

Aus dem Institut für Pathologie
(Direktor: Prof. Dr. med. C. Röcken)
Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister
(Leiter: Prof. Dr. med. W. Klapper)
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**ZUSAMMENSETZUNG DES BEGLEITINFILTRATS UND
KOEXPRESSION VON B-ZELL-TRANSKRIPTIONSFAKTOREN IN
FOLLIKULÄREN LYMPHOMEN**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

KAROLINE KOCH

aus Marburg

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Klapper

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Weichenthal

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 06.11.2013

gez.:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhalt

Abkürzungen	III
1 Einleitung	1
1.1 Follikuläre Lymphome	1
1.2 FoxP3	3
1.3 PD-1	4
1.4 Mum1/Irf4	5
1.5 Fragestellung und Ziele	6
2 Material und Methoden	7
2.1 Gewebeproben	7
2.2 Immunhistochemische Färbung.....	9
2.3 Fluoreszenzmehrfachfärbung	11
2.4 Kombinierte Färbung mit <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	11
2.5 Manuelle Auswertung der konventionellen immunhistochemischen Färbungen	15
2.6 Bildanalyse der konventionellen immunhistochemischen Färbungen.....	15
2.7 Bildanalyse der Fluoreszenzmehrfachfärbungen.....	17
2.8 Statistische Analyse	18
3 Ergebnisse	21
3.1 Verteilung FoxP3 und PD-1 positiver Zellen in reaktivem und malignem lymphatischem Gewebe	21
3.2 Korrelation FoxP3 und PD-1 positiver Zellen mit histopathologischen Merkmalen des follikulären Lymphoms	22
3.3 Korrelation FoxP3 und PD-1 positiver Zellen mit der Ausbreitung der Erkrankung	23
3.4 FoxP3 und PD-1 positive Zellen in Bezug auf den klinischen Risiko-Score FLIPI.....	25
3.5 Klinischer Verlauf follikulärer Lymphome in Bezug auf FoxP3 und PD-1 positive Zellen.....	26
3.6 Mum1-Expression in follikulären Lymphomen	27

3.7	Charakterisierung der Differenzierung Mum1 positiver Zellen in folliculären Lymphomen.....	27
3.8	Proliferationsrate von Mum1 positiven Zellen in reaktiven Keimzentren und malignen Follikeln.....	30
3.9	Korrelation der Mum1-Expression mit histologischen und klinischen Merkmalen des folliculären Lymphoms	32
3.10	Mum1-Expression in Bezug auf den klinischen Verlauf folliculärer Lymphome	33
4	Diskussion.....	35
5	Zusammenfassung.....	43
6	Literaturverzeichnis	45
	Danksagung	55
	Lebenslauf.....	56

Abkürzungen

Bcl2	B-cell lymphoma 2
Bcl6	B-cell lymphoma 6
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FLIPI	Follicular lymphoma interantional prognostic index
FoxP3	Forkhead Box Protein 3
GLSG	German low grade lymphoma study group
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HR	High risk
IgG	Immunglobulin G
IPEX	Immune dysregulation, polyendocrinopathy, entropathy and x-linked heritage-Syndrom
IR	Intermediate risk
IRF4	Interferon regulatory factor 4
LDH	Laktatdehydrogenase
LR	Low risk
MCP	Mitoxantron, Chlorambucil und Prednisolon
mg	Milligramm
Mum1	Multiple Myeloma 1
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	Posphat-gepufferte Kochsalzlösung
PD-1	Programmed Death 1
R-CHOP	Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon
TMA	Tissue Micro Array

T _{FH}	follikuläre T-Helfer-Zellen
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
ULN	upper limit of normal
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Follikuläre Lymphome

Das follikuläre Lymphom wird in der WHO-Klassifikation der Tumoren des hämatopoietischen Systems der Gruppe der reifzelligen B-Zell-Neoplasien zugeordnet und ist definiert als ein Tumor der Keimzentrums-B-Zellen, bestehend aus Centrocyten und Centroblasten (Swerdlow et al. 2008).

Anhand der Anzahl von Centroblasten pro mikroskopischem Gesichtsfeld in der 400-fachen Vergrößerung im Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Präparat kann das follikuläre Lymphom histologisch in drei Grade unterteilt werden: Grad 1 mit weniger als fünf Centroblasten pro Gesichtsfeld, Grad 2 mit 6-15 Centroblasten pro Gesichtsfeld und Grad drei mit mehr als 15 Centroblasten pro Gesichtsfeld. Grad 3 wird weiter unterteilt in Grad 3A, bei dem noch Centrocyten untermischt sind und Grad 3B mit Blastenrasen ohne Untermischung von Centrocyten (Swerdlow 2008; Mann und Berard 1983).

Die typische genetische Veränderung des follikulären Lymphoms ist die Translokation $t(14q32;18q21)$ (Yunis et al. 1982), hierbei wird das BCL2 Gen von Chromosom 18q21 in den Bereich der J-Region des Immunglobulin-Schwerkettengens auf Chromosom 14q32 Gens verlagert (Tsujiimoto et al. 1984; Tsujiimoto et al. 1985) und dadurch überexprimiert (Tsujiimoto et al. 1985). Die Überexpression von Bcl2 in den Follikeln des follikulären Lymphoms lässt sich auch immunhistochemisch darstellen und unterscheidet die malignen Follikel von reaktiven Keimzentren (Pezzella et al. 1990). Zusätzlich zu der Translokation $t(14;18)$ lassen sich in 89 % der follikulären Lymphome weitere genetische Abberationen nachweisen (Schwaenen et al. 2009).

Klinisch eingeteilt werden kann das follikuläre Lymphom nach der ursprünglich für Hodgkin-Lymphome entworfenen Ann-Arbor Klassifikation (Carbone et al. 1971) entsprechend der Krankheitsausbreitung in vier Stadien, wobei Stadium 1 und 2 auf eine Seite des Zwerchfells begrenzt sind und als frühe oder lokalisierte Erkrankung betrachtet werden, während Stadium 3 und 4 als fortgeschrittene Erkrankung gelten. Der internationale Prognoseindex für follikuläre Lymphome (follicular lymphoma international prognostic index, FLIPI; Solal-Céligny et al. 2004) teilt die Patienten

unter Berücksichtigung klinischer Faktoren in drei Gruppen mit verschiedenen Risikoprofilen ein (Solal-Céligny et al. 2004) und ist zurzeit das wichtigste Werkzeug, um Aussagen über den Krankheitsverlauf von follikulären Lymphomen zu treffen.

Dieser klinische Verlauf der Erkrankung ist heterogen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project 1997; Swerdlow et al. 2008). Die Erkrankung ist häufig schon bei Diagnose im Körper weit ausgebreitet. Nur ungefähr ein Drittel der Patienten wird in den lokalisierten Stadien I und II diagnostiziert (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project 1997). Die meisten Patienten zeigen einen langsamen Verlauf mit langsam fortschreitendem Lymphknoten- und Organbefall, multiplen Rezidiven, einer abnehmenden Therapiesensibilität und abnehmender Dauer der Remissionen (Johnson et al. 1995). Einige Patienten zeigen jedoch einen aggressiveren Verlauf und versterben nur wenige Jahre nach Diagnosestellung (Horning und Rosenberg 1984). Innerhalb von 15 Jahren zeigen über 30% der Patienten eine histologische Transformation in ein aggressives B-Zell-Lymphom, was mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf und einer deutlich schlechteren Prognose vergesellschaftet ist (Montoto et al. 2007).

Die Therapieoptionen sind hinsichtlich ihrer Aggressivität und Toxizität weit gestreut und beinhalten unter anderem Überwachung ohne Therapie bei asymptomatischen Patienten (sogenanntes "watch-and-wait"), Radiotherapie und kombinierte Immunchemotherapie (van Oers und Kersten 2011). In niedrigen Stadien führt Radiotherapie zu einer Heilungsrate von bis zu 50% (Campbell et al. 2010; Pugh et al. 2010). In höheren Stadien gilt Immunchemotherapie mit dem monoklonalen anti-CD20 Antikörper Rituximab als Goldstandard, wobei es kein weltweit standardisiertes Chemotherapieprotokoll gibt. Obwohl die Einführung von Rituximab in die Therapie von follikulären Lymphomen zu einer deutlichen Verbesserung des klinischen Verlaufs geführt hat (Hiddemann et al. 2005; van Oers und Kersten 2011), gelten follikuläre Lymphome in fortgeschrittenen Stadien nach wie vor als nicht heilbar.

Morphologisch imitieren follikuläre Lymphome reaktive Keimzentren. In physiologischen Keimzentren reifen naive B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen oder Gedächtnis-B-Zellen. Dieser Prozess wird einerseits reguliert durch die Expression verschiedener B-Zell-Transkriptionsfaktoren (Cattoretti et al. 2006), andererseits durch das aus T-Zellen und follikulären dendritischen Zellen bestehende zelluläre Umfeld (Microenvironment, Allen et al. 2007b).

Die Frage, ob die neoplastischen B-Zellen in folliculären Lymphomen durch die gleichen Faktoren reguliert werden, wie reaktive Keimzentren und ob diese Faktoren somit den Verlauf der Erkrankung beeinflussen können, ist daher von großem Interesse. Die Untersuchung von Genexpressionsprofilen zeigte zwei prognostisch relevante Profile, die aus Genen des reaktiven Begleitinfiltrats bestanden. Das mit einer besseren Prognose assoziierte Profil war dominiert von Genen, die vorwiegend von T-Zell Subpopulationen exprimiert werden, wobei der Gesamt-T-Zell-Gehalt hier nicht widerspiegelt wird. Das mit einer schlechteren Prognose assoziierte Profil zeigte vor allem von folliculären dendritischen Zellen exprimierte Gene (Dave et al. 2004). Versuche, immunhistochemische Marker zur Verlaufsvorhersage von folliculären Lymphomen zu etablieren, führten bislang zu kontroversen Ergebnissen. Als besonders erfolgversprechend erwiesen sich in bisherigen Studien die Marker FoxP3 (als Marker für regulatorische T-Zellen) und PD-1 (als Marker für folliculäre T-Helfer-Zellen) sowie der B-Zell-Transkriptionsfaktor Mum1/Irf4 (als Marker für eine plasmazytische Differenzierung beziehungsweise einer Differenzierung entsprechend eines Keimzentrumsaustritts).

1.2 FoxP3

FoxP3 ist ein Transkriptionsregulator, der auf dem X-Chromosom codiert ist und in dem Scurfy Mausstamm eine Mutation aufweist, was zu zahlreichen Autoimmunreaktionen bei männlichen Mäusen führt (Brunkow et al. 2001). Männer mit Defekten im FOXP3-Gen erkranken am sogenannten „immune dysregulation, polyendocrinopathy entropathy and x-linked heritage-Syndrom“ (IPEX, Bennett et al. 2001).

Bei Mäusen ist die Expression von FoxP3 beschränkt auf CD4+CD25+ T-Zellen mit regulatorischer Aktivität (Fontenot et al. 2003; Khattri et al. 2003). CD4+CD25+ T-Zellen von Scurfy Mäusen, die aufgrund der Mutation nur ein verkürztes FoxP3 Protein exprimieren können, zeigen keine regulatorische Aktivität (Khattri et al. 2003) und die Deletion von FOXP3 bei gesunden Mäusen führt zu einer lymphoproliferativen Autoimmunerkrankung (Fontenot et al. 2003). Die Transduktion von FOXP3 führt zur Entwicklung von regulatorischer Aktivität bei T-Zellen (Fontenot et al. 2003), FoxP3 kann jedoch bei Mäusen nicht durch T-Zell-Rezeptor-Aktivierung induziert werden (Khattri et al. 2003). Eine Subpopulation FoxP3 positiver T-Zellen

bei Mäusen wird innerhalb von Keimzentren gefunden und exprimiert zusätzlich Marker folliculärer T-Helferzellen. Diese folliculären regulatorischen T-Zellen scheinen an der Kontrolle der Keimzentrumsreaktion beteiligt zu sein (Wollenberg et al. 2011).

Bei Menschen korreliert die Expression von FoxP3 ebenfalls mit regulatorischer Aktivität von T-Zellen im peripheren Blut (Walker et al. 2003), sodass die Expression von FoxP3 als immunhistochemischer Marker für regulatorische T-Zellen (T_{reg}) genutzt wird.

Die Infiltration von FoxP3 positiven Zellen in verschiedenen Typen solider Tumoren und ihr Einfluss auf den klinischen Verlauf wurden in mehreren Studien untersucht und unterscheiden sich je nach Entität (Beyer und Schultze 2006). FoxP3-Expression in Tumorzellen von T-Zell-Lymphomen kommt nur selten vor und wurde in wenigen peripheren T-Zell-Lymphomen und großzellig-anaplastischen T-Zell-Lymphomen beschrieben (Bonzheim et al. 2008). Die Rolle von FoxP3 positiven Zellen im Begleitinfiltrat von B-Zell-Neoplasien wurde vor allem in folliculären Lymphomen untersucht. Hier fanden einige Gruppen einen positiven Effekt auf den klinischen Verlauf von folliculären Lymphomen durch einen hohen Anteil oder bestimmte Infiltrationsmuster FoxP3 positiver Zellen (Alvaro et al. 2006; Carreras et al. 2006; Glas et al. 2007; Farinha et al. 2010; Lee et al. 2006; Tzankov et al. 2008).

1.3 PD-1

Erstmals nachgewiesen wurde die Expression von PD-1 mRNA in zwei lymphoiden Zelllinien, bei denen ein programmierter Zelltod induziert wurde (Ishida et al. 1992). PD-1 ist ein transmembranäres Protein, das zur Immunglobulin-Familie gehört (Ishida et al. 1992). Die Expression des PD-1 Proteins wurde in aktivierten murinen T- und B-Zellen (Agata et al. 1996) sowie in aktivierten humanen T-Zellen beschrieben (Vibhakar et al. 1997). Zwei Liganden für PD-1 wurden identifiziert: PD-L1 und PD-L2, die von aktivierten Monozyten, dendritischen Zellen und in parenchymatösen Organen exprimiert werden. Die Bindung der Liganden an PD-1 führt zur Hemmung der Proliferation und der Zytokinproduktion von T-Zellen (Freeman et al. 2000; Latchman et al. 2001).

In lymphatischem Gewebe lässt PD-1 sich immunhistochemisch nachweisen in T-Zellen innerhalb des Keimzentrums, während T-Zellen außerhalb von Keimzentren

größtenteils PD-1 negativ sind (Dorfman et al. 2006), sodass die Expression von PD1 als Marker für T-Zellen des Keimzentrums (follikuläre T-Helferzellen, T_{FH}) genutzt werden kann.

Hinsichtlich hämatologischer Neoplasien exprimieren die Tumorzellen von angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphomen PD-1. Weiterhin exprimieren die T-Zellen, die Rosetten um die Tumorzellen von lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphomen bilden in einem großen Teil der Fälle PD-1 (Dorfman et al. 2006).

In follikulären Lymphomen sind PD-1 positive Zellen in variablem Ausmaß als Teil des nicht-neoplastischen Begleitinfiltrats vorhanden. Der Gehalt PD-1-positiver Zellen innerhalb des Lymphomgewebes wurde sowohl mit einer besseren Prognose (Carreras et al. 2009; Wahlin et al. 2010) als auch mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Richendollar et al. 2011).

1.4 Mum1/Irf4

Das Gen IRF4 codiert den Transkriptionsfaktor Irf4, der zur Familie der Interferon-regulierten Faktoren gehört und spezifisch in lymphoiden Zellen exprimiert wird (Matsuyama et al. 1995). Im Rahmen der B-Zell-Differenzierung ist dieser notwendig für die Differenzierung zu Plasmazellen (Klein et al. 2006). Irf4 wird exprimiert in Mantelzonen- und Marginalzonen-B-Zellen und ist negativ in den meisten Keimzentrums-B-Zellen, die den Transkriptionsfaktor Bcl6 exprimieren. Der Antikörper Mum1p erkennt ein fixationsresistentes Epitop des Irf4-Proteins (Mum1), dass in einer kleinen Gruppe von Keimzentrumszellen, hauptsächlich in der hellen Zone und in Plasmazellen exprimiert wird (Falini et al. 2000; Cattoretti et al. 2006). Diese Zellen sind negativ für den Keimzentrumstranskriptionsfaktor Bcl6 und den Proliferationsmarker Ki67 (Falini et al. 2000).

In multiplen Myelomen führt die Translokation t(6;14) zu einer Juxtaposition des IRF4-Gens und des Immunglobulinschwerkettengens, hierdurch kommt es zu einer Überexpression von Mum1/Irf4 (Iida et al. 1997; Yoshida et al. 1999). In diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen kann eine unphysiologische Koexpression von Mum1/Irf4 und Bcl6 in 45% der Fälle beobachtet werden (Cattoretti et al. 2006).

In follikulären Lymphomen wird Mum1 in 37% der Fälle in mehr als 30% der Zellkerne exprimiert (Naresh 2007), was als beginnende plasmazytische

Differenzierung betrachtet werden könnte. Diese Gruppe von folliculären Lymphomen ist häufig CD10 negativ, negativ für die Translokation t(14;18) und zeigt häufiger histologisch Grad 3A oder 3B (Naresh 2007; Karube et al. 2007).

1.5 Fragestellung und Ziele

Folliculäre Lymphome sind die zweithäufigsten Lymphome in der westlichen Welt, mit bisher nur schwer vorhersagbarem klinischen Verlauf. Da folliculäre Lymphome morphologisch Keimzentren imitieren, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Regulationsfaktoren der physiologischen Keimzentrumsreaktion auf den Verlauf des folliculären Lymphoms untersucht.

Die Ziele dieser Arbeit waren:

1. Die Expression der T-Zell-Antigene FoxP3 und PD-1 und dadurch den Gehalt an T_{reg} und T_{FH} im Begleitinfiltrat des folliculären Lymphoms zu quantifizieren mit dem Verlauf der Erkrankung in folliculären Lymphomen zu korrelieren,
2. Mum1/Irf4-exprimierende Zellen als potenziell plasmazytisch differenzierte Zellen in reaktiven Keimzentren und folliculären Lymphomen näher zu charakterisieren und
3. die Expression des B-Zell-Transkriptionsfaktors Mum1/Irf4 in den Lymphomzellen des folliculären Lymphoms und dessen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung in folliculären Lymphomen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Gewebeproben

Alle Untersuchungen wurden an Lymphomproben von Patienten durchgeführt, die in Studien der deutschen Studiengruppe für niedrig maligne Lymphome (German low grade lymphoma study group, GLSG) behandelt wurden. Die Patienten haben mit der Einwilligung in die Behandlungsstudie auch der hier durchgeführten Begleitforschung zugestimmt. Innerhalb der Studien GLSG 1996 (Nickenig et al. 2006) und GLSG 2000 (Hiddemann et al. 2005) für fortgeschrittene folliculäre Lymphome wurden die Patienten mit den Chemotherapieschemata MCP (Melphalan, Chlorambucil, Prednisolon), CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon) und R-CHOP (CHOP kombiniert mit dem monoklonalen anti-CD20 Antikörper Rituximab) behandelt. Diese Patienten zeigten ein folliculäres Lymphom im Ann-Arbor-Stadium III oder IV mit einer histologisch bestätigten Diagnose und Notwendigkeit einer Therapie, definiert als das Vorhandensein von B-Symptomatik, hämatopoietischer Insuffizienz, schnellem Fortschreiten der Erkrankung oder der Ausbildung eines Tumor-Bulks (Hiddemann et al 2005; Nickenig et al. 2006).

Weiterhin wurden Gewebeproben von Patienten mit folliculärem Lymphom in lokalisierten Stadien untersucht. Diese Patienten hatten ein Ann-Arbor Stadium I bis IIIA und wurden im Rahmen einer prospektiven, randomisierten Studie mit verschiedenen Radiotherapieschemata behandelt: extended field (n=68), involved field (n=4), totally lymphoid (n=39), für 14 Patienten war keine Dokumentation vorhanden. Da diese Studie noch nicht entblindet ist, war für die Patienten mit lokalisierten Stadien keine klinische Korrelation möglich.

Die Marker FoxP3 und PD1 wurden an Lymphomproben von insgesamt 264 Patienten untersucht. 139 Patienten wurden in der Studien GLSG 1996 (137 Patienten) und GLSG 2000 (2 Patienten) für folliculäre Lymphome in fortgeschrittenen Stadien behandelt. 125 Patienten wurden in der Studie für lokalisierte folliculäre Lymphome behandelt. Die klinischen Daten der Patienten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Für alle Patienten mit fortgeschrittenem follikulären Lymphom wurden bereits in einer vorangegangenen Studie die Parameter Gesamt-T-Zell Gehalt, Tumorsklerose und histologischer Grad erhoben (Klapper et al. 2007).

Für die Untersuchung der Mum1 Expression wurden Tissue Micro Arrays (TMAs) mit Lymphomproben von 211 Patienten untersucht. Von diesen Patienten wurden 47 in der Studie GLSG 1996 und 164 in der Studie GLSG 2000 behandelt. Die klinischen Daten der Patienten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Die Koexpression des Transkriptionsfaktors Mum1/Irf4 mit Ki67 und Bcl6 wurde an einem TMA mit Proben von insgesamt 22 Patienten mit follikulären Lymphomen untersucht.

Reaktiv vergrößerte Tonsillen wurden anonymisiert untersucht, um Daten für Normalgewebe zu gewinnen.

Variable	Wert	Anzahl	%
Alter	> 60 Jahre	75	28
Geschlecht	männlich	122	46
Ann-Arbor-Stadium	1	78	30
	2	28	11
	3	61	23
	4	93	36
Lymphknoten-Regionen	> 4	106	41
ECOG	> 1	7	3
LDH	> ULN	61	26
HB	< 120 g/l	28	12
FLIPI	LR	92	41
	IR	71	32
	HR	62	28

Tabelle 1: Klinische Charakteristika der Patienten, die auf FoxP3/ PD-1-Expression untersucht wurden (ECOG= Eastern cooperative oncology group, LDH= Laktatdehydrogenase, ULN= upper limit of normal, HB= Hämoglobin, FLIPI= Follicular lymphoma international prognostic index, LR= low risk, IR= intermediate risk, HR= high risk).

Variable	Wert	Anzahl	%
Alter	> 60 Jahre	50	30
Geschlecht	männlich	79	47
Stadium	3	55	34
	4	108	66
Lymphknoten-Regionen	> 4	110	70
ECOG	> 1	15	9
LDH	erhöht	41	24
Hb	> 120 g/l	39	24
FLIPI	LR	19	12
	IR	70	45
	HR	67	43

Tabelle 2: Klinische Charakteristika der Patienten, die auf Mum1/Irf4-Expression untersucht wurden (ECOG= Eastern cooperative oncology group, LDH= Laktatdehydrogenase, HB= Hämoglobin, FLIPI= Follicular lymphoma international prognostic index, LR= low risk, IR= intermediate risk, HR= high risk).

2.2 Immunhistochemische Färbung

Zur Untersuchung der Expression einzelner Marker wurden konventionelle immunhistochemische Färbungen an Ganzschnitten und TMAs durchgeführt. Die verwendeten Antikörper, Chemikalien, Lösungen und Geräte sind in Tabelle 3, 4 und 5 zusammengefasst.

Immunhistochemische Färbungen können manuell oder automatisiert durchgeführt werden. Für beide Methoden wurden zunächst ca. 5 µm dicke Schnittpräparate angefertigt.

Die Färbungen mit den Antikörpern PD-1 und FoxP3 wurden manuell durchgeführt. Dafür wurden die Schnittpräparate für 10 Minuten in Xylol gestellt, um das Paraffin aus dem Gewebe zu entfernen. Anschließend wurde das Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Da endogene Peroxidasen zu einer ausgedehnten Hintergrundfärbung führen können, wurden diese mit Hilfe von

10%iger Wasserstoffperoxidlösung blockiert. Antigene weisen in formalinfixiertem Gewebe häufig Konformationsveränderungen auf, die die Detektion mit Antikörpern ohne Vorbehandlung unmöglich machen. Diese Konformationsänderungen können durch Erhitzen bei definierten pH-Werten rückgängig gemacht und die Antigene somit „demaskiert“ werden (Shi et al. 1991; Shi et al. 1993). Zur Antigendemaskierung wurden die Präparate für drei Minuten in einem Dampfdrucktopf gekocht. Für die PD-1 Färbung wurde ein Citrat-basierter Puffer mit einem pH-Wert von 6 verwendet, die Schnitte für die FoxP3 Färbung wurden in einem EDTA-basierten Puffer bei pH 8 vorbehandelt. Die Primärantikörper wurden im Verhältnis 1:50 (FoxP3) beziehungsweise 1:25 (PD-1) in 1%iger boviner Serum Albumin Lösung verdünnt. Auf jeden Schnitt wurden 100 µl der Antikörperlösung aufgetropft und bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Die Markierung der Primärantikörper erfolgte mit dem ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit. Zunächst wurde eine Verstärkerlösung für 20 Minuten inkubiert, anschließend ein mit Meerrettich-Peroxidase markierter, gegen IgG der Primärantikörper-Spezies gerichteter Antikörper für 30 Minuten. Als Chromogen wurde Diaminobenzidin verwendet, das bei Kontakt mit der Antikörper-gebundenen Peroxidase einen braunen Farbniederschlag bildet. Die Färbereaktion wurde nach zwei bis fünf Minuten nach optischer Kontrolle der Färbung unterbrochen. Die Kerngegenfärbung erfolgte mit saurem Hämalaun nach Meier. Die Präparate wurden zunächst fünf bis zehn Minuten in der Hämalaun-Lösung gefärbt, anschließend für 20 Minuten in Wasser gebläut. Schließlich wurden die gefärbten Schnittpräparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und maschinell eingedeckelt.

Die Färbung mit dem Antikörper gegen Mum1 wurde maschinell mit einem BondMax Autostainer durchgeführt. Zuerst wurde auch hier das Paraffin in Xylol ausgewaschen und endogene Peroxidasen mit Wasserstoffperoxidlösung blockiert. Die Antigendemaskierung erfolgte mit der Citrat-basierten Lösung ER1. Der Primärantikörper wurde im Verhältnis 1:50 verdünnt und für 20 Minuten inkubiert. Die anschließenden Färbeschritte erfolgten mit Hilfe des Bond Polymer Refine detection Kit. Ein Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Maus IgG) wurde zunächst für 8 Minuten inkubiert, anschließend ein Anti-Kaninchen-Antikörper, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase. Wie auch bei der manuellen Färbung wurde Diaminobenzidin zur Visualisierung und Hämalaun als Kerngegenfärbung verwendet.

2.3 Fluoreszenzmehrfachfärbung

Fluoreszenzmehrfachfärbungen wurden mit zwei an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Sekundärantikörpern durchgeführt, sodass die Koexpression von mehreren Antigenen in einer Zelle gezeigt werden konnte.

Die Fluoreszenzmehrfachfärbungen wurden an 5 µm dicken Schnittpräparaten durchgeführt. Diese wurden zunächst in Xylol deparaffinisiert, hierbei wurden die Ganzschnitte für 10 Minuten und die TMA-Schnitte für eine Stunde im Xylol belassen. Die Antigendemaskierung erfolgte, wie auch bei den konventionellen Färbungen, durch Kochen unter Druck bei pH 6 in einem Citrat-basierten Puffer. Die Ganzschnitte wurden 3 Minuten gekocht, die TMA-Schnitte 4 Minuten. Die Primärantikörper wurden in HAMA ELISA Lösung in folgenden Verhältnissen verdünnt: Mum1 1:50, Bcl6 1:10, Ki67 80:20. Jeweils 100 µl der verdünnten Primärantikörper in den Kombinationen Mum1/Bcl6 und Mum1/Ki67 wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen. Zwei unterschiedliche, jeweils gegen die Spezies der Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper wurden im Verhältnis 1:100 in phosphatgepufferter Kochsalzlösung verdünnt und jeweils 100 µl pro Farbstoff und Schnitt für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die Schnitte wurden wieder in phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen. Um das Signal des Mum1 Antikörpers zu verstärken, wurde hier ein dritter, gegen die Spezies des Sekundärantikörpers gerichteter, fluoreszenzmarkierter Antikörper verwendet. Dieser wurde ebenfalls im Verhältnis 1:100 verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Um die Zellkerne gegenzufärben wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet. Der Farbstoff wurde im Verhältnis 1:5000 verdünnt und für 2 Minuten inkubiert. Zuletzt wurden die Schnitte mit Dako fluorescent mounting medium eingedeckelt.

2.4 Kombinierte Färbung mit *in situ*-Hybridisierung

Um darzustellen, ob Mum1 positive Zellen in folliculären Lymphomen plasmazytisch differenziert sind, wurde eine *in situ*-Hybridisierung der Immunglobulinleichtketten kappa und lambda mit einer konventionellen immunhistochemischen Mum1-Färbung kombiniert.

Sowohl die *in situ*-Hybridisierung als auch die Färbung wurden auf einem Leica Bond Max Färbeautomaten durchgeführt. Die Schnitte wurden bei 72°C deparaffiniert. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten bei 37°C mit Proteinase K angedaut. Die Detektion der Leichtketten erfolgte mit Fluorescein-konjugierten Oligonukleotiden, diese wurden für 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Anfärbung der markierten Leichtketten erfolgte mit Hilfe des Bond polymer Refine detection kit mit Diaminobenzidin als Farbstoff. Als zweiter Schritt erfolgte die immunhistochemische Färbung. Zunächst wurde eine Antigendemaskierung mit einem Citrat-basierten Puffer (Bond epitope retrieval solution 1) durchgeführt. Der Primärantikörper (Maus-anti-Mum1, Dako) wurde im Verhältnis 1:50 verdünnt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Anfärbung der markierten Zellen mit Hilfe des Bond polymer Red refine detection kit und Fast red als Farbstoff.

Als Ergebnis zeigte sich eine nukleäre, rote Anfärbung von Mum1 sowie eine cytoplasmatische, braune Anfärbung der Immunglobulinleichtketten.

Antikörper	Hersteller
Mouse- anti- human- FoxP3	Abcam, Klon 236A/E7
Mouse- anti- human- PD-1	Abcam, Klon NAT
Mouse-anti-human-Mum1	Dako, Klon Mum1p
Rabbit-anti-human-Mum1	Biocare medical, Klon Mum1p
Mouse-anti-human-Ki67	Institut für Pathologie, Sektion Hämatopathologie und Lymphknoten- register, Kiel, selbst hergestellt
Mouse-anti-human-Bcl6	Dako, Klon PG-B6 p
Alexa 488 goat anti rabbit	Invitrogen A-11008
Alexa 488 donkey anti goat	Invitrogen A-11055
Alexa 555 donkey anti mouse	Invitrogen A-31570

Tabelle 3: Antikörper und Hersteller

Chemikalien	Hersteller
Aluminiumkaliumsulfat	Merck Nr. 1.01047
Aqua destillata	DeltaSelect Nr. 23705-12A
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Nr. A-4503
Chloralhydrat	Merck Nr. 1.02425
Citrat	Merck Nr. 1.00244
Diaminobenzidin	DAKO Nr. K3468
EDTA	Merck Nr. 1.08421
Ethanol	Merck Nr. 1.00983
Fluorescence mounting medium	DAKO Nr. S3023
Hämatoxylin	Merck Nr. 1.15938
Salzsäure (HCl, 2 Mol)	Merck Nr. 1.09063
Methanol	Merck Nr. 1.06009
Natriumchlorid (NaCl)	Walter & Co
Natriumjodat (NaIO ₃)	Merck Nr. 1.06525
Natronlauge (NaOH, 2 Mol)	Merck Nr. 1.09136
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) 10x	GIBCO Nr. 70013-016
Pertex [®] Eindeckelmedium	Medite Nr. Per 30000
Trisma-Base	Sigma Nr. T1503
Trisma-Hydrochlorid	Sigma Nr. T3253
Tween 20	Merck Nr. 8.22184
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ , 30%)	Merck Nr. 1.07210
Xylol	Merck Nr. 1.08681

Tabelle 4: Chemikalien und Hersteller

Lösung	Herstellung
1%iges Wasserstoffperoxid	200 ml Methanol, 6 ml H ₂ O ₂ 30%
TBS+ Tween 20	9,0 g TRIS-Base, 68,5 g TRIS-HCl, 87,8 g NaCl, 5,0 ml Tween 20, 10 l aqua dest.
Citratpuffer pH 6	2,1 g Citrat, 1 l aqua dest., auf pH 6 titrieren mit NaOH (2 Mol) und HCl (2 Mol)
EDTA-Puffer pH 8	3,72 g EDTA, 1 l aqua dest., auf pH 8 titrieren mit NaOH (2 Mol) und HCl (2 Mol)
Hämalaun	1 g Hämatoxylin, 1 l aqua dest., 0,2 g Natriumjodat, 50 g Aluminiumkaliumsulfat, 50 g Chloralhydrat, über Nacht stehen lassen, 1 g Citrat
PBS-Puffer	50 ml 10-fach konzentrierte PBS verdünnt mit 450 ml aqua dest.

Tabelle 5: Lösungen und Puffer

Geräte	Hersteller
Axioskop Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen
BondMax Autostainer	Leica Microsystems, Wetzlar
Colorview III Mikroskopkamera	Olympus Soft Imaging Systems, Münster
Dampfdrucktopf	Tefal, Offenbach
Deckgläschen	Menzel- Gläser, Braunschweig
Objekträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Pipetten und -spitzen	Eppendorf, Hamburg
Promounter RCM2000 Coverslipping Machine	Medite, Burgdorf
Rasterokkular	Zeiss, Oberkochen
Spot RT slider Fluoreszenzkamera	Diagnostic Instruments Nr. RT230

Tabelle 6: Geräte und Hersteller

2.5 Manuelle Auswertung der konventionellen immunhistochemischen Färbungen

Alle Schnittpräparate wurden zunächst bei 100-facher Vergrößerung betrachtet, um das Färbeergebnis zu überprüfen und passende folliculäre und interfolliculäre Areale für die Analyse auszuwählen. Ausgewählt wurden Areale die einerseits ein ausreichend starkes Färbeergebnis vorwiesen, sodass auch schwach positive Zellen sicher detektiert werden konnten, andererseits eine gute Fixierung, sodass Zellkerne sicher erkannt und voneinander getrennt werden konnten. In diesen Arealen wurde daraufhin bei 400-facher Vergrößerung der Anteil der positiv gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl ausgezählt. Gezählt wurden jeweils 100 Zellen in drei folliculären und in der FoxP3- und PD-1-Färbung zusätzlich in drei interfolliculären Arealen pro Fall. Für die folgenden statistischen Analysen wurde aus den drei Einzelwerten jeweils ein Mittelwert für den folliculären beziehungsweise den interfolliculären Anteil gebildet. Weiterhin wurde ein perifolliculäres Muster von FoxP3 oder PD-1 positiven Zellen qualitativ registriert. Dieses Muster ist definiert als ein dicht gepackter Ring positiv gefärbter Zellen an der Grenze zwischen folliculärem und interfolliculärem Raum.

2.6 Bildanalyse der konventionellen immunhistochemischen Färbungen

Die für Bildanalyse und Bildverarbeitung verwendete Software ist in Tabelle 7 zusammengefasst.

An 130 Fällen aus der Gruppe der fortgeschrittenen Stadien wurde eine computergestützte Bildanalyse der FoxP3 Färbung durchgeführt. Hierfür wurde das Programm AnalySIS verwendet. Zuerst wurden passende Areale ausgewählt, die sich durch eine ausreichend starke Färbereaktion und eine ausreichende Größe auszeichneten. Von diesen Arealen wurden mit einer Mikroskopkamera Bilder aufgenommen. Auch für die Bildanalyse wurden jeweils drei folliculäre und drei interfolliculäre Areale ausgewählt. Die Auswahl der Areale erfolgte nach Möglichkeit so, dass der Follikel beziehungsweise das interfolliculäre Areal das komplette Bild ausfüllten, sodass die komplette Bildfläche analysiert werden konnte. Falls das nicht möglich war, wurden die betreffenden Regionen nachträglich auf dem Bild markiert. Die Bilder wurden in Graustufenbilder konvertiert und eine Korrektur von Beleuchtungsinhomogenitäten sowie eine Kontrastverstärkung durchgeführt.

An den so bearbeiteten Bildern wurde zunächst die Anzahl der positiven Zellkerne bestimmt. Hierfür wurden ein Grauschwellenwert und ein Pixelgrenzwert festgelegt. Der Grauschwellenwert bestimmt, welche Graustufe ein Partikel mindestens haben muss um als positiv erkannt zu werden. Der Pixelgrenzwert legt fest, wie viele Pixel ein Partikel mindestens haben muss, um als Partikel erkannt zu werden. Der Grauschwellenwert ist abhängig von der Schnittdicke und der Färbeintensität und wurde somit für jedes Bild individuell festgelegt. Der Pixelgrenzwert betrug für alle Bilder 150 Pixel. Alle Partikel im Bild, die den vorgegebenen Werten entsprachen, wurden registriert und als Gesamtzahl ausgegeben.

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl gestaltete sich schwieriger, da direkt aneinander angrenzende Zellkerne mit ähnlichen Grauwerten als ein Partikel wahrgenommen wurden. Die Gesamtzellzahl wurde daher näherungsweise über die Gesamtfläche aller Zellen und die mittlere Zellkerngröße bestimmt. Zur Bestimmung der Gesamtzellfläche wurde zunächst ein Grauschwellenwert festgelegt, der sämtliche Zellkerne abdeckt und die Fläche des so erfassten Areal gemessen. Anschließend wurden einzeln liegende Zellkerne ausgewählt und die mittlere Größe aller ausgewählten Partikel bestimmt (Abb. 1). Die Anzahl der Zellkerne wurde bestimmt, indem die Gesamtfläche durch die mittlere Einzelfläche dividiert wurde. Schließlich wurde der prozentuale Anteil der FoxP3 positiven Zellkerne (= Anzahl positive Zellkerne/ Gesamtkernzahl x 100) errechnet.

Aus den drei folliculären und den drei interfolliculären Werten wurde jeweils ein Mittelwert für die weitere Bearbeitung gebildet.

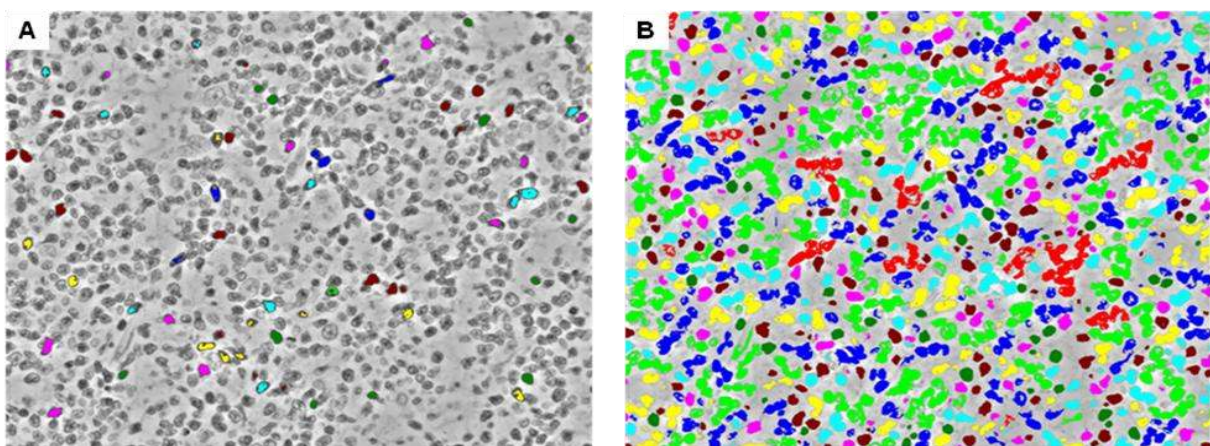


Abb. 1: Computergestützte Bildanalyse der konventionellen immunhistochemischen Färbungen. Bildanalytische Registrierung der positiv angefärbten Zellkerne (A) und der Gesamtfläche der Zellkerne (B).

2.7 Bildanalyse der Fluoreszenzmehrfachfärbungen

Zunächst wurden ausgewählte Areale mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops und einer Fluoreszenzkamera fotografiert. Von jeder Tonsille wurden von drei Follikeln die helle und die dunkle Zone getrennt fotografiert, von jedem Lymphomfall wurden drei Follikel aufgenommen. Jedes Bild wurde in drei Farbkanälen (Alexa 488, Alexa 555, DAPI) aufgenommen. Aus den Bildern wurde mit der Software „VisiView“ der unspezifische Färbegrund gelöscht. Anschließend wurden in Adobe Photoshop die zu analysierenden Regionen ausgeschnitten, vor einen schwarzen Hintergrund gelegt und in Graustufenbilder übersetzt.

Diese Bilder wurden mit Hilfe der Software TissueFACS (TissueGnostics, Wien, Österreich) ausgewertet. Zuerst wurden alle vorhandenen Zellkerne anhand des DAPI-Bildes detektiert (Abb. 2A). Mit Hilfe der so angefertigten Zellkernmaske wurde die Färbintensität der jeweiligen Marker für jeden einzelnen Zellkern berechnet (Abb 2B und C). Die Ergebnisse wurden in Punktwolkendiagrammen ausgegeben, wobei jeder Punkt einen Zellkern darstellt (Abb 2D und E). Jeder Punkt konnte zu dem entsprechenden Zellkern im Bild zurückverfolgt werden. Ein Grenzwert zwischen positiven und negativen Zellen wurde jeweils händisch festgelegt. Der Anteil der jeweils einfach- und doppelpositiven Zellen wurde berechnet. Anschließend wurden die positiven Zellen für beide Marker untersucht auf den Anteil der Zellen, die auch den zweiten Marker exprimieren.

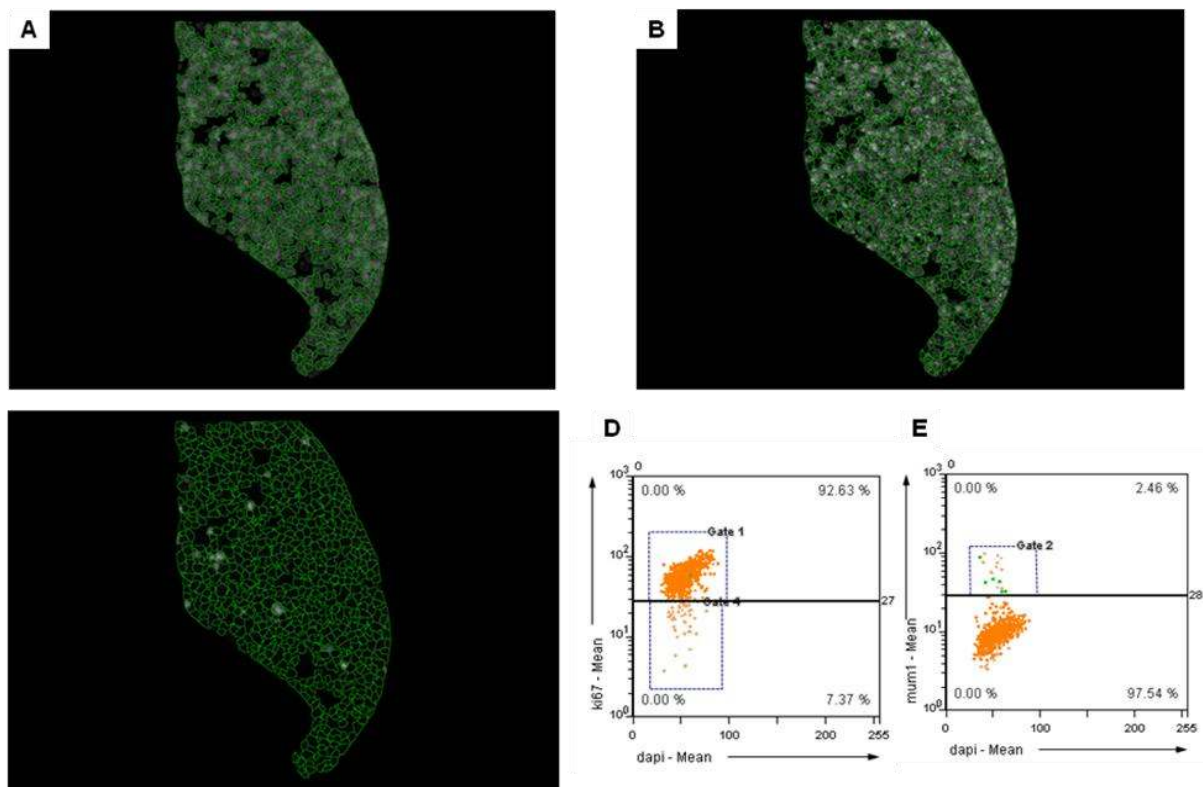


Abb. 2: Computergestützte Bildanalyse der Fluoreszenzmehrfachfärbungen. Segmentierung der Zellkerne anhand der DAPI-Färbung (A), Analyse der Anzahl der positiv angefärbten Zellkerne der jeweiligen Marker in der Kernmaske (B und C), Ausgabe der Ergebnisse in Punktwolkendiagrammen, wobei jeder Punkt eine Zelle darstellt (D und E). X-Achse= Intensität der DAPI-Färbung, y-Achse= Intensität der Ki67- (D) beziehungsweise Mum1-Färbung (E). Gate 1= Ki67 positive Zellen, Gate 2= Mum1 positive Zellen, Gate 4= Ki67 negative Zellen.

2.8 Statistische Analyse

Die Unterschiede der FoxP3 und PD1 Expression in den verschiedenen Stadien wurden mittels ANOVA mit Hilfe von GraphPad Prism berechnet. Zum Vergleich der Mum1 Expression in folliculären Lymphomen und reaktiven Keimzentren, sowie in Ki67-Positiven und -negativen Zellen wurden t-Tests angewendet. Um die Korrelation mit der Zeit zum Therapieversagen und dem Gesamtüberleben zu untersuchen, wurden Kaplan-Meier-Kurven berechnet und multi- und univariate Coxregressionen durchgeführt (in Zusammenarbeit mit Eva Hoster, LMU München). Die Zeit bis zum Therapieversagen ist definiert als das Zeitintervall zwischen Aufnahme in die Studie und Versagen der Induktionstherapie (minimale Remission, stabile Erkrankung oder

Progress), Rezidiv oder Tod des Patienten; das Gesamtüberleben wurde errechnet als der Zeitraum zwischen Aufnahme in die Studie und letztem Nachbeobachtungszeitpunkt oder Tod des Patienten (Hiddemann et al. 2005; Nickenig et al. 2006).

Software	Hersteller
AnalySIS FIVE	Olympus Soft Imaging System, Münster
Adobe Photoshop	Adobe Systems, San Jose, Kalifornien, USA
GraphPad Prism	Graph Pad Software, San Diego, Kalifornien, USA
TissueFACS	TissueGnostics, Wien, Österreich
VisiView	Visitron Systems, Puchheim

Tabelle 7: Software und Hersteller

3 Ergebnisse

3.1 Verteilung FoxP3 und PD-1 positiver Zellen in reaktivem und malignem lymphatischem Gewebe

Die Verteilung von folliculären T-Helfer-Zellen und regulatorischen T-Zellen in Normalgewebe wurde an drei Tonsillen mit dem histologischen Bild einer unspezifischen Tonsillitis untersucht. Innerhalb der reaktiven Keimzentren zeigte sich in der PD-1 Färbung eine ungleichmäßige Verteilung zwischen dunkler und heller Zone mit einem höheren Gehalt an positiven Zellen in der hellen Zone (29,6% positive Zellen gegenüber 5,6% positive Zellen in der dunklen Zone). FoxP3 positive Zellen waren in reaktiv vergrößerten Keimzentren nur sehr spärlich vorhanden (1,6% positive Zellen) und zeigten keine Zonierung. Ein perifollikuläres Verteilungsmuster ließ sich weder für PD1 noch für FoxP3 nachweisen.

Die Verteilung im folliculären Lymphom wurde an Gewebeproben von insgesamt 264 Patienten untersucht. Ergebnisse der Foxp3 Färbung waren für 242 Patienten verfügbar, Ergebnisse der PD-1 Färbung für 163 Patienten, beide Marker waren bei 140 Patienten auswertbar. Repräsentative Beispiele der Färbungen sind in Abbildung 3 dargestellt.

In folliculären Lymphomen waren sowohl FoxP3 als auch PD-1 positive Zellen gleichmäßig in den malignen Follikeln verteilt, Unterschiede im Anteil der positiven Zellen zeigten sich jedoch im Vergleich zum interfollikulären Raum. FoxP3 positive Zellen fanden sich hauptsächlich im interfollikulären Raum (4,3% positive Zellen in den Follikeln gegenüber 11,0% positive Zellen im interfollikulären Raum). PD-1 hingegen wurde bevorzugt von Zellen innerhalb der neoplastischen Follikel exprimiert (12,7% positive Zellen innerhalb der Follikel gegenüber 3,3% positive Zellen im interfollikulären Raum). Ein hoher folliculärer Gehalt an positiven Zellen war für beide Marker assoziiert mit einem hohen interfollikulären Anteil des gleichen Zelltyps ($p < 0,001$ für FoxP3 und $p = 0,001$ für PD-1).

Insgesamt 27 Lymphomfälle zeigten ein perifollikuläres Verteilungsmuster FoxP3 positiver Zellen, ein perifollikuläres Verteilungsmuster PD-1 positiver Zellen konnte in 25 Fällen nachgewiesen werden (Abb. 3). Dieses Muster war für beide Marker assoziiert mit einem hohen Gehalt an positiven Zellen im folliculären Raum ($p = 0,025$

für FoxP3 und $p < 0,001$ für PD-1), eine Korrelation mit einem hohen Gehalt positiver Zellen auch im interfollikulären Raum ließ sich nur für FoxP3 nachweisen ($p < 0,001$).

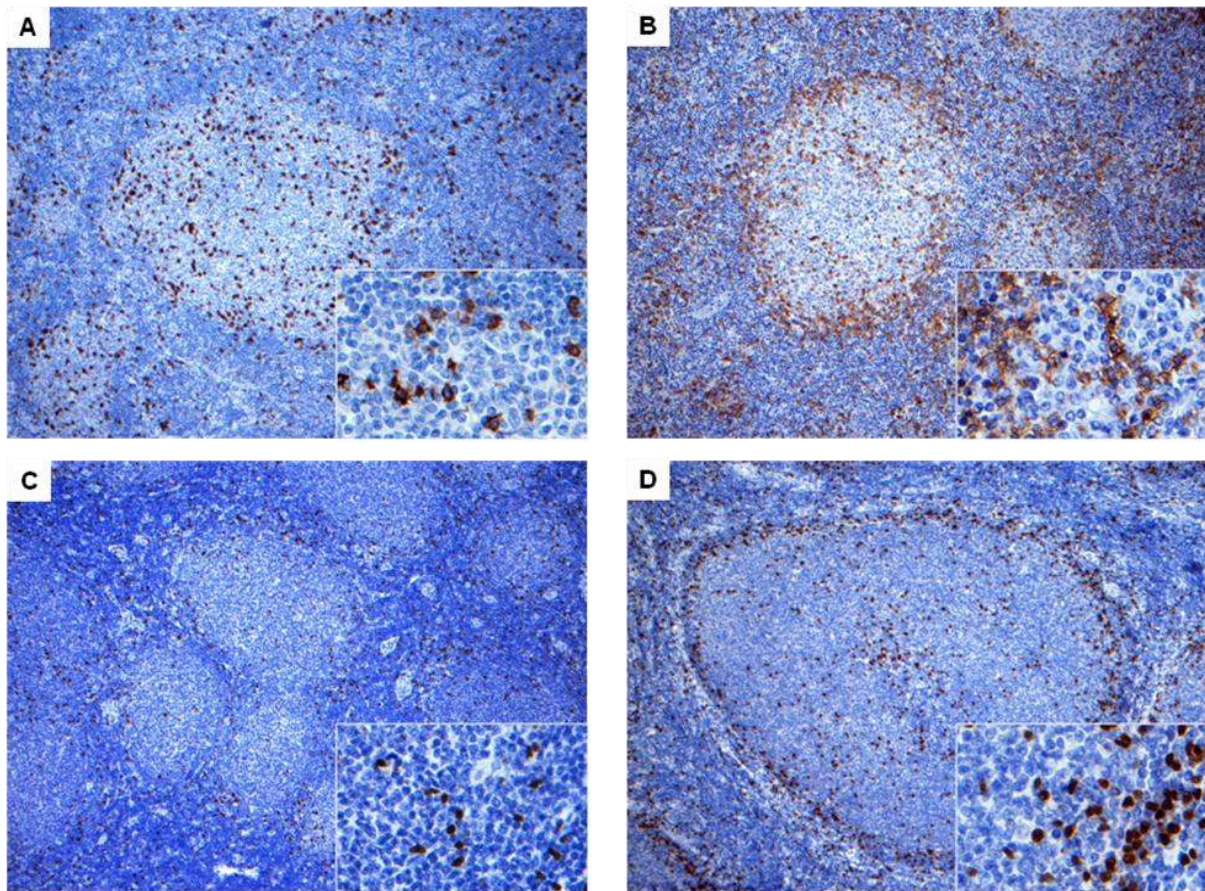


Abb. 3: Verteilungsmuster von PD-1 und FoxP3 positiven Zellen in folliculären Lymphomen. PD-1 positive Zellen ohne perifollikuläres Verteilungsmuster (A) und mit perifollikulärem Verteilungsmuster (B); FoxP3 positive Zellen ohne (C) und mit perifollikulärem Verteilungsmuster (D). Vergrößerung 100-fach, Bildausschnitte 400-fach.

3.2 Korrelation FoxP3 und PD-1 positiver Zellen mit histopathologischen Merkmalen des folliculären Lymphoms

In einer vorangegangenen Studie wurden an dem Studienkollektiv der fortgeschrittenen Stadien bereits das Vorkommen und die prognostische Wertigkeit von verschiedenen histologischen Markern untersucht: Gesamt-T-Zell-Gehalt, histologischer Grad, diffuses Wachstumsmuster und Tumor-Sklerose (Klapper et al.

2007). Mit diesen bereits vorhandenen Werten wurde der Gehalt an regulatorischen T-Zellen und folliculären T-Helfer-Zellen korreliert.

Der Gesamt-T-Zell-Gehalt, ermittelt durch eine immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen das Antigen CD3 korreliert mit dem Gehalt von PD-1 im folliculären und interfolliculären Raum ($p= 0,022$ folliculär und $p= 0,013$ interfolliculär), mit dem Gehalt an FoxP3 positiven Zellen jedoch nur im interfolliculären Raum ($p< 0,001$). Die Tumorsklerose, die sich in der oben genannten Studie als einziger prognostisch relevanter Parameter herausstellte, zeigte keine Korrelation mit dem Gehalt an PD-1 und FoxP3 positiven Zellen, ebenso war keine Korrelation mit einem diffusen Wachstumsmuster oder dem histologischen Grad nachweisbar. Keiner der erhobenen Parameter war assoziiert mit einem perifolliculären Verteilungsmuster von PD-1 oder FoxP3 positiven Zellen.

3.3 Korrelation FoxP3 und PD-1 positiver Zellen mit der Ausbreitung der Erkrankung

Die beiden untersuchten Kohorten unterschieden sich hinsichtlich der Ausbreitung der Erkrankung. Ein Vergleich des FoxP3 und PD-1 Gehalts zwischen den beiden Kohorten zeigte auch in dieser Hinsicht einen signifikanten Unterschied, sowohl im folliculären als auch im interfolliculären Raum. In der Studienkohorte für lokalisierte folliculäre Lymphome war der mittlere Anteil FoxP3 positiver Zellen interfolliculär niedriger im Vergleich zu der Studienkohorte für fortgeschrittene folliculäre Lymphome. Die Medianwerte betragen 8,0% versus 14,8% ($p< 0,0001$). Der PD-1 Gehalt hingegen war in der Studiengruppe für fortgeschrittene Stadien in beiden Kompartimenten signifikant niedriger. Hier betragen die Medianwerte interfolliculär 4,0% und 2,7% ($p< 0,0001$); folliculär 14,3% und 11,7% ($p= 0,0010$). Auch die Ausbildung eines perifolliculären Verteilungsmusters für FoxP3 positive Zellen unterschied sich in beiden Gruppen: Während in der Studiengruppe für niedrige Stadien nur 2% der Fälle ein perifolliculäres Verteilungsmuster zeigten, waren es in der Studiengruppe für fortgeschrittene Stadien 19% ($p< 0,0001$).

Klinisch werden folliculäre Lymphome nach ihrer Ausbreitung unterteilt in Ann-Arbor-Stadien. Da beide Kohorten eine Überschneidung betreffend der folliculären Lymphome im Stadium 3A zeigten, wurde die gesamte Gruppe in Ann-Arbor-Stadien aufgeteilt. Auch hierbei zeigten sich signifikante Unterschiede. In höheren

Erkrankungsstadien zeigte sich ein höherer FoxP3 Gehalt im interfollikulären Raum ($p < 0,0001$, Median in Stadium I, II, III und IV 8,3%, 8,0%, 13,3% und 14,5%, Abb. 4A), während der Gehalt an PD-1 positiven Zellen in höheren Ann-Arbor Stadien geringer war ($p < 0,0001$, Median in Stadium I, II, III und IV 5,3%, 3,7%, 3,3% und 2,7%; Abb. 4B). Der Anteil an FoxP3 positiven Zellen innerhalb der Follikel war unabhängig vom Stadium (Abb. 4C), hingegen zeigte sich auch im follikulären Raum ein geringerer Gehalt PD-1-positiver Zellen in hohen Krankheitsstadien ($p = 0,0146$, Median im Stadium I, II, III und IV 14,0%, 15,2%, 13,0%, 11,2%; Abb. 4D). Ein perifollikuläres Muster FoxP3 positiver Zellen war signifikant häufiger in höheren Stadien zu finden ($p < 0,0001$, Anteil in Stadium I, II, III und IV 3%, 0%, 6%, 24%). Der Anteil von Fällen mit einem perifollikulären Muster PD-1 positiver Zellen unterschied sich nicht signifikant zwischen den Stadien.

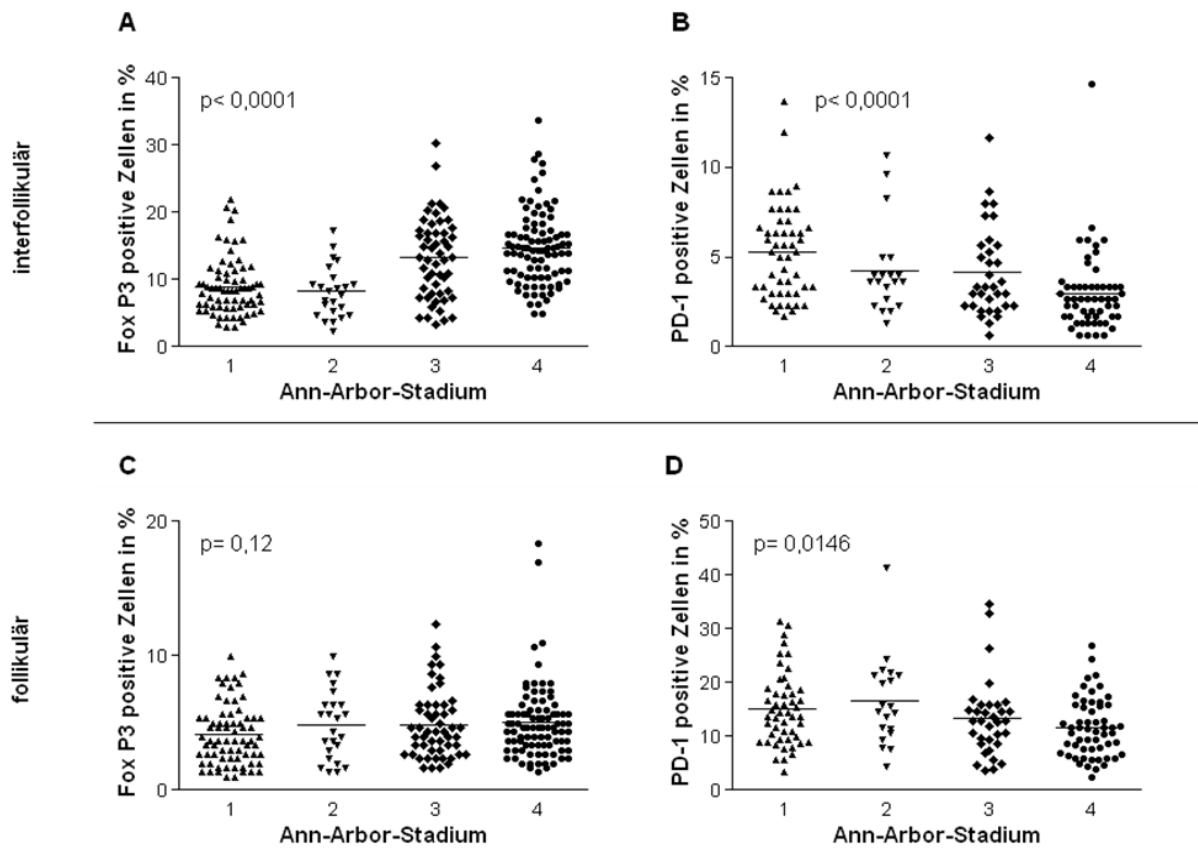


Abb. 4: Anteil FoxP3 und PD-1 positiver Zellen in unterschiedlichen Erkrankungsstadien. Im interfollikulären Raum ist der Anteil FoxP3-positiver Zellen in hohen Krankheitsstadien höher (A), der Anteil PD-1 positiver Zellen hingegen ist geringer (B). Im Follikel zeigte sich in den verschiedenen Stadien kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Anteils FoxP3 positiver Zellen (C), der Anteil PD-1 positiver Zellen ist auch im Follikel in höheren Stadien geringer (D). Dargestellt sind Scatter Plots. Jeder Punkt stellt einen Fall dar, die Querbalken zeigen die Mittelwerte. X-Achse= Ann-Arbor-Stadium, y-Achse= PD-1 beziehungsweise FoxP3 positive Zellen in %.

3.4 FoxP3 und PD-1 positive Zellen in Bezug auf den klinischen Risiko-Score FLIPI

Der internationale Prognoseindex für follikuläre Lymphome (FLIPI) dient der klinischen Risikoabschätzung und ist zurzeit das am besten etablierte Werkzeug zur Prognoseerstellung. Der FLIPI war in beiden Kohorten für insgesamt 225 Patienten verfügbar. Der FLIPI war assoziiert mit dem interfollikulären Anteil sowohl FoxP3 als

auch PD-1 positiver Zellen. FoxP3 positive Zellen im interfollikulären Raum waren zu einem größeren Anteil in Proben von Patienten aus der Hochrisiko-Gruppe enthalten (Median in der Niedrigrisiko-, Intermediärrisiko- und Hochrisiko-Gruppe 9,3%, 14,1% und 14,7%, $p < 0,0001$). Der Anteil PD-1 positiver Zellen nahm hingegen mit steigender Risikogruppe ab (Median in der Niedrigrisiko-, Intermediärrisiko- und Hochrisiko-Gruppe 4,0%, 3,0% und 2,7%, $p < 0,0001$). Auch ein perifollikuläres Muster FoxP3 positiver Zellen war mit der FLIPI-Risikogruppe assoziiert: In der Niedrigrisiko-Gruppe fand sich signifikant seltener ein perifollikuläres Muster (Anteil an positiven Fällen in der Niedrigrisiko-, Intermediärrisiko- und Hochrisikogruppe 5%, 18% und 16%, $p = 0,022$).

3.5 Klinischer Verlauf follikulärer Lymphome in Bezug auf FoxP3 und PD-1 positive Zellen

Die Korrelation mit dem klinischen Verlauf wurde anhand der Zeit bis zum Therapieversagen und des Gesamtüberlebens in der Kohorte mit fortgeschrittenen follikulären Lymphomen untersucht. Die mittlere Zeit bis zum Therapieversagen betrug für die Gruppe 33 Monate bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 108 Monaten. Bei sechs Patienten zeigte sich eine Progression unter Therapie, bei einem Patienten ein stabiler Krankheitsverlauf, bei 76 Patienten ein Rezidiv der Erkrankung, neun Patienten verstarben in Remission. Das Fünfjahresüberleben betrug 80%, das 10-Jahresüberleben 74%.

In einer univariaten Cox-Regression zeigte keine der erhobenen Variablen eine Korrelation mit der Zeit zum Therapieversagen und dem Gesamtüberleben, ein perifollikuläres Muster FoxP3 positiver Zellen zeigte jedoch einen Trend zu einer kürzeren Zeit zum Therapieversagen ($p = 0,089$; Abb. 5A) und einem schlechteren Gesamtüberleben ($p = 0,069$; Abb. 5B). In einer multivariaten Cox-Regression adjustiert für den FLIPI wurden diese Werte signifikant ($p = 0,02$ für die Zeit zum Therapieversagen und $p = 0,025$ für das Gesamtüberleben). Die Hazard ratio betrug 1,80 für die Zeit zum Therapieversagen und 2,29 für das Gesamtüberleben.

Für die Studie für lokalisierte follikuläre Lymphome lagen wegen fehlender Entblindung keine klinischen Daten vor.

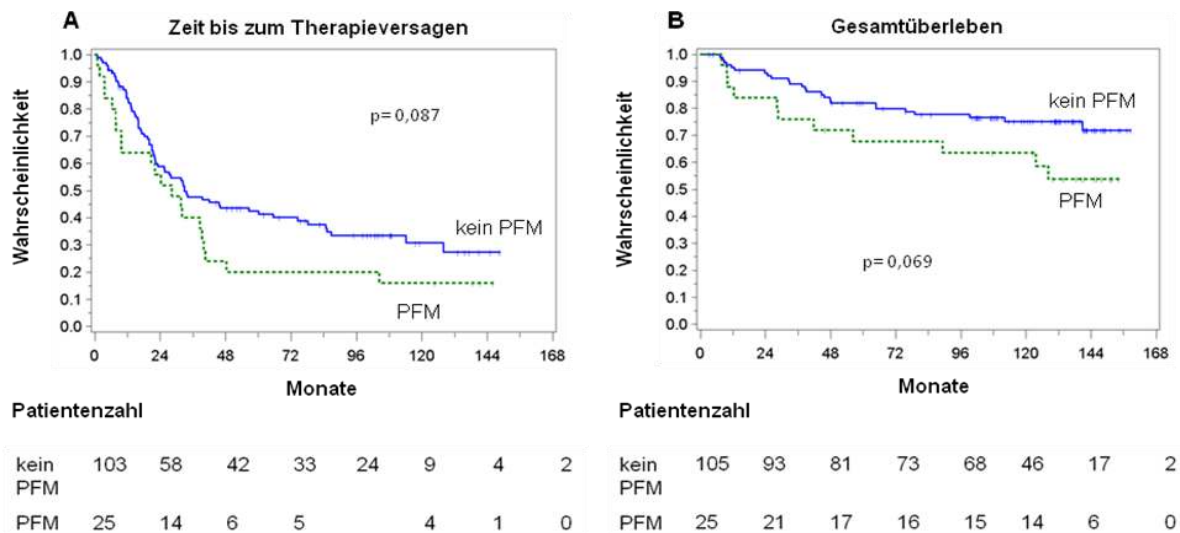


Abb. 5: Zeit bis zum Therapieversagen und Gesamtüberleben abhängig vom Vorhandensein eines perifollikulären Musters. Ein perifollikuläres Muster FoxP3 positiver Zellen zeigt einen Trend zu einer kürzeren Zeit zum Therapieversagen (A) und einem schlechteren Gesamtüberleben (B). Dargestellt sind Kaplan Meier Kurven. PFM= perifollikuläres Muster.

3.6 Mum1-Expression in folliculären Lymphomen

Die Mum1-Expression in folliculären Lymphomen sowie deren Variabilität wurde an TMA's mit Proben von 210 Patienten mittels konventioneller immunhistochemischer Färbung untersucht. Die Färbung war in insgesamt 169 Fällen auswertbar. Der Anteil Mum1 positiver Zellen war sehr variabel mit einem Medianwert für Mum1 positive Zellen innerhalb der malignen Follikel von 4,7% bei einem Minimum von 0,3% und einem Maximum von 61,3%, einem Mittelwert von 7,5% und einer Standardabweichung von 9%. Mehr als 20% Mum1 positive Zellen waren in 13 Fällen (8%) nachweisbar, mehr als 30% in 6 Fällen (4%).

3.7 Charakterisierung der Differenzierung Mum1 positiver Zellen in folliculären Lymphomen

Zur Charakterisierung der Differenzierung der Mum1 positiven Zellen innerhalb des folliculären Lymphoms wurde der Immunphänotyp dieser Zellen mittels Doppelmarkierungen bestimmt. Eine Fluoreszenz-Doppelfärbung mit dem

Transkriptionsfaktor Bcl6 wurde zur Bestimmung eines Keimzentrumsphänotyps der Mum1 positiven Zellen verwendet. Die Färbung war in insgesamt zehn Fällen von 22 auswertbar. Im Mittel waren 66,7% aller Zellen innerhalb des follikulären Lymphoms positiv für Bcl6 (Einzelwerte zwischen 29,5% und 85,2%). Der Mittelwert der Mum1 Expression innerhalb des follikulären Lymphoms lag bei 23,3% (Einzelwerte zwischen 2,3% und 88,7%). Im Mittel zeigten 52,8% der Mum1 positiven Zellen eine Koexpression des Keimzentrumsmarkers Bcl6 (Einzelwerte zwischen 33,9% und 81,8%, Abb. 6A und B).

Um zu überprüfen, ob Mum1 positive Zellen im follikulären Lymphom eine plasmazytische Differenzierung aufweisen, wurden vier Fälle konventionell für Mum1 gefärbt und die Färbung mit einer *in situ*-Hybridisierung für mRNA der Immunglobulin-Leichtketten kappa und lambda kombiniert. Insgesamt 4,8% der Mum1 positiven Zellen zeigten eine Koexpression mit der Leichtkette kappa, 1,7% eine Koexpression mit der Leichtkette lambda (Abb. 6C und D).

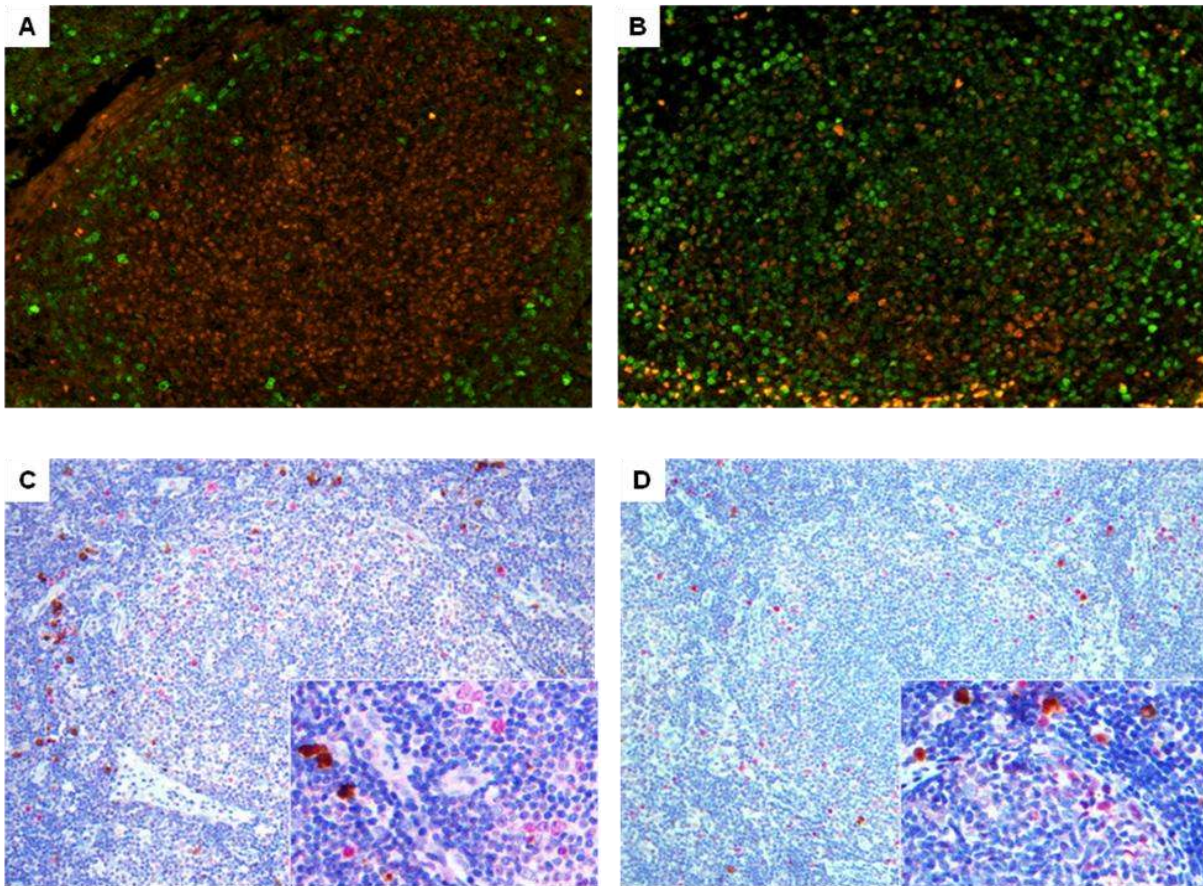


Abb. 6: Phänotyp Mum1 positiver Zellen in folliculären Lymphomen. In folliculären Lymphomen zeigen Mum1 positive Zellen eine variable Koexpression von Bcl6 (A und B, rote Färbung= Bcl6, grüne Färbung= Mum1). In der Mehrzahl der Mum1 positiven Zellen werden die Immunglobulin-Leichtketten kappa (C) und lambda (D) nicht exprimiert (Kombinierte immunhistochemische Färbung/in-situ Hybridisierung, rot= Mum1, braun= kappa/lambda, Vergrößerung 100-fach, Bildausschnitte 400-fach)

3.8 Proliferationsrate von Mum1 positiven Zellen in reaktiven Keimzentren und malignen Follikeln

Ob die deregulierte Expression von Mum1 in Keimzentrumzellen auch zu einer Deregulation von funktionellen Abläufen der B-Zell-Differenzierung führt, wurde anhand von Fluoreszenz-Doppelfärbungen mit dem Proliferationsmarker Ki67 in reaktiven Keimzentren und follikulären Lymphomen untersucht.

Insgesamt neun reaktive Keimzentren aus drei Tonsillen wurden zur Gewinnung von Normalwerten verwendet. Die reaktiven Keimzentren zeigten eine Kompartimentalisierung der Proliferationsaktivität mit einer hochproliferativen dunklen und einer niedrigproliferativen hellen Zone. Mum1 positive Zellen waren in den beiden Zonen unterschiedlich häufig vertreten (Abb. 7A). In der hochproliferativen Zone betrug der Mittelwert 2,7%, in der niedrigproliferativen Zone 12,6% ($p < 0,0001$; Abb. 7B). Mum1 wurde in beiden Zonen signifikant häufiger in nicht proliferierenden Zellen exprimiert (Abb. 7C).

Die Follikel der follikulären Lymphome zeigten keine Kompartimentalisierung (Abb. 8A und B). Die mittlere Proliferationsrate betrug 17,0% mit Mittelwerten der einzelnen Fälle zwischen 5,4% und 28,0% bei einer Standardabweichung von 8,87%. Der Anteil Mum1 positiver Zellen zeigte eine weite Streuung mit einem Mittelwert von 26,3% und Werten zwischen 3,9% und 91,1%. Die Standardabweichung betrug 29,23%. Im Gegensatz zu den reaktiven Follikeln wurde hier Mum1 signifikant häufiger in proliferierenden Zellen exprimiert ($p = 0,0212$; Abb. 8C).

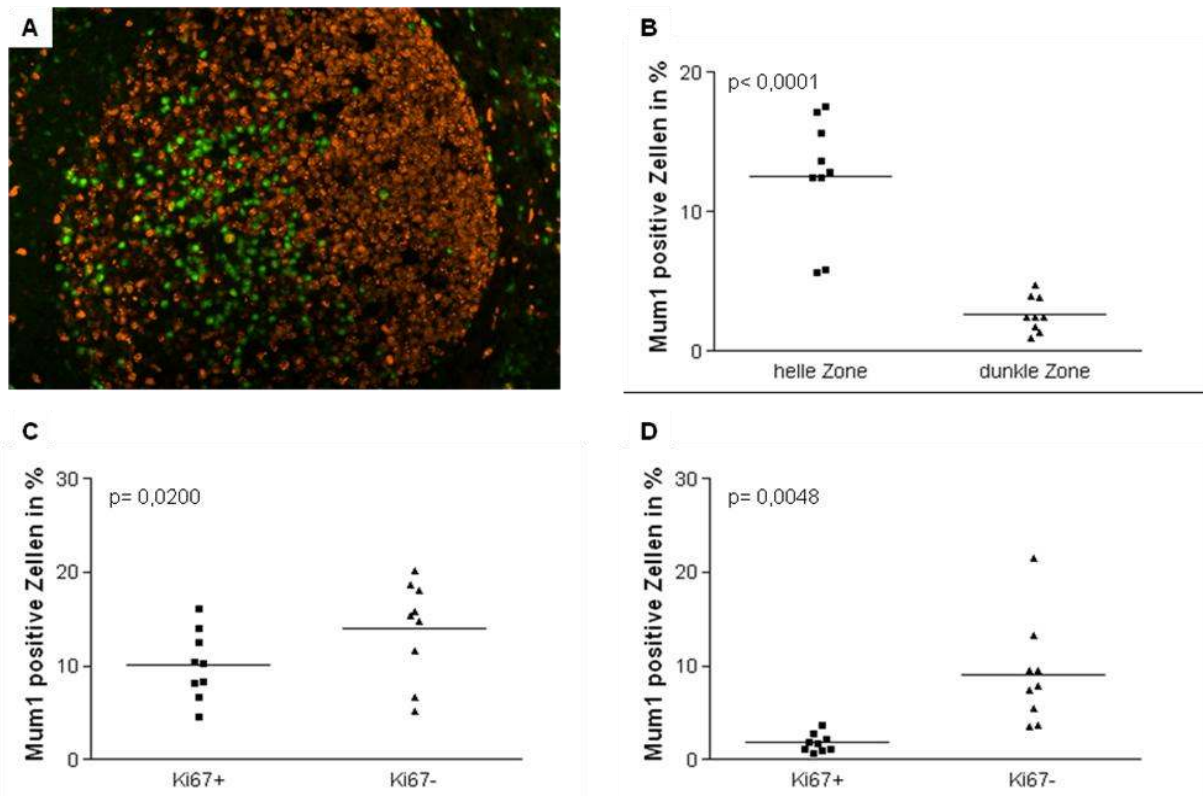


Abb. 7: Mum1-Expression und Proliferation in reaktiven Keimzentren. Reaktive Keimzentren sind geteilt in eine niedrig-proliferierende helle Zone und eine hoch-proliferierende dunkle Zone (A; Fluoreszenzmehrfachfärbung, rote Färbung= Ki67, grüne Färbung= Mum1). Mum1 positive Zellen finden sich signifikant häufiger in der hellen Zone (B). Sowohl in der hellen (C) als auch in der dunklen Zone (D) wird Mum1 häufiger in Ki67 negativen Zellen exprimiert (Scatter plots, jeder Punkt repräsentiert einen Fall, die Querbalken stellen Mittelwerte dar).

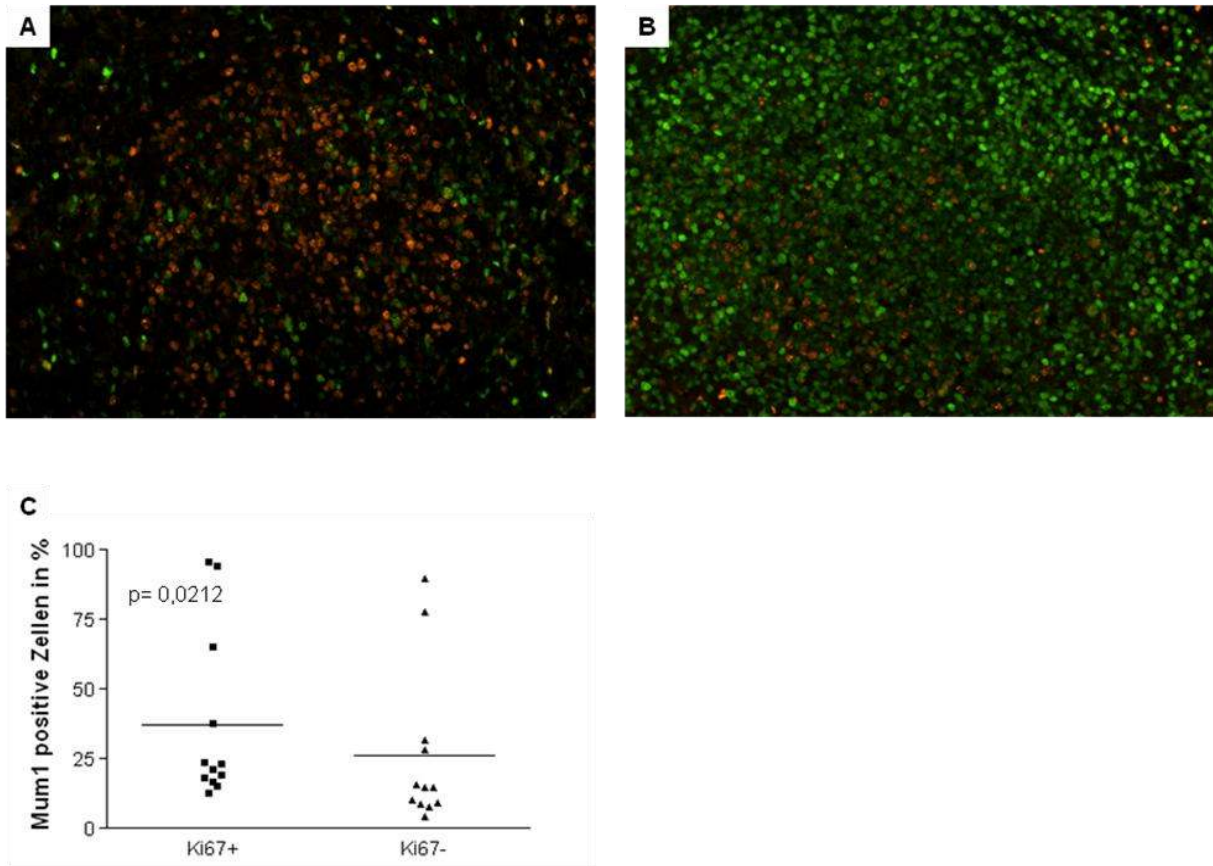


Abb. 8: Mum1 Expression und Proliferation in folliculären Lymphomen. Follikuläre Lymphome zeigen keine Zonierung (A und B; Fluoreszenzmehrfachfärbungen, rote Färbung= Ki67, grüne Färbung= Mum1). Hier wird Mum1 signifikant häufiger in Ki67 positiven Zellen exprimiert (C, Scatter plot, jeder Punkt repräsentiert einen Fall, die Querbalken stellen Mittelwerte dar).

3.9 Korrelation der Mum1-Expression mit histologischen und klinischen Merkmalen des folliculären Lymphoms

Im Rahmen der klinischen Studie wurden für die Patienten der histologische Grad, die Ausbreitung der Erkrankung in Form des Ann-Arbor-Stadiums sowie der FLIPI erhoben.

Informationen zu histologischen Grad waren für insgesamt 136 Patienten vorhanden (Grad 1: 114, Grad 2: 22). Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Mum1 Expression zeigten sich hier nicht (Mittelwert Grad 1: 7,2%, Mittelwert Grad 2: 10,9 %, $p= 0,22$). Auch zwischen den Ann-Arbor-Stadien 3 (55 Patienten) und 4 (108

Patienten) ergab sich kein signifikanter Unterschied (Mittelwert Stadium 3: 7,7%, Mittelwert Stadium 4: 7,7%, $p=0,64$).

Bei Einteilung der Patienten in die Risikogruppen des internationalen Prognoseindex für folliculäre Lymphome zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied. In höheren Risikogruppen war ein höherer Anteil an Mum1 positiven Zellen nachweisbar. Die Mittelwerte betragen in der Niedrigrisikogruppe 5,7%, in der mittleren Risikogruppe 6,3% und in der Hochrisikogruppe 9,1% ($p=0,00356$).

3.10 Mum1-Expression in Bezug auf den klinischen Verlauf folliculärer Lymphome

Um die Korrelation des Mum1 Gehalts mit dem klinischen Verlauf zu untersuchen, wurden die Zeit bis zum Therapieversagen und das Gesamtüberleben untersucht.

Für die Zeit bis zum Therapieversagen lagen Daten für insgesamt 160 Patienten vor. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 61 Monate. Bei einer Einteilung der Patienten in drei Gruppen nach dem Anteil der Mum1 positiven Zellen ($< 10\%$: 125 Patienten; $10-20\%$: 22 Patienten und $> 20\%$: 13 Patienten) ergab sich für die Gruppe $< 10\%$ eine mittlere Zeit bis zum Therapieversagen von 48 Monaten, für die beiden anderen Gruppen die mittlere Zeit zum Therapieversagen noch nicht erreicht, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0,14$). Bei Zusammenlegung der beiden höherexprimierenden Gruppen ($< 10\%$ versus $> 10\%$) zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p=0,057$). Bei einer Analyse ausschließlich der Patienten mit einem Hochrisiko FLIPI ergab sich eine bessere Zeit bis zum Therapieversagen bei einem Mum1 Anteil von $> 10\%$ verglichen mit einem Anteil von $< 10\%$ (mittlere Zeit bis zum Therapieversagen nicht erreicht versus 41 Monate, $p=0,0279$).

Da die Kombination von Chemotherapie mit monoklonalen Anti-CD20-Antikörpern zu einer deutlichen Verbesserung des klinischen Verlaufs bei Patienten mit folliculären Lymphomen führt, wurde die Zeit bis zum Therapieversagen gesondert für Patienten untersucht, die Immun-Chemotherapie erhalten hatten. Es waren Daten von 81 Patienten verfügbar, von denen 67 Patienten $< 10\%$ Mum1 positive Zellen aufwiesen, 9 Patienten $10-20\%$ und 5 Patienten $>20\%$. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 41 Monate. Weder beim Vergleich der drei Gruppen noch beim Vergleich der niedrigexprimierenden Gruppe mit den beiden höherexprimierenden Gruppen ergab sich eine signifikant unterschiedliche Zeit bis zum Therapieversagen.

Daten zum Gesamtüberleben lagen für insgesamt 169 Patienten vor. Hiervon zeigten 133 Patienten Mum1-Expression in < 10% der Zellen, 23 Patienten in 10-20% der Zellen und 13 Patienten in > 20% der Zellen. Das mittlere Gesamtüberleben war in keiner der drei Gruppen erreicht bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 70 Monaten. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Gesamtüberlebens zwischen den drei Gruppen ($p= 0,52$). Auch beim Vergleich von Patienten mit < 10% Mum1 positiven Zellen und Patienten mit > 10% Mum1 positiven Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p= 0,41$).

4 Diskussion

Follikuläre Lymphome leiten sich von den B-Zellen des Keimzentrums ab (Swerdlow et al. 2008). Im Keimzentrum reifen naive B-Zellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen heran, reguliert einerseits durch ein spezifisches zelluläres Milieu, andererseits durch die aufeinanderfolgende Herauf- und Herabregulation der Expression verschiedener B-Zell-Transkriptionsfaktoren. Ob diese Faktoren oder ihre Deregulation im Krankheitsverlauf von follikulären Lymphomen eine Rolle spielen und sich somit als prognostische Marker eignen würden, wurde anhand von Proben von Patienten untersucht, die im Rahmen einer randomisierten Studie behandelt wurden.

Das zelluläre Milieu von reaktiven Keimzentren besteht aus T-Zellen, Makrophagen und follikulären dendritischen Zellen, die in unterschiedlichen Anteilen in der hellen und dunklen Zone des Keimzentrums vorkommen (Allen et al. 2007a). Auch in follikulären Lymphomen kommen diese Zelltypen in unterschiedlichem Ausmaß als nicht-neoplastisches Begleitinfiltrat vor (Klapper 2011). Die Tatsache, dass diese Zellen in reaktiven Keimzentren einen wichtigen Einfluss auf Proliferation, Apoptose und Differenzierung von Keimzentrums-B-Zellen haben (Allen et al. 2007a; Allen et al. 2007b), legt die Frage nahe, ob auch die malignen B-Zellen im follikulären Lymphom durch das Begleitinfiltrat beeinflusst werden. Gen-Expressions-Analysen zeigen, dass Anzahl oder Aktivierung dieser nicht-neoplastischen Zellen mit dem klinischen Verhalten von follikulären Lymphomen korrelieren (Dave et al. 2004). Eine Signatur, die sich aus Genen von T-Zellen und Makrophagen zusammensetzt, ist mit einer guten Prognose assoziiert, während eine Signatur aus Genen von follikulären dendritischen Zellen und Makrophagen mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Mit diesem Genexpressionsmodell ist es möglich, die Prognose von follikulären Lymphomen unabhängig vom internationalen Prognoseindex vorherzusagen (Dave et al. 2004). Genexpressionsanalysen sind jedoch in der Routinediagnostik wegen des hohen Arbeits- und Kostenaufwandes, der schwierigen Normalisierung und Kalibrierung bei Untersuchung einzelner Fälle und der schwierigen Anwendbarkeit an formalinfixiertem Material bisher nicht einsetzbar. Immunhistochemische Färbungen hingegen sind eine gut etablierte Methode in der Routinediagnostik. Daher wurde von mehreren Arbeitsgruppen versucht, die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen

in prognostisch verwertbare immunhistochemische Färbungen zu übersetzen. Verschiedene, gegen T-Zellen und Makrophagen gerichtete Antikörper wurden verwendet (Carreras et al. 2006; Tzankov et al. 2008; Alvaro et al. 2006; Lee et al. 2006; Farinha et al. 2010; Richendollar et al. 2011; Glas et al. 2007; Wahlin et al. 2010). Die T-Zell-Marker FoxP3 und PD-1 zeigten hierbei heterogene, in einigen Studien jedoch vielversprechende Ergebnisse (de Jong et al. 2009).

Einige Gruppen fanden eine Korrelation zwischen hohem Anteil an FoxP3 positiven Zellen und besserem Gesamtüberleben (Carreras et al. 2006; Tzankov et al. 2008) oder niedrigeren FLIPI-Risikogruppen (Alvaro et al. 2006; Carreras et al. 2006). Die Analyse von verschiedenen Verteilungsmustern der FoxP3 -positiven Zellen zeigte in einer Studie ein Überlebensvorteil bei perifollikulärem Verteilungsmuster (Lee et al. 2006), in einer anderen Studie ein schlechteres Gesamtüberleben und ein höheres Transformationsrisiko bei einem follikulären Verteilungsmuster im Vergleich zu einem diffusen Verteilungsmuster (Farinha et al. 2010). In zwei Studien war der Gehalt FoxP3 positiver Zellen nicht relevant für die Prognose (Richendollar et al. 2011; Glas et al. 2005).

PD-1 in follikulären Lymphomen wurde in drei Studien untersucht. Hiervon zeigten zwei eine positive Korrelation zwischen Prognose und PD-1 positiven Zellen (Carreras et al. 2009; Wahlin et al. 2010), in der dritten Studie dagegen war ein hoher Anteil an PD-1 positiven Zellen korreliert mit einem schlechteren Überleben (Richendollar et al. 2011). Auch eine mögliche funktionelle, Interleukin 4-vermittelte Beziehung zwischen follikulären T-Helfer-Zellen und den Zellen des follikulären Lymphoms wurde beschrieben (Pangault et al. 2010).

In unserer Studie fanden wir keine Korrelation von Gesamtüberleben mit dem Gehalt an PD-1 oder FoxP3 positiven T-Zellen. Ein perifollikuläres Verteilungsmuster war, im Widerspruch zu einer vorangegangenen Studie (Lee et al. 2006), assoziiert mit einem schlechteren Überleben in einem multivariaten Cox-Modell, adjustiert für den FLIPI.

Die Diskrepanzen unserer und anderer Ergebnisse mit den Ergebnissen der Genexpressionsstudien lassen sich auf verschiedenen Weisen erklären. Zuerst ist es wichtig zu bemerken, dass weder FoxP3 noch PD-1 Teil der prognostischen Genexpressionssignaturen waren, die gedanklicher Ausgangspunkt für die meisten Arbeiten zum Begleitinfiltrat bei follikulären Lymphomen waren. Weiterhin ist eine Genexpressionssignatur eine komplexe Information aus einer Vielzahl an Genen, die

möglicherweise auch interagieren. Diese Information lässt sich nicht mit einer immunhistochemischen Färbung für ein einzelnes Protein oder einen Zelltyp reproduzieren.

Auch für die Widersprüche zwischen den immunhistochemischen Studien finden sich Erklärungen. Hier wurden die Daten zunächst an verschiedenen Arten von Proben erhoben: einige Gruppen verwendeten TMAs (Alvaro et al. 2006; Farinha et al. 2010; Farinha et al. 2005; Lee et al. 2006; Richendollar et al. 2011; Tzankov et al. 2008), andere Ganzschnitte (Carreras et al. 2006; Carreras et al. 2009; Glas et al. 2007). Zusätzlich wurden die meisten Studien an einer einzelnen Institution durchgeführt, sodass die Proben über einen langen Zeitraum gesammelt werden mussten. Dies führte dazu, dass die Patienten eine Vielzahl verschiedener Therapieschemata erhielten. Insbesondere hinsichtlich neuerer Ergebnisse, die zeigen, dass der Einfluss des Begleitinfiltrats auf den Verlauf von follikulären Lymphomen abhängig ist von der angewendeten Therapie (de Jong et al. 2009), liefert dies eine Erklärung für Diskrepanzen.

FoxP3 ist beim Menschen, im Gegensatz zu Mäusen, durch T-Zell–Rezeptor-Aktivierung induzierbar in einer kleinen Gruppe CD4+CD25- T-Zellen, die dadurch regulatorische Aktivität entwickeln (Walker et al. 2003). Eine transiente, *in vitro* induzierte FoxP3 Expression hingegen ist nicht assoziiert mit regulatorischer Funktion, hierfür scheint eine dauerhafte Expression von FoxP3 notwendig zu sein (Gavin et al. 2006). Trotz der möglichen induzierbaren Expression von FoxP3 in nicht-regulatorischen T-Zellen, handelt es sich doch bei einem großen Teil der FoxP3 positiven Zellen um T-Zellen mit regulatorischer Aktivität (Walker et al. 2003), sodass FoxP3 als immunhistochemischer Marker für T^{reg} verwendet werden kann.

PD-1 wird von T-Lymphozyten innerhalb des Keimzentrums exprimiert, während außerhalb von Keimzentren in physiologischem lymphatischem Gewebe keine PD-1 positiven Zellen nachweisbar sind (Dorfmann et al. 2006). somit qualifiziert sich PD-1 als immunhistochemischer Marker für T_{FH}.

In unserer Studie verwendeten wir ausschließlich Ganzschnitte von Lymphknoten von Patienten, die innerhalb von prospektiven, randomisierten Studien behandelt wurden. Hierdurch lag einerseits ausreichend Material zur Datengewinnung vor, andererseits waren die Therapien einheitlich und der Verlauf der Patienten über lange Zeiträume hinweg dokumentiert. Ein Nachteil dieser Kohorte ist die Tatsache, dass die Patienten nicht mit anti-CD20 Antikörpern behandelt wurden, die heute zur

Standardtherapie für fortgeschrittenen folliculäre Lymphome gehören und die Prognose der Patienten signifikant verbessert haben (Hiddemann et al. 2005). Folliculäre Lymphome sind eine Erkrankung mit einem relativ langsamen Verlauf, sodass Analysen des Gesamtüberlebens eine lange Nachbeobachtungszeit voraussetzen, die für mit anti-CD20 Antikörpern behandelte Patienten derzeit noch nicht vorliegen. Das Ergebnis, dass FoxP3 und PD-1 Immunhistochemie zur Prognoseerstellung für Patienten mit fortgeschrittenen folliculären Lymphomen von eingeschränktem Wert sind, kann somit auf heute behandelte Patienten möglicherweise nicht ohne Weiteres übertragen werden.

Unser zweites Ergebnis, dass das Begleitinfiltrat des folliculären Lymphoms sich in verschiedenen Stadien und FLIPI-Risikogruppen unterscheidet, ist jedoch als therapieunabhängig zu interpretieren, da diese Daten schon vor Therapiebeginn erhoben werden. Somit haben diese Daten aller Wahrscheinlichkeit nach auch Bedeutung für folliculäre Lymphome mit Anti-CD20-Therapie. Insbesondere die Veränderungen des Begleitinfiltrats in den verschiedenen Stadien könnten Einblicke in die Pathogenese von folliculären Lymphomen gewähren. Die Stadien repräsentieren die Ausbreitung der Erkrankung im Körper und könnten somit auch als Korrelat für das zeitliche Fortschreiten der Erkrankung beziehungsweise für die Dauer der Erkrankung vor Diagnose und Therapieeinleitung verstanden werden. Unter dieser Annahme würde sich eine Entwicklung von einem reaktiven Begleitinfiltrat, reich an folliculären T-Helfer-Zellen und arm an regulatorischen T-Zellen, hin zu einem malignen Begleitinfiltrat, reich an regulatorischen T-Zellen und arm an folliculären T-Helfer-Zellen zeigen. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass diese Hypothese auf einem Vergleich unterschiedlicher Patienten basiert. Eine Untersuchung mehrerer Lymphknoten desselben Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten, idealerweise ohne dazwischenliegende Therapie (zum Beispiel während einer "watch and wait" Phase), wäre erstrebenswert. Solche Proben lagen uns allerdings nicht vor, da während einer watch and wait Phase für gewöhnlich nicht ein weiteres Mal biopsiert wird, wenn die Diagnose bereits gestellt wurde.

Interessant ist diese Hypothese auch hinsichtlich neuer Daten zu initialen Stadien des folliculären Lymphoms. Im Blut zirkulierende Zellen mit einer Translokation t(14;18) in gesunden Individuen (Limpens et al. 1995) und Bcl2-positive Keimzentren in Lymphknoten mit erhaltener Architektur, sogenannte folliculäre Lymphome *in situ*

(Cong et al. 2002), und partielle Infiltration von Lymphknoten (Adam et al. 2005) wurden als Vorgängerläsionen des voll ausgeprägten follikulären Lymphoms postuliert. Auch wurden Untergruppen des follikulären Lymphoms beschrieben, wie gastrointestinale follikuläre Lymphome (Schmatz, 2011), kutane Keimzentrumslymphome (Senff et al. 2007; de Fernández Larrea et al. 2011) oder pädiatrische follikuläre Lymphome (Oschlies et al. 2010) die in niedrigen Stadien diagnostiziert werden und auch bei zeitlich fortgeschrittener Erkrankung nicht im Körper disseminieren. Unterschiede des Begleitinfiltrats in frühen und lokalisierten Erkrankungen im Vergleich zum disseminierten, fortgeschrittenen follikulären Lymphom könnten in Zukunft die Rolle des Begleitinfiltrats in der Pathogenese des follikulären Lymphoms weiter aufklären. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die Reifung von naiven B-Zellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen im Keimzentrum wird unter anderem reguliert durch die Transkriptionsfaktoren Bcl6 und Mum1/Irf4. Während Bcl6 die Bildung und Aufrechterhaltung des Keimzentrums bewirkt, steuert Mum1/Irf4 die Differenzierung zur Plasmazelle und den Keimzentrumsaustritt der differenzierten Plasmazelle (Cattoretti et al. 2006). Im reaktiven Keimzentrum hemmt Mum1/Irf4 die Expression von Bcl6 durch Bindung im Bereich des Bcl6-Promotors (Saito et al. 2007), sodass eine Koexpression beider Transkriptionsfaktoren unter physiologischen Bedingungen nur in einer kleinen Anzahl von Zellen vorkommt. Diese können als Zellen im Übergang vom Zentrozyten zur Plasmazelle verstanden werden (Cattoretti et al. 2006). Follikuläre Lymphome als Bcl6-positives malignes Korrelat des Keimzentrums wurden zunächst als Mum1/Irf4-negative Lymphome betrachtet. Im Rahmen von weiteren Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass eine Untergruppe der follikulären Lymphome mit besonderen Eigenschaften Mum1/Irf4- Expression in einem Teil der Zellen zeigt. Diese Lymphome zeigten signifikant häufiger als Mum1/Irf4-negative follikuläre Lymphome eine Negativität für den Keimzentrumsmarker CD10 sowie ein Fehlen der Translokation t(14;18). Ebenfalls häufiger beobachtet wurde ein histologischer Grad 3. Die Mum1/Irf4 positiven Lymphome zeigten in den bisher publizierten Studien einen tendenziell günstigeren Verlauf, dies ist jedoch bei kurzen Nachbeobachtungszeiten und kleinen Gruppen in den bisherigen Untersuchungen nur eingeschränkt verwertbar (Naresh 2007; Karube et al. 2007).

Wir haben in unserer Studie den Phänotyp von Mum1/Irf4-positiven Zellen in

reaktiven Keimzentren und follikulären Lymphomen durch Fluoreszenz-Mehrfachfärbungen näher charakterisiert, um zu klären, ob die Expression dieses Proteins mit einem Keimzentrums-Austritts-Phänotyp einhergeht. Weiterhin wurde an Proben von in Studien behandelten Patienten Mum1/Irf4-Expression in follikulären Lymphomen und die Korrelation mit dem klinischen Verlauf untersucht.

Wie bereits in anderen Arbeiten berichtet, zeigte sich ein breites Spektrum der Mum1/Irf4-Expression mit in den meisten Fällen niedrigen Werten, jedoch einer kleinen Untergruppe mit Mum1/Irf4 Expression in über 20% der Zellen. Um die Mum1/Irf4 positiven Zellen in follikulären Lymphomen näher zu charakterisieren, wurden Mehrfachfärbungen durchgeführt. Das follikuläre Lymphom gilt als Neoplasie der Keimzentrumszellen, der Keimzentrumstranskriptionsfaktor Bcl6 wird in einem großen Teil der Tumorzellen exprimiert. Im Gegensatz zu reaktiven Keimzentren wurde im follikulären Lymphom Mum1/Irf4 in variablem Ausmaß mit Bcl6 koexprimiert. Somit sind in follikulären Lymphomen nicht nur eine größere Anzahl Mum1/Irf4 positiver Zellen vorhanden, sondern es findet eine Expression in Bcl6 positiven Zellen statt, die unter physiologischen Umständen Mum1/Irf4 negativ wären. Mechanismen der Mum1/Irf4-Überexpression und pathologischen Koexpression wurden in verschiedenen hämatologischen Neoplasien beschrieben. In multiplen Myelomen führt eine Translokation t(6;14) zu einer Verlagerung des IRF4 Gens unter die Kontrolle des Immunglobulinschwerketten-Promotors (Iida et al. 1997; Yoshida et al. 1999). Eine Translokation des IRF4 Gens unter die Kontrolle von Immunglobulin-Promotoren konnte auch in einer Subgruppe größtenteils pädiatrischer follikulärer Lymphome und diffuser großzelliger B-Zell-Lymphome nachgewiesen werden. Auch hier zeigte sich in einem großen Teil der Fälle eine Bcl6 Koexpression. Weiterhin waren alle Fälle gekennzeichnet durch das Fehlen einer Translokation t(14;18) (Salaverria et al. 2011). Adulte diffuse großzellige B-Zell-Lymphome können eine Koexpression von Irf4 und Bcl6 zeigen, verursacht durch Brüche oder Mutationen im Bereich der Irf4-Bindungsstellen des BCL6-Promotors (Saito et al. 2007).

Mum1 positive Zellen in reaktiven Keimzentren weisen eine plasmazytische Differenzierung auf und werden als Zellen der späten Keimzentrumsreaktion kurz vor Verlassen des Keimzentrums interpretiert (Cattoretti et al. 2006). Um zu untersuchen, ob es sich bei den Mum1/Irf4 positiven Zellen in follikulären Lymphomen ebenfalls um plasmazytisch differenzierte Zellen handelt, wurde eine immunhistochemische

Färbung für Mum1/Irf4 kombiniert mit einer in-situ Hybridisierung für RNA der Immunglobulin Leichtketten kappa und lambda. Nur in einem geringen Prozentsatz der Mum1 positiven Zellen konnte Leichtketten RNA nachgewiesen werden. Bei Mum1 positiven Zellen in folliculären Lymphomen handelt es sich somit um Bcl6 positive Tumorzellen, die eine pathologische Koexpression von Mum1 aufweisen und nicht plasmazytisch differenziert sind. Mum1/Irf4 Expression in folliculären Lymphomen scheint somit von physiologischen Regulationsmechanismen und Funktionen des Transkriptionsfaktors entkoppelt zu sein.

Um weitere Hinweise auf eine Deregulation von Mum1/Irf4 in folliculären Lymphomen zu finden, haben wir die Proliferationsaktivität von Mum1/Irf4 positiven Zellen unter reaktiven und malignen Bedingungen mittels Fluoreszenzmehrfachfärbungen untersucht. In reaktiven Keimzentren zeigte sich ein Überwiegen Mum1/Irf4 positiver Zellen in der niedrigproliferativen hellen Zone. Der überwiegende Anteil der Mum1/Irf4 positiven Zellen war Ki67 negativ. Dieses Bild passt zu plasmazytisch differenzierten Zellen kurz vor dem Keimzentrumsaustritt. In folliculären Lymphomen waren Mum1/Irf4 positive Zellen ebenso wie proliferierende Zellen ungeordnet im Follikel verteilt. Die Auswertung der Mehrfachmarkierung zeigte, dass ein Mum1/Irf4 hier überwiegend in proliferierenden Zellen exprimiert wird.

Die pathologische Koexpression mit Bcl6, der Verlust der Differenzierungsfunktion sowie die pathologische Proliferationsaktivität weisen darauf hin, dass Mum1/Irf4-Expression eine Rolle in der Pathogenese des folliculären Lymphoms spielen könnte. Daher haben wir die Rolle von Mum1/Irf4 Überexpression im klinischen Verlauf an Proben von Patienten untersucht, die im Rahmen von prospektiven, randomisierten Studien behandelt wurden. Hier zeigte sich lediglich innerhalb der Gruppe der Hochrisiko-FLIPI Patienten eine längere Zeit bis zum Therapieversagen. Eine Korrelation mit dem Gesamtüberleben war nicht nachweisbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Einblicke in die Biologie von folliculären Lymphomen gewonnen, obwohl wir somit weder für das nicht-maligne Begleitinfiltrat noch für den Transkriptionsfaktor Mum1/Irf4 eine prognostische Rolle in folliculären Lymphomen nachweisen konnten. Untersuchungen des Begleitinfiltrats in frühen Stadien oder dauerhaft lokalisierten Varianten von folliculären Lymphomen könnten noch weitere Informationen über den Zusammenhang zwischen Begleitinfiltrat und Krankheitsausbreitung liefern. Auch die deregulierte Expression von Mum1/Irf4 und der zumindest partielle Funktionsverlust werfen weitere Fragen auf. Der

Mechanismus der Überexpression in adulten folliculären Lymphomen ist nicht geklärt, ebenso wenig der Einfluss auf weitere, unter physiologische Bedingungen durch Mum1/Irf4 kontrollierte Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel Blimp1 oder Xbp1. Von großem Interesse wird in diesem Zusammenhang auch die Expression von Myc sein, da erst kürzlich die Interaktion von Bcl6 und Myc im Keimzentrum gezeigt wurde (Dominguez-Sola et al. 2012)

5 Zusammenfassung

Follikuläre Lymphome sind die zweithäufigsten Non-Hodgkin-Lymphome in der westlichen Welt (Swerdlow et al. 2008). Der klinische Verlauf ist heterogen und schwer vorhersagbar. Da follikuläre Lymphome morphologisch und auf zellulärer Ebene reaktive Keimzentren imitieren, wurden in den vergangenen Jahren untersucht, ob Faktoren, welche die B-Zell-Differenzierung in Keimzentren kontrollieren, auch Einfluss auf den Verlauf von follikulären Lymphomen haben. Genexpressionsstudien haben gezeigt, dass Genexpressionssignaturen, die aus Signalen des reaktiven Begleitinfiltrats bestehen, eine Aussage über den Verlauf der Erkrankung erlauben (Dave et al. 2004; Glas et al. 2005). Ebenso wurde gezeigt, dass in einer kleinen Gruppe follikulärer Lymphome der B-Zell-Transkriptionsfaktor Mum1 überexprimiert wird, wobei die klinische Bedeutung unklar bleibt (Naresh 2007; Karube et al. 2007).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von T-Zellsubpopulationen und der Expression des Transkriptionsfaktors Mum1/Irf4 auf den klinischen Verlauf und auf weitere Eigenschaften des follikulären Lymphoms untersucht. Diese Untersuchungen wurden an Lymphomproben von Patienten durchgeführt, die im Rahmen von prospektiven Studien behandelt wurden. Zusätzlich wurden Mum1/Irf4-positive Zellen weiter charakterisiert.

Bei der Untersuchung anderer klinischer Parameter zeigte sich eine Veränderung der Zusammensetzung des T-Zell-Infiltrats im Rahmen der Ausbreitung der Erkrankung im Körper. Die Mum1/Irf4-positiven Zellen im follikulären Lymphom zeigen biologische Unterschiede zu Mum1/Irf4-positiven Zellen in reaktiven Follikeln hinsichtlich der vermehrten Koexpression von Bcl6 und ihrer erhöhten Proliferationsaktivität.

Ein perifollikuläres Verteilungsmuster FoxP3 positiver Zellen ist mit einem schlechteren Verlauf der Erkrankung assoziiert, der Anteil der FoxP3- und PD-1-positiven T-Zell-Subpopulationen korreliert jedoch nicht mit dem klinischen Verlauf. Eine Korrelation der Mum1-Expression mit dem klinischen Verlauf war nicht nachweisbar.

Sowohl die zelluläre Zusammensetzung des Begleitinfiltrats innerhalb des Lymphomgewebes als auch die unphysiologische Koexpression von B-Zell-

Transkriptionsfaktoren scheinen eine Rolle in der Biologie der Erkrankung zu spielen, obwohl sich weder die T-Zell-Marker FoxP3 und PD-1 noch der Transkriptionsfaktor Mum1/Irf4 als immunhistochemische prognostische Marker für folliculäre Lymphome anwenden lassen. Weiterführende Untersuchungen an frühen oder lokalisierten Varianten von folliculären Lymphomen könnten in Zukunft weitere Einblicke in Mechanismen der Entstehung und des Fortschreitens von folliculären Lymphomen geben.

Publikationen im Rahmen der Arbeit

Koch, K; Hoster, E; Unterhalt, M; Dreyling, M; Hiddemann, W; Klapper, W (2008): The prognostic role of histopathology and T-cell-subpopulations in follicular lymphoma- results from a prospective, randomized trial of the german low grade lymphoma study group (GLSG). *Der Pathologe*, Supplement 1, S. 16, Abstract Nummer Do-051.

Koch, K; Szczepanowski, M; Culemeyer L; Klapper W (2010): Expression of transcription factors in the proliferative compartment of follicular lymphoma. Vortrag, *XVth meeting of the European Association for Haematopathology*, Uppsala, Sweden, September 25-30, 2010

Koch, K; Hoster, E; Unterhalt, M; Ott, G; Rosenwald, A; Hansmann, ML; Engelhard, M; Hiddemann, W; Klapper, W (2012): The composition of the microenvironment in follicular lymphoma is associated with the stage of the disease. *Hum. Pathol.*, S. 2274- 2281.

6 Literaturverzeichnis

A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project (1997). *Blood* 89 (11), S. 3909–3918.

Adam, P; Katzenberger, T; Eifert, M; Ott, MM; Rosenwald, A; Müller-Hermelink, HK; Ott, G (2005): Presence of preserved reactive germinal centers in follicular lymphoma is a strong histopathologic indicator of limited disease stage. *Am. J. Surg. Pathol.*, S. 1661–1664.

Agata, Y; Kawasaki, A; Nishimura, H; Ishida, Y; Tsubata, T; Yagita, H; Honjo, T (1996): Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.*, S. 765–772.

Allen, CDC; Okada, T; Cyster, JG (2007a): Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity*, S. 190–202.

Allen, CDC; Okada, T; Tang, HL; Cyster, JG (2007b): Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science*, S. 528–531.

Alvaro, T; Lejeune, M; Salvadó, M; Lopez, C; Jaén, J; Bosch, R; Pons, LE (2006): Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. *J. Clin. Oncol.*, S. 5350–5357.

Bennett, CL; Christie, J; Ramsdell, F; Brunkow, ME; Ferguson, PJ; Whitesell, L; Kelly, TE; Saulsbury, FT; Chance, PF; Ochs, HD (2001): The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*, S. 20–21.

Beyer, M; Schultze, JL (2006): Regulatory T cells in cancer. *Blood*, S. 804–811.

Bonzheim, I; Geissinger, E; Tinguely, M; Roth, S; Grieb, T; Reimer, P; Wilhelm, M; Rosenwald, A; Müller-Hermelink, HK; Rüdiger, T (2008): Evaluation of FoxP3 Expression in Peripheral T-Cell Lymphoma. *American Journal of Clinical Pathology*, S. 613–619.

Brunkow, ME; Jeffery, EW; Hjerrild, KA; Paeper, B; Clark, LB; Yasayko, SA; Wilkinson, JE; Galas, D; Ziegler, SF; Ramsdell, F (2001): Disruption of a new

forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.*, S. 68–73.

Campbell, BA; Voss, N; Woods, R; Gascoyne, RD; Morris, J; Pickles, T; Connors, JM; Savage, KJ (2010): Long-term outcomes for patients with limited stage follicular lymphoma: involved regional radiotherapy versus involved node radiotherapy. *Cancer*, S. 3797–3806.

Carbone, PP; Kaplan, HS; Musshoff, K; Smithers, DW; Tubiana, M (1971): Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res.*, S. 1860–1861.

Carreras, J; Lopez-Guillermo, A; Fox, BC; Colomo, L; Martinez, A; Roncador, G; Montserrat, E; Campo, E; Banham, AH (2006): High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*, S. 2957–2964.

Carreras, J; Lopez-Guillermo, A; Roncador, G; Villamor, N; Colomo, L; Martinez, A; Hamoudi, R; Howat, WJ; Montserrat, E; Campo, E (2009): High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, S. 1470–1476.

Cattoretti, G; Shaknovich, R; Smith, PM; Jäck, H; Murty, VV; Alobeid, B (2006): Stages of germinal center transit are defined by B cell transcription factor coexpression and relative abundance. *J. Immunol.*, S. 6930–6939.

Cong, P; Raffeld, M; Teruya-Feldstein, J; Sorbara, L; Pittaluga, S; Jaffe, ES (2002): *In situ* localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood*, S. 3376–3382.

Dave, SS; Wright, G; Tan, B; Rosenwald, A; Gascoyne, RD; Chan, WC; Fisher, RI; Braziel, RM; Rimsza, LM; Grogan, TM; Miller, TP; LeBlanc, M; Greiner, TC; Weisenburger, DD; Lynch, JC; Vose, J; Armitage, JO; Smeland, EB; Kvaloy, S; Holte, H; Delabie, J; Connors, JM; Lansdorp, PM; Ouyang, Q; Lister, TA; Davies, AJ; Norton, AJ; Muller-Hermelink, HK; Ott, G; Campo, E; Montserrat, E; Wilson, WH; Jaffe, ES; Simon, R; Yang, L; Powell, J; Zhao, H; Goldschmidt, N; Chiorazzi, M; Staudt, LM (2004): Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N. Engl. J. Med.*, S. 2159–2169.

Dominguez-Sola, D; Victora GD; Ying, CY; Phan RT; Saito, M; Nussenzweig, CN; Dalla-Favera, R (2012): The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nat. immunol.* S. 1083-91.

Dorfman, DM; Brown, JA; Shahsafaei, A; Freeman, GJ (2006): Programmed death-1 (PD-1) is a marker of germinal center-associated T cells and angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.*, S. 802–810.

Falini, B; Fizzotti, M; Pucciarini, A; Bigerna, B; Marafioti, T; Gambacorta, M; Pacini, R; Alunni, C; Natali-Tanci, L; Ugolini, B; Sebastiani, C; Cattoretti, G; Pileri, S; Dalla-Favera, R; Stein, H (2000): A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood*, S. 2084–2092.

Farinha, P; Al-Tourah, A; Gill, K; Klasa, R; Connors, JM; Gascoyne, RD (2010): The architectural pattern of FOXP3-positive T cells in follicular lymphoma is an independent predictor of survival and histologic transformation. *Blood*, S. 289–295.

Farinha, P; Masoudi, H; Skinnider, BF; Shumansky, K; Spinelli, JJ; Gill, K; Klasa, R; Voss, N; Connors, JM; Gascoyne, RD (2005): Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood*, S. 2169–2174.

Fernández Larrea, C de; Martínez-Pozo, A; Mercadal, S; García, A; Gutierrez-García, G; Valera, A; Ghita, G; Colomo, L; Gainza, E; Villamor, N; Nomdedeu, B; Estrach, T; Montserrat, E; Campo, E; López-Guillermo, A (2011): Initial features and outcome of cutaneous and non-cutaneous primary extranodal follicular lymphoma. *Br. J. Haematol.*, S. 334–340.

Fontenot, JD; Gavin, MA; Rudensky, AY (2003): Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, S. 330–336.

Freeman, GJ; Long, AJ; Iwai, Y; Bourque, K; Chernova, T; Nishimura, H; Fitz, LJ; Malenkovich, N; Okazaki, T; Byrne, MC; Horton, HF; Fouser, L; Carter, L; Ling, V; Bowman, MR; Carreno, BM; Collins, M; Wood, CR; Honjo, T (2000): Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.*, S. 1027–1034.

Gavin, MA; Torgerson, TR; Houston, E; DeRoos, P; Ho, WY; Stray-Pedersen, A; Ocheltree, EL; Greenberg, PD; Ochs, HD; Rudensky, AY (2006): Single-cell analysis

of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, S. 6659–6664.

Glas, AM; Kersten, MJ; Delahaye, LJM; Witteveen, AT; Kibbelaar, RE; Velds, A; Wessels, LFA; Joosten, P; Kerkhoven, RM; Bernardis, R; van Krieken, JHJM; Kluin, PM; van't Veer, LJ; Jong, D de (2005): Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. *Blood*, S. 301–307.

Glas, AM; Knoops, L; Delahaye, L; Kersten, MJ; Kibbelaar, RE; Wessels, LA; van Laar, R; van Krieken, JHJM; Baars, JW; Raemaekers, J; Kluin, PM; van't Veer, LJ; Jong, D de (2007): Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, S. 390–398.

Hiddemann, W; Kneba, M; Dreyling, M; Schmitz, N; Lengfelder, E; Schmits, R; Reiser, M; Metzner, B; Harder, H; Hegewisch-Becker, S; Fischer, T; Kropff, M; Reis, H; Freund, M; Wörmann, B; Fuchs, R; Planker, M; Schimke, J; Eimermacher, H; Trümper, L; Aldaoud, A; Parwaresch, R; Unterhalt, M (2005): Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*, S. 3725–3732.

Horning, SJ; Rosenberg, SA (1984): The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *N. Engl. J. Med.*, S. 1471–1475.

Iida, S; Rao, PH; Butler, M; Corradini, P; Boccadoro, M; Klein, B; Chaganti, RS; Dalla-Favera, R (1997): Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nat. Genet.*, S. 226–230.

Ishida, Y; Agata, Y; Shibahara, K; Honjo, T (1992): Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.*, S. 3887–3895.

Johnson, PW; Rohatiner, AZ; Whelan, JS; Price, CG; Love, S; Lim, J; Matthews, J; Norton, AJ; Amess, JA; Lister, TA (1995): Patterns of survival in patients with

recurrent follicular lymphoma: a 20-year study from a single center. *J. Clin. Oncol.*, S. 140–147.

Jong, D de; Koster, A; Hagenbeek, A; Raemaekers, J; Veldhuizen, D; Heisterkamp, S; Boer, JP de; van Glabbeke, M (2009): Impact of the tumor microenvironment on prognosis in follicular lymphoma is dependent on specific treatment protocols. *Haematologica*, S. 70–77.

Karube, K; Guo, Y; Suzumiya, J; Sugita, Y; Nomura, Y; Yamamoto, K; Shimizu, K; Yoshida, S; Komatani, H; Takeshita, M; Kikuchi, M; Nakamura, N; Takasu, O; Arakawa, F; Tagawa, H; Seto, M; Ohshima, K (2007): CD10-MUM1+ follicular lymphoma lacks BCL2 gene translocation and shows characteristic biologic and clinical features. *Blood*, S. 3076–3079.

Khattri, R; Cox, T; Yasayko, S; Ramsdell, F (2003): An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.*, S. 337–342.

Klapper, W (2011): Pathobiology and diagnosis of follicular lymphoma. *Semin Diagn Pathol*, S. 146–160.

Klapper, W; Hoster, E; Rölver, L; Schrader, C; Janssen, D; Tiemann, M; Bernd, H; Determann, O; Hansmann, M; Möller, P; Feller, A; Stein, H; Wacker, H; Dreyling, M; Unterhalt, M; Hiddemann, W; Ott, G (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.*, S. 3330–3336.

Klein, U; Casola, S; Cattoretti, G; Shen, Q; Lia, M; Mo, T; Ludwig, T; Rajewsky, K; Dalla-Favera, R (2006): Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.*, S. 773–782.

Latchman, Y; Wood, CR; Chernova, T; Chaudhary, D; Borde, M; Chernova, I; Iwai, Y; Long, AJ; Brown, JA; Nunes, R; Greenfield, EA; Bourque, K; Bousiotis, VA; Carter, LL; Carreno, BM; Malenkovich, N; Nishimura, H; Okazaki, T; Honjo, T; Sharpe, AH; Freeman, GJ (2001): PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.*, S. 261–268.

Lee, AM; Clear, AJ; Calaminici, M; Davies, AJ; Jordan, S; MacDougall, F; Matthews, J; Norton, AJ; Gribben, JG; Lister, TA; Goff, LK (2006): Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3-positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. *J. Clin. Oncol.*, S. 5052–5059.

Limpens, J; Stad, R; Vos, C; Vlaam, C de; Jong, D de; van Ommen, GJ; Schuurin, E; Kluin, PM (1995): Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood*, S. 2528–2536.

Mann, RB; Berard, CW (1983): Criteria for the cytologic subclassification of follicular lymphomas: a proposed alternative method. *Hematol Oncol*, S. 187–192.

Matsuyama, T; Grossman, A; Mittrücker, HW; Siderovski, DP; Kiefer, F; Kawakami, T; Richardson, CD; Taniguchi, T; Yoshinaga, SK; Mak, TW (1995): Molecular cloning of LSIRF, a lymphoid-specific member of the interferon regulatory factor family that binds the interferon-stimulated response element (ISRE). *Nucleic Acids Res.*, S. 2127–2136.

Montoto, S; Davies, AJ; Matthews, J; Calaminici, M; Norton, AJ; Amess, J; Vinnicombe, S; Waters, R; Rohatiner, AZS; Lister, TA (2007): Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, S. 2426–2433.

Naresh, KN (2007): MUM1 expression dichotomises follicular lymphoma into predominantly, MUM1-negative low-grade and MUM1-positive high-grade subtypes. *Haematologica*, S. 267–268.

Nickenig, C; Dreyling, M; Hoster, E; Pfreundschuh, M; Trumper, L; Reiser, M; Wandt, H; Lengfelder, E; Unterhalt, M; Hiddemann, W (2006): Combined cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and prednisone (CHOP) improves response rates but not survival and has lower hematologic toxicity compared with combined mitoxantrone, chlorambucil, and prednisone (MCP) in follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized trial of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Cancer*, S. 1014–1022.

Oschlies, I; Salaverria, I; Mahn, F; Meinhardt, A; Zimmermann, M; Woessmann, W; Burkhardt, B; Gesk, S; Krams, M; Reiter, A; Siebert, R; Klapper, W (2010): Pediatric follicular lymphoma--a clinico-pathological study of a population-based series of patients treated within the Non-Hodgkin's Lymphoma--Berlin-Frankfurt-Munster (NHL-BFM) multicenter trials. *Haematologica*, S. 253–259.

Pangault, C; Amé-Thomas, P; Ruminy, P; Rossille, D; Caron, G; Baia, M; Vos, J de; Roussel, M; Monvoisin, C; Lamy, T; Tilly, H; Gaulard, P; Tarte, K; Fest, T (2010):

Follicular lymphoma cell niche: identification of a preeminent IL-4-dependent TFH–B cell axis. *Leukemia*, S. 2080–2089.

Pezzella, F; Tse, AG; Cordell, JL; Pulford, KA; Gatter, KC; Mason, DY (1990): Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol*, S. 225–232.

Pugh, TJ; Ballonoff, A; Newman, F; Rabinovitch, R (2010): Improved survival in patients with early stage low-grade follicular lymphoma treated with radiation: a Surveillance, Epidemiology, and End Results database analysis. *Cancer*, S. 3843–3851.

Richendollar, BG; Pohlman, B; Elson, P; Hsi, ED (2011): Follicular programmed death 1-positive lymphocytes in the tumor microenvironment are an independent prognostic factor in follicular lymphoma. *Hum. Pathol.*, S. 552–557.

Saito, M; Gao, J; Basso, K; Kitagawa, Y; Smith, PM; Bhagat, G; Pernis, A; Pasqualucci, L; Dalla-Favera, R (2007): A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer Cell*, S. 280–292.

Salaverria, I; Philipp, C; Oschlies, I; Kohler, CW; Kreuz, M; Szczepanowski, M; Burkhardt, B; Trautmann, H; Gesk, S; Andrusiewicz, M; Berger, H; Fey, M; Harder, L; Hasenclever, D; Hummel, M; Loeffler, M; Mahn, F; Martin-Guerrero, I; Pellissery, S; Pott, C; Pfreundschuh, M; Reiter, A; Richter, J; Rosolowski, M; Schwaenen, C; Stein, H; Trümper, L; Wessendorf, S; Spang, R; Küppers, R; Klapper, W; Siebert, R (2011): Translocations activating IRF4 identify a subtype of germinal center-derived B-cell lymphoma affecting predominantly children and young adults. *Blood*, S. 139–147.

Schwaenen, C; Viardot, A; Berger, H; Barth, TFE; Bentink, S; Döhner, H; Enz, M; Feller, AC; Hansmann, M; Hummel, M; Kestler, HA; Klapper, W; Kreuz, M; Lenze, D; Loeffler, M; Möller, P; Müller-Hermelink, H; Ott, G; Rosolowski, M; Rosenwald, A; Ruf, S; Siebert, R; Spang, R; Stein, H; Truemper, L; Lichter, P; Bentz, M; Wessendorf, S (2009): Microarray-based genomic profiling reveals novel genomic aberrations in follicular lymphoma which associate with patient survival and gene expression status. *Genes Chromosomes Cancer*, S. 39–54.

Senff, NJ; Hoefnagel, JJ; Neelis, KJ; Vermeer, MH; Noordijk, EM; Willemze, R (2007): Results of radiotherapy in 153 primary cutaneous B-Cell lymphomas

classified according to the WHO-EORTC classification. *Arch Dermatol*, S. 1520–1526.

Shi, SR; Chaiwun, B; Young, L; Cote, RJ; Taylor, CR (1993): Antigen retrieval technique utilizing citrate buffer or urea solution for immunohistochemical demonstration of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections. *J. Histochem. Cytochem.*, S. 1599–1604.

Shi, SR; Key, ME; Kalra, KL (1991): Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.*, S. 741–748.

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, P; Zucca, E; Montserrat, E (2004): Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood*, S. 1258–1265.

Swerdlow, SH (2008): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4. Aufl., Internat. Agency for Research on Cancer, Lyon.

Tsujimoto, Y; Cossman, J; Jaffe, E; Croce, CM (1985): Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, S. 1440–1443.

Tsujimoto, Y; Finger, LR; Yunis, J; Nowell, PC; Croce, CM (1984): Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, S. 1097–1099.

Tzankov, A; Meier, C; Hirschmann, P; Went, P; Pileri, SA; Dirnhofer, S (2008): Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, S. 193–200.

van Oers, MHJ; Kersten, MJ (2011): Treatment strategies in advanced stage follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol*, S. 187–201.

Vibhakar, R; Juan, G; Traganos, F; Darzynkiewicz, Z; Finger, LR (1997): Activation-induced expression of human programmed death-1 gene in T-lymphocytes. *Exp. Cell Res.*, S. 25–28.

Wahlin, BE; Aggarwal, M; Montes-Moreno, S; Gonzalez, LF; Roncador, G; Sanchez-Verde, L; Christensson, B; Sander, B; Kimby, E (2010): A unifying microenvironment model in follicular lymphoma: outcome is predicted by programmed death-1-positive, regulatory, cytotoxic, and helper T cells and macrophages. *Clin. Cancer Res.*, S. 637–650.

Walker, MR; Kasprowicz, DJ; Gersuk, VH; Benard, A; van Landeghen, M; Buckner, JH; Ziegler, SF (2003): Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J. Clin. Invest.*, S. 1437–1443.

Wollenberg, I; Agua-Doce, A; Hernández, A; Almeida, C; Oliveira, VG; Faro, J; Graca, L (2011): Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells. *J. Immunol.*, S. 4553–4560.

Yoshida, S; Nakazawa, N; Iida, S; Hayami, Y; Sato, S; Wakita, A; Shimizu, S; Taniwaki, M; Ueda, R (1999): Detection of MUM1/IRF4-IgH fusion in multiple myeloma. *Leukemia*, S. 1812–1816.

Yunis, JJ; Oken, MM; Kaplan, ME; Ensrud, KM; Howe, RR; Theologides, A (1982): Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.*, S. 1231–1236.

Danksagung

Prof. Dr. Wolfram Klapper danke ich für die hervorragende Betreuung während der gesamten Arbeit. Seine ansteckende Begeisterung für die Hämatopathologie und sein großes Interesse am Fortschreiten der Arbeit haben es mir ermöglicht, Verständnis für das Fachgebiet und ein über die Doktorarbeit hinausreichendes Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten zu entwickeln.

Olivera Batic, Charlotte Botz-von Drathen, Monika Hauberg und Michael Weiß möchte ich danken für die hervorragende Einführung in immunhistochemische Techniken, die Unterstützung bei der Anfertigung und Auswertung der Färbungen und die freundliche Aufnahme im Labor.

Eva Hoster danke ich für die statistische Analyse der an den Studienkollektiven erhobenen Daten und für die ausführliche und geduldige Beantwortung meiner Fragen.

Die guten Ratschläge und konstruktiven Verbesserungsvorschläge von Christiane Stuhlmann-Laeisz und Maren Kuhli waren mir eine wertvolle Hilfe beim Erstellen dieser Arbeit.

Meinen Eltern, Ingrid und Werner Koch danke ich von Herzen für ihr Vertrauen und ihre vielseitige Unterstützung während meines Studiums und noch weit darüber hinaus.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum 21.04.1984
Geburtsort Marburg
Staatsangehörigkeit deutsch

Ausbildung

2003 bis 2009 Christian-Albrechts-Universität, Kiel
Studium der Humanmedizin

1995 bis 2003 Martin-Luther-Schule, Marburg
Gymnasium, Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife

Berufliche Laufbahn

2010 bis 2011 Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Institut für Pathologie, Sektion Hämatopathologie
Forschungsstelle im Rahmen des Projekts "Das persönliche
Archiv des Kieler Pathologen Karl Lennert"

seit 2012 Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Institut für Pathologie
Assistenzärztin in Weiterbildung

Publikationen

Koch, K; Hoster, E; Unterhalt, M; Dreyling, M; Hiddemann, W; Klapper, W (2008):
The prognostic role of histopathology and T-cell-subpopulations in follicular
lymphoma- results from a prospective, randomized trial of the german low grade
lymphoma study group (GLSG). *Der Pathologe*, Supplement 1, S. 16.

Koch, K; Szczepanowski, M; Culemeyer L; Klapper W (2010): Expression of transcription factors in the proliferative compartment of follicular lymphoma. Oral presentation, *XVth meeting of the European Association for Haematopathology*, Uppsala, Sweden, September 25-30, 2010

Oschlies, I; Burkhardt, B; Salaverria, I; Rosenwald, A; d`Amore, ES; Szczepanowski, M; **Koch, K**; Hansmann, ML; Stein, H; Möller, P; Reiter, A; Zimmermann, M; Rosolen, A; Siebert, R; Jaffe, ES; Klapper, W (2011): Clinical, pathological and genetic features of primary mediastinal large B-cell lymphomas and mediastinal gray zone lymphomas in children. *Haematologica*, S. 262-268

Koch, K; Klapper, W (2011): Endogenous Interferon alpha therapy in follicular lymphoma? *LeukLymphoma*, S. 1168-1169

Hartmann, S; Agostinelli, C; Klapper, W; Korkolopoulou, P; **Koch, K**; Marafioti, T; Piccaluga, PP; Patsouris, E; Pileri, S; Hansmann, ML (2011): Revising the historical collection of epithelioid cell-rich lymphomas of the Kiel Lymph Node Registry: what is Lennert's lymphoma nowadays? *Histopathology*, S. 1173-1182

Koch, K; Hoster, E; Unterhalt, M; Ott, G; Rosenwald, A; Hansmann, ML; Engelhard, M; Hiddemann, W; Klapper, W (2012): The composition of the microenvironment in follicular lymphoma is associated with the stage of the disease. *Hum. Pathol.* S.2274-2281