil der Follikel mit erhaltener Mantelzone in 10%-Stufen	Erhaltene Mantelzone: ein Follikel mit IgD-Kranz, der mindestens 25% der Zirkumferenz umfasst
MIB	1. Mittelwert in 10%-Stufen 2. Keimzentrum mit höchster Proliferation in 10%-Stufen (punctum maximum)	
Kappa	1. vorhanden/nicht vorhanden 2. sekretorische Differenzierung (ja/nein)	Leichtkettenexpression und Differenzierung
Lambda	1. vorhanden/nicht vorhanden 2. sekretorische Differenzierung (ja/nein)	Leichtkettenexpression und Differenzierung
LEL (B-Zellen)	Keine/wenige (<5 B-Zellen)/LEL (>5B-Zellen)	LEL: Lymphoepitheliale Läsion
IEL (T-Zellen)	keine/wenige (<40/100)/viele (>40/100)	Intraepitheliale T-Zellen in Relation zu den umgebenden Epithelzellen

Tabelle 4: Beurteilungskriterien der Immunhistochemie. Darstellung der einzelnen immunhistochemisch untersuchten Parameter mit den jeweiligen Evaluationsmodi. Die Analyse erfolgte durch zwei Untersucher (C. Thorns, T. Huckhagel) im Konsensusverfahren.

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Das Prinzip

Die Methode der direkten FISH beruht im Wesentlichen auf einer Bindung der jeweiligen fluoreszenzmarkierten DNA-Sonde an ihre spezifische Komplementär-DNA in der Probe. Zur Anlagerung ist es notwendig, die Doppelstrang-DNA in dem Untersuchungsgut zu denaturieren und somit den Einzelstrang für die Sonde anlagerungsfähig zu machen. Ein großer Vorteil des Verfahrens ist die Möglichkeit, diese Untersuchung sowohl an Interphasechromosomen, als auch am Genom im Zustand der Metaphase anzuwenden. Methodisch kam in dieser Studie ausschließlich die direkte FISH zum Einsatz. Die indirekte FISH, bei der das Verfahren um eine Bindung an die hybridisierte haptenassoziierte Sonde mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper erweitert wird, fand bei den durchgeführten Untersuchungen keine Anwendung.

Die Verfahrensschritte im Einzelnen

1. Entparaffinierung

Die Paraffinschnitte werden zunächst entparaffiniert. Dazu wird die Probe dreimal für jeweils 5 Minuten in Rotihistol bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt eine Spülung mit 100%-igem Ethanol. Nach einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 80%, 75%) für jeweils 2 Minuten wird für 5 Minuten in aqua destillata gewaschen.

2. Kochen im Dampfkochtopf (thermische Demaskierung)

Die Proben werden im Dampftopf in 1 Liter 1mM EDTA-Puffer bei pH 8,0 unter höchstem Druck für 1 Minute gekocht und anschließend für 2 Minuten in aqua destillata gewaschen.

3. Pepsin-Verdau (Enzymatische Demaskierung)

Die Objektträger inkubieren für 30 Minuten bei 37 Grad Celsius in der Pepsinlösung (15mg Pepsin [Sigma P6887] und 1,5 ml 1M HCL auf 150 ml aqua destillata).

4. Fixierung

Die Objektträger werden für 2 Minuten in 1%-igem Paraformaldehyd fixiert. Vorher und nachher werden die Präparate für eine Minute in aqua destillata gewaschen. Abschließend gelangen die Proben in eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 85%, 100%).

5. Hybridisierungsprozess

Die Probe wird mit 2µl Sondenverdünnung versetzt. Bei der Verdünnung werden zu 1 µl Sonde 7µl Hybridisierungspuffer und 2µl steriles Wasser gegeben. Das Areal wird mittels Fixogum unter einem Deckglas versiegelt und das Material anschließend für 30 Minuten bei 80 Grad Celsius im Wasserbad denaturiert. Der folgende Hybridisierungsprozess nimmt einen Zeitraum von 72 Stunden in Anspruch.

6. Waschen

Für diesen Vorgang müssen 2 Waschlösungen angelegt werden.

Lösung 1: 2 ml 20X SSC und 300 µl Igepal (A-630 Sigma I3021) auf 100 ml aqua destillata

Lösung 2: 10 ml 20X SSC und 100 µl Igepal (A-630 Sigma I3021) auf 100 ml aqua destillata

Die Objektträger kommen zuerst für 2 Minuten in Lösung 1 bei 71 Grad Celsius (Wasserbad), danach für 1 Minute bei Raumtemperatur in Lösung 2.

Die Gegenfärbung mit DAPI für 5 Minuten schließt den Prozess ab. Vor und nach der DAPI-Färbung wird kurz in 2 X SSC gespült.

Die fertiggestellten Präparate werden auf den Objektträgern mit Antifade (Vectashield mounting medium; Vector H-1000, 10 ml) eingedeckt.

Verwendete Sonden

Bcl2-Splitsonde: Dual color break apart 18q21

IgH-Bcl2-Fusionssonde: LSI IGH 14q32 green, LSI BCL2 18q21 orange

Myc-Splitsonde: Dual color break apart 8q24

IgH-Myc-Fusionssonde: LSI IGH 14q32 green, MYC 8q24 orange, CEP-8 aqua

Bcl6-Splitsonde: LSI Bcl-6 3q27

Die Sonden stammen sämtlich von der Firma Abbott Molecular (Wiesbaden, Germany).

Der detaillierte Aufbau der Sonden mit den jeweiligen chromosomalen Anlagerungsbereichen findet sich im Anhang.

Alle FISH-Proben wurden von zwei Untersuchern (C. Thorns, T. Huckhagel) am Fluoreszenzmikroskop (Axioskop der Firma Zeiss) evaluiert. Die Filter der Firma Vysis sind für die Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorochrome (grünes, oranges und DAPI-Spektrum) kompatibel ausgewählt worden.

Grenzwerte der FISH-Analysen

Die Grenzwerte für die Registrierung eines Bruchereignisses oder einer Fusion wurden im Vorfeld im Rahmen einer Studie, die sich auf die Referenzgruppe der UFL bezog (Thorns 2008) nach folgendem etablierten Grundprinzip entwickelt:

Für 5 gesunde Kontrollfälle sind FISH-Präparate wie oben beschrieben angelegt und jeweils 60 Zellkerne pro Sonde und Fall von 3 Untersuchern (W. Gollub, B. Stassek, C. Thorns) untersucht worden. Der Grenzwert wurde nach Ventura (2006) als Mittelwert (arithmetisches Mittel) der Untersuchungsergebnisse plus 3 Standardabweichungen definiert. Es ergaben sich damit für die Splitsonden Grenzwerte von 10% und für die Fusionssonden Grenzwerte von 15% positiver Zellkerne. Um auch Amplifikationen erfassen zu können, wurden für Bcl-2/ IgH und Myc/ CEP17 Normalverhältnisse in den

gesunden Gewebeproben gebildet. Beide hieraus ermittelten Grenzwerte für eine gewertete Amplifikation betragen 1,2:1.

Statistik und biometrische Beratung

Es kamen bei der statistischen Auswertung der Daten für die kategorialen Variablen der exakte Test nach Fischer sowie der Chi-Quadratstest nach Pearson für die erstellten Kontingenztabelle zum Einsatz. Die quantitativen Parameter wurden mittels Mann-Whitney-U-Test auf statistische Signifikanz untersucht. Die Analyse erfolgte computergestützt durch die Anwendung des Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Das Signifikanzniveau liegt konventionsgemäß bei $\alpha = 0,05$ (5%). Da es sich um eine Untersuchung von stark explorativem Charakter handelt, wurde auf eine Alpha-Adjustierung nach Holms- Bonferroni zunächst bewusst verzichtet. Am Ende dieses Abschnittes sind die Ergebnisse allerdings der Vollständigkeit halber auch noch einmal gesondert mit Alpha-Adjustierung aufgeführt. Im Vorfeld der statistischen Bewertung des Datensatzes hat ein Beratungsgespräch über die Auswahl und die Anwendung geeigneter Analyseverfahren bei Frau Professor Doktor Inke R. König aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck (IMBS) stattgefunden.

Ergebnisse

Allgemeine und morphologische Resultate

Analyse von 31 primär gastrointestinalen follikulären Lymphomen

Geschlechtsverteilung und Alter

Die Patienten des untersuchten Kollektivs wiesen ein Geschlechtsverhältnis von 1,07:1 (Männer:Frauen) auf und zeigten damit eine ungefähr ausgeglichene Ratio.

Die Altersstruktur der betroffenen Patienten bei Entnahme der Biopsie bot einen Mittelwert (arithmetisches Mittel) von 63,7 Jahren bei einer Spannweite von 39 bis 85 Jahren.

Knochenmarkbefall

Es lagen nur für 22,6% der Fälle Daten bezüglich eines Knochenmarkbefalles vor. Hier überwog mit 57,1% der Anteil der Patienten ohne KM-Befall leicht gegenüber 42,9% der Fälle mit Infiltration des Knochenmarks. Aufgrund der unzureichenden Datenlage lässt sich hieraus jedoch keine tragfähige Aussage über die Infiltration des Knochenmarks bei Patienten mit primärem gastrointestinalen follikulären Lymphom (GIFL) ableiten.

Lokalisationen der Primärmanifestationen

Das regionale Auftreten der einzelnen Lymphommanifestationen wies eine deutliche Häufung zugunsten eines Dünndarmbefalles und innerhalb dessen wiederum des Zwölffingerdarms auf. Von den insgesamt 31 GIFL entfielen 14 auf das Duodenum, bei 6 Patienten war das Ileum betroffen und in 1 Fall zeigte sich eine Manifestation im Abschnitt des Jejunum. Bei 6 Biopsien wurde als Entnahmestelle lediglich der Dünndarm ohne weitere Spezifizierung angegeben. Insgesamt hatten 4 Patienten primäre GIFL außerhalb des Dünndarms (Mundhöhle, Pharynx, Vallecula). Dieses Verteilungsmuster zeigt innerhalb des Dünndarms eine auffällige Präferenz für das Duodenum an.

Zusätzlich waren bei 5 Fällen nodale Strukturen involviert. Diese sind vor der gastrointestinalen Manifestation jedoch nicht bekannt gewesen, sodass eine parallele Genese beziehungsweise ein sekundärer Befall der Lymphknoten angenommen werden darf. Es scheint gerechtfertigt, auch bei diesen Fällen von primär gastrointestinalen follikulären Lymphomen zu sprechen, da die Haupttumormasse dem digestiven System zugeordnet werden konnte.

Morphologische Aspekte der primären GIFL

Für die morphologische Beurteilung wurden konventionell gefärbte Schnitte (Hämatoxylin-Eosin, Giemsa, Versilberungen, PAS) angefertigt, die in einem Konsensusverfahren von zwei Untersuchern (C. Thorns, T. Huckhagel) ausgewertet wurden.

Das Grading der Tumore erfolgte nach dem derzeit gültigen etablierten WHO-Schema (Harris et al. 2008). Pro Fall wurden 10 High-Power-Fields (hpf = 0,159 mm²; 40 X

Objektiv) ausgewertet. Die Klassifikation erfolgte nach dem höchsten histologischen Grad in der Probe. Die Grundlagen des WHO-Gradings finden hier der Vollständigkeit halber noch einmal Erwähnung :

Grad 1 → 0- 5 Centroblasten pro hpf

Grad 2 → 6-15 Centroblasten pro hpf

Grad 3 → >15 Centroblasten pro hpf

Grad 3 a: noch Centrozyten vorhanden

Grad 3 b: geschlossene Centroblastenrasen ohne Centrozyten

Bezüglich des histologischen Gradings ergab sich bei den GIFL ein deutlicher Hang zu niedrigen Tumorgraden. 20 Patienten ließen einen Grad-1-Tumor erkennen und 8 Fälle wurden als FL vom Grad 2 klassifiziert. Somit waren 28 von insgesamt 31 und damit 90,3% der Tumoren niedriggradig („low grade“). 3 Fälle zeigten einen höheren Centroblastenanteil als 15 pro hpf, so dass diese zu den FL Grad 3 zu rechnen waren. Einer dieser 3 Fälle zeichnete sich durch flächendeckende Centroblastenrasen (dichtes Feld aus Centroblasten ohne erkennbare Centrocyten) aus und erfüllte somit die Kriterien des Untergrades 3 b.

Betrachtet man die folliculäre Wachstumsstruktur der GIFL, so waren bei 21% (6/29) der Fälle diffuse Anteile von mehr als 20% der Tumorfläche vorhanden. Unter den 6 Tumoren befand sich lediglich 1 FL vom Grad 3. Bei dieser Konstellation wird konventionsgemäß die Zusatzdiagnose eines diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) gestellt.

Eine Aussage über die Existenz einer Sklerose konnte bei insgesamt 29 von 31 GIFL (93,6%) getroffen werden. Bei einem Anteil von 82,8% (24/29) trat keine Sklerose im bioptisch gesicherten Material auf. Bei den restlichen 17,2% (5/29) lag nur eine leicht ausgeprägte Sklerose vor.

Kategorie	Werte der GIFL	Kommentar
Geschlechtsverhältnis (m:w)	1,07:1 (1,07)	
Alter in Jahren (arithmetisches Mittel)	63,7	Spannweite von 39-85
Lokalisation	14 X Duodenum 6 X Ileum 1 X Jejunum 6 X Dünndarm (nicht spezifiziert) 4 X andere (Pharynx, Mundhöhle, Vallecula)	-Bevorzugter Befall des Duodenums -zusätzlich bei 5 Fällen paralleler Befall nodaler Strukturen
Grading (1,2,3a und b; nach WHO)	20 X Grad 1 8 X Grad 2 3 X Grad 3	Die 3 Tumore vom WHO- Grad 3 ließen sich in 2 Fälle mit Grad 3a und einen Fall mit Grad 3b unterteilen
Diffuse Anteile > 20%	21% (6/29)	Davon nur 1 Fall Grad 3
Sklerose (kein, gering, stark)	82,8% (24/29) : kein 17,2% (5/29): gering	

Tabelle 5: Zusammengefasste Darstellung der untersuchten epidemiologischen und histomorphologischen Charakteristika der primären gastrointestinalen follikulären Lymphome (GIFL).

Allgemeiner und morphologischer Vergleich der GIFL mit der Gruppe der primär nodalen follikulären Lymphome (NFL)

Die Prozentwerte sind, falls nicht anders angegeben, auf ganze Prozente gerundet. Dadurch bedingt können im Einzelfall die summierten Werte leicht über beziehungsweise unter 100% betragen. Die im Text genannten P-Werte wurden auf die dritte Nachkommastelle gerundet. Das vorab definierte Signifikanzniveau der verwendeten Tests liegt bei $\alpha=0,05=5\%$. Sofern es im Text nicht spezifischer definiert ist, liegt den folgenden statistischen Bewertungen immer die Betrachtung der zweiseitigen Signifikanz zugrunde.

Geschlecht

Bei beiden Gruppen ergab die Analyse ein annähernd ausgeglichenes Verhältnis der Geschlechter. Die GIFL hatten eine Ratio (m:w) von 1,07:1 und bei dem Kollektiv der NFL lag das Verhältnis bei 0,90:1 (m:w). Der aus den Daten nach dem Exakten Test nach Fisher berechnete P-Wert war mit 0,832 deutlich oberhalb des gewählten Signifikanzniveaus von 0,05 positioniert. Ein Anhaltspunkt für differente Geschlechtsverteilungen in beiden Kollektiven liegt also nicht vor.

Manifestationsalter

Das Durchschnittsalter der Patienten mit einem primären GIFL zeigte sich mit einem arithmetischen Mittel von 63,7 Jahren gegenüber dem Mittelwert der NFL von 56,3 um mehr als 7 Jahre nach oben versetzt. Der Altersunterschied in beiden Gruppen zum Zeitpunkt der Manifestation war signifikant. Betrachtete man für beide Fraktionen die Fälle der unter sechzig Jahre alten Patienten und stellte sie den mindestens sechzigjährigen Erkrankten (60 plus X, wobei $X \geq 0$) gegenüber, so konnte ein statistischer Nachweis für ein unterschiedliches Krankheitsmanifestationsalter erbracht werden (P-Wert: 0,01). Der Anteil der Patienten mit einem Alter von 60 oder mehr Jahren zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme war bei den primär gastrointestinalen folliculären Lymphomen mit 71% (22/31) deutlich höher als bei der Referenz der NFL mit 42% (33/78). Dies untermauert ein späteres Auftreten der GIFL gegenüber den NFL.

Knochenmarkinfiltration

Bezüglich des Knochenmarkbefalls war von den 31 Fällen der Studiengruppe nur bei 7 Patienten (22%) aus dem verfügbaren Datensatz eine Klärung des Knochenmarkstatus möglich. Von diesen 7 Patienten wiesen 3 Infiltrationen des Knochenmarks auf (43%). Aus dieser zahlenmäßig geringen Stichprobe ergeben sich keine Hinweise auf einen Unterschied des betrachteten Parameters gegenüber der Vergleichsgruppe der primär nodalen folliculären Lymphome (NFL), bei der ebenfalls in etwas weniger als der Hälfte der Fälle (37/78 = 47%) das Knochenmark befallen war. Aufgrund der unvollständigen Informationslage für den KM-Infiltrationsgrad der GIFL-Patienten sollten diese Ergebnisse allerdings nicht überbewertet werden.

Manifestationsort

In den Lokalisationen unterschieden sich beide Gruppen bereits per definitionem aufgrund der gewählten Einschlusskriterien der GIFL-Fraktion (siehe Abschnitt Material und Methoden). Voraussetzung für die Inklusion in das Studienkollektiv war eine primäre gastrointestinale Manifestation des folliculären Lymphoms. 27 der 31 (87%) untersuchten Fälle betrafen den Dünndarm. Relative Hauptlokalisation war mit 14 von 31 (45%) Biopsaten das Duodenum. Das Vergleichskollektiv zeigte dementsprechend andere primäre Lokalisationen. Alle Excidate der Vergleichsgruppe waren nodalen Ursprungs, wobei 37% (29/78) der Biopsate einen cervicalen Entnahmeort und 28% (22/78) der Gewebeproben einen inguinalen Ursprung aufwiesen. 17% (13/78) der Fälle waren axillär lokalisiert.

Grading

Das histologische Grading wurde für beide Gruppen hinsichtlich der relativen Häufigkeit von High-Grade-Tumoren untersucht (Grad 3a und b). 3 von 31 (10%) Tumoren der Studiengruppe (GIFL) mussten als hochmaligne eingestuft werden. Bei der Komparationsgruppe (NFL) zeigten 24% der Präparate das histologische Bild eines hochmalignen folliculären Lymphoms (Grad 3a oder 3b). Obwohl der Unterschied zwischen den GIFL und den NFL recht groß zu sein scheint, erreichte er in der statistischen Überprüfung noch keine Signifikanz (P-Wert: 0,114), so dass allenfalls ein Trend zu

niedrigeren Graden der GIFL gegenüber den unselektionierten FL aus den vorliegenden Daten herausgelesen werden kann. Eine weitere Differenzierung der Gradeinteilung des GIFL zeigte, dass unter den 28 sogenannten Low-Grade-Tumoren eine deutliche Mehrheit von 20 FL den histologischen Grad 1 und demgegenüber eine Minderheit von 8 Neoplasien einen Grad 2 aufwies. Dieses Verhältnis von 2,5:1 (20 FL vom Grad 1 / 8 FL vom Grad 2) wurde in der Gruppe der primär nodalen follikulären Lymphome (NFL) mit 43 Fällen vom Grad 1 und 16 Proben vom histologischen Grad 2 und damit einem Verhältnis von 2,7:1 nachvollzogen. Es ergeben sich damit aus den Beobachtungen keine statistisch untermauerten Beweise dafür, dass sich die Studiengruppen hinsichtlich ihres WHO-Grades und damit in ihren Relationen von Centroblasten zu Centrozyten unterscheiden lassen.

Diffuse Areale

21% (6/29) der betrachteten GIFL wiesen diffuse Anteile von mehr als 20% der Tumorfläche auf. Die NFL ließen zu 28% (22/78) diffuse Areale von mehr als 20% der Tumorfläche erkennen. In dem Grundkollektiv (UFL) galt dies ebenfalls für einen Anteil von 28%. Eine genaue Analyse der durchschnittlichen diffusen Tumorflächen beider Kontingente ergab 10% für die GIFL und 19% für die NFL. Damit verfehlten die Unterschiede eine statistische Signifikanz mit $p=0,621$. Es liegt also kein hinreichend begründeter Verdacht auf ein geringer ausgeprägtes beziehungsweise selteneres diffuses Wachstum bei der Subgruppe der primär gastrointestinalen follikulären Lymphome gegenüber den NFL vor.

Sklerose

Ein weiterer morphologischer Parameter, der bei dem follikulären Lymphom beschrieben wird, ist die Sklerose. In den 31 Fällen der GIFL konnte bei 29 Präparaten eine Auswertung dieses Kriteriums erfolgen (94%). Bei 83% (24/29) der untersuchten Schnitte ließ sich keine Sklerose ausfindig machen, die restlichen Tumoren zeigten allesamt lediglich eine leichte Sklerose (17% = 5/29). Vergleicht man diese Ergebnisse mit den NFL, so fällt auf, dass die nodalen follikulären Lymphome zu 58% (45/78) eine Sklerose aufweisen, wobei 36% (entsprechend 62% der für das qualitative Kriterium der Sklerose positiven Fälle) der NFL eine bezüglich dem quantitativen Aspekt leichtgradige und 22% (38% der sklerosepositiven Fälle) eine ausgeprägte Sklerosierung erkennen lassen. Es zeigte sich damit zwischen den Vergleichsgruppen (GIFL und NFL) eine deutliche Abweichung sowohl in Bezug auf die Existenz (qualitatives Kriterium) als auch hinsichtlich der Verteilung der Ausprägungsgrade (quantitatives Kriterium) einer Sklerose. Beide Gruppen differierten somit im relativen Anteil und in der Stärke der Sklerose. Die Unterschiede in der Skleroseausprägung waren statistisch hochsignifikant mit einem P-Wert von 0.00. Es scheint hiermit also ein belastbarer und zur Abgrenzung der GIFL gegenüber den primär nodalen FL geeigneter Parameter vorzuliegen.

Zusammenfassung allgemeiner und morphologischer Differenzen

Tabellarische Darstellung signifikanter epidemiologischer und morphologischer Unterschiede beider Studienkollektive (GIFL versus NFL)

Kriterium	GIFL (%)	NFL (%)	P-Wert
Anteil der bei Biopsieentnahme mindestens sechzig Jahre alten Patienten (Altersstruktur)	71	42	0,01
Sklerose	05/29	45/78	0,00

Tabelle 6: Der P-Wert ist hier in der Dezimalform auf die zweite Nachkommastelle gerundet angegeben. Es wurde der exakte Test nach Fisher angewendet; GIFL = primär gastrointestinale folliculäre Lymphome ; NFL = primär nodale folliculäre Lymphome (Vergleichsgruppe).

Immunhistochemische Befunde

Immunhistochemischer Vergleich der primär gastrointestinalen folliculären Lymphome mit der Referenzgruppe der nodalen folliculären Lymphome

Im Folgenden werden die primär gastrointestinalen FL auf immunhistochemische Parameter hin untersucht, die bei dem typischen FL nodalen Ursprunges charakteristische Ausprägungen haben. Es soll dabei geprüft werden, ob sich statistisch fundierte Differenzen im Antigenmuster des immunhistochemischen Profils beider Gruppen (GIFL versus NFL) finden lassen. Sämtliche Analysen wurden nach dem Konsensprinzip von 2 Untersuchern (C. Thorns, T. Huckhagel) vorgenommen.

CD 3

Das CD3-Molekül ist ein sogenannter Pan-T-Zellmarker. Die T-Zellen sind integraler Bestandteil des Tumormikromilieus und beeinflussen dieses neben weiteren Zellpopulationen wie zum Beispiel den Histozyten und den folliculären Dendritischen Retikulumzellen. Das umgebende Tumormilieu rückte in jüngster Zeit zunehmend in den Fokus des Interesses, da es für den klinischen Verlauf und die Pathogenese bedeutsam zu sein scheint (Leich et al. 2011). Es wurde zunächst das Verteilungsmuster ausgewertet. Dabei konnte zwischen 3 Kategorien zur Beschreibung der Verteilung CD3-positiver Zellen gewählt werden. Die Möglichkeiten waren im Einzelnen:

- ein diffuses Muster
- ein perifolliculäres Muster
- ein intrafolliculäres Muster

29 der 31 Fälle ließen sich diesbezüglich morphologisch auswerten (94%). In 76% (22/29) der Proben waren die CD3-positiven Zellen diffus verteilt. Die restlichen Schnitte kennzeichneten sich durch ein perifollikuläres Verteilungsmuster. Die Gruppe der NFL wies in 81% (63/78) der Fälle ein diffuses Muster auf. Damit ergaben sich in der statistischen Bewertung für diesen Parameter keine signifikanten Unterschiede (P-Wert 0,597).

Der Anteil an CD3-positiven T-Zellen lag im Kollektiv der GIFL bei durchschnittlich (arithmetisches Mittel) 15% mit einer Schwankungsbreite der Werte von 5% bis 40%. Die Referenzgruppe der NFL hatte einen durchschnittlichen Anteil CD3-positiver Zellen von 21%. Vergleicht man beide Fraktionen bezüglich der Anteile an CD3-positiven Zellen, indem man für die betreffenden Ensembles jeweils die Fälle mit maximal 10% CD3-positiven Zellen den Proben mit mehr als 10% CD3-exprimierenden Zellen gegenüberstellt, so liegt ein statistisch hochsignifikantes Ergebnis mit einem P-Wert von 0,000 vor. Damit darf für beide Gruppen ein Unterschied hinsichtlich des CD3-Expressionsniveaus konstatiert werden.

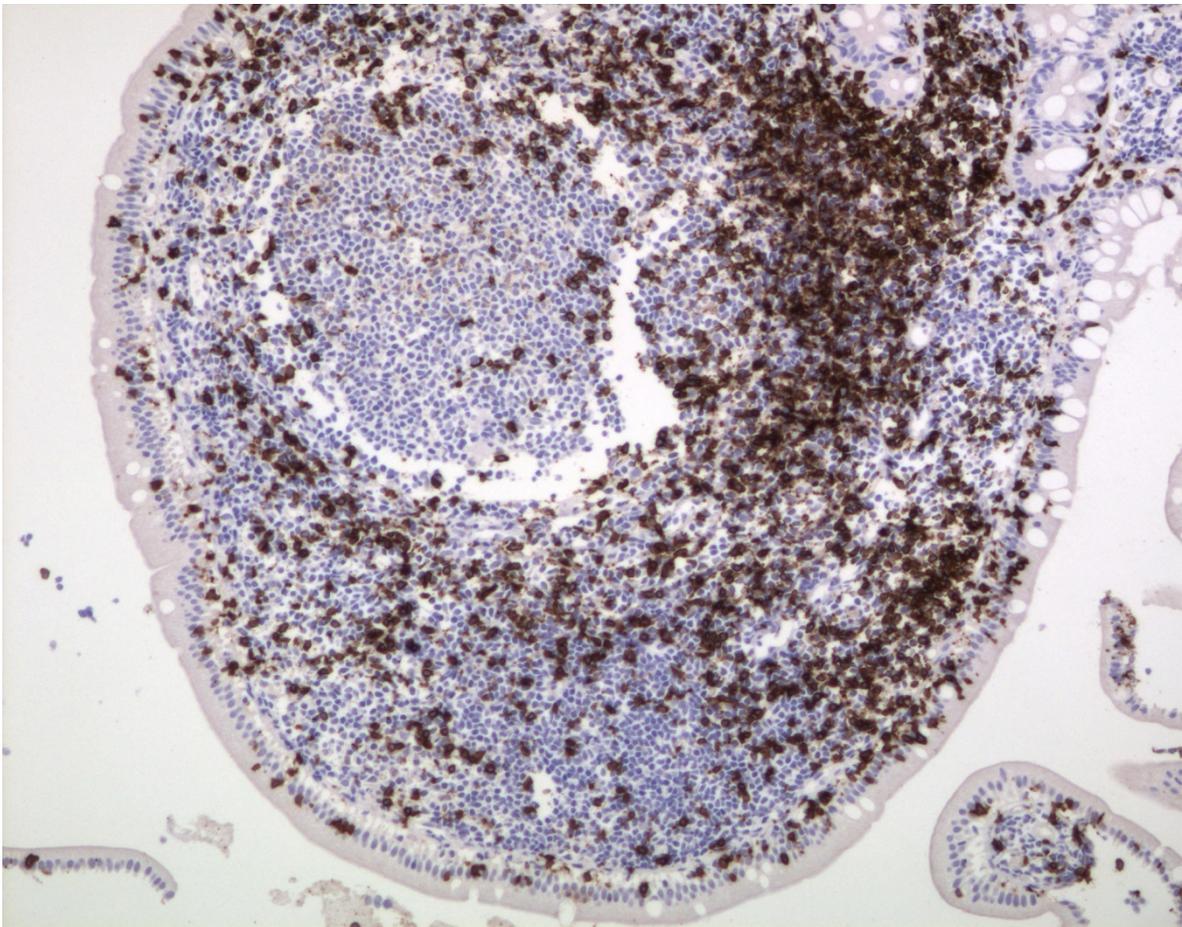


Abbildung 1: Der Ausschnitt zeigt eine diffuse Verteilung der CD3-markierten T-Zellen (10 X Objektiv) bei einem GIFL.

CD4

Das CD4-Antigen dient der T-Zellspezifizierung. Es charakterisiert die Subpopulation der T-Helfer-Zellen. Dieser Marker wurde nach demselben Schema evaluiert wie zuvor das CD3. Es waren 29 von 31 Fällen und damit 94% beurteilbar. Von diesen präsentierten 90% (26/29) ein diffuses Ausbreitungsmuster. Die übrigen 10% (3/29) ließen eine perifollikuläre Verteilung erkennen. Die nodalen follikulären Lymphome (NFL) des Komparationskollektivs wiesen zu 83% (65/78) ein diffuses Muster auf. 13% (10/78) ließen eine perifollikuläre Akkumulation erkennen und 4% (3/78) zeigten eine intrafollikuläre Fokussierung der CD4-positiven Zellen. Dieses Kriterium der Verteilung CD4-positiver Zellen betreffend war keine Signifikanz für eine Differenz in den einander gegenübergestellten Gruppen gegeben (Chi-Quadrat-Test nach Pearson mit $p=0,516$). Ein Unterschied bestand jedoch darin, dass bei den nodalen Fällen auch 3 hauptsächlich intrafollikuläre Anhäufungen der markierten Zellen auftraten (4% versus 0% bei den GIFL). Der relative Anteil CD4-positiver Zellen betrug bei den GIFL 7% mit einer Bandbreite von 5% - 15%. 95% der analysierten Fälle hatten einen CD4-Anteil bezogen auf die Gesamtzellmasse von höchstens 10%. Das Referenzkollektiv der NFL bot hier einen deutlich höheren Durchschnittswert mit 15% CD4-positiven Zellen. Der Prozentsatz an Fällen mit maximal 10% CD4-positiver Zellen gemessen an der Gesamtzellzahl im Präparat lag in diesem Kollektiv bei 41% (32/78). Der Unterschied war mit einem P-Wert von 0,000 hochsignifikant. Es darf also von einer quantitativen Differenz hinsichtlich des t-zellulären Mikrotumormilieus beider Fraktionen ausgegangen werden. Die GIFL scheinen damit eine geringere Anzahl CD4-positiver Zellen zu enthalten.

CD8

Ebenso wie das CD4-Molekül dient auch das CD8 der Spezifizierung einer T-Zell-Subpopulation. Diese Untergruppe wird durch die zytotoxischen T-Zellen repräsentiert, die in der Lage sind, anhand von Perforinen Zellwände zu desintegrieren. Das Verteilungsbild wurde ebenso wie beim CD4 in drei qualitativ verschiedene Ausprägungstypen untergliedert (diffus, perifollikulär, intrafollikulär). Es waren 94% (29/31) der Proben für die immunhistochemische CD8-Untersuchung analysierbar. Ein diffuses Muster lag bei 93% (27/29) der Fälle vor. Bei 2 (7%) Präparaten positionierten sich die CD8-positiven Zellen perifollikulär. Ein ganz ähnliches Lokalisationsverhältnis konnte bei der Referenzgruppe verzeichnet werden. Bei den 78 NFL erbrachte die Auswertung in 90% (70/78) der Gewebeschnitte ein diffuses Verteilungsbild, während 9% (7/78) eine überwiegend perifollikuläre Akkumulation erkennen ließen. In einem Fall (entsprechend einem Anteil von 1% (1/78)) waren die CD8-positiven Zellen intrafollikulär zentriert. Auch bei der Grundgesamtheit der unselektionierten FL waren die Verhältnisse ähnlich gelagert. Hier hatten 88% (90/102) der CD8-exprimierenden Zellen eine vornehmlich diffuse Verbreitung. Es lag mit einem P-Wert von 0,776 im Vergleich der GIFL mit den NFL kein Anhaltspunkt für einen Unterschied in beiden Kollektiven vor. Im Durchschnitt (arithmetisches Mittel) konnte auf 7% der Zellen der GIFL das CD8-Molekül immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die Variabilität erstreckte sich dabei von 5%-20%. Der relative Anteil von Fällen, in denen CD8 höchstens in 10% der Zellen sichtbar gemacht werden konnte, bildete mit 96% die Majorität. Auch hier war der CD8-Anteil der Referenzproben (NFL) mit einem Mittelwert von 8% nahezu identisch. Der Anteil der Fälle mit einem Maximalwert von 10% an CD8-markierten Zellen lag bei 88% (69/78). Damit besteht kein statistisch fundierter Hinweis für eine diesbezügliche Differenz beider

Kollektive (GIFL versus NFL) (P-Wert von 0,447).

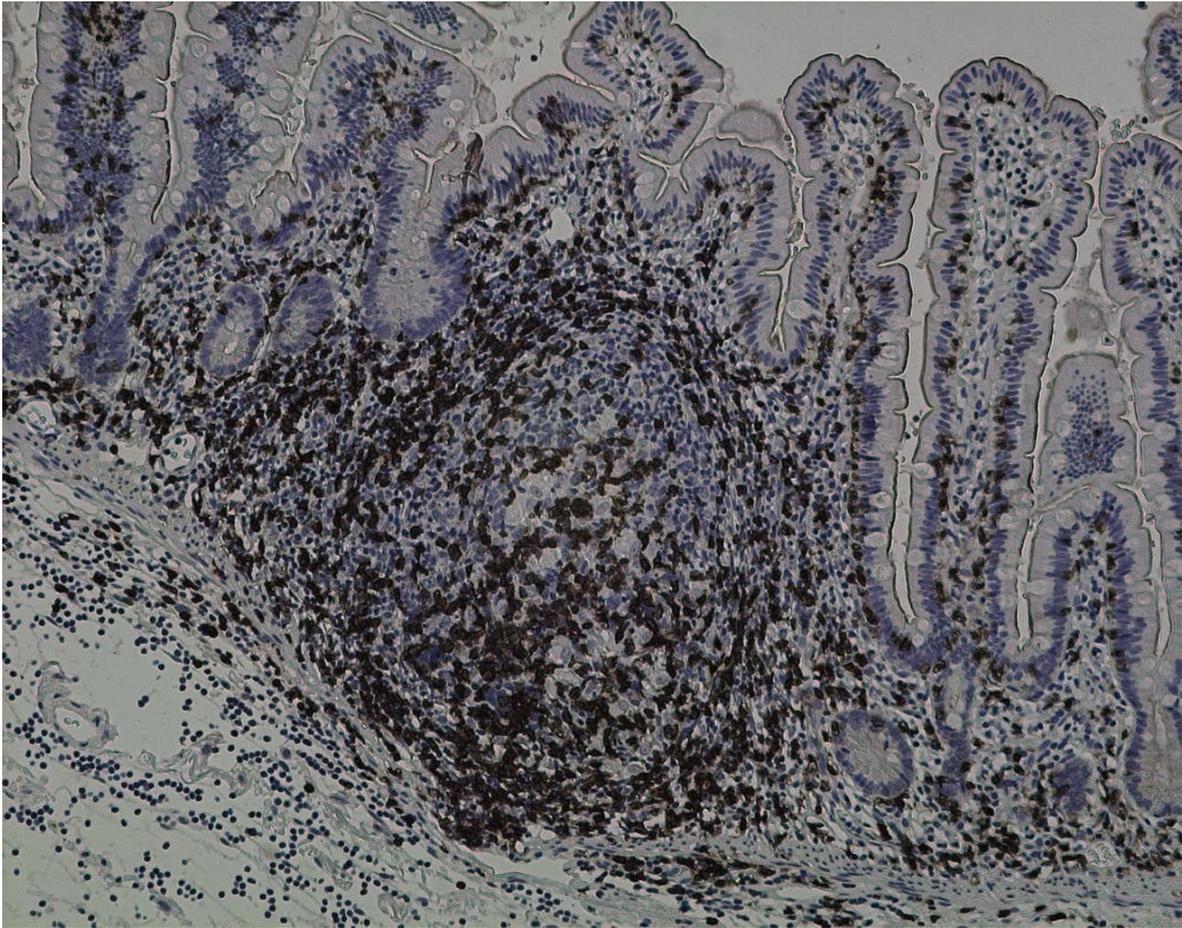


Abbildung 2: Diffuse Verteilung der CD8-positiven T-Zellen in einem primären gastrointestinalen folliculären Lymphom (10 X Objektiv).

Die CD4/CD8-Ratios sind aufgrund der Differenz der Anteile CD4-positiver Zellen beider Gruppen mit 1,000 (7% / 7%) bei den GIFL und 1,875 (15% / 8%) bei den NFL deutlich verschieden (p-Wert von 0,000).

CD68

CD68 (repräsentiert durch den Klon PGM-1) wird in Zellen des mononukleären Phagozytensystems, also in Monozyten und Makrophagen/Histiozyten exprimiert. Der verwendete Klon führt im Gegensatz zu anderen verwendeten diagnostischen Immunglobulinen nicht zu einer Darstellung der granulozytären Linie, so dass relativ selektiv das monozytär-histiozytäre System dargestellt werden kann. Es wurde einerseits die Verteilung der positiven Zellen nach dem schon beschriebenen Schema (diffus, peri- oder intrafollikulär) untersucht, und andererseits die relative Anzahl der CD68-markierten Zellen an der Gesamtzellularität bestimmt. In allen aussagefähigen Proben (28 von 31 Fällen waren auswertbar) fanden sich die entsprechenden Zellen diffus verteilt. Dies traf auch auf die Referenzgruppe zu. Hier zeigten 99% (75/76) der beurteilbaren Schnitte ein

diffuses Muster, wobei einmalig auch eine intrafollikuläre Akzentuierung der CD68-positiven Zellen gesehen wurde (1%; 1/76). Der P-Wert fiel dementsprechend nicht signifikant mit 1,000 aus.

Keines der Präparate aus der Gruppe der GIFL wies einen CD68-Anteil von mehr als 10% auf. In den meisten Fällen (64%; 18/28) trugen sogar weniger als 5% das CD68-Molekül in immunhistochemisch nachweisbarer Quantität. Bei der Vergleichskohorte der NFL gelang der Nachweis von mehr als 10% CD68-positiver Zellen bei 1% (1/76) der evaluationsfähigen Fälle. Damit ist ein statistisch signifikanter Unterschied nicht gegeben.

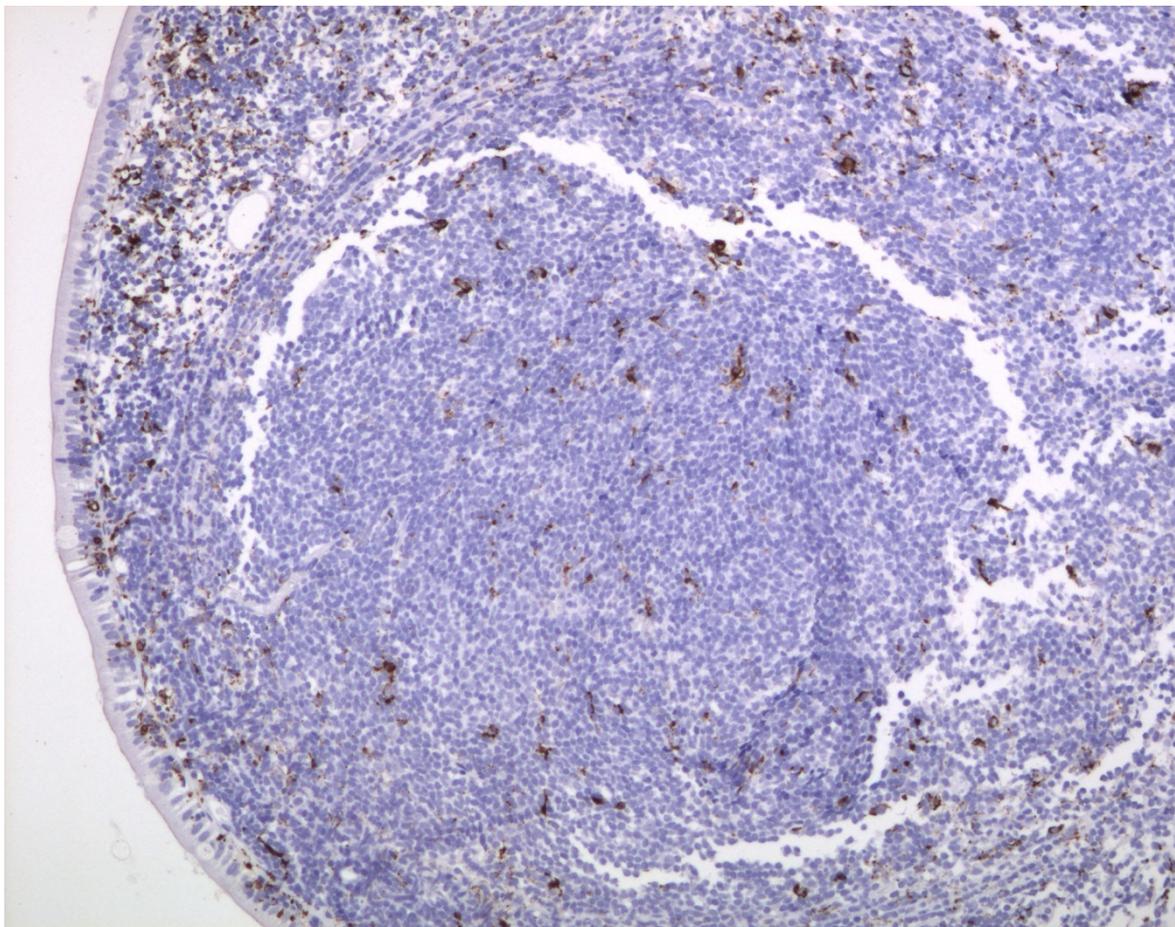


Abbildung 3: Im Bild erkennbar ist die für folliculäre Lymphome typische diffuse Verteilung der PGMI(=CD68)-markierten Makrophagen. Sie machen in den meisten Fällen einen relativen Anteil von weniger als 5% der Gesamtzellzahl aus (10 X Objektiv).

CD20

CD20 wird als sogenannter Pan-B-Zellmarker beschrieben. Es ist ein Molekül, das konstitutiv von nahezu allen B-Zellen exprimiert wird. Lediglich sehr frühe B-Präkursoren (=Pro-B-Zellen=B-Zellen, die noch keine IG μ -Schwerketten produzieren) sind CD20-negativ. Da das folliculäre Lymphom eine Tumorentität ist, die sich von einem neoplastisch entarteten Klon einer Keimzentrumszelle, die ja wiederum eine B-Zelle darstellt, ableitet, ist per se eine CD20-Positivität zu fordern. In allen 29 erfolgreich

immunhistochemisch präparierten Schnitten konnte eine CD20-Expression belegt werden. Gleiches gilt auch für die Referenzgruppe. Alle Fälle der NFL-Gruppe präsentierten CD20-markierte Tumorzellen.

CD10

Unter dem CD10-Molekül versteht man einen Marker für Zellen des Keimzentrums eines Lymphfollikels. In der Studiengruppe (GIFL) konnten 94% (29/31) immunhistochemisch für diesen Cluster of Differentiation evaluiert werden. Zugrundegelegt wurde eine semiquantitative Einteilung (einem ordinalen Skalenniveau entsprechend) in eine stark positive, eine schwach positive und eine negative Gruppe. Eine starke Expression fiel bei 83% (24/29) der GIFL auf, während die restlichen Präparate als schwach positiv einzustufen waren (17%). CD-10-negative Befunde gab es nicht. In der Referenz besaß das Gros der Fälle mit 74% (58/78) ebenfalls eine stark ausgeprägte CD10-Positivität. Es fiel hier aber auf, dass 8% (6/78) kein CD10 exprimierten. Bei 18% (14/78) konnte ein schwach positiver immunhistochemischer Nachweis für CD10 geführt werden. Die Befunde waren statistisch nicht signifikant (P-Wert: 0,297).

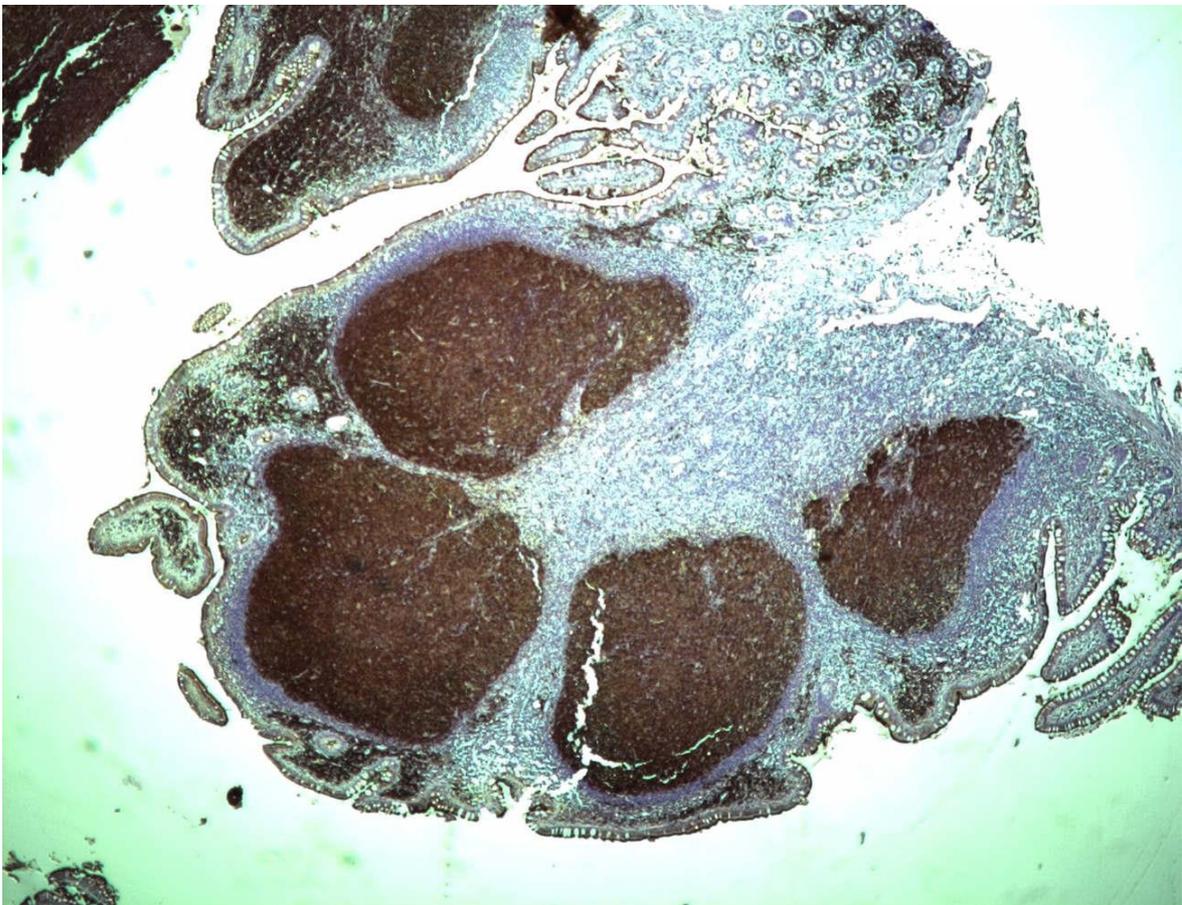


Abbildung 4: Es sind mehrere Follikel mit CD10-markierten Tumorzellen zu erkennen. Die Follikel erscheinen beim follikulären Lymphom typischerweise homogen ohne Polarisierung in eine helle und dunkle Zone, wie sie beim reaktiven Follikel mit Keimzentrum vorliegt; (2,5 X Objektiv).

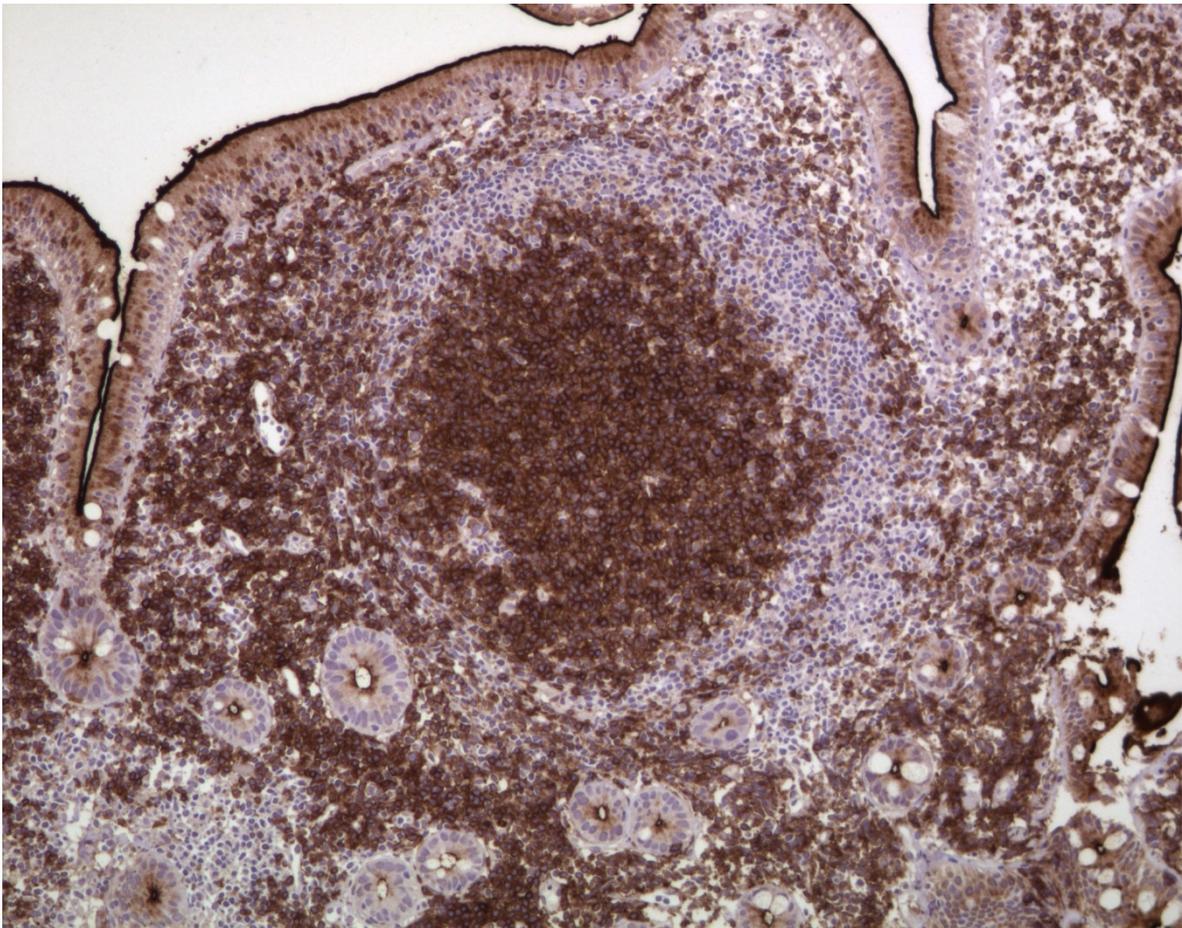


Abbildung 5: Neoplastischer Lymphfollikel mit perifollikulärer Umgebung in der CD10-Immunhistochemie bei stärkerer Vergrößerung (10 X Objektiv); man erkennt deutlich auch außerhalb des Follikels CD10-positive neoplastische Zellen.

Bandförmig subepitheliales Wachstumsmuster

Als Besonderheit der GIFL fiel bei insgesamt 3 von 31 Fällen (10%) im Rahmen der immunhistochemischen Analyse ein spezielles Wachstumsmuster der CD10+ Tumorzellen auf. Es zeigten sich subepithelial gelagerte bandförmige Tumorzellstraßen, die nicht mit diffusen Arealen in direktem räumlichen Kontakt standen. 2 der insgesamt 3 betroffenen Proben wiesen überhaupt keine diffusen Bereiche auf, sodass hier Verwechslungen beider Phänomene ausgeschlossen sein dürften.

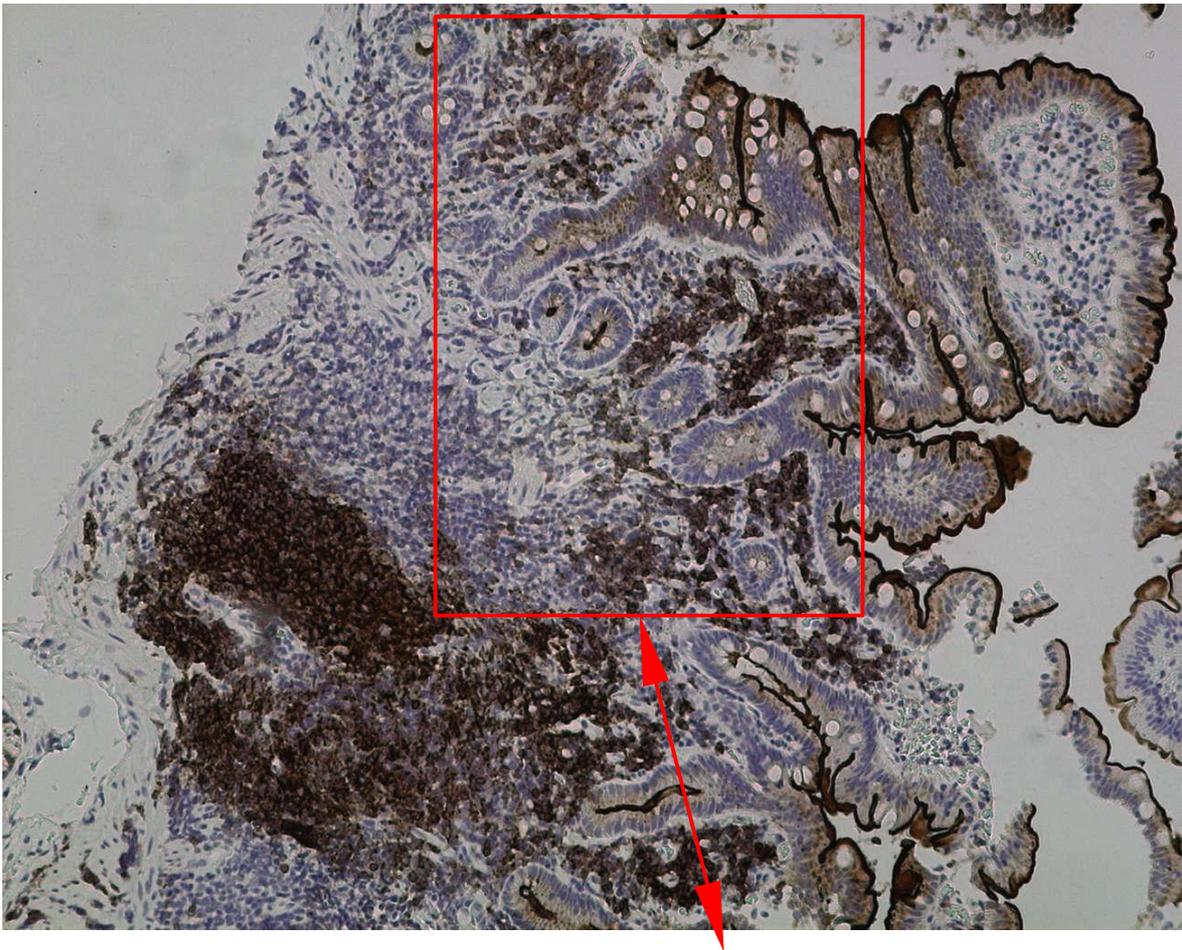
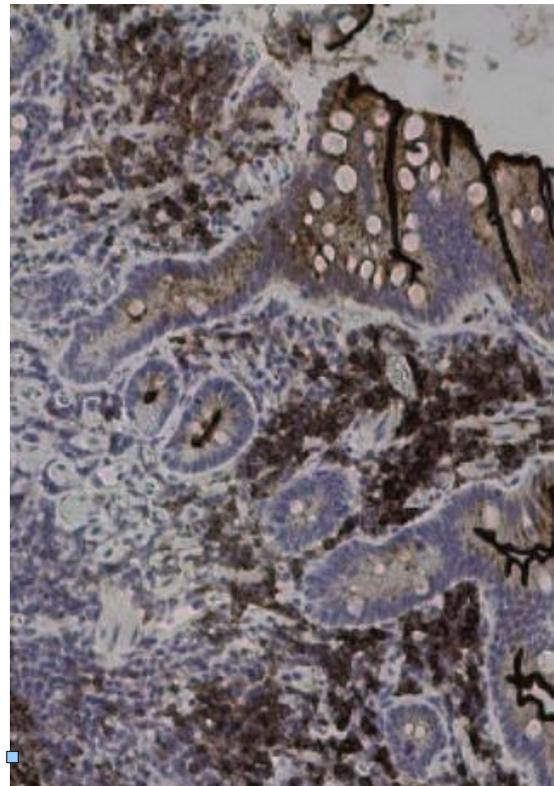


Abbildung 6: Die obere Abbildung zeigt ein bandförmig subepitheliales Wachstumsmuster der CD10-markierten Tumorzellen (schwarz) in einem GIFL. Zur Veranschaulichung wurde der essentielle Bereich nebenstehend nochmals vergrößert dargestellt (10 X Objektiv).



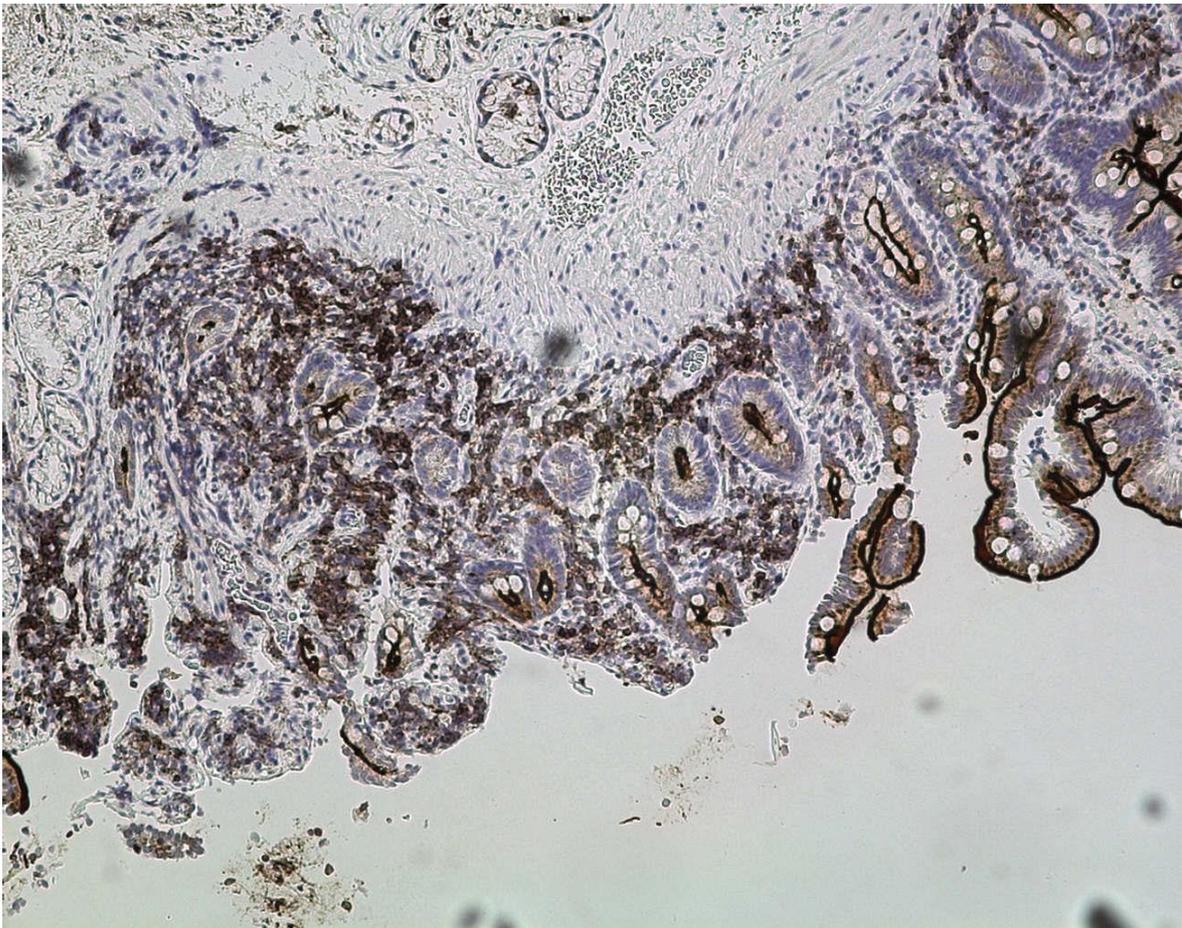


Abbildung 7: Bandförmig subepitheliales Muster CD10-positiver neoplastischer Zellen (schwarz) eines GIFL in der Bildmitte (10 X Objektiv) in einem weiteren Fall.

Bcl6

Bcl6 zählt, wie auch das CD10-Molekül, ebenfalls zu den keimzentrumsassoziierten Markern. Das Bcl6-Gen enthält die Erbinformation für einen Transkriptionsrepressor und ist auf dem Chromosom 3q27 lokalisiert. Im Endeffekt akkumulieren die Einzelwirkungen der Transkriptionsrepression in der Beeinflussung der lymphozytären Differenzierung. Es ist ein Antagonist des BLIMP, des B-Lymphozyten induzierten Maturationsproteins, das die Differenzierung der Lymphozyten steuert (Crotty et al. 2010). Von der Studiengruppe konnten 87% (27/31) der Fälle beurteilt werden. Es erfolgte eine Einstufung nach einem semiquantitativen Schema (stark positiv, schwach positiv, negativ). 78% der Proben waren als stark positiv zu taxieren, 19% (5/27) wiesen eine schwache Ausprägung auf. Ein Fall (4%) erbrachte keinen Nachweis für eine Bcl6-Expression. In der Referenzgruppe der nodalen FL konnte die Bcl6-Immunhistochemie bei 45% (35/78) der Proben untersucht werden. Das Verteilungsmuster der einzelnen Fraktionen verhielt sich gegenüber der GIFL-Gruppe ähnlich. 71% (25/35) der Präparate brachten eine stark positive Bcl6-Expression hervor, während 29% (10/35) für Bcl6 nur schwach anfärbbar waren. In der Referenzgruppe (NFL) war im Gegensatz zur Studiengruppe der GIFL kein Fall negativ für Bcl6. Durch die ähnliche Ausprägung in beiden Vergleichspopulationen lag ein P-Wert

von 0,365 und damit keine statistisch signifikante Differenz vor.

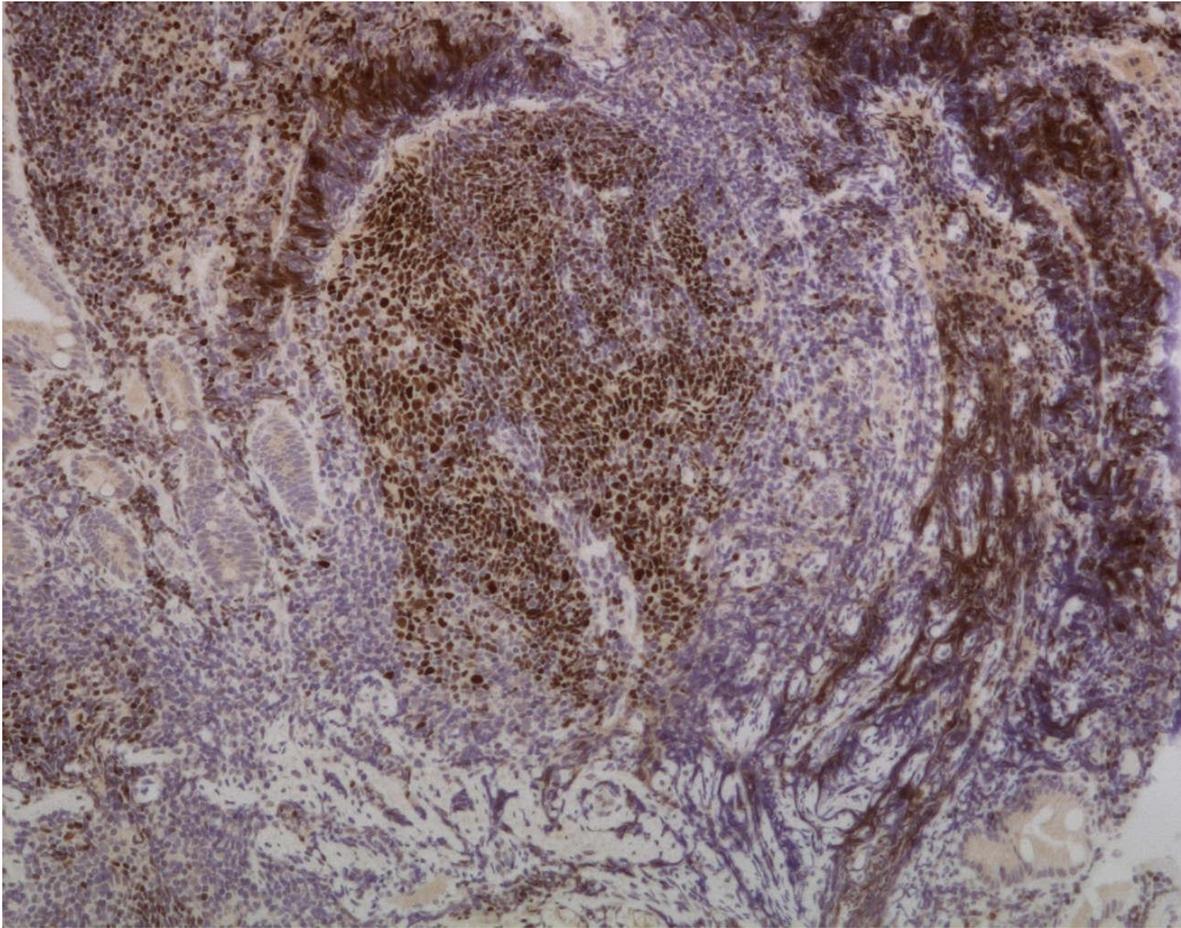


Abbildung 8: Immunhistochemisch Bcl6-positiver Follikel in der Bildmitte (10 X Objektiv).

Bcl2

Bcl2 ist ein entscheidender Faktor bei der Genese des folliculären Lymphoms. Eine Translokation des Bcl2-Gens von Chromosom 18 in den Bereich des Promotors der Immunglobulinschwerkette (IGH) auf Chromosom 14 ist ein wesentliches Charakteristikum für diesen Typus der niedrigmalignen NHL. Der Schwerkettenpromotor sorgt konsekutiv für eine deregulierte Hyperexpression des Bcl2-Gens in den betroffenen Zellen, die dann wiederum der immunhistochemischen Auswertung zugänglich sind. In seiner Wirkung entfaltet Bcl2 vor allen Dingen eine immortalisierende Funktion. Es kann daher als Antiapoptotikum bezeichnet werden. Da T-Zellen konstitutionell Bcl2 exprimieren, werden sie bei der Evaluation als interne Referenz des jeweiligen Präparates genutzt. Eine starke oder schwache Bcl2-Positivität ist also immer relativ zu den im Präparat befindlichen T-Zellen zu sehen. Für Bcl2 waren 94% (29/31) der Schnitte aus den GIFL-Fällen beurteilbar. 93% (27/29) exprimierten das Molekül in gleicher oder höherer Intensität als die umliegenden T-Zellen, jeweils 3,5% (1/29) erreichten eine schwache Positivität oder waren als negativ einzustufen. Die nodalen FL boten ein hiervon deutlich abweichendes Bild. Hier konnten alle 78 Fälle immunhistochemisch ausgewertet werden. Davon lag bei 72% (56/78) eine gleich starke oder ausgeprägtere Bcl2-Expression als in

den T-Zellen der jeweiligen Probe vor. 22% (17/78) offenbarten eine geringere Positivität und 6% (5/78) waren negativ. Es ergab sich damit ein Hinweis für eine differierende BCL2-Expression beider Kollektive, der mit einem P-Wert von 0,055 die festgelegte Signifikanzschwelle nur marginal verfehlte.

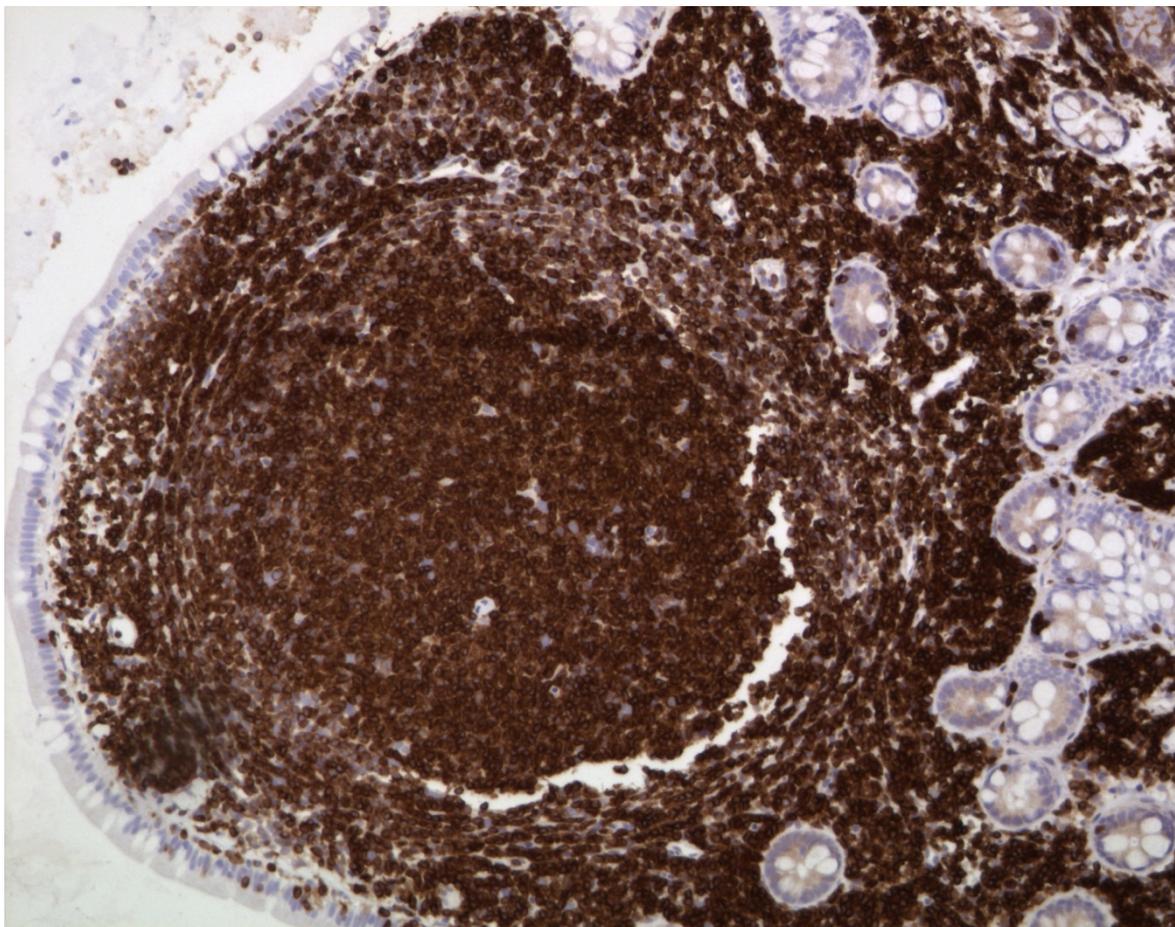


Abbildung 9: Ausgeprägte intra- und perifollikuläre Expression von Bcl2 in einem GIFL (10 X Objektiv).

IgD

Das IgD (Immunglobulin D) wird von nicht neoplastischen Zellen des Follikelmantels exprimiert. Es eignet sich daher sehr gut dazu, bei follikulären Lymphomen den Anteil an erhaltenen Follikelmänteln zu bestimmen. Eine Mantelzone wurde in dieser Studie als existent gewertet, wenn sie mindestens ein Viertel der Zirkumferenz des Follikels umfasste. Die Untersuchung erfolgte dahingehend, dass der Anteil der Lymphfollikel mit erhaltener Mantelzone am Gesamtbestand der Follikel im mikroskopierten Feld der jeweiligen Probe ermittelt wurde. 29 von 31 Fällen konnten auf IgD-Kränze hin beurteilt werden. Es waren in der Gruppe der gastrointestinalen follikulären Lymphome nur bei einem Präparat 3% (1/29) Mantelzonen nach der oben beschriebenen Definition nachweisbar. Hier wurde in 20% der Follikel ein erhaltener Mantel beobachtet. Dieser Befund stellte einen deutlichen Kontrast zu den Ergebnissen in der Referenzgruppe der NFL dar. Hier war die Fraktion der Fälle mit erhaltenen Mantelzonen deutlich größer. 96%

(75/78) der Proben der NFL konnten ausgewertet werden. Von diesen trugen 33% (25/75) Follikelmäntel mit einem durchschnittlichen Anteil von 42%, wobei sich der Anteil in den einzelnen Proben sehr variabel verhielt (Range: 5-100%). Die restlichen 67% (50/75) der NFL wiesen keine Mantelzonen nach obiger Definition auf. Die relativen Anteile erhaltener Mäntel in den positiven Proben beider Kollektive zu vergleichen ist aufgrund der Tatsache, dass in der Studiengruppe nur für einen Fall ein von Null verschiedener Wert vorliegt, nicht angebracht. Es erscheint sinnvoller, die Frage nach der Existenz oder dem Fehlen von Follikelmänteln unabhängig vom jeweiligen Ausprägungsgrad, also den Relativanteil positiver Präparate beider Gruppen, zu bewerten. Hier konnte ein statistisch hoch signifikantes Ergebnis für die Unterschiedlichkeit beider Populationen belegt werden. Der P-Wert belief sich auf 0,002.

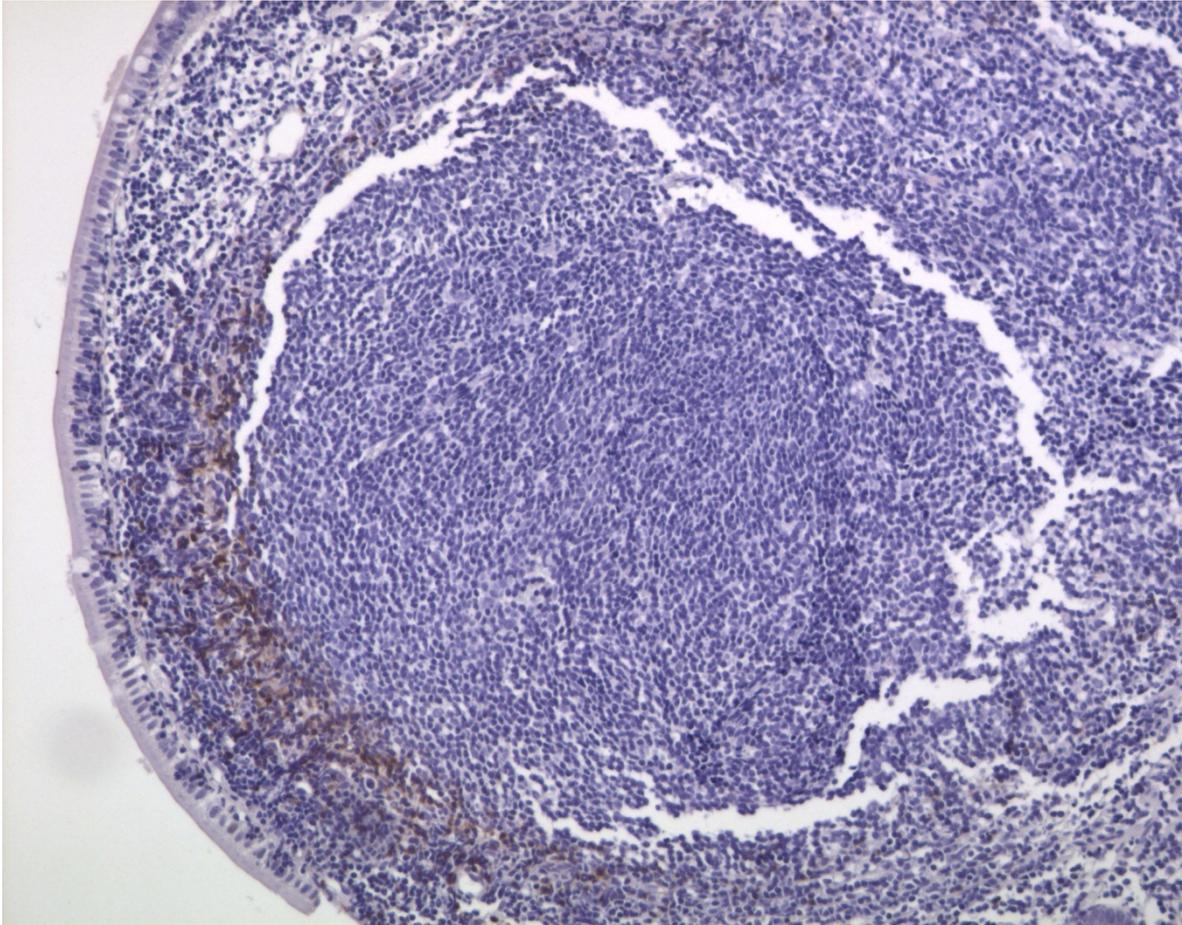


Abbildung 10: Partuell erhaltener Follikelmantel im unteren linken Bildanteil (10 X Objektiv). Die Mantelzellen kommen in der IgD-Immunhistochemie zur Darstellung.

MIB

MIB findet in der immunhistochemischen Analyse weite Verbreitung als Proliferationsmarker. Es ist ein Antikörper, der gegen das Antigen Ki-67 gerichtet ist. Dieses Protein kann in allen Phasen des aktiven Zellzyklus (G1, S, G2, Mitose) nachgewiesen werden, fehlt aber bei ruhenden Zellen (G0). Aufgrund dieser Eigenschaft

wird das Zellwachstum gut abgebildet. Bestimmt wurden 2 Indices (Ki-67-labeling-Index). Zunächst einmal erfolgte eine Berechnung des durchschnittlichen Proliferationsanteils aller Tumorzellen und in zweiter Linie eine Kalkulation des maximalen MIB-Indexes, der in einem Gesichtsfeld des Präparates beobachtet werden konnte (punctum maximum, hot spot).

Der mittlere MIB-Index lag bei den GIFL, von denen 94% (29/31) ausgewertet werden konnten, bei 11,4% mit einer sehr variablen Bandbreite von 5% bis 60%. Der maximale MIB-Index im Fokus betrug im Mittel 19,3% mit einem Höchstwert von 75% in einer Probe. Die Referenzgruppe (NFL) ließ deutlich höhere Werte bei beiden Parametern erkennen. Hier ergab die Auszählung der beurteilbaren Fälle (77/78) eine Rate von 19% für den durchschnittlichen mittleren MIB-Index und 43% für das arithmetische Mittel der fokalen maximalen Proliferationsraten (hot spot, punctum maximum). Damit war interessanterweise der durchschnittliche Proliferationsanteil der gesamten Tumorphäche bei den Referenzproben der NFL so hoch wie die puncta maxima der primär gastrointestinalen FL (GIFL). Für beide Werte (MIB mittel und MIB maximal) konnten beim Vergleich beider Gruppen statistisch hochsignifikante Unterschiede mit P-Werten von 0,001 für den mittleren MIB-Index und 0,000 für die fokalen Maxima belegt werden.

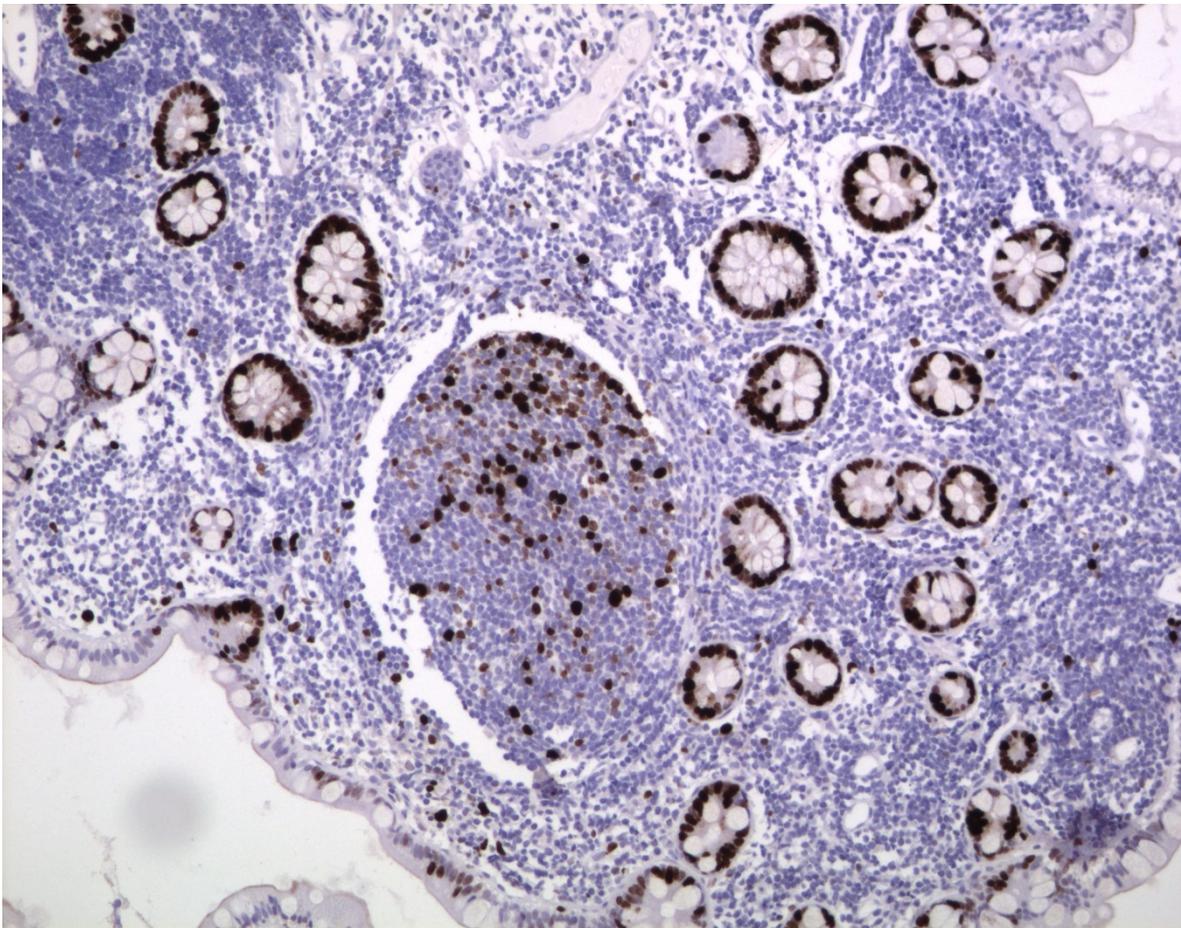


Abbildung 11: Die Mikrofotografie zeigt die MIB-markierte proliferative Zellfraktion. Diese Zellen befinden sich im aktiven Zellzyklus und grenzen sich damit von den inaktiven Zellen der G₀-Phase ab. Angefärbt sind ebenfalls die Drüsenepithelien, die physiologischerweise einen hohen Zellumsatz aufweisen (10 X Objektiv).

CD23

Das CD23-Molekül wird von folliculären dendritischen Zellen (FDC) exprimiert. Diese bilden den Lymphfollikel durchziehende retikuläre Strukturen aus, sogenannte FDC-Netze. Es ist weiterhin bekannt, dass die Tumorzellen der folliculären Lymphome zum Teil ebenfalls CD23 exprimieren. In der durchgeführten Studie wurden beide Aspekte ausgewertet. Zum einen wurden die einzelnen Fälle semiquantitativ auf die Existenz von FDC-Netzwerken hin untersucht. Dabei gab es vier mögliche Ausprägungsstufen (kein, schwach, mäßig, kräftig). Zum anderen wurde der Anteil an CD23-positiven Tumorzellen registriert, wobei die einzelnen Prozentsätze auf ordinalem Niveau zu drei Kategorien zusammengefasst wurden (<30%, 30-70%, >70%).

Die GIFL ließen sich zu 94% (29/31) hinsichtlich des CD23-Merkmals bewerten. 1 Fall (3%) zeigte keine Netzwerke in der verfügbaren Probe. 41% (12/29) trugen schwach ausgeprägte retikuläre Muster und jeweils 28% (8/29) präsentierten Tumorflächen mit mäßiger oder kräftiger Netzzeichnung. In der Referenzgruppe (NFL) wurde eine deutlich davon abweichende Verteilung ermittelt. Es konnten alle 78 Fälle ausgewertet werden. 10% (8/78) hatten keine FDC-Netze und 18% (14/78) kennzeichneten sich durch schwache Muster. 13% (10/78) brachten mäßige Netzwerke hervor und 59% (46/78) fielen mit kräftigen retikulären Strukturen auf. Diese in beiden Gruppen deutlich differenten Muster waren hochsignifikant (P-Wert:0,005). Interessanterweise sind bei der Gruppe der nodalen folliculären Lymphome die Extremfälle gegenüber den GIFL relativ häufiger. Dies betrifft sowohl die Fälle ohne, als auch diejenigen mit kräftigen FDC-Mustern.

Der Anteil positiver Tumorzellen in der Gruppe der primär gastrointestinalen folliculären Lymphome betrug in 72% der Fälle (21/29) unter 30%. In 24% (7/29) der Proben ließ sich ein Anteil zwischen 30% und 70% feststellen und nur ein Präparat (3%) (1/29) stach durch einen Anteil von mehr als 70% an CD23-positiven Tumorzellen hervor. Ein analoges Verteilungsspektrum trat auch in der nodalen Gruppe auf. Hier besaßen 69% (54/78) einen CD23-positiven Anteil an der Gesamttumorzellzahl von weniger als 30%, 19% (15/78) ließen zwischen 30% und 70% markierte Zellen erkennen und bei 12% (9/78) war die Rate mit über 70% zu veranschlagen. Aufgrund der ähnlichen Distributionsstruktur beider Kollektive konnte keine signifikante Differenz belegt werden. Der aus dem Chi-Quadratstest ermittelte P-Wert betrug 0,415.

Monotypische Leichtketten (λ / κ)

94% (29/31) der Biopsate konnten der Analyse zugeführt werden. Davon exprimierten 10% (3/29) monotypische Leichtketten der Immunglobuline. Einer der Fälle zeigte eine Coexpression von κ und λ . Das Gewebematerial der 3 Proben brachte ausschließlich monotypische Kappakettenmuster hervor. Solitäre Lambdaketten konnten damit in keinem Fall der GIFL nachgewiesen werden. Die NFL waren mit 38% (30/78) deutlich häufiger von einer monotypischen Leichtkettenexpression betroffen. Eine Coexpression beider Leichtketten lag in 4% (3/78) vor. Was die Verteilung der monotypischen Ketten anbelangt, so waren in 63% (19/30) Kappaketten und in 37% (11/30) Lambdaketten vorhanden. Dieses Verhältnis steht im Kontrast zur solitären Kappaexpression, die bei den primär gastrointestinalen FL zum Ausdruck kam. Die differierenden Raten der Existenz von monotypischen Leichtketten in beiden Gruppen sind mit einem P-Wert von 0,005 als hochsignifikant einzustufen. Aufgrund der seltenen monotypischen Ig-Leichtkettenexpression beim GIFL sollten die Befunde allerdings dennoch mit Zurückhaltung bewertet werden.

Lymphoepitheliale Läsionen (LEL)

Unter diesem Begriff sind B-Zell-Invasionen des Epithels von Schleimhäuten zu verstehen. Eine LEL wurde in diesem Studiendesign als Ansammlung von mehr als 5 Lymphozyten der B-Zell-Linie (CD20-positiv) innerhalb des Schleimhautepithels definiert. Weniger als 5 Lymphozyten wurden zwar unter der Kategorie 'wenige Lymphozyten' zusammengefasst registriert, erfüllten aber noch nicht die Kriterien einer LEL. Die Zielsetzung einer Untersuchung auf lymphoepitheliale Läsionen besteht darin, einen eventuell vorhandenen epithelialen Tropismus der Zellen aufzudecken. Da sich in den Lymphknoten naturgemäß kein Schleimhautgewebe befindet, konnte die Gruppe der nodalen folliculären Lymphome nicht auf lymphoepitheliale Läsionen untersucht werden. Es folgt daher eine deskriptive Analyse der GIFL ohne Vergleich mit einem Referenzkollektiv.

28 von 31 Fällen waren für die LEL-Analyse zugänglich, was einen Anteil von 90% aller GIFL-Proben umfasst. Von diesen 28 Biopsaten zeigten 50% (14/28) mindestens eine LEL. 36% (10/28) besaßen im untersuchten Schnitt keine B-Zell-Invasionen und 14% (4/28) wiesen zwar intraepitheliale B-Lymphozyten auf, die jedoch jeweils in der Anzahl ihrer Zellen zu gering ausfielen, um als LEL gewertet werden zu können.

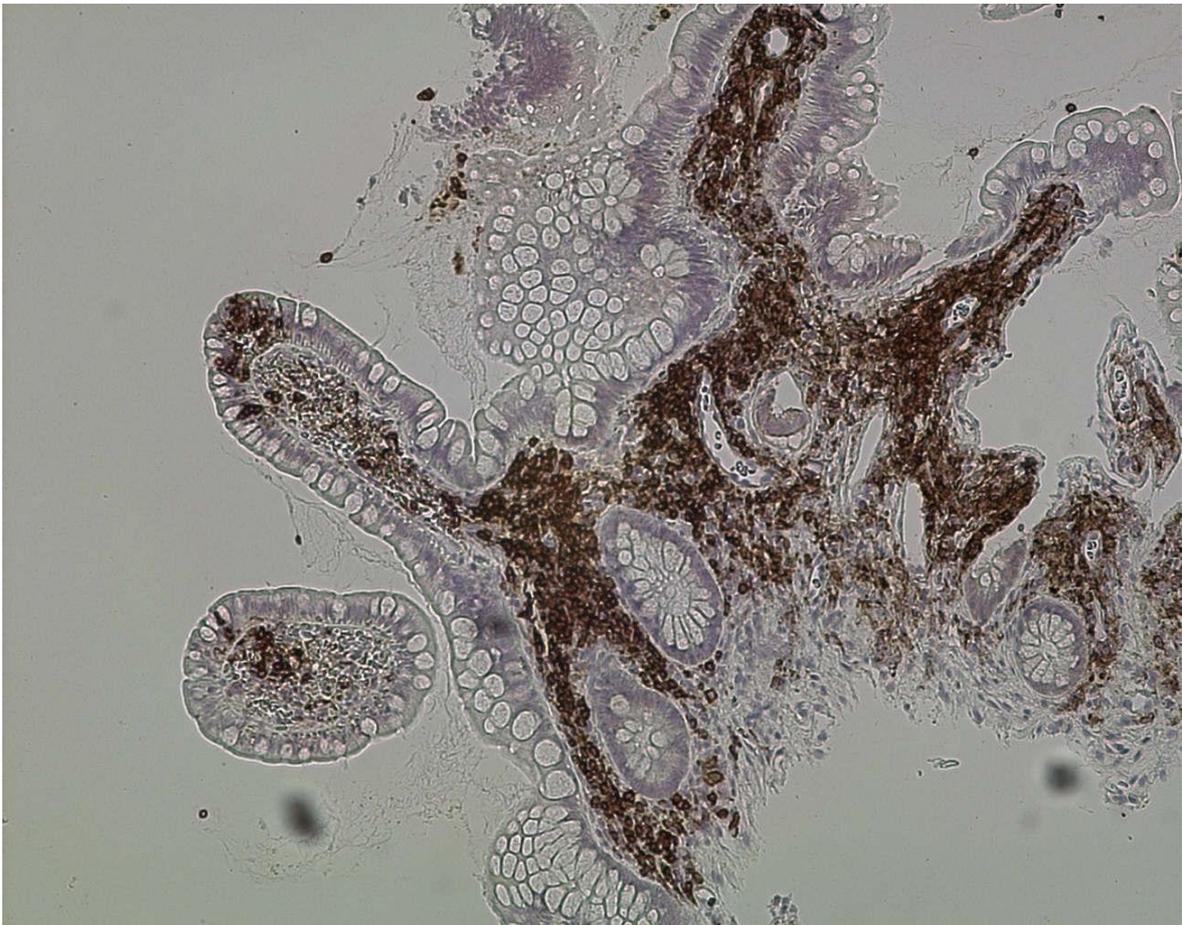


Abbildung 12: Deutlich ist eine LEL in der linken Bildmitte zu erkennen (10 X Objektiv). Die Tumorzellen (CD20-positiv) heben sich vom Epithel ab.

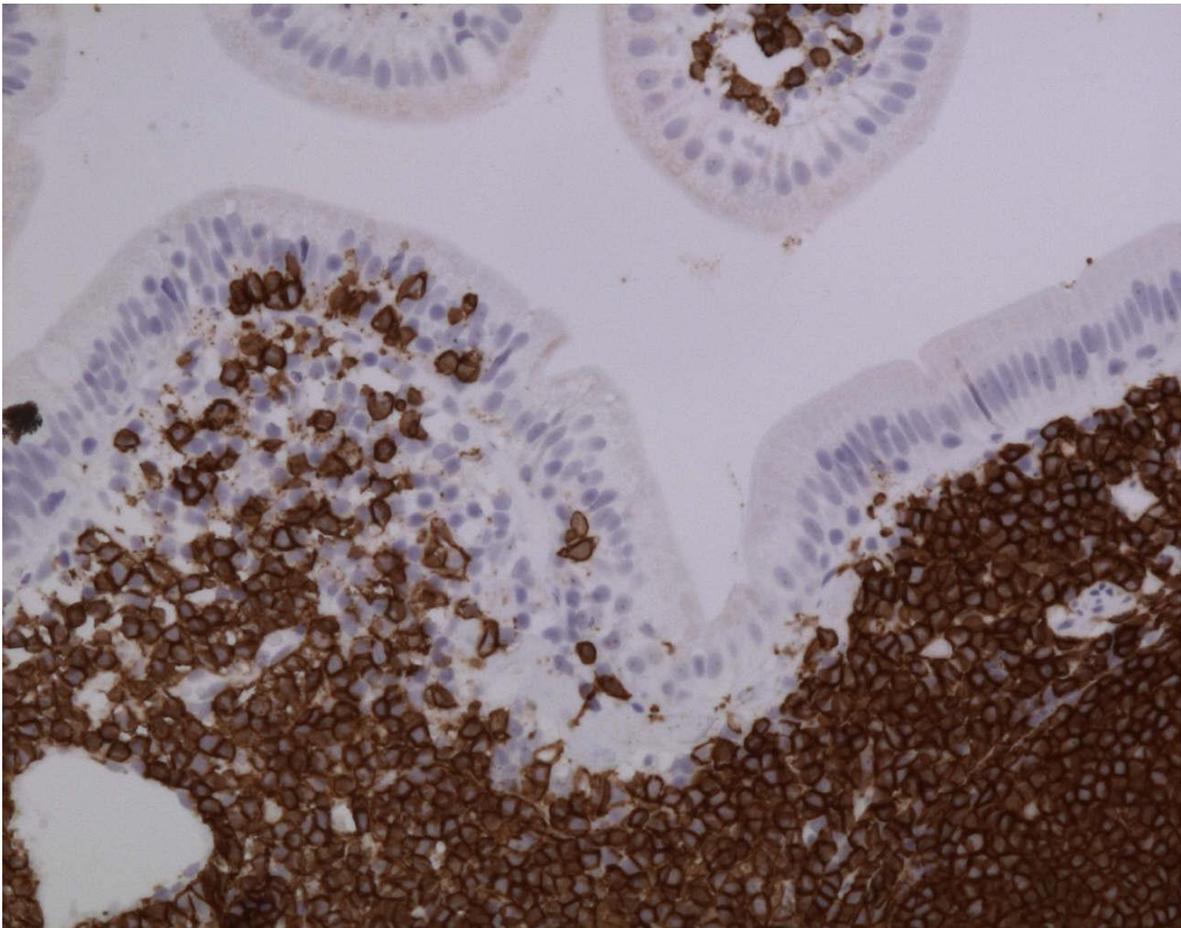


Abbildung 13: LEL im linken oberen Bild Drittel mit kumulierten CD20-markierten B-Zellen im Dünndarmepithel (20 X Objektiv).

Intraepitheliale Lymphozyten (IEL)

Die intraepithelialen Lymphozyten sind im Gegensatz zu den LEL (siehe oben) intraepithelial lokalisierte T-Zellen (CD3-positiv). Sie wurden semiquantitativ ausgewertet, wobei drei Kategorien wählbar waren. Keine IEL, weniger als 40 T-Lymphozyten pro 100 Zellen oder mehr als 40 T-Lymphozyten pro 100 Zellen. Auch hier war aufgrund der Tatsache, dass die Referenzproben sich aus Lymphknotengewebe zusammensetzten, kein Vergleich möglich und es kann daher nur eine Beschreibung der GIFL-Biopsate wiedergegeben werden. 32% (9/28) der Schnitte ließen keinerlei IEL erkennen. Eine Majorität von 68% (19/28) besaß zwar intraepithelial lokalisierte T-Zellen, welche aber die Schranke von 40 T-Lymphozyten pro 100 Zellen nicht überschritten. Kein Fall brachte eine T-Zell-Dichte hervor, die den Grenzwert (40/100) übertraf.

Zusammenfassung signifikanter immunhistochemischer Ergebnisse

Charakteristikum	GIFL in Prozent	NFL in Prozent	P-Wert Dezimalwerte ¹
CD3 (Anteil der Fälle mit maximal 10% positiven Zellen)	46 (13/28)	10 (8/78)	0,000
CD4 (Anteil der Fälle mit maximal 10% positiven Zellen)	95 (21/22)	41 (32/78)	0,000
Bcl2- Expression stärker (als T-Zellen ²) geringer (als T-Zellen ²) negativ	93 (27/29) 3 (1/29) 3 (1/29)	72 (56/78) 22 (17/78) 6 (5/78)	0,055
MIB-Index Mittelwert (Anteil der Fälle mit maximal 10% positiven Zellen)	79 (23/29)	43 (33/76)	0,001
Maximaler MIB-Index im Follikel mit der höchsten Expression (Anteil der Fälle mit maximal 10% positiven Zellen)	48 (14/29)	6 (5/77)	0,000
FDC-Netze ³ fehlend schwach mäßig kräftig	3 (1/29) 41 (12/29) 28 (8/29) 28 (8/29)	10 (8/78) 18 (14/78) 13 (10/78) 59 (46/78)	0,005
monotypische Leichtketten (Expression eines IG- Leichtkettentypus)	10 (3/29)	38 (30/78)	0,005
Follikelmäntel (IgD) (Anteil der Fälle mit erhaltenen IgD-markierten Follikelmänteln)	3 (1/29)	33 (25/75)	0,002

Tabelle 7: CD3, CD4, MIB mittel, MIB maximal: mit den jeweiligen Kategorien sind in der Tabelle die relativen Anteile an der Gesamtzellzahl gemeint ; 1. P-Werte wurden in der Dezimalform auf die dritte Nachkommastelle gerundet ; 2. T = T-Zellen. Sie dienen bei der Evaluation von Bcl2 als interne Referenz ; 3. FDC-Netze sind als Netzwerke von folliculären dendritischen Zellen (= Subgruppe von antigenpräsentierenden Zellen) definiert. Diese werden durch CD23-Expression immunhistochemisch detektiert.

Für eine explorative Datenanalyse, wie sie in dieser Studie durchgeführt wurde, ist eine Risikoadjustierung für multiples Testen nicht zwingend erforderlich. Um die Aussagekraft und Bedeutsamkeit der Ergebnisse jedoch zu erhöhen, wurde für die Immunhistochemie eine Korrektur des Alphafehlers nach Holm-Bonferroni vorgenommen. Unter diesen Bedingungen blieben weiterhin statistisch signifikante Ergebnisse bestehen, die im Folgenden tabellarisch aufgeführt sind.

In der Alphaadjustierung nach Holm-Bonferroni wird nach Festlegung des globalen Alpha-Niveaus (das Alpha-Niveau wurde konventionsgemäß in dieser Studie auf 5%=0,05 festgesetzt) für die Einzelstatistiken jeweils ein lokales Alpha-Niveau nach folgender Formel berechnet:

lokales Alpha-Niveau für Test Nummer X=globales Alpha-Niveau/(Anzahl der Tests–X+ 1)

Insgesamt wurden in der immunhistochemischen Evaluation 17 Einzeluntersuchungen durchgeführt:

CD3-Verteilung, CD3-Anteil, CD4-Verteilung, CD4-Anteil, CD8-Verteilung, CD8-Anteil, CD68-Verteilung, CD68-Anteil, IGD-Mantelzonenexistenz, IG-Leichtkettenexpression, FDC-Netze, CD23-Expression der Tumorzellen, BCL2-Expression, BCL6-Expression, CD10-Expression, MIB-Index (Mittelwert), MIB-Index (punctum maximum)

Damit sind die lokalen Alpha-Niveaus auf die vierte Nachkommastelle gerundet nach Holm-Bonferroni zu berechnen:

Test 1: 0,0029

Test 2: 0,0031

Test 3: 0,0033

Test 4: 0,0036

Test 5: 0,0038

Test 6: 0,0042

Tabellarisch dargestellte statistisch signifikante immunhistochemische Ergebnisse unter Berücksichtigung der Alpha-Korrektur nach Holm-Bonferroni

Charakteristikum	P-Wert (als Dezimalzahl₁)
CD3 (Anteil positiver Zellen)	0,000
CD4 (Anteil positiver Zellen)	0,000
MIB-Index (punctum maximum)	0,000
MIB-Index (Mittelwert)	0,001
Existenz IGD-positiver Mantelzonen	0,002

Tabelle 8: Legende: 1. Dezimalzahl auf die dritte Nachkommastelle gerundet. Zur genauen Beschreibung der Kategorien in der linken Spalte siehe Tabelle zu den statistischen Ergebnissen ohne Alpha-Korrektur.

Die Expression monotypischer Leichtketten ist mit einem P-Wert von 0,005 zwar hochsignifikant, erfüllt aber dennoch nicht die strengen Kriterien der Alphakorrektur nach Holm-Bonferroni, da der Wert über dem für den in der Reihenfolge an Position 6 stehenden Test berechneten lokalen Alpha-Niveau von 0,0042 liegt. Damit sind alle nachfolgenden Tests im Rahmen dieser Adjustierungsmethode nicht signifikant und demzufolge die jeweiligen Nullhypothesen nicht abzulehnen.

FISH-Ergebnisse

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Mit Hilfe der FISH-Analyse können Rearrangements des genetischen Materials aufgedeckt werden. Die Methode der direkten FISH, die in der Studie zur Anwendung kam, besteht im Wesentlichen darin, dass mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Sonden (Oligonukleotide mit spezifischer Basensequenz) nach dem Auftrennen des zellulären Genoms in Einzelstrang-DNA (Denaturierung) an für die jeweilige Sonde spezifische komplementäre DNA-Sequenzen binden und die Position anhand einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse bestimmt werden kann. Dies macht man sich bei Translokationen, Amplifikationen und Deletionen diagnostisch zunutze. Während bei Amplifikationen und Deletionen eine numerische Änderung der angelagerten Sonden feststellbar ist, die durch ein gesteigertes oder vermindertes Verhältnis zu definierten Referenzsonden auffällt, welche an anderen Abschnitten des Genoms angelagert sind und

somit der Amplifikation oder Deletion im Regelfall entgehen, ist das Prinzip bei der Translokation anders. Hier unterscheidet man zunächst zwei differente Methoden. Die sogenannten Splitsonden (Break-apart, Bruchsonden) geben an, ob in einem vorab definierten Genabschnitt ein chromosomaler Bruch eingetreten ist. Hierzu wird ein Sondenpaar verwendet, das telomer- und centromerseitig von der erwarteten Bruchzone an die DNA bindet. Eine Spaltung wird in der Fluoreszenzmikroskopie als Distanz beider Sonden signale sichtbar. Bei den sogenannten Fusionssonden binden centromer- und telomerseitig der potentiellen Translokationsstelle gleichfarbig fluoreszierende Sonden an einen genetischen Abschnitt. Damit besteht unter dem Fluoreszenzmikroskop im Normalfall ein Bild aus homogen einfarbigen (in dieser Studie roten und grünen) Sondenpaaren. Die gleichfarbigen Sonden der jeweiligen Paare liegen derartig dicht beisammen, dass sie bei optischer Evaluation als ein Signal imponieren. Kommt es nun zur Translokation mit entsprechender Fusion, so gelangen die verschiedenartig fluoreszierenden Sonden in unmittelbare Nachbarschaft zueinander. Es resultieren daher doppelfarbige Fluoreszenzspots (rot und grün in dieser Studie), die oftmals nach den Regeln der komplementären Farbenlehre als gelb imponieren. Der Unterschied beider Sondentypen liegt vor allem darin, dass bei Splitsonden nur das Bruchereignis selbst, nicht aber der Translokationspartner ausfindig gemacht werden kann. Bei der Untersuchung mittels Fusionssonde wird das korrespondierende Fusionsgen verifiziert. Ein Nachteil der Fusionssonden besteht allerdings darin, dass der Fusionspartner bekannt sein muss. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung kann sowohl an Metaphasechromosomen als auch am Interphasegenom angewendet werden, was gegenüber der konventionellen Bänderungstechnik (Chromosomenanalyse) einen wesentlichen Vorteil darstellt. Die FISH ist ein Grundpfeiler in der Diagnostik vieler genetischer Erkrankungen und wird zudem intensiv genutzt, um Vorgänge im Rahmen der Tumorgenese, die oftmals für die jeweilige neoplastische Entität charakteristische Aberrationen durchläuft, aufzudecken. In dieser Studie wurden für Bcl2 (Chromosom 18) und MYC (Chromosom 8) jeweils eine Split- und eine Fusionssonde mit IgH (Chromosom 14) untersucht und für Bcl6 (Chromosom 3) eine Splitsonde ausgewertet. Die genaue Charakterisierung der Sonden findet sich im Abschnitt 'Material und Methoden' sowie im Anhang.

FISH-Analyse der primär gastrointestinalen folliculären Lymphome im Vergleich mit der Referenzgruppe der nodalen folliculären Lymphome

Die Prozentwerte sind, sofern nicht anders angegeben, auf ganze Prozente gerundet. Dadurch bedingt können im Einzelfall die summierten Werte etwas über beziehungsweise unter 100% rangieren. Die im Text genannten P-Werte wurden auf die dritte Nachkommastelle gerundet. Das vorab definierte Signifikanzniveau der verwendeten Tests liegt bei $\alpha=0,05=5\%$.

Der ermittelte Cut-Off-Wert (Grenzwert) wurde für die Splitsonden bei 10% und für die Fusionssonden bei 15% angesetzt. Die ausführliche Darstellung und Herleitung der Berechnungsgrundlage für diese Grenzwerte findet sich im Abschnitt 'Material und Methoden'. Sämtliche FISH-Sonden wurden von zwei Untersuchern (C. Thorns, T. Huckhagel) in einem Konsensusverfahren evaluiert.

Bcl2-Split

Es waren 100% (31/31) der Proben für Bcl2 auswertbar. Davon entfielen auf die Fraktion der positiven Fälle 77% (24/31). Bei 23% (7/31) konnte kein Bruchphänomen zur Darstellung gebracht werden. Die Referenzgruppe der nodalen folliculären Lymphome zeigte eine ungefähr gleich gelagerte Verteilung mit 80% (60/75) Bcl2-positiven Biopsaten und 20% (15/75) negativen Fällen. Damit konnte für das Bruchereignis von Bcl2 keine statistisch signifikante Differenz beobachtet werden (P-Wert: 0,766) und es ist folglich anzunehmen, dass das Ereignis unabhängig von der primären Lokalisation der Neoplasie auftritt.

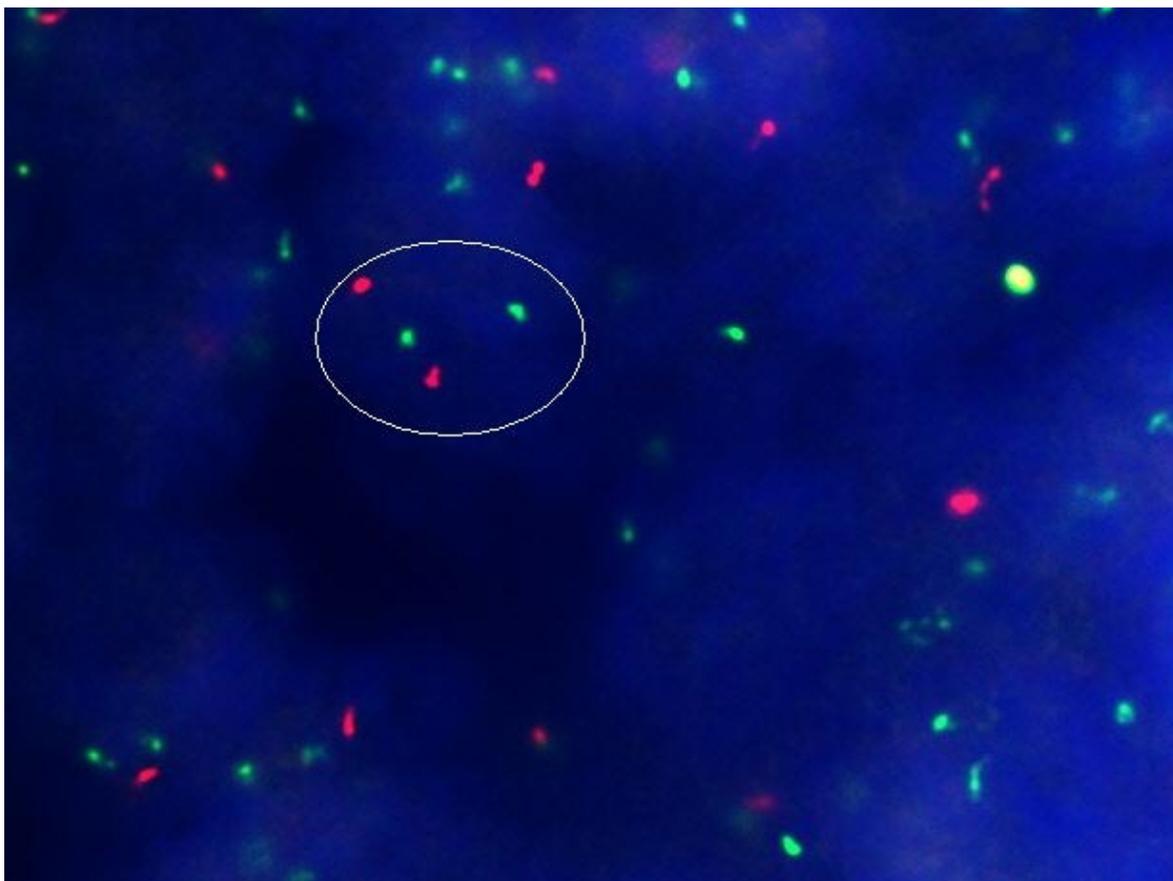


Abbildung 14: Es liegt bei dieser FISH ein Bruchereignis im Bcl2-Locus eines GIFL auf Chromosom 18 vor. Die Bcl2-Break-apart-Sonden sind deutlich voneinander separiert. Besonders gut zu erkennen ist dieses Phänomen im markierten Areal.

Bcl2-IgH-Fusion

Auch hier konnten in der Gruppe der GIFL 100% (31/31) der Präparate untersucht werden. Für die folliculären Lymphome ist eine Translokation des Bcl-2-Gens in den Bereich des Schwerkettenlokus der Immunglobuline auf Chromosom 14 typisch. Das aus der Evaluation der Bcl2-Break-apart-Sonde bereits erwartbare Ergebnis bestätigte sich größtenteils. Auffällig war in diesem Zusammenhang jedoch, dass sich in einem der Fälle das Bruchereignis nicht ursächlich auf eine Bcl2-IgH-Fusion zurückführen ließ. Wohin in dieser Probe die Bcl2-Translokation erfolgt ist, lässt sich mit dem gewählten methodischen

Ansatz nicht feststellen.. 74% (23/31) wurden unter den gegebenen Kriterien als Bcl2-IgH-fusionierte Fälle gewertet, 26% (8/31) mussten als negativ eingestuft werden. Die Referenzproben (NFL) ergaben mit 81% (61/75) positiven und 19% (14/75) negativen Schnitten keine signifikante Differenz beider Kollektive (P-Wert: 0,410).

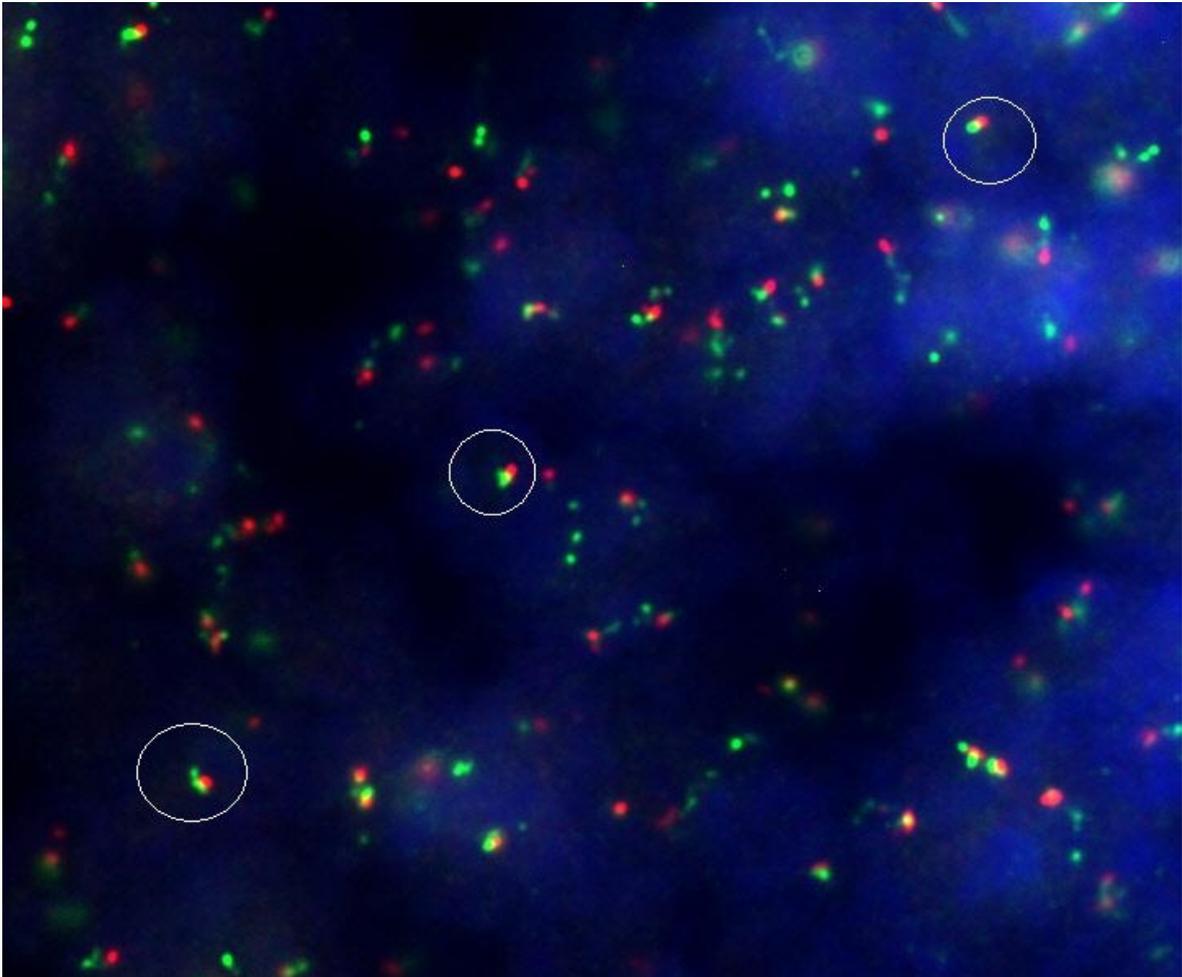


Abbildung 15: Die Mikrofotografie zeigt eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in einem primär gastrointestinalen FL. Es liegt eine Bcl2-IgH-Fusion vor, die an 3 Positionen zur Verdeutlichung weiß umrandet ist. Es handelt sich bei diesem Fall um denselben, der weiter oben im Rahmen der Bcl2-Split-Ergebnisdarstellung gezeigt wurde.

Bcl2-Amplifikation

Alle 31 GIFL-Proben konnten ausgewertet werden. In 6% (2/31) der Fälle lag eine Amplifikation vor. Die nodale Referenzfraktion ergab eine Amplifikationsrate für Bcl2 von 4% (3/75). Die Ergebnisse waren also nahezu kongruent und eine statistische Signifikanz bezüglich eines Unterschiedes beider Gruppen entfiel dadurch mit einem P-Wert von 0,588.

Betrachtet man die genetischen Aberrationen in der Synopsis, so waren bei den GIFL in 84% (26/31) und bei den Lymphomen der Vergleichskohorte ebenfalls in 84% (64/76) der Fälle Veränderungen (Bruch, Fusion, Amplifikation) des Bcl2-Genlokus nachweisbar.

MYC-Split und MYC-IgH-Fusion

Es konnten für diese Sonde 90% (28/31) der Fälle untersucht werden. Sämtliche Proben offenbarten hinsichtlich eines Bruchereignisses intakte Myc-Loci (keiner der Fälle zeigte ein Splitereignis). Konsekutiv konnte daher auch kein Fall mit einer Myc-IgH-Fusion auftreten, da das Bruchereignis hierfür eine Grundvoraussetzung darstellt. Im Referenzkollektiv (NFL) waren von den 78 Biopsaten 73 in die Wertung einzubeziehen, was einem Anteil von 94% entspricht. Hiervon zeigten 96% (70/73) keine Bruchereignisse über dem festgelegten Cutoff von 10%. 3 Fälle und somit 4% waren diesbezüglich als positiv einzuordnen. Der P-Wert lag bei 0,558 (Exakter Test nach Fisher). Die Myc-IgH-Fusions-Sonde lieferte das entsprechende Verteilungsmuster. Auch hier ließ sich bei 96% der 74 analysierbaren Proben keine Fusion nachweisen, während 4% (3/74) quantitative Fusionen über dem Cut-Off von 15% liegende Fusionen trugen. Dies entspricht allen Fällen der NFL mit einem registrierten Bruchereignis im Myc-Gen. Auch hier ist mit einem P-Wert von 0,555 im statistischen Vergleich beider Gruppen kein signifikanter Unterschied festzustellen.

MYC-Amplifikation

Die Studiengruppe der GIFL war für eine Amplifikation zu 100% beurteilbar. Lediglich 1 Fall zeigte ein grenzwertig positives Muster, was einem Anteil von 3% (1/31) entspricht. Alle übrigen Fälle waren nicht mit einer numerischen Zugewinn, der den Myc-Lokus betrifft, behaftet. Die Amplifikationsrate von 1% (1/73) der nodalen Referenzgruppe zeigte gegenüber den GIFL vergleichbare Ergebnisse. Hier konnten 94% (73/78) der Biopsate in die Untersuchung einbezogen werden. Der P-Wert aus der Amplifikationsanalyse lag bei 0,248.

Damit bestand summa summarum in der Sparte der gastrointestinalen FL nur bei einem Fall (3%) eine Aberration in Form einer Amplifikation, die ihrerseits auch nur als grenzwertig positiv charakterisiert werden konnte. Demgegenüber war eine Aberration bei den Präparaten der Lymphknoten in 5% (4/76) vorhanden. Die Befundunterschiede waren nicht signifikant mit einem P-Wert von 0,673.

Bcl6-Split

Für Bcl6 wurde nur eine Break-apart-Sonde (Bruchsonde) verwendet. Hiermit kann ein Bruchereignis, nicht jedoch der zugehörige Translokationspartner oder eine mögliche Amplifikation nachgewiesen werden. 28 von 31 GIFL-Proben lieferten ausreichend verwertbares Material, was einem Anteil von 90% entspricht. Hiervon ließ sich bei einem Fall (4% = 1/28) ein Splitphänomen nachweisen, das in seinem Ausprägungsgrad den festgelegten Grenzwert von einem 10%-Anteil der Tumorzellen überschritt. Von den 78 Vergleichsproben war ein Anteil von 99% evaluationsfähig (77/78). Davon entfielen auf die Fraktion mit Bruchereignis 16% (12/77). Die unterschiedlichen Ergebnisse konnten mit einem P-Wert von 0,177 (Exakter Test nach Fisher) das Signifikanzniveau nicht erreichen.

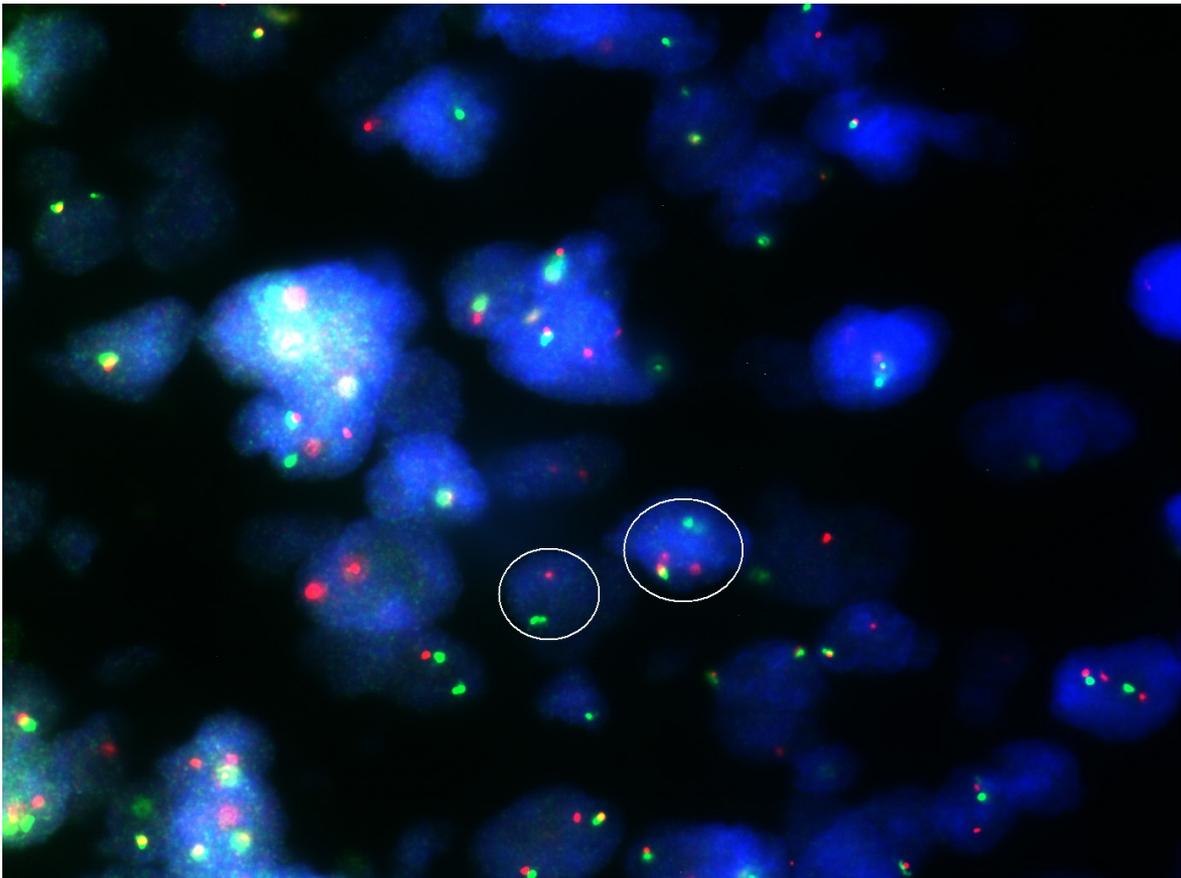


Abbildung 16: Nachweis eines Bcl6-Bruches in einem primär gastrointestinalen FL. Zwei Kerne, in denen ein Bcl6-Split vorliegt, sind durch Markierung zur Veranschaulichung hervorgehoben.

Statistische Gesamtbewertung der FISH-Analyse

In der vergleichenden FISH-Bewertung konnten bei einem gewählten Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ keine statistisch signifikanten Differenzen beider Studiengruppen bezüglich der untersuchten Sonden (Bcl2-Split, Bcl2-IgH-Fusion, Myc-Split, Myc-IgH-Fusion, Bcl6-Split) belegt werden. Lediglich das Bcl6-Bruch-Phänomen wies mit einem P-Wert von 0,177 auf einen Trend für einen möglichen Unterschied beider Kollektive in der Form hin, dass die primär gastrointestinalen folliculären Lymphome eventuell seltener ein Bcl6-Split-Ereignis beinhalten könnten.

Übersicht der FISH-Ergebnisse

Aberration	GIFL (in %*)	NFL (in %*)	P-Wert
Bcl2-Split	77	80	0,766 = n.s.
Bcl2-IgH-Fusion	74	81	0,410 = n.s.
MYC-Split	0	4	0,558= n.s.
MYC-IgH-Fusion	0	4	0,555 = n.s.
Bcl6-Split	4	16	0,177 = n.s.

*Tabelle 9: GIFL = primär gastrointestinale folliculäre Lymphome; NFL = nodale folliculäre Lymphome = Referenzgruppe; bei dem P-Wert handelt es sich um die Signifikanz aus dem jeweiligen Chi-Quadratstest (Kreuztabelle) ; n.s. = nicht signifikant; * die Werte der Tabelle sind als Prozentangaben zu verstehen. Die Bemessungsgrundlage der einzelnen Werte ist die für den untersuchten Parameter jeweils verfügbare Anzahl evaluationsfähiger Proben (= 100%), die nicht notwendigerweise mit der Gesamtanzahl der Fälle in der jeweiligen Gruppe übereinstimmen muss.*

Diskussion

Das folliculäre Lymphom als die nach dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) zweithäufigste Entität der Non-Hodgkin-Lymphome ist eine durch zahlreiche Studien sowohl in klinischer, als auch in morphologischer, immunhistochemischer und molekulargenetischer Hinsicht gut beschriebene Form der malignen Neoplasien. Es stellt ein von den Keimzentrums-B-Zellen (Centroblasten und Centrozyten) der Lymphfollikel ausgehendes bösartiges Geschehen dar, das über einen meist langfristigen Zeitraum von den Patienten unbemerkt abläuft und somit als indolent bezeichnet werden kann (Harris et al. 2008). Sein relativer Anteil an allen NHL beträgt zwischen 20% und 35% (Harris et al. 2008, The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project 1997, Vitolo et al. 2008). Das Ziel dieser Dissertation war es, das primär gastrointestinale folliculäre Lymphom als eine bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt in deutlich geringerem Umfang untersuchte und damit definierte Subgruppe des folliculären Lymphoms nach den oben genannten Kriterien - namentlich der Morphologie, der Immunhistochemie und der Molekulargenetik - zu analysieren und die Befunde mit den Ergebnissen der weitaus besser charakterisierten nodalen folliculären Lymphome zu vergleichen. Hierbei ging es vornehmlich darum, die Unterschiede und die Gemeinsamkeiten beider Kollektive herauszuarbeiten und zu prüfen, ob es berechtigte Hinweise für die Annahme gibt, die primär gastrointestinalen folliculären Lymphome als spezifische Entität mit eigenen Charakteristika innerhalb des Spektrums der folliculären Lymphome zu begreifen. Hierzu wurde die Gewebedatenbank des Institutes für Pathologie der Universität zu Lübeck systematisch nach primär gastrointestinalen folliculären Lymphomen durchsucht. Die Einschlussvoraussetzungen sind im Abschnitt 'Material und Methoden' eingehend erläutert worden. Den Aufnahmekriterien genügten insgesamt 31 Proben. Als Referenz diente eine Subgruppe aus einem Kollektiv von 102 folliculären Lymphomen, die nicht hinsichtlich ihrer primären Lokalisation selektioniert wurden. Primär haben die Exzidate für anderweitige Untersuchungen der Forschungsgruppe 'folliculäres Lymphom' des Instituts für Pathologie der Universität zu Lübeck zur Verfügung gestanden. Die Einschlussbedingungen für diese 102 Fälle finden sich ebenfalls im Bereich 'Material und Methoden' dieser Arbeit detailliert aufgeführt. Die ausgewählte Subgruppe umfasste alle nodalen Fälle aus der Grundgesamtheit der 102 Patienten mit folliculärem Lymphom. Dieses Kriterium wurde von insgesamt 78 der 102 Resektate erfüllt.

Das folliculäre Lymphom manifestiert sich in den überwiegenden Fällen primär in den Lymphknoten (Hitz et al. 2011, Tari et al. 2011). Dieses allgemein bekannte Charakteristikum trifft auch auf die unselektionierte Referenzgruppe der Untersuchung zu. Hier waren insgesamt 78 der 102 Biopsate nodalen Ursprungs, was einem relativen Anteil von 76% entspricht. Im zeitlichen Verlauf kommt es dann häufig zum Befall weiterer Organe, allen voran dem Knochenmark in 40 – 70% (Hitz et al. 2011), der Milz und dem peripheren Blut. Der Gastrointestinaltrakt wird zumeist erst relativ spät in den Krankheitsprozess integriert. Gelegentlich tritt ein FL aber auch primär in extranodalen Strukturen wie der Haut, dem digestiven System, der Brust oder den Testes auf (Harris et al. 2008). Sofern der Gastrointestinaltrakt als primärer Ursprung des Lymphoms fungiert, lässt sich das neoplastische Gewebe hauptsächlich im Dünndarm und dabei insbesondere im Duodenum lokalisieren (Harris et al. 2008). Shia et al. (2002) führten eine klinisch-pathologische Studie durch, bei der sie alle verfügbaren sicher primär gastrointestinalen FL einschlossen und berichteten von einem über achtzigprozentigen Anteil derartiger Pathologien mit Befall des Dünndarms (22/26 Proben), wobei hiervon wiederum der Zwölffingerdarm den häufigsten Manifestationsort repräsentierte. Yamamoto et al. (2010)

haben in einer Übersichtsarbeit die verfügbaren endoskopisch gewonnenen Daten für 183 primäre GIFL zusammengestellt und konnten dabei ebenfalls das Duodenum als bedeutsamste Manifestationszone identifizieren. Die Prädominanz innerhalb des Dünndarms wird jedoch kontrovers beurteilt. So sehen andere Studien das Ileum als Prädilektionsort des primären GIFL an (Damaj et al. 2003, LeBrun 1992). Hier ein endgültiges Urteil fällen zu können wird insbesondere durch die Tatsache erschwert, dass oftmals multiple Läsionen im GI-Trakt verteilt vorliegen (Yamamoto et al. 2010). Ein allgemeiner Konsens besteht nur hinsichtlich der kumulierten relativen Häufung im Dünndarm gegenüber den anderen Abschnitten des Verdauungstraktes. Das Kollektiv der 31 primären GIFL dieser Studie stützt die Auffassung, dass das Duodenum die Hauptlokalisierung für primär intestinale FL darstellt. 14 der 31 Fälle (45%) manifestierten sich im Zwölffingerdarm, wohingegen lediglich 6 Proben (19%) das Ileum befielen. Bei 6 Biopsaten konnte die Dünndarmlokalisierung nicht näher spezifiziert werden. Es darf daher vermutet werden, dass sich unter diesen Proben auch noch duodenale Präparate befanden. Für die folliculären Lymphome wird im Verlauf eine Beteiligung des Knochenmarks von 40% – 70% angegeben (Harris et al. 2008, Hitz et al. 2011, Solal-Celigny et al. 2004). Diese Werte finden sich in der Referenzgruppe wieder. 37 der 78 nodalen Fälle zeigten eine Infiltration des Knochenmarks in der vorliegenden Knochenmarkbiopsie, was einem Prozentsatz von 47 entspricht. 46 der 102 Fälle aus dem Ursprungskollektiv und damit 45 % wiesen eine Knochenmarkinfiltration auf. Bei der Studiengruppe der GIFL fehlten leider bei einem beträchtlichen Anteil die Angaben über eine bestehende Beteiligung des Knochenmarks, sodass nur für 7 von 31 Proben eine Aussage gefällt werden kann. Diese 7 Präparate ordnen sich der typischen relativen Häufigkeit mit 43% KM-Infiltration unter, so dass hier keine Anhaltspunkte für eine von der Grundgesamtheit abweichende Rate der Knochenmarkinvasivität der GIFL vorliegen, gleichwohl bei einer so geringen Anzahl von Präparaten keine endgültige Klärung dieser Frage erfolgen kann und es weiterer Untersuchungen bedarf, um die Datenlage diesbezüglich zu verbessern.

Die Altersstruktur der Patienten mit einem folliculären Lymphom bei Diagnosestellung ist in vielen Studien evaluiert worden. Nur selten sind Patienten unter 20 Jahren betroffen (Harris et al. 2008). In einer groß angelegten Untersuchung (Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project 1997) an 304 folliculären Lymphomen wurde ein Durchschnittsalter von 59 Jahren ermittelt. Dasselbe oder ein vergleichbares mittleres Alter tritt ebenfalls in anderen Studien auf (Tari et al. 2011), sodass hier bereits eine suffiziente Datenlage besteht. Die 78 nodalen folliculären Lymphome mit einem Durchschnittsalter von 56,3 Jahren zum Zeitpunkt der Biopsie und die 102 unselektionierten folliculären Lymphome der Grundgesamtheit (58,1 Jahre im Mittel bei Diagnosestellung) reihen sich damit in die aus der Literatur bekannten Dimensionen ein. Für primär gastrointestinale folliculäre Lymphome wurde in mehreren Studien ein durchschnittliches Alter von 52 bis 59 Jahren ermittelt (Damaj et al. 2003, Huang et al. 2008, Misraji et al. 2011, Na et al. 2011, Shia et al. 2002, Tari et al. 2011, Yamamoto 2010). Die 31 GIFL der Studiengruppe stehen diesen Ergebnissen entgegen. Die Altersstruktur dieser Lymphompatienten mit einem durchschnittlichen Alter von 63,7 Jahren liegt deutlich über den bislang benannten Werten und hebt sich auch von der nodalen Referenzgruppe statistisch signifikant ab, sofern man die Kollektive nach Altersgruppen (<60 Jahren versus >60 Jahren) aufgetrennt gegenüberstellt. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam allerdings auch eine japanische Studie, die ein mittleres Alter von 60 Jahren für Patienten mit einem folliculären Lymphom speziell des Duodenum ermittelte (Tsujioka et al. 2007). Eine Untersuchung von primär extranodalen nichtcutanen FL mit 27 Teilnehmern offenbarte ebenfalls ein mittleres Alter von 64 Jahren, wobei diese Angaben unter Vorbehalt betrachtet werden müssen, da es sich hierbei nicht nur um gastrointestinale FL handelte (Weinberg et al. 2009). Für die

Differenzen könnten neben ethnischen Ursachen insbesondere die geringen Fallzahlen der einzelnen Studien verantwortlich sein. Die Majorität der bislang publizierten Fälle an primär gastrointestinalen FL hat ihren Ursprung in Japan. Dieses geographische Ungleichgewicht liegt möglicherweise in der dort praktizierten extensiven endoskopischen Explorationsrate der Bevölkerung begründet (Yamamoto et al. 2010).

Auch das Geschlecht wurde in zahlreichen Studien für die teilnehmenden Patienten registriert, sodass diesbezüglich eine breite Datenbasis besteht. Es wurden in der Vergangenheit Geschlechtsverhältnisse zwischen 1,7:1 (w:m) und 0,96:1 (w:m) beschrieben (Harris et al. 2008, The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project 1997, Solal-Celigny et al. 2004, Tari et al. 2011), wobei der Analyse von Solal-Celigny et al. aus dem Jahre 2004 zwecks Erstellung des FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index) mit einer Fallzahl von mehr als 4000 Patienten sicherlich die höchste Aussagekraft innewohnt. In dieser Studie zeigte sich für die FL ein ausgeglichenes Geschlechtsverhältnis von 0,96:1 (w:m). Bei den nodalen Lymphomen der Referenzgruppe bot sich mit einer Ratio von 1,1:1 (w:m) kein abweichendes Bild. Auch die Subgruppe der primären GIFL ist bereits mehrfach für diesen Parameter evaluiert worden. Bis auf einige Ausnahmen, die über unausgeglichene Verhältnisse der Geschlechtsverteilung hinsichtlich eines maskulinen Überschusses berichten (Misdraji et al. 2011), kommen die meisten Veröffentlichungen zu dem Ergebnis einer weitestgehend gleichen Belastung von Männern und Frauen beim primären GIFL (Shia et al. 2002, Tari et al. 2011, Tsujioka et al. 2007, Yamamoto et al. 2010). Die Auswertung der 31 GIFL in dieser Studie ergab konkordante Resultate mit einer Ratio von 0,93:1 (w:m).

Insgesamt fügen sich die Kollektive der Studien- und der Vergleichsgruppe in der Alters- und Geschlechtsstruktur in den Rahmen bisheriger Untersuchungen ein, sodass ein Selektionsbias eher unwahrscheinlich ist und die Annahme eines repräsentativen Datensatzes berechtigt erscheint. Dies ist für die Generalisierbarkeit der registrierten Ergebnisse von großer Bedeutung.

Morphologische Aspekte

Das Grading wurde nach dem geltenden WHO-Standard in der dritten Edition für beide Ensembles (GIFL und NFL) durchgeführt. Das aktuelle WHO-Schema sieht eine Graduierung in 3 distinkte Gruppen vor, die sich durch die Anzahl an Centroblasten pro High-Power-Field (0,159 mm²; 40 X Objektiv) unterscheiden. Für die jeweiligen Grenzwerte der einzelnen Tumorgade sei auf den Abschnitt 'Material und Methoden' verwiesen. Bisherige Studien kombinieren häufig FL der Grade 1 und 2 miteinander, da es sich bei diesen um ein Kontinuum indolenter Lymphome handelt und es keine klinisch belegte Relevanz für unterschiedliche Verläufe der Tumoren beider Grade gibt (Harris et al. 2008). Den so zusammengefassten niedriggradigen FL stehen die hochgradigen FL Grad 3 a und b gegenüber, die ein deutlich aggressiveres Potential aufweisen. Dies trifft insbesondere auf die Tumoren vom Grad 3 b zu, sodass einige Autoren dazu übergegangen sind, die folliculären Lymphome vom Grad 3 a eher zu den indolenten FL zu rechnen und diese (Grad 1, 2 und 3a) den Neoplasien vom Grad 3b, die sich durch geschlossene Blastenrasen definieren lassen und vom Verlauf her den DLBCL ähneln, gegenüberzustellen (Hitz et al. 2011). Diese Zuordnungsproblematik wird zurzeit allerdings noch kontrovers beurteilt. So subsumiert eine Genprofilstudie die FL vom Grad 3b aufgrund des globalen Genexpressionsniveaus unter die FL und deckt deutliche Unterschiede zu den DLBCL auf (Piccaluga et al. 2008), was jedoch dem klinisch ähnlichen Verlauf der DLBCL und FL 3b entgegensteht. Weiterhin wurde in dieser Untersuchung eine relativ homogene globale Genexpression der Grade 1, 2 und 3a

festgestellt und der Grad 3b durch ein davon differentes Muster als eigene Entität aufgefasst, sodass hier eine Gegenüberstellung von FL (1, 2 und 3a) und FL 3b vorgeschlagen wurde. Diese Einschätzung wird auch von anderen Studien aufgrund von abgrenzbaren Translokationsanalysen für Bcl2 und Bcl6 geteilt (Horn et al, 2011). Eine endgültige Klärung dieser Frage bleibt zukünftigen Studien vorbehalten. Außerdem tritt bei FL vom Grad 3b in ungefähr 60 - 80% der Fälle eine diffuse Tumorkomponente hinzu. Es muss in solchen Fällen die separate Diagnose eines DLBCL gestellt werden. Beim Grad 3 a ist eine solche Zusatzdiagnose seltener vorhanden. Nicht selektionierte FL sind zu 80% bis 90% als niedriggradig (Grad 1 und 2) einzustufen (Harris et al. 2008). Von den 78 nodalen follikulären Lymphomen des Vergleichskollektivs wurden 19 Fälle als hochgradig eingestuft, was einem Anteil von 24% entspricht. Die Gruppe der UFL (Grundpopulation) wies mit 25 hochgradigen FL von insgesamt 102 Fällen einen Anteil von 25% an Neoplasien vom Grad 3 auf. Bei den primär gastrointestinalen FL offenbarte die Histologie mit einem Anteil hochgradiger Lymphome von 10% einen gegenüber der Referenzgruppe deutlich niedrigeren Wert. Andere Untersuchungen bestätigen diesen Befund. So besaßen beispielsweise alle 26 Fälle von duodenalen FL in einer japanischen Studie maximal einen histologischen Grad 2 (Sentani et al. 2008). Es muss hier jedoch ein möglicher Bias in Betracht gezogen werden, da es sich bei den analysierten Fällen zumeist um inzidentelle Befunde handelte, die bei Routineendoskopien entdeckt worden waren. Eine damit assoziierte frühzeitige Diagnosestellung könnte sich verzerrend auf die histologische Graduierung der Neoplasien auswirken. 26 primär gastrointestinale FL eines anderen Untersuchungskollektivs verteilten sich zu 88% auf die Grade 1 und 2 (Shia et al. 2002), was sich mit den Daten der 31 GIFL dieser Studie ebenfalls in Einklang bringen lässt. Eine Synopsis dieser Befunde unterstützt die Auffassung, dass die Subpopulation der GIFL eine Tendenz zu eher niedrigeren Bewertungen im Grading und damit einem eher geringen Centroblastenanteil zeigt. Aufgrund der geringfügigen Überschreitung des Signifikanzniveaus (P-Wert = 0,114) in der Gegenüberstellung von niedrig- und hochgradigen FL beider Kollektive ist allerdings eine statistisch abgesicherte Beurteilung diesbezüglich von weiteren vergleichenden Studien mit größeren Fallzahlen abhängig. Diffuse Anteile waren bei den NFL der Referenz insgesamt stärker und häufiger ausgeprägt als bei den GIFL. Die durchschnittliche diffuse Tumorphäche der NFL lag mit 19% deutlich über dem Mittelwert des GIFL-Kontingentes (10%). Betrachtete man die Tumoren mit einer diffusen Tumorphäche von mehr als 20%, so wiesen die NFL ebenfalls mit 28% der Tumoren gegenüber den GIFL mit 21% häufiger eine Überschreitung dieses Grenzwertes auf. Shia et al. (2002) beschreiben passend dazu einen Anteil von 19% primär gastrointestinaler Fälle, die kein prädominant follikuläres Wachstumsmuster aufweisen, was definitionsgemäß einem follikulären Relativanteil von weniger als 75% und damit einem diffusen Wachstum von mehr als 25% der Gesamttumorphäche entspricht. Die Ergebnisse beider Arbeiten sind daher bei analogen Studienkollektiven und vergleichbar definierten Kriterien übereinstimmend. Eine Studie an 457 niedriggradigen (Grad 1 oder 2 nach WHO) FL berichtet von einem 86-prozentigen Anteil an Neoplasien, die einen follikulären Wuchs von 80% oder mehr der Gesamttumorphäche präsentieren (diffuser Anteil also kleiner als 20%) (Bhagavathi et al. 2009). Dass die Werte beider Kontingente (GIFL und NFL) etwas über diesen Angaben liegen, hängt mutmaßlich mit der Selektion der Fälle zusammen. In die hier durchgeführte Untersuchung sind auch hochgradige Tumoren eingeschlossen worden, sodass beide Studien von differenten Populationen ausgehen. Die hochgradigen FL treten bekanntermaßen häufiger als Träger diffuser Anteile auf. Die Studie von Bhagavathi et al. (2009) konnte für die einzelnen nach dem Ausmaß des diffusen Wachses kategorialisierten Fraktionen keine Unterschiede für das Outcome verifizieren. Insgesamt ist die klinische Bedeutung der Existenz und des Ausmaßes diffuser

Anteile beim niedriggradigen FL gegenwärtig noch nicht endgültig geklärt. Sollten jedoch Anteile eines zumindestens partiell diffusen Tumors hochgradig sein (>15 Blasten pro hpf), so hat dies sehr wohl prognostische Auswirkungen. Dies schlägt sich in der dann notwendigen Zusatzdiagnose eines DLBCL nieder.

Einen weiteren Parameter, der bei follikulären Lymphomen gelegentlich festzustellen ist, stellt die Sklerose dar. In der Literatur ist der morphologische Aspekt der Sklerose selten hinsichtlich einer prognostischen Relevanz untersucht worden. Eine Arbeit, die 158 Patienten aus einem Kollektiv einer prospektiven Therapiestudie fortgeschrittener FL der GLSG (German Low Grade Lymphoma Study Group) bezüglich einer Sklerose auswertete, konnte für dieses morphologische Kriterium einen signifikanten Effekt auf das Gesamtüberleben aufzeigen. Die Sklerose war mit einem schlechteren Gesamtüberleben (OS = Overall Survival) verbunden. Von den 158 Patienten ließen 22 eine Sklerose erkennen. Dies entsprach einem Relativanteil von 14% der untersuchten Grundgesamtheit (Klapper et al. 2007). Diese Beurteilung wird jedoch in der Literatur nicht einheitlich gesehen. So wurden in einer Studie zur Analyse der Häufigkeiten und klinischen Auswirkungen einer Sklerose in verschiedenen NHL-Entitäten für 67 primär nodale follikuläre Lymphome häufiger niedrige, lokalisierte Stadien und ein besseres 5-Jahres-Überleben bei vorhandener Sklerose gefunden (Bennett 1975). Von den 67 FL dieser Untersuchung trugen 27 Präparate mikroskopisch nachweisbare sklerotische Anteile, was einen Anteil von 40% ausmacht. Es ist zu beachten, dass Angaben zu eventuellen Überlebensvorteilen immer vor dem Hintergrund der contemporären verfügbaren therapeutischen Strategien gesehen werden müssen, was im zeitlichen Verlauf durch neue Behandlungsregime zu potentiell differenten Ergebnissen und Verschiebungen für das Gesamtüberleben führen kann. Es sind in der Vergangenheit einige prädominante Lokalisationen für sklerotische FL beschrieben worden. Diese umfassen unter anderem den retroperitonealen Raum (Waldron et al. 1983) und die Leistenregion. Die primär gastrointestinalen FL dieser Arbeit zeigten bei der Evaluation in 17% (5/29) der Fälle eine geringfügige Sklerose. Eine Tendenz zur ausgeprägten bindegewebigen Durchsetzung des Tumors konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Bei den 78 nodalen FL (NFL) der Vergleichskohorte wurde eine Sklerose in 45 Proben gefunden, was 58% der untersuchten Biopsate entspricht. Die 102 Neoplasien des ursprünglichen Kollektivs (UFL) offenbarten ebenfalls einen deutlich größeren Anteil sklerotischer Proben (60%). Bei näherer Betrachtung ist eine Sklerose bei den NFL nicht nur häufiger, sondern auch im Mittel stärker ausgeprägt. Diese Ergebnisse sind statistisch signifikant, sodass die Schlussfolgerung berechtigt erscheint, dass sich GIFL als Subgruppe der FL durch eine geringere Sklerose von der nodalen Variante der follikulären Lymphome abgrenzen lassen. Ob sich hierdurch klinische Auswirkungen ergeben, kann aufgrund fehlender Daten zum Verlauf (Morbidität, Mortalität) der Studienfälle nicht angegeben werden. Es bleibt künftigen Untersuchungen überlassen, hierzu Stellung zu nehmen.

Kontext der immunhistochemischen Ergebnisse

Immunhistochemisch ist das follikuläre Lymphom in mehreren Studien bereits analysiert worden. Das relativ homogene immunhistochemische Profil der follikulären Lymphome ist bereits im Jahr 1984 aufgefallen. Das in der damaligen Nomenklatur noch als centroblastisch-centrozytisches Lymphom bezeichnete follikuläre Lymphom wurde dort durch eine einheitliche immunhistochemische Konstellation von dem rein centrozytischen Lymphom abgegrenzt (Harris et al. 1984). Diese Studie brachte zusätzliche Erkenntnisse über die dendritischen Zellen der unmittelbaren Umgebung ein. Sie konnten nicht nur im Lymphknotengewebe, sondern auch außerhalb dessen in extralymphatischen vom

follikulären Lymphom befallenen Geweben immunhistochemisch dargestellt werden. Die relative immunologische Uniformität bildet zusammen mit dem ähnlichen klinischen Verlauf der verschiedenen Tumorgrade (1, 2 und 3a) noch heute eine wesentliche Grundlage dafür, dass das follikuläre Lymphom als eine Entität verstanden wird. Das immunhistochemische Profil umfasst B-Zell-Antigene (CD19, CD20, CD22, CD79a) und die Keimzentrummarker CD10 sowie Bcl6. CD10 ist unter funktionellen Gesichtspunkten eine Metalloendopeptidase (Anagnostopoulos 2003). Bcl6 fungiert als Antagonist des BLIMP1 (B-Lymphozyten-induziertes-Maturations-Protein) und hemmt dadurch die Ausdifferenzierung von B-Lymphozyten. Außerdem steigert es die Proliferationsrate und inhibiert DNA-Schadens-Kontrollsysteme (Crotty et al. 2010). Sowohl CD10 als auch Bcl6 sind beim FL zumeist intrafollikulär stärker exprimiert als interfollikulär. Während bei follikulären Lymphomen jedoch die interfollikulären Bereiche im Regelfall in variabler Stärke diese beiden Antigene exprimieren, grenzen sich reaktive lymphatische Hyperplasien durch fehlende CD10- bzw. Bcl6-Positivität interfollikulärer Areale von ihren neoplastischen Pendants ab (Dogan et al. 2000). Die positive Expression von Bcl6 und CD10 im interfollikulären Raum bei den FL wird durch die Tatsache begründet, dass dieses Areal in unterschiedlichem Ausprägungsgrad durch die neoplastischen B-Zellen infiltriert wird. Diese Theorie der Tumorzellmigration wird durch weitere Befunde gestützt. So konnten Dogan et al. (2000) identische Leichtkettenrestriktionsmuster und Rearrangements der Schwereketten Gene für die follikulären wie auch die interfollikulären Regionen in der überwiegenden Anzahl der FL aufdecken. Bedingt durch die Singularität dieser jeweiligen Kombinationen ist der Monoklonalitätsnachweis erbracht. In der gleichen Studie zeigte sich für die interfollikulären B-Zellaggregate gegenüber den follikulären Tumorzellen ein geringerer Proliferationsindex. Die Follikelzonen sind zudem durch CD21/CD23/CD35-positive follikuläre dendritische Retikulumzellen charakterisiert, was für die Unterscheidung zwischen follikulären und diffusen Bereichen von Bedeutung ist. In den diffusen Arealen des Tumors ist ein derartiger Nachweis nicht zu führen (Chang et al. 2003). Bestimmte FDC-Marker wurden in Studien dahingehend untersucht, ob sie in den histologischen Schnitten in allen neoplastischen Follikeln gleichermaßen auftraten. Dies ist nicht der Fall. Für neoplastisches Lymphknotengewebe ist nachgewiesen worden, dass die Antigene CD21 und CD35 insbesondere im Bereich der subkapsulären Sinus hochreguliert sind. CD23 hingegen zeigte sich in allen Follikeln der betroffenen Lymphknoten relativ homogen exprimiert und ist demnach lokalisationsunabhängiger. Dafür liegen bei den FL oftmals nur partielle FDC-Immunprofile vor, wobei das CD23-Molekül seltener als das CD21 oder CD35 dargestellt werden kann (Chang et al. 2003), weil es nur bei vollständig differenzierten FDC zu finden ist. Weiterhin legen Vergleiche von neoplastisch infiltrierten Lymphknotenstationen unterschiedlicher anatomischer Lokalisationen eine abweichende CD23-Expressionsrate der Tumorzellen selbst nahe. So konnte in einem direkten Vergleich zwischen 78 inguinalen Lymphknoten und 141 anderweitig exstirpierten Proben eine signifikant häufigere Expression von CD23 in den Präparaten aus der Leistengegend beobachtet werden (Thorns et al. 2007). Die Bcl2-Expression ist abhängig vom Tumorgrad. Während die überwiegende Anzahl (85-90%) der niedriggradigen FL (Grad 1 und 2) Bcl2 aufgrund der charakteristischen Translokation des Bcl2-Gens in den Einflussbereich des Immunglobulinschwerketten-Enhancers exprimiert, sind nur etwa die Hälfte aller FL vom Grad 3 positiv für Bcl2. Dies kann zum Teil mit Mutationen im Bcl2-Gen erklärt werden, die dafür verantwortlich gemacht werden, dass das zum verwendeten Bcl2-Antikörper korrespondierende Epitop verändert wird und der spezifische AK infolge dessen nicht mehr bindungsfähig ist. Somit bleibt die Expression in diesen Fällen unerkannt. Die Argumentationskette lässt sich jedoch auch umgekehrt betrachten. Es ist bekannt, dass Bcl2 im Wesentlichen nicht nur eine antiapoptotische Funktion durch die

Regulation der Permeabilität innerer Mitochondrienmembranen für Cytochrom C besitzt, das dann wiederum Teil des Apoptosoms (apoptosesteuernder Proteinkomplex) wird, sondern auch den Zellzyklus anhält, indem es den Übergang von der G₀-Phase in die G₁-Phase blockiert (Leich et al. 2011). Das bedeutet, dass ein erniedrigtes Bcl2-Niveau also nicht zwangsläufig Folge einer durch höhergradige Tumoren bedingten Minderdetektion mutierter Bcl2-Proteine sein muss, sondern auch als Grundlage erhöhter Proliferationsraten der neoplastischen Zellen bei durch geringere Bcl2-Expression enthemmtem Zellzyklus gesehen werden kann. Die Wirkungskette ist bislang noch nicht entschlüsselt und bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Mithilfe der Immunhistochemie für Bcl2 lassen sich neoplastische Follikel (Bcl2-positiv) von reaktiven Lymphfollikeln (Bcl2-negativ) differenzieren, wobei das Fehlen einer erkennbaren Expression ein FL aus dem genannten Grund einer möglichen Mutation der Antikörperbindungsstelle nicht ausschließt (Harris et al. 2008). Die zellulären Elemente eines FL exprimieren zudem häufig membranassoziierte Immunglobuline (IgM > IgD > IgG > IgA) (Vitolo et al. 2008). Eine wesentliche Bedeutung hat das tumorbegleitende Mikromilieu (T-Zellen, histiozytäre Elemente), das daher zunehmend in den Fokus der Studien gerät. Gesonderte immunhistochemische Analysen bei explizit primär gastrointestinalen FL umfassen zumeist nur geringe Fallzahlen. In einer Studie mit 26 Teilnehmern, bei denen ein primär gastrointestinales follikuläres Lymphom diagnostiziert wurde, exprimierten alle Fälle CD20 und Bcl2 und keiner ließ eine Positivität für CD3, CD5 oder CD23 erkennen. Bei 24 der insgesamt 26 Biopsate bildeten die Tumorzellen CD10 aus (Shia et al. 2002). Vergleichbare Ergebnisse erhielten Yoshino et al. (2000) bei der Auswertung von 8 primär gastrointestinalen FL. Hier waren die Tumoren positiv für CD20, CD10, Bcl2, CD75 und CD79 und negativ für CD3, CD5, cyclin D1 und CD23. Auch bei Goodlad et al. (2003) konnten, sofern man nur die gastrointestinalen Fälle der Arbeit, die sich generell mit extranodalen non-cutanen FL (gastrointestinal, thyroideal, tonsillär und muskulär) befasste, berücksichtigt, keine von den genannten Studien abweichenden Befunde für die immunhistochemischen Charakteristika erhoben werden. Eine Analyse von Weinberg et al. (2009), welche die bislang größte Gegenüberstellung von extranodalen-extradermalen FL und nodalen FL behandelte, konnte im Unterschied zu den anderen Beobachtungen eine geringere Expressionsrate für CD10 in den Tumoren der extranodalen Variante verifizieren (CD10-negative extranodale Fälle: 9/27; CD10-negative nodale Fälle: 5/44). Hier muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Studienpopulationen ebenfalls heterogen waren, da bei Weinberg et al. (2009) extranodale Fälle verschiedener Körperregionen, und nicht nur mit dem Gastrointestinaltrakt assoziierte Manifestationen ausgewertet wurden. Die vollständige Penetration der Bcl2-Expression von primär gastrointestinalen FL in den genannten Studien konnte im Wesentlichen durch die aktuelle Analyse nachvollzogen werden, wobei die nodalen follikulären Lymphome eine statistisch signifikant geringere Bcl2-Positivität aufwiesen. Dies könnte – wie bereits beschrieben - mit erhöhten Mutationsraten im Bereich des Bcl2-Gens zusammenhängen, was insbesondere mit der Tendenz zu einem höheren Tumorgrad und damit einhergehend auch einer gesteigerten Proliferationsfraktion der NFL gegenüber den GFL plausibel erscheint (siehe Ergebnisteil). In vorangegangenen Veröffentlichungen ist der positiv korrelierende Zusammenhang zwischen dem Tumorgrad und der proliferativen Aktivität beim FL beschrieben worden. Mit der Proliferationsrate steigt das allgemeine Risiko für genetische Mutationen an. Sowohl der durchschnittliche Proliferationsindex als auch der korrespondierende Wert im punctum maximum ('hot spot', Focus = Follikel mit der höchsten Proliferationsrate) lagen bei den Lymphomen des Verdauungstraktes in dieser Arbeit signifikant unter denen der Referenzgruppe (NFL). Derartige Befunde konnten für extranodale und nicht die Haut einbeziehende follikuläre

Lymphome bereits von Weinberg et al. (2009) gezeigt werden (durchschnittlicher Ki67-Index der extranodalen FL von 10% versus 20% bei den nodalen FL). Beide Untersuchungen ergaben praktisch identische Werte für die Wachstumsfraktionen der einzelnen verglichenen Kollektive.

Die 31 GIFL wiesen gegenüber der gleichartig evaluierten Referenzgruppe der nodalen FL eine signifikant geringere Anzahl an CD3/CD4-positiven Zellen auf. Hierbei handelt es sich um T-Helfer-Zellen. T-Zellinfiltrate werden bei FL häufig vorgefunden und sind Bestandteil des Tumormilieus, das zudem noch histiozytäre Elemente beherbergt (Harris et al. 2008). Die Infiltration seitens dieser Populationen ist allerdings nicht spezifisch für das folliculäre Lymphom, sondern lässt sich ebenfalls in nicht entarteten Keimzentren finden. Inwiefern das zwischen den einzelnen Fraktionen für die T-Zell-Dichte differente Tumormilieu klinische Bedeutung besitzt, wird in weiteren Studien noch zu prüfen sein.

Beim Ausprägungsgrad der FDC-Netzwerke ließ sich zwischen beiden Studienpopulationen ein signifikanter Unterschied feststellen. Die NFL zeigten in mehr als der Hälfte aller Fälle kräftige FDC-Muster, während die GIFL nur in weniger als 30% der Proben Netze folliculärer dendritischer Zellen auf dem entsprechenden Niveau erkennen ließen. Diese Befunde – statistisch signifikant weniger T-Zellinfiltrate und FDC-Netze bei den GIFL im Vergleich zur Referenzgruppe - unterstützen den bereits von Chang et al. (2003) beobachteten positiven Zusammenhang der CD23-Expression von folliculären dendritischen Zellen und der T-Zell-Dichte im Tumorgewebe.

Eine monotypische Leichtkettenrestriktion trat bei den GIFL mit 10% signifikant seltener auf als dies bei den Präparaten der Kontrollgruppe (NFL) der Fall war (38%). Eine von Weiss et al. (2010) vorgenommene Leichtkettenanalyse von FL ergab für 30 von 46 Fällen (65%) eine monotypische Leichtkettenexpression, wobei mit einem Verhältnis von 2:1 mehr Leichtketten vom Kappa-Typ vorlagen. Präparate reaktiver lymphatischer Hyperplasien, die im gleichen Setting ebenfalls evaluiert worden waren, synthetisierten in keinem Fall nur Leichtketten eines Typs. Die im Verhältnis dazu geringeren Häufigkeiten einer Leichtkettenrestriktion der unselektionierten Referenzgruppe, die der aktuellen Studie zugrundeliegt, ist möglicherweise mit der Tatsache in Verbindung zu bringen, dass Weiss et al. (2010) durch Kombination zweier Verfahren (Durchflusscytometrie und Immunhistochemie) eine höhere Detektionsrate (Sensitivität) tatsächlich positiver Fälle erzielen konnte als dies durch die Anwendung nur einer diagnostischen Methode (Immunhistochemie) möglich gewesen ist. Interessanterweise wurde bei den GIFL ebenfalls das Übergewicht der Kappaexpression bestätigt. Es traten hier bei den Proben mit monotypischer Leichtkettenexpression ausschließlich solitäre Kappa-Muster auf (3/29). Eine monotypische Lambdaexpression konnte in keiner Probe nachgewiesen werden.

Mantelzonen, die als Kränze IgD-exprimierender Zellen im Randbereich des Follikels immunhistochemisch sichtbar gemacht werden können, werden gemeinhin als Zeichen einer frühen Manifestation gewertet, da sie der ursprünglichen präneoplastischen Follikelarchitektur noch relativ nahe sind. Bei Fällen mit erhaltenen Mantelzonen könnte es sich, so die aktuelle Sichtweise, um eine Weiterentwicklung beziehungsweise Progression vom folliculären Lymphoma in situ (auch: intrafolliculäre Neoplasie) handeln, bei der präexistente nicht neoplastische Follikel von einem Bcl2-positiven Zellklon kolonisiert werden. Die intrafolliculäre Neoplasie stellt damit die frühestmögliche Variante eines folliculären Lymphoms dar, wobei die klinische Bedeutung dieses Phänomens bislang noch nicht endgültig geklärt ist, da nicht notwendigerweise jedes FLIS (folliculäres Lymphoma in situ) in ein manifestes Lymphom übergehen muss (Harris et al. 2008). Eine immunhistochemische Untersuchung an 182 folliculären Lymphomen konnte für 45% der Neoplasien einen Mantelzonenerhalt belegen, wobei die Anteile der Follikel mit konserviertem Mantel sich sehr variabel präsentierten. Bei 12% (22/182) der untersuchten

Proben waren mehr als die Hälfte der Follikel mit IgD-Kränzen bestückt. Eine Mantelzone wurde gewertet, sobald die Corona aus IgD-exprimierenden Zellen mindestens ein Viertel der Follikelzirkumferenz umschloss (Thorns et al. 2008). Es konnte in der Studie kein Zusammenhang zwischen erhaltener Mantelzone und CD23-Expression der neoplastischen Zellen, Tumorgrad, Patientenalter oder Geschlecht hergestellt werden. Dieselbe Definition eines existenten Mantels liegt auch der aktuellen Arbeit zugrunde, sodass ein direkter Vergleich der Ergebnisse möglich ist. Hier zeigen sich für die primären GIFL deutlich abweichende Befunde. Von 29 Fällen, die immunhistochemisch beurteilbar waren, ließen sich IgD-positive Follikelsäume nur in einem Präparat identifizieren. Die nodalen FL des Referenzkollektivs boten mit einem Anteil von 33% (25/75) gegenüber den GIFL einen deutlichen Kontrast. Die Befunde der Referenz treffen die Dimensionen der bereits weiter oben beschriebenen Befunde von Thorns et al. (2008), die an 182 follikulären Lymphomen für Fälle mit erhaltenen Mantelzonen ermittelt wurden. Somit lässt sich konstatieren, dass bei primären GIFL statistisch signifikant ($p= 0,002$) geringere Raten an Neoplasien mit erhaltenem Mantel vorliegen. Bis dato war eine Abhängigkeit dieses Charakteristikums von der primären Lokalisation des Tumors nicht bekannt gewesen.

Im Rahmen der immunhistochemischen Observation fielen lymphoepitheliale Läsionen (LEL) bei der Hälfte der auswertbaren GIFL-Präparate auf (14/28). LEL wurden in dieser Studie als Akkumulation von mindestens 5 B-Lymphozyten im intestinalen Schleimhautepithel definiert. Zu der Existenz von LEL gibt es in der Literatur nur wenige Angaben. Bende et al. (2003) beschreiben in einer Studie an 4 primär gastrointestinalen follikulären Lymphomen mit Dünndarmlokalisation ein Fehlen von LEL im Drüsenepithel des Intestinaltraktes. In keinem der genannten Fälle zeigten sich Infiltrationen oder gar Destruktionen der Epithelien durch den Tumor. Allerdings gibt es einen Fallbericht, in dem Tzankov et al. (2002) einen Patienten mit primär gastrischem follikulären Lymphom und LEL vorstellen. Der grundsätzliche Verdacht auf ein Marginalzonenlymphom vom MALT-Typ, einer im Magen verhältnismäßig häufig auftretenden Tumorentität, bei der LEL typischerweise vorhanden sind, bestätigte sich nicht und es konnte immunhistochemisch und molekulargenetisch ein FL diagnostiziert werden (CD10+; CD21+-FDC-Netze, Translokation [t14;18]). Außerhalb des Magens sind bis dato noch keine LEL-Befunde für das GIFL publiziert worden. Es besteht jedoch die Notwendigkeit, weiterführende Untersuchungen zur Abschätzung der Häufigkeit und klinischen Relevanz von LEL beim GIFL durchzuführen. Auch die molekularen Mechanismen, die zur Migration neoplastischer Zellen in das Schleimhautepithel des GI-Traktes beitragen, stellen ein lohnendes Ziel zukünftiger Forschungstätigkeit dar.

Bei insgesamt 3 Präparaten der 31 GIFL zeigte sich ein bislang noch nicht in der Literatur beschriebenes Wachstumsmuster, das als „subepithelial bandförmig“ bezeichnet werden kann. Im Ergebnisteil sind Abbildungen dieser morphologischen Eigentümlichkeit zu finden. Eine Täuschung durch einen diffusen Wuchs ist prinzipiell nicht auszuschließen, aber sie erscheint unter Berücksichtigung der Tatsache, dass 2 dieser 3 Proben ansonsten keine diffusen Areale aufweisen und im dritten Präparat die diffusen Bereiche keinen direkten Kontakt mit der Zone der subepithelial bandförmigen Tumorzellformation besitzen, unwahrscheinlich. Weiteren Studien wird es vorbehalten bleiben, diese Befunde zu reproduzieren und Häufigkeit sowie Bedeutung dieses Phänomens zu bestimmen.

Aspekte der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die FISH-Diagnostik (Bcl2-Split und Bcl2-IgH-Fusion, Myc-Split und Myc-IgH-Fusion, Bcl6-Split) wurde in dieser Studie für alle GIFL und alle NFL unter gleichen Rahmenbedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind detailliert im Ergebnisteil der

Arbeit dargelegt. Es ergaben sich im direkten Vergleich beider Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Lediglich für ein Bcl6-Split-Phänomen könnte mit 4% der GIFL versus 16 % der NFL eine Tendenz für ein selteneres Auftreten dieses Ereignisses bei den GIFL vorliegen (P-Wert = 0,177). Es ist aus vorherigen Studien bekannt, dass das Risiko für ein Bcl6-Split-Phänomen bei höherem Tumorgrad zunimmt (Harris et al. 2008). Betrachtet man die Referenzgruppe genauer, so stellt man fest, dass nicht nur die Gesamtheit aller NFL im Durchschnitt ein höheres Grading entwickelt (24% hochgradige NFL; 10% hochgradige GIFL), sondern insbesondere die Subgruppe der NFL mit nachweisbarem Bcl6-Bruch-Phänomen sich noch einmal von den Bcl6-negativen Referenzfällen abhebt. Sie konnte zu 33% (4/12) als hochgradig klassifiziert werden. Die vorbeschriebene Korrelation beider Parameter ist damit auch in dieser Studie analog nachvollziehbar. Für die Translokation (t14/18)[q32; q21] ergaben beide Gruppen mit 74% der GIFL und 81% der NFL recht ähnliche Werte (P-Wert = 0,410), die sich im Rahmen der meisten Studien bewegen. Es werden in der Literatur zahlreiche Analysen für das folliculäre Lymphom beschrieben, in denen Werte zwischen 60% und 95% auftraten (Diaz-Alderete 2008, Harris et al. 2008, Meijerich et al. 1997, Vitolo et al. 2008, Yamamoto et al. 2010). Die Bandbreite differenter Befunde ist mutmaßlich im Wesentlichen durch zwei Ursachen begründet. Zum einen ergeben die verschiedenen in den einzelnen Studien praktizierten Analysetechniken (Cytogenetik, FISH, PCR) voneinander abweichende Ergebnisse, zum anderen werden regionale Unterschiede mit deutlich höheren Translokationsinzidenzen in den USA (bis zu 90%) und demgegenüber verminderten relativen Häufigkeiten im asiatischen Raum (bis zu 30%) für die Varianz verantwortlich gemacht (Montoto et al. 2003). Die europäische durchschnittliche Inzidenz liegt dabei im Mittelfeld zwischen den Raten in den Vereinigten Staaten und Asien. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass bedingt durch unterschiedliche potentielle Bruchzonen bei der Translokation einige Verfahren nicht suffizient anwendbar sind, da sie nur für bestimmte definierte Bereiche entwickelt wurden. Dies gilt beispielsweise für die PCR-Primer, die sich daraus ergebende Anteil sollte allerdings nicht allzu ausgeprägt ins Gewicht fallen, da in den allermeisten Fällen die MBR (Major Breakpoint Region) oder seltener die MCR (Minor Cluster Region) betroffen sind. Meijerich et al. (1997) verglichen die Häufigkeiten, in denen beide Regionen als Ereignisbereich für eine Abspaltung auftraten, und erhielten dabei ein Verhältnis von 4:1 (MBR:MCR). Auch für primär gastrointestinale FL sind gesonderte Bcl2-IgH-Translokationsanalysen durchgeführt worden. Damaj et al. (2003) konnten bei 11 von 14 Proben (ca. 80%) einen entsprechenden Nachweis erbringen. Yamamoto et al. (2010) berichten bei Anwendung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung über eine Fusionsrate (t14/t18) von 72% bei FL des intestinalen Systems. Die GIFL lassen sich folglich im Gegensatz zu den primär cutanen FL, welche im Regelfall keine Bcl2-IgH-Fusion zeigen (Jaffe 2009), anhand dieses Kriteriums der Translokation nicht von der Menge der nodalen FL separieren. Eine Myc-IgH-Fusion konnte bei den 31 GIFL in dieser Arbeit in keinem Präparat diagnostiziert werden und auch in der Referenzgruppe wiesen nur drei Proben (3/74 = 4%) ein positives Fusionssignal auf. Follikuläre Lymphome wurden in der Forschungshistorie selten auf eine solche Fusion hin untersucht, sodass nur kleine und wenige Vergleichsserien zur Verfügung stehen. Die meisten Veröffentlichungen basieren auf isolierten Falldarstellungen (Case-Reports). Lesley et al. (2008) haben 102 unselektierte FL auf Anomalien des Myc-Locus (8q24) untersucht und sind bei 3 Proben fündig geworden (3%). Diese Rate entspricht unseren Daten für nodale FL. Auch bei den primären GIFL scheinen Bruchereignisse im MYC-Locus nicht häufiger aufzutreten (0/30). Ob sie letztendlich seltener als bei den nodalen FL diagnostiziert werden können, vermag diese Studie aufgrund der dafür zu geringen Fallzahl nicht zu beantworten. Translokationsereignisse im Myc-Abschnitt auf Chromosom 8 sind nicht

häufig anzutreffende Phänomene beim FL, die allgemein bei hochmalignen NHL vorgefunden werden (Burkitt-Lymphom, transformiertes oder de-novo-DLBCL, akute lymphoblastische Leukämie). Alle 3 Fälle mit Myc-Aberration zeigten bei Lesley et al. (2008) das typische Profil folliculärer Lymphome (CD10+, Bcl6+, Bcl2+, sämtliche Präparate mit prädominant folliculärem Wachstum). Für die eigenen Referenzfälle kann dies nicht bestätigt werden. Von den 3 Proben mit Myc-IgH-Fusion war bei 2 Präparaten ein prädominant diffuses Wachstumsmuster (Synonym: fokal folliculär = weniger als 25% folliculäres Wachstum) auffällig, eine Probe präsentierte sich rein folliculär ohne diffuse Anteile. Auch Bcl2-Positivität war nur in 2 von 3 Fällen gegeben. Abschließend kann festgehalten werden, dass eine Myc-Translokation ein selten beim FL (und auch beim GIFL) auftretendes, bisher in seiner klinischen Relevanz aufgrund zu geringfügigen Datenmaterials ungeklärtes molekulargenetisches Ereignis darstellt.

Die gesonderte Analyse von molekulargenetischen Amplifikationen, welche den Bcl2-Locus oder den Myc-Locus betrafen, ergab für die GIFL keine von der Grundgesamtheit abweichenden Ergebnisse. Eine Bcl2-Amplifikation war in 2/31 der GIFL und in 3/75 der NFL erkennbar, was in beiden Fraktionen einem vergleichbaren Anteil entspricht. Analoges gilt für einen numerischen Zugewinn des Myc-Gens, der in beiden Gruppen ebenfalls auf gleichartigem Niveau rangierte (1/31 der GIFL und 1/73 der NFL). Bentz et al. (1996) haben 28 Patienten mit klassischem folliculären Lymphom auf Amplifikationen gescreent und dabei neben anderen numerischen Veränderungen auf subchromosomaler Ebene in 2 Proben hochgradige MYC-Amplifikationen (7-fache und 4-fache Amplifikation gegenüber einem Beta-Myosin-Referenzgen) verifizieren können. Diese Befunde lassen sich mit den eigenen Ergebnissen vereinbaren. Die klinischen Auswirkungen einer MYC-Amplifikation sind ebenso wie die Bedeutung einer Translokation bislang noch nicht beurteilbar.

In der Synopsis der FISH-Analyse heben sich die folliculären Lymphome des Gastrointestinaltraktes von den nodalen FL hinsichtlich der betrachteten Gen-Regionen nicht ab. Sie scheinen vielmehr unter den meisten Gesichtspunkten ein Kontinuum darzustellen. Das einzige aus den erhobenen Daten ableitbare potentielle Merkmal zur Segregation beider Kollektive könnte eine verminderte Bcl6-Translokationsrate der GIFL gegenüber den NFL sein. Dieses Ergebnis erreichte allerdings möglicherweise aufgrund einer zu geringen Fallzahl keine statistische Signifikanz, sodass weitere Untersuchungen zur Bestätigung notwendig sind.

Gesamtbetrachtung

Nach eingehender Analyse und Bewertung aller verfügbaren epidemiologischen, morphologischen, immunhistochemischen und molekulargenetischen Parameter von 31 primär gastrointestinalen folliculären Lymphomen liegen anhand des direkten Vergleiches mit einem nodalen Referenzkollektiv (n = 78) berechtigte Gründe vor, das GIFL als eine eigene und abgrenzbare Entität innerhalb des Spektrums der folliculären Lymphome zu betrachten. Beide Kollektive unterscheiden sich sowohl in allgemeinen epidemiologischen (z.B. Altersstruktur) und morphologischen (z.B. Häufigkeit und Grad einer Sklerose) Charakteristika wie auch hinsichtlich spezifischer immunhistochemischer Eigenschaften (z.B. MIB-Proliferationsindex, Anteil IgD-positiver Follikelmäntel) signifikant. Auch im begleitenden Tumormilieu (CD3+-T-Zelldichte) bestehen Differenzen zwischen beiden Gruppen. In der FISH-Diagnostik der untersuchten Genloci (Bcl2, Bcl6, Myc) hingegen ließen sich keine signifikanten Unterscheidungskriterien für beide Kollektive definieren.

Zusammenfassung

Das folliculäre Lymphom ist nach dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom das zweithäufigste Non-Hodgkin-Lymphom. Es handelt sich dabei um eine neoplastische Entartung von (CD10+) Keimzentrums-B-Zellen mit morphologisch zumindest partiell folliculärem Wachstum. Sein charakteristisches Merkmal ist die Translokation des Bcl2-Gens vom Chromosom 18q21 in den Einflussbereich des Promotors der Immunglobulin-Schwerkette (IgH) auf Chromosom 14q32. Dadurch wird das Bcl2-Gen konstitutionell exprimiert und seiner Funktion gemäß antiapoptotisch wirksam, was zu einem Selektionsvorteil der translozierten Zellen führt. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass es sich beim FL sowohl klinisch als auch molekulargenetisch und phänomenologisch um eine heterogene Gruppe von Neoplasien handelt. Dies führt zu der Frage, ob sich in der Sammelbezeichnung "folliculäres Lymphom" nicht mehrere Entitäten unterscheiden lassen. Für das cutane FL konnte diese Frage bereits aufgrund des typischen Fehlens einer Bcl2-IgH-Fusion bei weitestgehend mit dem nodalen FL übereinstimmendem immunhistochemischen Profil positiv beantwortet werden. Das Vorgehen der Untersuchung dieser Arbeit bestand darin, das primär gastrointestinale folliculäre Lymphom morphologisch, immunhistochemisch und molekulargenetisch zu definieren und die Befunde einer nodalen Vergleichsgruppe an folliculären Lymphomen gegenüberzustellen. Hierbei lag die Zielsetzung darin, mögliche Differenzen beider Kollektive in der Ausprägung der genannten Parameter zu erkennen und anhand der erhobenen Befunde Möglichkeiten der Abgrenzbarkeit von primären GIFL aufzuzeigen. Es wurden alle für den Zeitraum 2001 - 2008 verfügbaren Fälle primär gastrointestinaler folliculärer Lymphome aus dem Register des Institutes für Pathologie der Universität zu Lübeck in die Studiengruppe einbezogen, sofern die Gewebedatenbank für den jeweiligen Fall quantitativ und qualitativ adäquates Material vorrätig hatte. Diese Kriterien wurden von 31 Proben erfüllt. Als Referenz diente ein Kollektiv von 78 nodalen FL, die ebenfalls der Biobank des Institutes entstammten. Beide Fraktionen wurden von zwei Untersuchern im Konsensusverfahren nach morphologischen, immunhistochemischen und molekulargenetischen Aspekten ausgewertet. Bei der Evaluation zeigten sich signifikante Unterschiede im Hinblick auf epidemiologische (Altersstruktur), morphologische (Sklerosegrad) und immunhistochemische (MIB-Index, IgD-Mantelzonen, T-Zell-Dichte, FDC-Netze, Bcl2-Expression) Gesichtspunkte. Außerdem offenbarte sich ein bis dato noch nicht für das GIFL beschriebenes Wachstumsmuster, das als „subepithelial bandförmig“ bezeichnet werden kann. Ursache und Bedeutung dieses Phänomens sind bislang noch unklar.

Die FISH-Diagnostik konnte für Bcl2, Myc und Bcl6 im Hinblick auf Translokationsereignisse oder numerische Aberrationen keine signifikanten Abweichungen der GIFL von der Referenzgruppe der nodalen FL nachweisen.

In der Gesamtbetrachtung lassen sich durch die erhobenen Daten für primär gastrointestinale FL abgrenzbare Charakteristika bestimmen. Diese Merkmale betreffen im Wesentlichen das Tumormilieu und immunhistochemische Parameter. Auf molekulargenetischer Ebene selbst konnten jedoch für die untersuchten Bereiche keine Differenzen beobachtet werden. Um die Frage nach einer eigenständigen Entität der GIFL zu beantworten sind weitere Studien zur Bestimmung des klinischen Verlaufs sowie des globalen Genexpressionsprofils notwendig. Auch sollten sich zur Verifikation der Befunde dieser Arbeit weitere Untersuchungen anschließen, um die Ergebnisse auf eine breitere Datenbasis stellen zu können. Erst aus dem hierdurch erzeugten Gesamtbild wird sich die Entitätsfrage hinreichend fundiert beantworten lassen.

Literaturverzeichnis

1. Anagnostopoulos I (2003): [Classification and differential diagnosis of B-cell lymphomas]. *Verh Dtsch Ges Pathol.*; 87:32-42.
2. Bende RJ, Smit LA, Bossenbroek JG, Aarts WM, Spaargaren M, de Leval L, Boeckxstaens GE, Pals ST, van Noesel CJ (2003): Primary follicular lymphoma of the small intestine: alpha4beta7 expression and immunoglobulin configuration suggest an origin from local antigen-experienced B cells. *Am J Pathol.*; 162(1):105-13.
3. Bennett MH (1975): Sclerosis in non-Hodgkin's lymphomata. *Br J Cancer Suppl.*; 2:44-52.
4. Bentz M, Werner CA, Döhner H, Joos S, Barth TF, Siebert R, Schröder M, Stilgenbauer S, Fischer K, Möller P, Lichter P (1996): High incidence of chromosomal imbalances and gene amplifications in the classical follicular variant of follicle center lymphoma. *Blood*; 88(4):1437-44.
5. Bhagavathi S, Gu K, Loberiza FR, Bast M, Vose JM, Weisenburger DD (2009): Does a diffuse growth pattern predict for survival in patients with low-grade follicular lymphoma? *Leuk Lymphoma*; 50(6):900-3.
6. Cerroni L, Arzberger E, Pütz B, Höfler G, Metze D, Sander CA, Rose C, Wolf P, Rütten A, McNiff JM, Kerl H (2000): Primary cutaneous follicle center cell lymphoma with follicular growth pattern. *Blood*; 95(12):3922-8
7. Chang KC, Huang X, Medeiros LJ, Jones D (2003): Germinal centre-like versus undifferentiated stromal immunophenotypes in follicular lymphoma. *J Pathol.*; 201(3):404-12.
8. Christie L, Kernohan N, Levison D, Sales M, Cunningham J, Gillespie K, Batstone P, Meiklejohn D, Goodlad J (2008): C-MYC translocation in t(14;18) positive follicular lymphoma at presentation: An adverse prognostic indicator? *Leuk Lymphoma*; 49(3):470-6.
9. Cirillo M, Federico M, Curci G, Tamborrino E, Piccinini L, Silingardi V (1992): Primary gastrointestinal lymphoma: a clinicopathological study of 58 cases. *Haematologica*; 77(2):156-61. Review.
10. Crotty S, Johnston RJ, Schoenberger SP (2010): Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat Immunol.*; 11(2):114-20.
11. Damaj G, Verkarre V, Delmer A, Solal-Celigny P, Yakoub-Agha I, Cellier C, Maurschhauser F, Bouabdallah R, Leblond V, Lefrère F, Bouscary D, Audouin J, Coiffier B, Varet B, Molina T, Brousse N, Hermine O (2003): Primary follicular lymphoma of the gastrointestinal tract: a study of 25 cases and a literature review. *Ann Oncol.*; 14(4):623-9.

12. de Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, Klapper W, Lee A, Sander B, Thorns C, Campo E, Molina T, Norton A, Hagenbeek A, Horning S, Lister A, Raemaekers J, Gascoyne RD, Salles G, Weller E; Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium (2007): Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications--a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol.*; 25(7):805-12
13. de Jong D, Xie W, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, Klapper W, Lee A, Sander B, Thorns C, Campo E, Molina T, Hagenbeek A, Horning S, Lister A, Raemaekers J, Salles G, Gascoyne R, Weller E (2008): Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications. A study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium (LLBC). *J Clin Pathol.*; 62(2):128-38
14. de Jong D (2005): Molecular pathogenesis of follicular lymphoma: a cross talk of genetic and immunologic factors. *J Clin Oncol.*; 23(26):6358-63.
15. Díaz-Alderete A, Doval A, Camacho F, Verde L, Sabin P, Arranz-Sáez R, Bellas C, Corbacho C, Gil J, Perez-Martín M, Ruiz-Marcellán M, Gonzalez L, Montalbán C, Piris M, Menarguez J (2008): Frequency of BCL2 and BCL6 translocations in follicular lymphoma: relation with histological and clinical features. *Leuk Lymphoma*; 49(1):95-101
16. Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson PG (2000): CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol.*; 24(6):846-52.
17. Fischbach W (2000): [Gastrointestinal lymphoma: etiology, pathogenesis and therapy]. *Internist*; 41(9):831-40.
18. Freedman A (2011): Follicular lymphoma: 2011 update on diagnosis and management. *Am J Hematol.*; 86(9):768-75.
19. Harris NL, Swerdlow SH, Jaffe ES, Ott G, Nathwani BN, de Jong D, Yoshino T, Spagnolo D. (2008): Follicular lymphoma. WHO. (2008)
20. Hitz F, Ketterer N, Lohri A, Mey U, Pederiva S, Renner C, Taverna C, Hartmann A, Yeow K, Bodis S, Zucca E (2011): Diagnosis and treatment of follicular lymphoma. *Swiss Med Wkly.*; 141:w13247.
21. Horn H, Schmelter C, Leich E, Salaverria I, Katzenberger T, Ott MM, Kalla J, Romero M, Siebert R, Rosenwald A, Ott G (2011): Follicular lymphoma grade 3B is a distinct neoplasm according to cytogenetic and immunohistochemical profiles. *Haematologica*; 96(9):1327-34
22. Huang WT, Hsu YH, Yang SF, Chuang SS (2008): Primary gastrointestinal follicular lymphoma: a clinicopathologic study of 13 cases from Taiwan. *J Clin*

Gastroenterol.; 42(9):997-1002.

23. Klapper W, Hoster E, Rölver L, Schrader C, Janssen D, Tiemann M, Bernd HW, Determann O, Hansmann ML, Möller P, Feller A, Stein H, Wacker HH, Dreyling M, Unterhalt M, Hiddemann W, Ott G; German Low Grade Lymphoma Study Group (2007): Tumor sclerosis but not cell proliferation or malignancy grade is a prognostic marker in advanced-stage follicular lymphoma: the German Low Grade Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol.*; 25(22):3330-6.
24. LeBrun DP, Kamel OW, Cleary ML, Dorfman RF, Warnke RA (1992): Follicular lymphomas of the gastrointestinal tract. Pathologic features in 31 cases and bcl-2 oncogenic protein expression. *Am J Pathol.*; 140(6):1327-35.
25. Misdraji J, Harris NL, Hasserjian RP, Lauwers GY, Ferry JA (2011): Primary follicular lymphoma of the gastrointestinal tract. *Am J Surg Pathol.*; 35 (9):1255-63.
26. Mori M, Kobayashi Y, Maeshima AM, Gotoda T, Oda I, Kagami Y, Bennett S, Nomoto J, Azuma T, Yokoyama H, Maruyama D, Kim SW, Watanabe T, Matsuno Y, Tobinai K (2010): The indolent course and high incidence of t(14;18) in primary duodenal follicular lymphoma. *Ann Oncol.*; 21(7):1500-5
27. Na YJ, Kim ER, Kim SJ, Kim WS, Ko YH, Son HJ (2012): Primary Gastrointestinal Follicular Lymphoma: Single-Center 12 Year Experiences. *Hepatogastroenterology*; 59(115-116) (zum Zeitpunkt der Erstellung dieses Verzeichnisses ist der Artikel noch nicht als Printausgabe erschienen. Die Seitenzahl steht noch nicht fest.)
28. Ott G, Rosenwald A, Leich E (2011): Pathology, pathogenesis and molecular genetics of follicular NHL. *Best Pract Res Clin Haematol.*; 24(2):95-109
29. Piccaluga PP, Califano A, Klein U, Agostinelli C, Bellosillo B, Gimeno E, Serrano S, Solè F, Zang Y, Falini B, Zinzani PL, Pileri SA (2008): Gene expression analysis provides a potential rationale for revising the histological grading of follicular lymphomas. *Haematologica*; 93(7):1033-8
30. Sentani K, Maeshima AM, Nomoto J, Maruyama D, Kim SW, Watanabe T, Kobayashi Y, Tobinai K, Matsuno Y (2008): Follicular lymphoma of the duodenum: a clinicopathologic analysis of 26 cases. *Jpn J Clin Oncol.*; 38(8):547-52
31. Shia J, Teruya-Feldstein J, Pan D, Hegde A, Klimstra DS, Chaganti RS, Qin J, Portlock CS, Filippa DA (2002): Primary follicular lymphoma of the gastrointestinal tract: a clinical and pathologic study of 26 cases. *Am J Surg Pathol.*; 26(2):216-24
32. Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, Au WY, Bellei M, Brice P, Caballero D, Coiffier B, Conde-Garcia E, Doyen C, Federico M, Fisher RI, Garcia-Conde JF, Guglielmi C, Hagenbeek A, Haïoun C, LeBlanc M, Lister AT, Lopez-Guillermo A, McLaughlin P, Milpied N, Morel P, Mounier N,

- Proctor SJ, Rohatiner A, Smith P, Soubeyran P, Tilly H, Vitolo U, Zinzani PL, Zucca E, Montserrat E (2004): Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood*; 104(5):1258-65
33. Takata K, Okada H, Ohmiya N, Nakamura S, Kitadai Y, Tari A, Akamatsu T, Kawai H, Tanaka S, Araki H, Yoshida T, Okumura H, Nishisaki H, Sagawa T, Watanabe N, Arima N, Takatsu N, Nakamura M, Yanai S, Kaya H, Morito T, Sato Y, Moriwaki H, Sakamoto C, Niwa Y, Goto H, Chiba T, Matsumoto T, Ennishi D, Kinoshita T, Yoshino T (2011): Primary gastrointestinal follicular lymphoma involving the duodenal second portion is a distinct entity: a multicenter, retrospective analysis in Japan. *Cancer Sci.*; 102(8):1532-6
 34. Tari A, Asaoku H, Kunihiro M, Tanaka S, Fujihara M, Yoshino T (2011): Clinical features of gastrointestinal follicular lymphoma: comparison with nodal follicular lymphoma and gastrointestinal MALT lymphoma. *Digestion*; 83(3):191-7
 35. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project (1997). A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*; 89:3909-18
 36. Thorns C, Bernd HW, Krokowski M, Feller AC (2008): Preservation of follicle mantle in follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma*; 49(1):166-7
 37. Thorns C, Kalies K, Fischer U, Höfig K, Krokowski M, Feller AC, Merz H, Bernd HW (2007): Significant high expression of CD23 in follicular lymphoma of the inguinal region. *Histopathology*; 50(6):716-9
 38. Tsujioka T, Wada H, Yata K, Kondo T, Suemori S, Tokunaga H, Ohmori K, Kubo Y, Nakanishi H, Mikami M, Haruma K, Sadahira Y, Sugihara T (2007): [Clinical analysis of eight patients with primary follicular lymphoma in the duodenum]. *Rinsho Ketsueki*; 48(2):134-9
 39. Tzankov A, Hittmair A, Müller-Hermelink HK, Rüdiger T, Dirnhofer S (2002): Primary gastric follicular lymphoma with parafollicular monocytoid B-cells and lymphoepithelial lesions, mimicking extranodal marginal zone lymphoma of MALT. *Virchows Arch.*; 441(6):614-7
 40. Vitolo U, Ferreri AJ, Montoto S (2008): Follicular lymphomas. *Crit Rev Oncol Hematol.*; 66(3):248-61
 41. Waldron JA Jr, Newcomer LN, Katz ME, Cadman E (1983): Sclerosing variants of follicular center cell lymphomas presenting in the retroperitoneum. *Cancer*; 52(4):712-20
 42. Weinberg OK, Ma L, Seo K, Beck AH, Pai RK, Morales A, Kim Y, Sundram U, Tan D, Horning SJ, Hoppe RT, Natkunam Y, Arber DA (2009): Low stage follicular lymphoma: biologic and clinical characterization according to nodal or extranodal primary origin. *Am J Surg Pathol.*; 33(4):591-8

43. Weiss LM, Loera S, Bacchi CE (2010):Immunoglobulin light chain immunohistochemistry revisited, with emphasis on reactive follicular hyperplasia versus follicular lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.*; 18(3):199-205
44. Yamamoto S, Nakase H, Yamashita K, Matsuura M, Takada M, Kawanami C, Chiba T (2010):Gastrointestinal follicular lymphoma: review of the literature. *J Gastroenterol.*; 45(4):370-88
45. Yoshino T, Miyake K, Ichimura K, Mannami T, Ohara N, Hamazaki S, Akagi T (2000):Increased incidence of follicular lymphoma in the duodenum. *Am J Surg Pathol.*; 24(5):688-93

Anhang

Nachfolgend sind die zur FISH-Diagnostik in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzsonden abgebildet. Die schematischen Darstellungen wurden der Homepage der Firma Abbott (<http://www.abbottmolecular.com>) entnommen.

Bcl2-Igh-Fusionssonde:

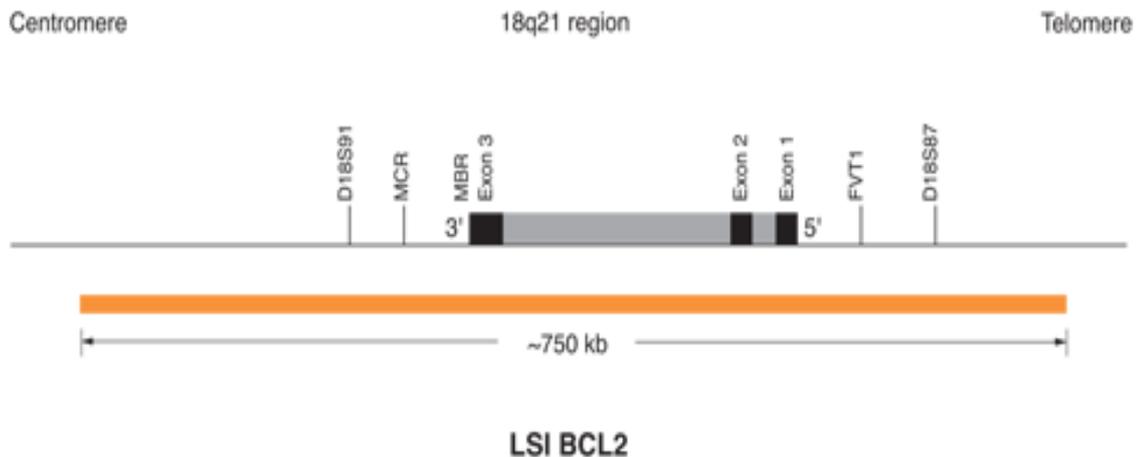


Abbildung 17: Detailliertes Schema des Bindungsareals für die Bcl2-Sonde auf Chromosom 18, die im Rahmen einer Fusionsdiagnostik der Translokation Bcl2-IgH t14/18 [q32;q21] verwendet wird.

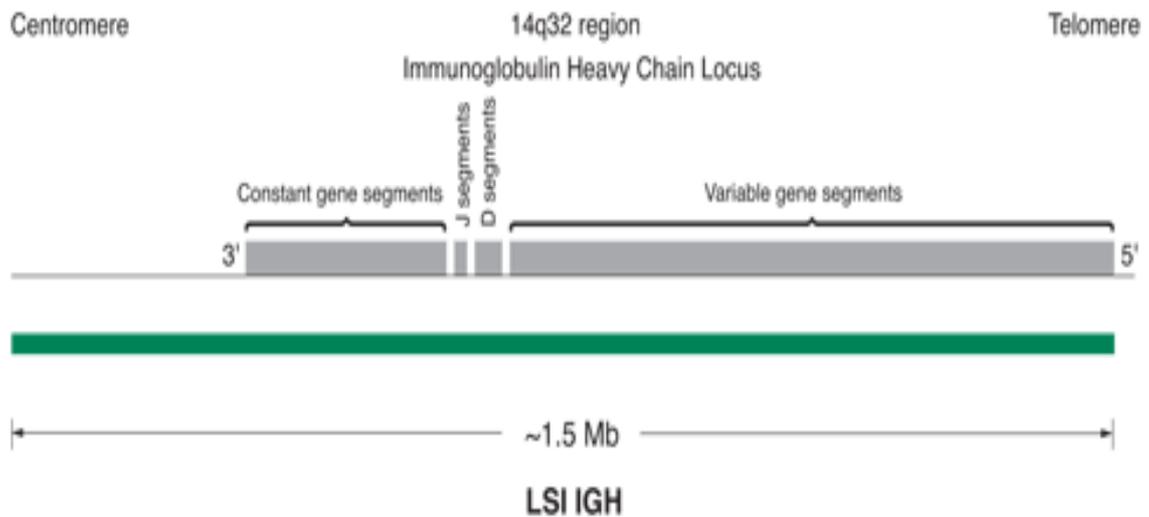


Abbildung 18: Skizze der Region des Immunglobulinschwerkettenlokus, an die eine Anlagerung der IgH-Sonde erfolgt. Sie wird im Rahmen einer Bcl2-IgH-Fusion in den Fusionsprozess involviert.

Bcl2-Split-Sonde



Abbildung 19: Schematische Lokalisation des typischen Bruchpunktes bei der Translokation $t(14;18)[q32;q21]$.

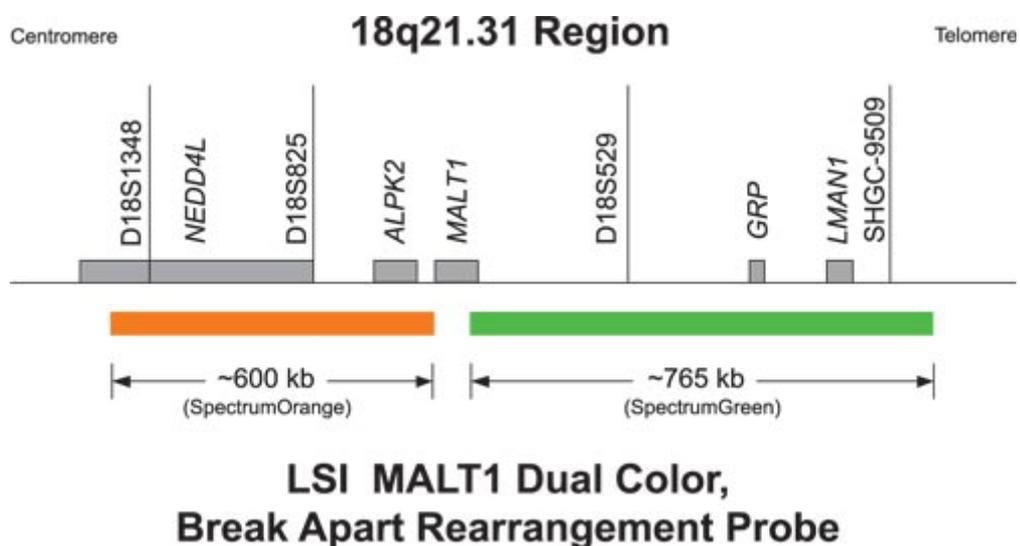
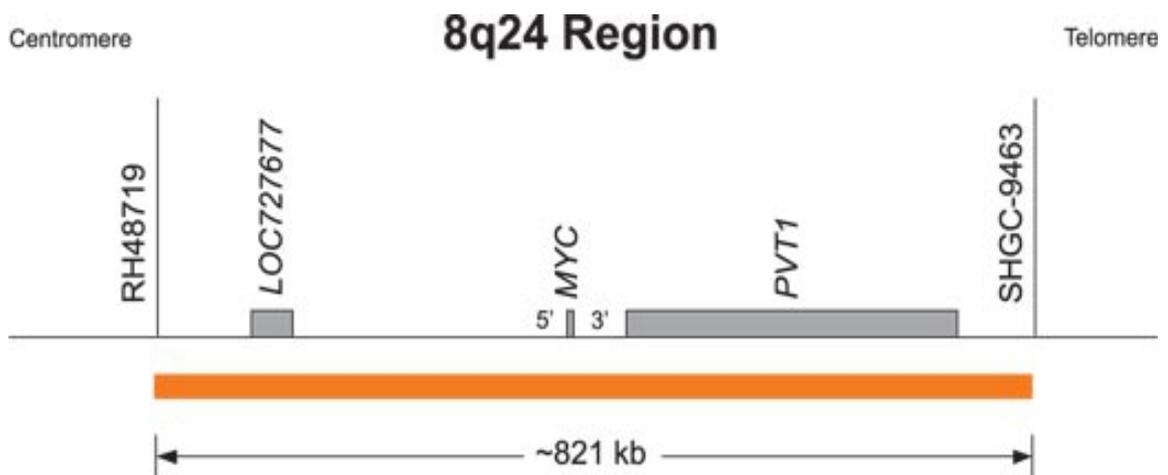


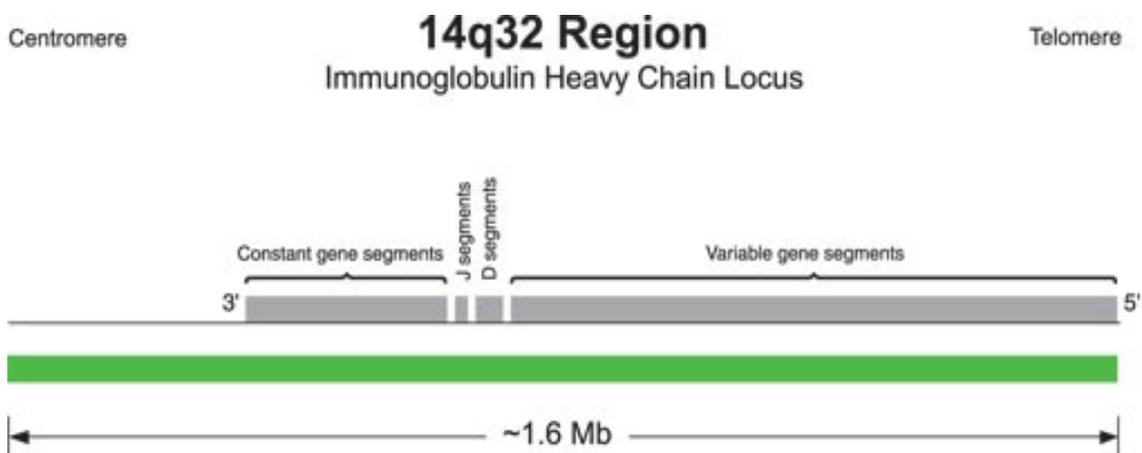
Abbildung 20: Die Bcl2-Region im Detail mit den für die Sondenanlagerung essentiellen Zonen (orange und grün). Das Bruchereignis findet im MALT1-Bereich statt, sodass eine Separation beider Sonden resultiert.

C-MYC-IgH-Fusionssonde



LSI MYC SpectrumOrange Probe

Abbildung 21: Chromosomaler Abschnitt 8q24. Die Sonde bindet an das Myc-Gen und umfasst zudem auch benachbarte Loci.



LSI IGH SpectrumGreen Probe

Abbildung 22: Die verwendete Sonde bindet an V-, D- und J-Segmente sowie an die konstante Region des Gen-Locus für die Immunglobulinschwerkette.

C-MYC-Split-Sonde

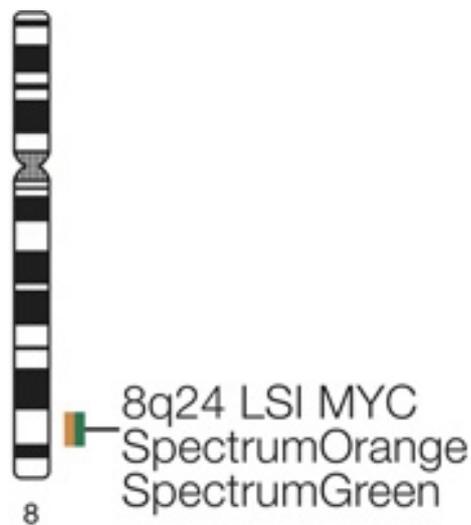
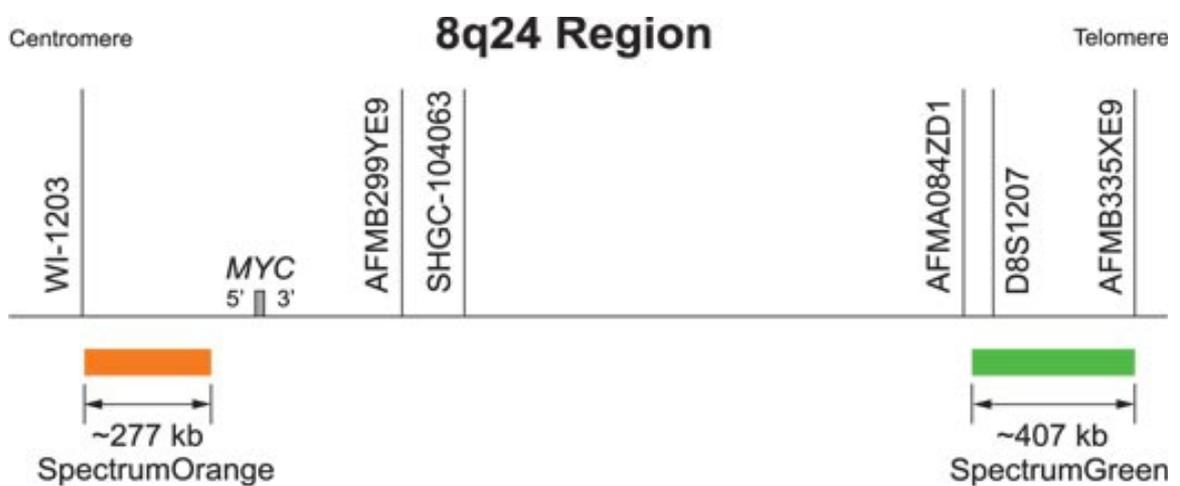


Abbildung 23: Lokalisation des c-MYC-Locus auf dem langen Arm von Chromosom 8. Beide Sonden liegen im Normalfall dicht beieinander. Das Bruchereignis im Rahmen einer Translokation führt zur Separation, die sich optisch in distinkt gefärbten Fluoreszenzsignalen manifestiert.



LSI MYC Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe

Abbildung 24: Dargestellt sind die vom c-Myc-Gen centromerseitig gelegene orange fluoreszierende Sonde und die telomerseitig lokalisierte Fluoreszeinsonde (grün) mit den entsprechenden Anlagerungssequenzen.

Bcl6-Split-Sonde

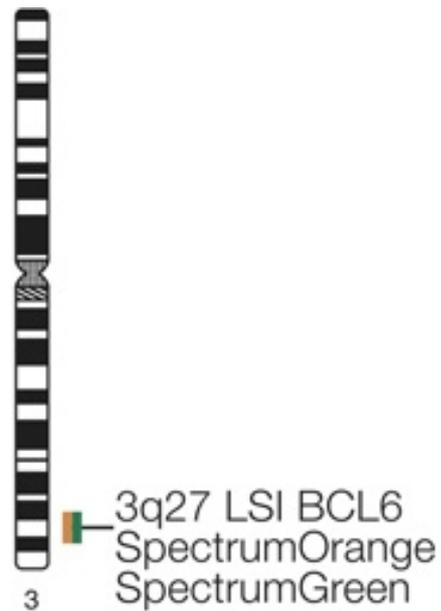


Abbildung 25: Lokalisation des Bcl6-Gens auf Chromosom 3.

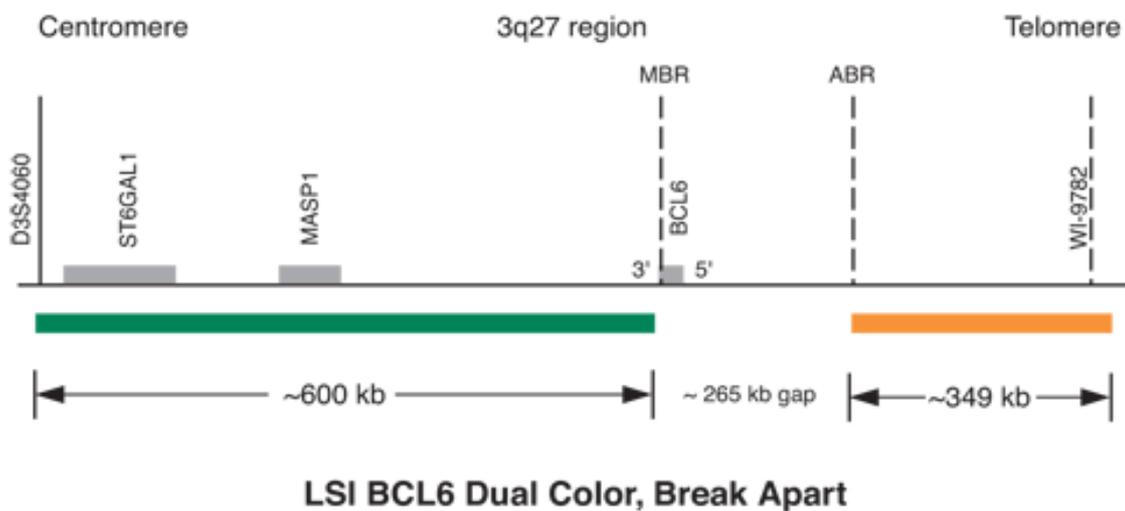


Abbildung 26: Detaillierte Darstellung des Bcl6-Locus auf dem langen Arm von Chromosom 3 mit den telomer- und centromerseitig angebundenen Fluoreszenzsonden. Zwischen beiden Sondenbereichen liegt ein Areal (265 Kilobasenpaare), in das die MBR (= Major Breakpoint Region) eingebettet ist.

Stellungnahme der Ethikkommission vom 26.8.2008



Im Fokus des Lebens
Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät

Ethik-Kommission

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe

Universität zu Lübeck

Stellv. Vorsitzende:

Frau Prof. Dr. med. M. Schrader

Ratzeburger Allee 160

23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann

Tel.: +49 451 500 4639

Fax: +49 451 500 3026

janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
Dr. med. Thorns
Institut für Pathologie

im Hause

nächtlich:

Herrn Prof. Feller

Direktor des Institutes für Pathologie

Aktenzeichen: 08-134

Datum 08.09.2008

Sitzung der Ethik-Kommission am 26. August 2008

Antragsteller: Herr Dr. Thorns / Herr Prof. Feller

Titel: Morphologische, immunhistochemische und molekulare Untersuchungen zum follikulären Lymphom

Sehr geehrter Herr Dr. Thorns,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat keine Bedenken.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Studie und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß bin ich

Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder: ☒

☒ Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)

Prof. Dr. Schweiger

(Psychiatrie)

Prof. Dr. Dendorfer

(Pharmakologie)

☒ Frau Prof. E. Stubbe

(Theologin)

Prof. Dr. Borck

(Medizin- und Wissenschaftsgeschichte)

☒ Frau H. Müller
(Pflege)

Dr. Kaiser

(Kinderchirurgie, Stellv. Vorsitzender der EK)

Herr Dr. Fieber

(Richter am Landgericht Lübeck)

☒ Prof. Schwinger

(Humangenetik)

☒ Herr Prof. Dr. Mönig
(Medizinische Klinik I)

☒ Frau Prof. Dr. M. Schrader

(Plastische Chirurgie)

☒ Herr Dr. Schultz

(Pädiatrie)

Herr D. Stojan

(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Alfred Christian Feller für die Überlassung des Laborarbeitsplatzes und die Möglichkeit, auf das Gewebematerial des Lymphomregisters zugreifen zu dürfen. Außerdem möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Christoph Thorns, für die vielen hilfreichen Ratschläge und eine gute fachliche Betreuung während des gesamten Arbeitsprozesses bedanken. Auch den Mitarbeitern des Institutes für Pathologie der Universität zu Lübeck, allen voran dem Personal des Labors, fühle ich mich zu großem Dank für die geleistete Unterstützung und Hilfe verpflichtet. Ohne die produktive Arbeitsatmosphäre, zu der alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter ihren individuellen Beitrag geleistet haben, wäre diese Arbeit in der jetzt vorliegenden Form nicht möglich gewesen.



Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name : Huckhagel
Vorname : Torge
Geburtsdatum : 27.03.1986
Geburtsort : Husum

Schulische Ausbildung:

2005 Abitur nach dem Besuch des Hermann-Tast-Gymnasiums in Husum

Medizinische Laufbahn:

2005 – 2011 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2006-2011 Tutor/Lehrtätigkeit in den Fächern : Anatomie, Neuroanatomie, Histologie,
Innere Medizin, klinische Umweltmedizin
2007 1. Staatsexamen (Gesamtnote „sehr gut“)
2008/2009 Experimentelle Arbeiten im Rahmen der Dissertation
2010/2011 Praktisches Jahr mit Auslandsaufenthalt in der Schweiz (Neurochirurgie)
2011 2. Staatsexamen (Gesamtnote „sehr gut“)
2012 Assistenzarzt (Neurochirurgie) Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf

Publikation

Gollub W, Stassek B, Huckhagel T, Bernd HW, Krokowski M, Merz H, Feller AC, Thorns C (2009): BCL6-translocations affect the phenotype of follicular lymphomas only in the absence of t(14;18) IgH/BCL2. Anticancer Res.; 29(11):4649-55.