

**Immunhistochemische und zytogenetische Analysen
zur Prävalenz von In-situ-Läsionen bei Patienten mit
Follikulärem Lymphom und Mantelzell-Lymphom**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Prill, Sophie

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Adam
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. K. Weisel

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Non-Hodgkin-Lymphome	8
1.2 Das Follikuläre Lymphom.....	9
1.2.1 Definition.....	9
1.2.2 Epidemiologie	10
1.2.3 Klinische Präsentation	11
1.2.4 Das <i>BCL2</i> -Gen und die t(14;18)(q32;q21)-Translokation	11
1.3 Das Mantelzell-Lymphom.....	12
1.3.1 Definition.....	12
1.3.2 Epidemiologie	12
1.3.3 Klinische Präsentation	13
1.3.4 Cyclin D1 und die t(11;14)(q13;q32)-Translokation	13
1.4 Vorläuferläsionen.....	14
1.4.1 Das Follikuläre Lymphom <i>in situ</i>	15
1.4.2 Das Mantelzell-Lymphom <i>in situ</i>	16
1.4.3 Therapie der In-situ-B-Zell-Lymphome.....	17
1.5 Ziel und Fragestellung der Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Gewebe von Patienten mit bekanntem manifestem Follikulärem Lymphom bzw. Mantelzell-Lymphom	19
2.1.2 Verwendete Reagenzien für die immunhistochemischen Verfahren..	20
2.1.3 Verwendete Reagenzien für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung..	21

2.2	Methoden	23
2.2.1	Anfertigung von ultradünnen Paraffin-Gewebeschnitten.....	23
2.2.2	Immunhistochemische Verfahren	23
2.2.3	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	25
2.2.4	Vergleichende Klonalitätsanalysen	27
3.	Ergebnisse.....	29
3.1	Prävalenz von In-situ-Läsionen in Patienten mit bekanntem Follikulärem Lymphom.....	29
3.1.1	Klinische Daten FLIS	32
3.2	Prävalenz von In-situ-Läsionen in Patienten mit manifestem Mantelzell- Lymphom	33
3.2.1	Präklinische MCL-Manifestationen in extranodalen lymphatischen Infiltraten in Geweben von MCL-Patienten.....	36
3.3	Molekularer Klonalitätsvergleich zwischen den retrospektiv detektierten präklinischen MCL-Infiltraten und dem jeweils korrespondierenden manifesten MCL.....	38
4.	Diskussion	39
5.	Zusammenfassung.....	44
	Literatur.....	47
	Danksagung.....	51

Abkürzungen

ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex-Methode
Ak	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata
BCL	B-cell lymphoma
CCND1	Cyclin D1
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin Dependent Kinase
cHL	klassisches Hodgkin-Lymphom
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DAPI	4',6 Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DLBCL	diffus großzelliges B-Zell Lymphom
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FL	Folikuläres Lymphom
FLIS	Folikuläres Lymphom <i>in situ</i>
G1-Phase	Gap 1-Phase
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Ig	Immunglobulin
IU	Internationale Einheit

LK	Lymphknoten
MBL	monoklonale B-Zell-Lymphozytose
MCL	Mantelzell-Lymphom
MCLIS	Mantelzell-Lymphom <i>in situ</i>
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Rb-Protein	Retinoblastomprotein
RT	Raumtemperatur
S-Phase	Synthesephase
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

1.1 Non-Hodgkin-Lymphome

Bei den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) handelt es sich um primäre maligne Tumoren des lymphatischen Gewebes, die zu 80 – 85 % der B-Zell-Reihe, zu 15 – 20 % der T-Zell-Reihe und seltener der Zellreihe der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) angehören (1).

Die klinische Manifestation der sich als heterogene Gruppe auszeichnenden NHL reicht von rein kutanen Erscheinungsformen bis hin zu einem systemischen Krankheitsbild mit Befall von Lymphknoten und extralymphatischen Organen sowie einem leukämischen Verlauf.

Die Zahl der jährlich neu Erkrankten beträgt nach Angaben des Robert-Koch-Instituts im Jahr 2002 in Deutschland etwa 12.100 (6.250 Frauen und 5.850 Männer) (1). Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 61 Jahren und für Frauen bei 64,7 Jahren (1). Die beobachtete 5- bzw. 10-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Männern 60 % bzw. 41 % und bei Frauen 63 % bzw. 44 % (Tumorregister München 2007).

Die Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome erfolgt prinzipiell nach den korrespondierenden Zellen der B-/T-Zell-Reifung unter Zuhilfenahme morphologischer, immunphänotypischer, (molekular-)genetischer und klinischer Befunde. Die aktuell gültige vierte Auflage der "WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues" der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 2008 ist eine Überarbeitung der Klassifikation von 2001, die dabei jedoch in ihrem Grundprinzip beibehalten und bestätigt wurde. Die vorgenommenen Änderungen betreffen die Integration neuer Entitäten oder provisorischer Kategorien, die Abgrenzung genetischer Subformen, die Präzisierung diagnostischer Kriterien sowie die Aufnahme neuer oder bestätigter Prognose-Indikatoren.

Wichtige Ergänzungen beziehen sich auch auf die Follikulären Lymphome (FL). So wurde z. B. unter Berücksichtigung der klinischen Relevanz das morphologische Grading revidiert (Zusammenfassung von Grad I und II) und das FL *in situ* definiert (s. u.) (1).

1.2 Das Follikuläre Lymphom

1.2.1 Definition

Das Follikuläre Lymphom (FL) ist ein indolentes B-Zell-Lymphom der Keimzentrumzellen, bestehend aus einer Mischung aus kleinen Zellen mit gekerbten Zellkernen (Zentrozyten) und großen blastären Keimzentrumzellen (Zentroblasten). Die Zentrozyten machen bei den FL Grad I/II den größten Anteil der Tumorzellen aus. Der Tumor zeigt typischerweise ein follikuläres und seltener ein diffuses Wachstumsmuster mit Zerstörung der normalen Lymphknotenarchitektur (1).

Das zytomorphologische Grading wird beim FL von der Anzahl eingestreuter Zentroblasten innerhalb eines Gesichtsfeldes (0,159 mm²) in starker Vergrößerung nach der Methode von Mann und Berard (2) bestimmt:

Grad I: 0 – 5 Zentroblasten/Gesichtsfeld,

Grad II: 6 – 15 Zentroblasten/Gesichtsfeld,

Grad III (a/b): > 15 Zentroblasten/Gesichtsfeld.

Grad I und II werden in der aktuellen WHO-Klassifikation von 2008 aufgrund fehlender tumorbiologischer Unterschiede zu einem Grad I/II zusammengefasst. Biologisch signifikante Unterschiede bestehen aber zwischen Grad IIIa und IIIb, was eine diesbezügliche Unterscheidung obligat macht. Grad IIIa mit (wenigen) verbleibenden Zentrozyten unterscheidet sich von Grad IIIb, bei dem der Tumor ausschließlich aus Zentroblasten besteht und damit dem Typ eines diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms mehr ähnelt als dem FL Grad I bis IIIa (1).

In der immunphänotypischen Charakterisierung sind die Tumorzellen typischerweise positiv für CD19, CD20 sowie CD22 und exprimieren die Keimzentrumsmarker CD10 sowie Bcl-6. In einer Färbung für CD23 sind in der Regel aufgesplitterte Netzwerke follikulärer dendritischer Zellen zu erkennen (1).

Charakteristisch für das FL ist die rekurrente chromosomale Translokation t(14;18)(q32;q21), die in 80 – 90 % der Fälle nachweisbar ist. Das Gen für das antiapoptotisch wirksame Onkogen *BCL2* (Chromosom 18) wird dabei an den Immunglobulinpromoter (Chromosom 14) gekoppelt, was zu einer konstitutionellen Überexpression von Bcl-2 und somit über eine Hemmung der Zellapoptose zur Akkumulation langlebiger Tumorzellen führt (3). Jüngste genetische Untersuchungen belegen aber, dass für eine klinische Manifestation des FL weitere – „sekundäre“ – genetische Alterationen notwendig sind (4).

In einzelnen Fällen können FL einen Übergang in ein aggressives NHL, typischerweise ein diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, vollziehen (sog. Richter-Transformation), was oft mit p53-Mutationen (Chromosom 17) oder weiteren chromosomalen Aberrationen assoziiert ist (5 – 6).

1.2.2 Epidemiologie

Follikuläre Lymphome stellen in der Gruppe der „indolenten“ Lymphome die häufigste Entität dar und machen etwa 30 % der Non-Hodgkin-Lymphome aus.

In Deutschland beträgt die Inzidenz sieben bis zehn Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr und ist in den letzten 30 Jahren stark angestiegen. In den USA wurde in den vergangenen zwei Dekaden eine nahezu dreifache Steigerung der Erkrankungsrate beobachtet. Am häufigsten sind Erwachsene im medianen Alter von 60 Jahren betroffen, wobei Frauen 1,7-mal häufiger als Männer erkranken (1).

1.2.3 Klinische Präsentation

Follikuläre Lymphome manifestieren sich mit einem vielgestaltigen klinischen Erscheinungsbild. Zwei Drittel der Patienten befinden sich bei Diagnosestellung bereits im klinischen Stadium III oder IV mit Infiltration abdominalen sowie thorakaler Lymphknotenstationen und der Milz. In 40 – 70 % der Fälle ist zudem das Knochenmark durch das Lymphom infiltriert (1). Der Tumor kann sich auch primär in extranodalen Geweben wie Gastrointestinaltrakt, Haut, Hoden oder Mamma manifestieren (1).

1.2.4 Das *BCL2*-Gen und die *t(14;18)(q32;q21)*-Translokation

Das *BCL2*-Gen (engl. „B-cell lymphoma 2“) kodiert ein Protein, das in der Chromosomenregion 18q21 lokalisiert ist (7). Dieses Bcl-2-Protein übt im Mitochondrium eukaryotischer Zellen – so auch während der Ontogenese der Keimzenterszellen – eine wichtige antiapoptotische Funktion aus (7).

Das Bcl-2-Protein blockiert die Erzeugung von Sauerstoffradikalen und die Aktivierung von Caspasen, wodurch die Induktion des Apoptosemechanismus wirksam verhindert wird.

Ursächlich für die aberrante Expression des Bcl-2-Proteins beim FL ist die Translokation des gesamten Bcl-2-kodierenden Bereichs an den *IgH*-Lokus auf Chromosom 14 (*t(14;18)(q32;q21)*), was zu einer starken Transkription des Gens führt. Das Bcl-2-Protein wird permanent exprimiert und erzeugt eine Blockade der Apoptose, in deren Folge der betroffene Zellklon expandiert (3).

In einer Studie von Yafei Liu et al. wurde dargelegt, dass *t(14;18)*-positive Zellen auch bei gesunden Individuen nachweisbar sind und ihre Häufigkeit in peripheren Blutlymphozyten und in der Milz signifikant mit dem Alter der Patienten ansteigt (8 – 10). Auch in vereinzelten Keimzentren reaktiver Lymphknoten von Patienten, die weder aktuell ein Lymphom noch eine Anamnese eines FL hatten, konnten bei 2,3 % der Individuen *t(14;18)*-positive B-Zellen nachgewiesen werden (11). Die Tatsache, dass nicht jedes

Individuum, bei welchem t(14;18)-positive Zellen nachgewiesen wurden, an einem Lymphom erkrankt, lässt darauf schließen, dass es weiterer Stimuli zur Entstehung eines manifesten Lymphoms bedarf.

1.3 Das Mantelzell-Lymphom

1.3.1 Definition

Mantelzell-Lymphome (MCL) sind B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome, die typischerweise aus monomorphen kleinen bis mittelgroßen lymphoiden Zellen mit unregelmäßigen Zellkernen bestehen (12). Genetische Landmarke ist hier die chromosomale Translokation t(11;14)(q13;q32), die zu einer konstitutionellen Überexpression des zellzyklusregulierenden Proteins Cyclin D1 führt (12). In jüngsten Untersuchungen wurden auch einzelne Cyclin-D1-negative Fälle identifiziert, die anstelle von Cyclin D1 dann Cyclin D2 oder D3 exprimierten (13). Verschiedene morphologische (mit diffusem, nodulärem, Marginalzonen- und selten follikulärem Wachstum) und zytologische (blastoid, pleomorph, kleinzellig, marginalzonenzellähnlich) Varianten werden gegeneinander abgegrenzt, wobei die blastoide und die pleomorphe Variante des MCL durch eine hohe Proliferationsrate gekennzeichnet und mit einem aggressiveren klinischen Verlauf assoziiert sind (12).

In der immunhistochemischen Analyse exprimieren die Tumorzellen weitgehend konstant die Pan-B-Zell-Marker CD19, CD20 und CD79a sowie aberrant den T-Zell-Marker CD5 sowie Cyclin D1. Negativ sind die malignen Zellen in der Regel für CD23 und die Keimzentrumsmarker CD10 und Bcl-6 (12). Oftmals ist auch eine IgM- oder IgD-Expression nachweisbar (12).

1.3.2 Epidemiologie

Das MCL macht ca. 3 – 10 % der NHL aus. Die Inzidenz beträgt 2 – 3 pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Das Mantelzell-Lymphom tritt gehäuft in einem

Alter zwischen 54 und 68 Jahren auf und es besteht eine deutliche männliche Präponderanz mit einer Ratio von 2:1 bis 7:1 (12).

1.3.3 Klinische Präsentation

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt bei 60 – 70 % der Patienten bereits ein fortgeschrittenes klinisches Stadium (Stadium III/IV) vor. In 90 % der Patienten finden sich extranodale Manifestationen, so z. B. in 75 % der Patienten eine Knochenmarkinfiltration, eine ausgeprägte Hepatosplenomegalie (25 %), eine Ausschwemmung im peripheren Blut (25 %) oder eine Infiltration des Magen-Darm-Trakts (12 – 17 %). Kürzlich wurde auch eine präklinische Manifestation beschrieben, d. h. MCL-Infiltrate, die erst nach Vorliegen der MCL-Diagnose retrospektiv in Geweben detektiert wurden, welche vor der diagnostischen Biopsie gewonnen worden waren. In 27 % der MCL-Patienten konnten solche Infiltrate zwischen 2 und 86 Monaten vor der MCL-Diagnose retrospektiv detektiert werden (14).

Der klinische Verlauf der Erkrankung ist im Vergleich zu anderen niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen zumeist aggressiver mit einer insgesamt schlechten Prognose, wobei die mittlere Überlebensdauer bei drei Jahren liegt und Langzeitüberlebende nur selten beobachtet werden (12).

1.3.4 Cyclin D1 und die t(11;14)(q13;q32)-Translokation

In der ganz überwiegenden Zahl der Fälle lässt sich beim Mantelzell-Lymphom die rekurrente chromosomale Translokation t(11;14)(q13;q32) nachweisen (12).

Durch diese Translokation gelangt das in der Chromosomregion 11q13 kartierte Onkogen *CCND1/PRAD1/BCL1*, welches das Regulatorprotein Cyclin D1 kodiert, in die Region 14q32 und steht hier unter transkriptioneller Kontrolle des Promoters der Immunglobulin-Schwerkette (*IgH-Gen*). Dies hat eine konstitutionelle Überexpression von Cyclin D1 mit konsekutiver Dysregulation des Zellzyklus zur Folge (15 – 16). Die aktiven Komplexe Cyclin D/CDK4 und

Cyclin E/CDK2 phosphorylieren das als Tumorsuppressor fungierende Retinoblastomprotein (Rb-Protein), wodurch der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt wird und Gene exprimiert werden, welche die Zelle aus der G1- in die S-Phase passieren lassen (17 – 20). In der Zelle wird dadurch die Vollendung des Zellzyklus veranlasst, was eine unkontrollierte klonale Zellexpansion zur Folge hat.

1.4 Vorläuferläsionen

Die Möglichkeit einer Vorläuferläsion bei hämatologischen malignen Neoplasien wurde zuerst bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL), einem niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zell-Reihe, in Betracht gezogen.

Die Beobachtung, dass eine monoklonale B-Zell-Lymphozytose (MBL) oft mit einer chronischen lymphatischen Leukämie oder einer anderen lymphatischen Neoplasie assoziiert ist, veranlasste eine Reihe von Forschungsgruppen, diese als potenzielle Vorläuferläsion einzustufen und daraufhin zu analysieren (21 – 23). Es ließ sich bestätigen, dass bei einer größeren Zahl von Patienten klonale B-Zellen mit einem CLL-Phänotyp bereits einige Jahre vor der Diagnose einer manifesten CLL zu finden sind. Der Verdacht, eine CLL manifestiere sich stets über die Vorläuferläsion MBL, ließ sich jedoch aufgrund der niedrigen Progressionsrate von 1 – 2 % pro Jahr nicht bestätigen (21).

Definitionsgemäß proliferieren Zellen bei In-situ-Lymphomen – lateinisch „in situ“ für „am (Ursprungs-)Ort“ – lediglich in einem sehr eingeschränkten Bereich um ihre physiologisch vorkommende anatomische Lokalisation, überschreiten die natürlichen Kompartimentgrenzen nicht und haben keinen Anschluss an das Blutgefäßsystem. Es ist daher schwierig, eine Vorläuferläsion für leukämisch verlaufende Lymphome wie die CLL zu definieren, da sich das Vorhandensein neoplastischer Zellen nicht auf ein bestimmtes Kompartiment beschränkt.

Weiterhin ist es bisher nicht möglich, für Lymphome, deren neoplastische Zellen keinen spezifischen Oberflächenmarker exprimieren, eine Vorläuferläsion zu definieren.

Bislang wurden potenziell präneoplastische Proliferationen des lymphatischen Gewebes, die immunphänotypisch und genetisch im strengeren Sinne die Kriterien für eine Vorläuferläsion erfüllen, im Wesentlichen für FL und MCL definiert und als In-situ-FL bzw. -MCL bezeichnet. Die Bezeichnung „in situ“ besagt dabei, dass die klonalen Proliferationen auf ihr physiologisches Kompartiment beschränkt sind, welches im Falle des FLIS dem Keimzentrum und im Falle des MCLIS der Mantelzone reaktiver Lymphfollikel entspricht.

Die klinische und biologische Wertigkeit dieser In-situ-Läsionen, die 2008 in die WHO-Klassifikation als Vorläuferläsionen aufgenommen wurden, ist noch weitgehend ungeklärt, ebenso wie die Frage nach der Entwicklung zu einem manifesten Tumor.

1.4.1 Das Follikuläre Lymphom *in situ*

Das Follikuläre Lymphom *in situ* (FLIS), das in der WHO-Klassifikation 2008 auch als intrafollikuläre Neoplasie bezeichnet wird, wurde 2002 zum ersten Mal in einer Studie von Cong et al. beschrieben (24). Eine Progression zu einem manifesten Lymphom wurde in Verlaufsstudien nur selten beobachtet (24 – 25).

Das FLIS bezeichnet eine Population monoklonaler B-Zellen, die das Keimzentrum reaktiver Lymphknoten kolonisiert und dabei das antiapoptotische Protein Bcl-2 unphysiologisch exprimiert sowie zumeist auch ungewöhnlich stark CD10 koexprimiert. Die Parenchymarchitektur des Lymphknotens bleibt dabei vollständig erhalten (24 – 26). Der starken Expression des Bcl-2-Proteins liegt die chromosomale Translokation t(14;18)(q32;q21) zugrunde, die sich auch in manifesten Follikulären Lymphomen nachweisen lässt.

Interessanterweise wurden auch im peripheren Blut gesunder Probanden ohne Anamnese oder manifestes FL t(14;18)(q32;q21)-positive („FL-ähnliche“) B-

Zellen nachgewiesen, und zwar in steigender Frequenz mit zunehmendem Lebensalter (27 – 28).

Die klinische und biologische Wertigkeit des FLIS in Bezug auf eine Progression zu einem manifesten Lymphom und somit die Frage, inwiefern es sich bei einem FLIS um einen präneoplastischen Befund handelt, bleibt bislang unklar. Therapeutische Konsequenzen der Diagnose FLIS ergeben sich bislang nur im Zusammenhang mit einem zeitgleich oder zeitversetzt auftretenden manifesten Lymphom (26).

Obwohl die t(14;18)-Translokation mit resultierender konstitutioneller Bcl-2-Überexpression das kennzeichnende genetische Ereignis in der Genese des FL ist, wird bislang angenommen, dass zusätzliche genetische Imbalancen für eine Expansion des malignen Klons zu einem manifesten FL erforderlich sind (4).

1.4.2 Das Mantelzell-Lymphom *in situ*

Das Mantelzell-Lymphom *in situ* (MCLIS) ist eine erst kürzlich beschriebene Läsion (29 – 30). Morphologisch ist diese Läsion durch (hyperplastische) Keimzentren gekennzeichnet, die von einer normalen Mantelzone umgeben sind, in welcher sich eine Population von Lymphozyten mit unregelmäßiger Kernkontur befindet. Immunhistochemisch kann das MCLIS durch eine nukleäre Expression von Cyclin D1 mit einer Koexpression von CD20 und einer schwächeren Koexpression von CD5 nachgewiesen werden. Die Cyclin D1 exprimierenden Zellen bleiben dabei definitionsgemäß und in Abgrenzung zu einem manifesten MCL mit Mantelzonen-Wachstumsmuster ausschließlich auf die nicht expandierte Mantelzone der Sekundärfollikel beschränkt (31 – 32).

Auch für das MCLIS ist bislang unklar, ob und in welchem Prozentsatz der Fälle es zu einem manifesten Lymphom wird oder ob es ohne weitere Progression als In-situ-Läsion im Organismus verbleibt.

1.4.3 Therapie der In-situ-B-Zell-Lymphome

Therapiemöglichkeiten, die sich im Falle eines diagnostizierten In-situ-B-Zell-Lymphoms ergeben können, werden in einer Leitlinie der WHO-Klassifikation 2008 (vgl. Tabelle 1) beschrieben. Entscheidend bei der Therapieführung ist dabei die Frage nach dem Vorhandensein eines an anderer Stelle befindlichen oder zeitlich zurückliegenden manifesten Lymphoms.

	Klinische Bedeutung	Therapiemöglichkeiten
FL <i>in situ</i>		
Kein manifestes Lymphom diagnostiziert	Indolent	Verlaufskontrolle
Zusätzlich manifestes Lymphom diagnostiziert	Synchron auftretend (Infiltration des FLIS durch gleichzeitig vorhandenes FL)	Therapie wie beim FL
	Metachron auftretend (Jahre zurückliegendes FL oder assoziiert mit anderem Lymphom (DLBCL, SMZL, MCL und cHL))	<ul style="list-style-type: none"> • Biopsie • Therapie wie beim FL • FLIS steht unter Beobachtung
MCL <i>in situ</i>		
Kein manifestes Lymphom diagnostiziert	Teilweise indolent	Engmaschige Verlaufskontrolle
Zusätzlich manifestes Lymphom diagnostiziert	Synchron auftretend (gleichzeitig mit MCL oder FL)	Therapie wie beim MCL
	Metachron auftretend (fortschreitendes Auftreten; aggressives Verhalten)	<ul style="list-style-type: none"> • Biopsie • Therapie wie beim MCL • MCLIS steht unter Beobachtung

Tabelle 1. Revidierte klinikopathologische Leitlinie zur Therapie der *In-situ*-B-Zell-Lymphome; WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (2008) (33) (DLBCL: Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, SMZL: Splenisches Marginalzonen-Lymphom, cHL: klassisches Hodgkin-Lymphom).

1.5 Ziel und Fragestellung der Arbeit

Zur Prävalenz des Follikulären sowie des Mantelzell-Lymphoms *in situ*, ihrer klinischen und biologischen Einordnung und der Frage, ob es sich dabei um die früheste Manifestation eines entsprechenden Lymphoms und damit um einen präneoplastischen Befund handelt, gibt es bisher nur wenige Daten.

Bei der Diagnose In-situ-Lymphom handelt es sich aufgrund fehlender klinischer Symptomatik häufig um einen Zufallsbefund.

Im Jahre 2002 stellten Cong et al. 23 Patientenfälle vor, in welchen ein FLIS identifiziert wurde. Dabei waren 44 % dieser Fälle mit einem manifesten oder im weiteren klinischen Verlauf nachgewiesenen FL assoziiert (24).

In einer weiteren Studie von Henopp et al. wurde das FLIS mit einer Häufigkeit von 2,3 % (3/132 Patienten) nachgewiesen. Hier bestand bei keinem der Patienten eine Anamnese oder eine Diagnose eines manifesten Lymphoms (11).

Auch zum MCLIS existieren bisher nur Untersuchungen, in welchen einzelne Fälle von In-situ-Läsionen des MCL exemplarisch dargestellt wurden, ohne dabei näher auf die Häufigkeit einzugehen, bei wie vielen Patienten mit manifestem MCL auch die In-situ-Form nachgewiesen werden kann (29 – 30).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, zum ersten Mal die Prävalenz des Follikulären Lymphoms *in situ* (FLIS) sowie des Mantelzell-Lymphoms *in situ* (MCLIS) bei Patienten mit entsprechendem manifestem Lymphom retrospektiv festzustellen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gewebe von Patienten mit bekanntem manifestem Follikulärem Lymphom bzw. Mantelzell-Lymphom

Aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen wurden zunächst diejenigen Patienten aus den Jahren 2000 bis 2010 ermittelt, bei denen ein FL bzw. ein MCL diagnostiziert wurde. Anschließend wurden aus dem Archiv sämtliche bereits analysierten Gewebeproben dieser Patienten herausgesucht. Zur Identifikation eines möglichen FLIS wurden dann alle Präparate immunhistochemisch für Bcl-2 gefärbt, in denen lichtmikroskopisch lymphatisches Parenchym mit Sekundärfollikeln erkennbar war.

Für die Suche nach MCLIS in Geweben von Patienten mit bekanntem MCL wurden zusätzlich zu den verfügbaren Geweben mit lymphatischem Parenchym auch alle Gewebe mit extranodalen Lymphozytenansammlungen herangezogen und immunhistochemisch für Cyclin D1 gefärbt.

In den gefundenen In-situ-Läsionen wurden die charakteristischen chromosomalen Bruchereignisse im *BCL2*-Genlocus (beim FL) bzw. im Cyclin-D1-Genlocus (beim MCL) mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) nachgewiesen.

Um festzustellen, ob es sich bei dem untersuchten Gewebe der In-situ-Läsion um eine Vorläuferläsion handelt, wurde bei ausreichend vorhandenem Material eine vergleichende Klonalitätsanalyse zwischen Geweben des manifesten Tumors und der In-situ-Läsion durchgeführt.

2.1.2 Verwendete Reagenzien für die immunhistochemischen Verfahren

Avidin-Biotin-Komplex

Avidin (A) und biotinylierte Meerrettichperoxidase (B) (Firma Dako, Glostrup, Dänemark) wurden gelöst. Dreißig Minuten vor Gebrauch wurden 5 µl Lösung (A) und 5 µl Lösung (B) mit 1000 µl TBS-Gebrauchslösung angesetzt. Der pH-Wert der eingestellten Lösung betrug 7,2.

Citratpuffer

Zunächst wurde 21,1 g Zitronensäure-Monohydrat (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1000 ml Aqua dest. gelöst, was einer 0,1 M Lösung entspricht, und auf einen pH-Wert von 6 eingestellt (Stammlösung). Danach wurde die Citratpuffer-Stammlösung mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnt (Gebrauchslösung).

DAB-Lösung

Es wurden 95 mg DAB (3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid) (Firma Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) in 180 ml Aqua dest. gelöst, es folgten 20 ml Substratpuffer (10-fach) und 700 µl Wasserstoffperoxid (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland).

Hämalaunlösung (nach Mayer)

Zur Herstellung der sauren Hämalaunlösung wurde 1 g Hämatoxylin in 1000 ml Aqua dest. gelöst und mit 0,2 g Natriumjodat und 50 g Aluminiumkaliumsulfat gemischt. Nach Zugabe von 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure entstand durch Schütteln eine violette Lösung.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

In der Lösung waren 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid und 12 mM Gesamt-Phosphat enthalten. Die eingestellte Pufferlösung hatte einen pH-Wert von 7,4.

Poly-L-Lysin-Lösung

Es wurden 5 mg Poly-L-Lysin (Firma Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) in 50 ml Aqua dest. gelöst.

Substratpuffer für die DAB-Lösung

In 500 ml Aqua dest. wurden 21 g Zitronensäure-Monohydrat (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland), 34 g Imidazol (Firma Fluka, Neu-Ulm, Deutschland) und 29,2 g Natriumchlorid gelöst. Der pH-Wert betrug 7,0.

TRIS-Puffer

In 1000 ml Aqua dest. wurden 60,5 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) und 90 g Natriumchlorid gegeben. Die so angesetzte Lösung wurde mit 2 N Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt (Stammlösung). Die Gebrauchslösung wurde durch eine Verdünnung der Stammlösung mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 hergestellt.

TRIS-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)

Für die Gebrauchslösung wurden 100 ml Stammlösung TRIS mit 900 ml physiologischer Kochsalzlösung gemischt.

2.1.3 Verwendete Reagenzien für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

DAPI-Lösung

Es handelte sich um eine Lösung von 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (Firma Vysis, Downers Grove, USA).

Hybridisierungspuffer

Aus 18 ml 5 M Natriumchlorid, 2 ml 1 M salzsaurem Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 50 ml Formamid, 30 ml Aqua bidest. und 0,1 ml Natriumdodecylsulfat (10 %) wurden 100 ml des Hybridisierungspuffers mit 50%iger Formamidkonzentration hergestellt.

Natriumcitrat-Lösung

Es wurden 29,4 g Trinatriumcitrat-Dihydrat (99 %) in 850 ml Aqua dest. gegeben. Die entstehende Lösung wurde mit Zitronensäure (2,1 g in 100 ml Aqua dest.) auf einen pH-Wert von 6 eingestellt (Stammlösung). In der Verdünnung 1:10 ergab sich die Gebrauchslösung.

Nonidet-P-40-Lösung (NP-40)

Diese Lösung diente als Vorbehandlungsdetergenz (Firma Vysis, Downers Grove, USA).

Pepsin-Puffer

Mit 920 µl autoklaviertem Wasser und 80 µl Pepsin (100 mg/ml) wurde eine Lösung hergestellt, die mit 1 N Salzsäure auf einen pH-Wert von 2,0 eingestellt wurde.

Saline-Sodium Citrate (SSC)

Es wurden 175,32 mg/ml Trinatriumcitrat-Dihydrat und 88,23 mg/ml Natriumchlorid in Aqua dest. gegeben. Anschließend wurde die Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Anfertigung von ultradünnen Paraffin-Gewebeschnitten

Für die immunhistochemischen Verfahren wurden von den formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcken am Mikrotom 2 – 4 µm dünne Schnitte angefertigt und auf zuvor mit Poly-L-Lysin-Lösung benetzten Objektträgern aufgebracht. Die gefertigten Schnitte wurden bei 60 °C über Nacht im Brutschrank getrocknet.

2.2.2 Immunhistochemische Verfahren

Die Schnittpräparate wurden in folgender absteigender Alkoholreihe entparaffinisiert:

- Inkubation für 2 x 10 Minuten in Xylol
- Inkubation für 2 x 5 Minuten in 99%igem Ethanol
- Inkubation für 1 x 5 Minuten in 90%igem Ethanol
- Inkubation für 1 x 10 Minuten in 80%igem Ethanol
- Inkubation für 1 x 10 Minuten in 70%igem Ethanol
- Zweimalige Spülung mit Aqua dest.

Die Antigene Bcl-2 und Cyclin D1 wurden mittels der Avidin-Biotin-Komplex(ABC)-Methode dargestellt.

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität wurden die Schnitte für 30 Minuten in eine Lösung aus 200 ml Ethanol und 6 ml Wasserstoffperoxid (30%ige Lösung) gegeben, mit destilliertem Wasser abgespült und anschließend einer Mikrowellenbehandlung zugeführt. Die Schnitte wurden hierbei in 10 mM Citratpuffer eingestellt. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt.

Nach einer Abkühlzeit von 20 Minuten sowie einer Spülung mit TRIS-Puffer (Gebrauchslösung) wurde ein Avidin-Biotin-Block zur Vermeidung

MATERIAL UND METHODEN

unspezifischer Farbreaktionen durchgeführt. Dieser erfolgte durch Inkubation mit 1 ml PBS und 4 Tropfen Avidin bei Raumtemperatur (RT) für 15 Minuten, anschließender Spülung mit PBS und weiterer Inkubation von 15 Minuten bei RT mit 1 ml PBS und 4 Tropfen Biotin.

Die Primärantikörper wurden vor der Applikation mit PBS verdünnt (vgl. Tabelle 2) und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die mit Anti-Bcl-2-Antikörpern behandelten Schnitte wurden nach der einstündigen Inkubation über Nacht im Kühlschrank belassen, bevor sie der weiteren Behandlung zugeführt wurden.

Antigen (Ak)	Spezifität	Verdünnung mit 1 x PBS	Bezugsquelle
Bcl-2-Ak	Monoklonal	1:50	Firma Dako (Glostrup, Dänemark)
Cyclin-D1-Ak	Monoklonal	1:40	Firma DCS (Hamburg, Deutschland)

Tabelle 2. Verwendete Antikörper

Nach einer Spülung in PBS bei RT für 30 Minuten erfolgte eine Inkubation mit dem biotinylierten Brückenantikörper, einem 1:100 verdünntem biotinyliertem Maus-Sekundärantikörper (Vector Laboratories). Danach wurden die Schnitte erneut mit PBS gespült und wiederum 30 Minuten bei RT mit Elite-ABC (Vectastain Elite ABC-Kit, Vector Laboratories) inkubiert.

Anschließend erfolgte die Farbreaktion mit DAB-Lösung. Hierzu wurden 0,1 g DAB in 100 ml TRIS-Salzsäure gelöst, nach Filtration der Lösung wurden 100 µl Wasserstoffperoxid hinzugegeben und unmittelbar danach die Schnitte für 5 – 7 Minuten eingestellt. Nach der Färbezeit wurden die Präparate in Leitungswasser gespült und in Aqua dest. eingestellt.

Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte in saure Hämalaunlösung (nach Mayer) 5 bis 10 Sekunden eingestellt und anschließend in Leitungswasser gebläut.

Abschließend wurden die Präparate mit Aqua dest. gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Entellan (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

2.2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Zum Nachweis eines genetischen Bruchereignisses im *BCL2*- bzw. Cyclin-D1-Genlocus in den identifizierten FLIS- bzw. MCLIS-Läsionen wurde eine Interphase-FISH am Paraffinmaterial durchgeführt. Methodisch wird hierbei der entsprechende Genlocus im Interphase-Zellkern mit zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierten spezifischen Sonden (s. u.) flankiert. Bei der hier durchgeführten Untersuchung handelt sich um eine *Break-apart*-Analyse mit rot-grüner Sondenkombination, die im Falle des Vorliegens eines Bruchereignisses im betreffenden Genort ein Auseinanderweichen eines der beiden normalerweise kolokalisierten Sondenpaare zeigt.

Verwendete FISH-Sonden:

- FLIS: Vysis LSI *BCL2* Dual Color Break Apart Rearrangement Probe, Abbott Molecular, Wiesbaden, Deutschland
- MCLIS: Vysis LSI *CCND1* Dual Color Break Apart Rearrangement Probe, Abbott Molecular, Wiesbaden, Deutschland

Die Entparaffinisierung der Schnitte erfolgte bei RT in drei Zeitintervallen zu je 10 Minuten durch Eintauchen in ein Xylol-Bad. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für 5 Minuten bei RT in Ethanol (100 %) dehydriert und mindestens 5 Minuten an der Luft getrocknet.

Nach Benetzung der Präparate mit einer Natriumcitrat-Lösung wurden diese 40 Minuten bei 95 °C in feuchter Kammer inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei RT mit Aqua dest. gewaschen.

Mithilfe eines Pepsin-Puffers, der auf die Schnitte aufgetragen wurde, wurden die Gewebe auf den Objektträgern im Wasserbad bei 37 °C für 4 Minuten zur Proteolyse angedaut. Nach dem Andau wurden die Schnitte im Wasserbad bei 72 °C zweimal für 10 Minuten mit SSC gewaschen.

Die Dehydrierung erfolgte anschließend bei RT in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70%igem, 80%igem und 100%igem Ethanol für jeweils zwei Minuten.

Die Präparate wurden 5 Minuten luftgetrocknet.

Nun wurde die Sondenlösung vorbereitet, die zunächst im Dunkeln bei RT 10 Minuten aufgetaut wurde. Im Anschluss wurde 1 µl Sondenlösung mit 7 µl Hybridisierungspuffer und 2 µl Aqua dest. gemischt und in einem Wasserbad bei 74 °C für 5 Minuten denaturiert.

Es wurden nun je 1,2 µl des Sondengemisches auf das zu untersuchende Areal des auf dem Objektträger befindlichen Präparats pipettiert, mit einem Deckglas (Ø 10 mm) eingedeckt und mit Fixogum (Klebstoff, Firma Marabu) luftdicht versiegelt. Die Objektträger wurden bei 37 °C über Nacht (mindestens 15 Stunden) in einer feuchten Kammer hybridisiert.

Um die hybridisierte Region unter dem Fluoreszenzmikroskop leichter aufzufinden, wurde die Lage des Deckglases auf der Rückseite des Objektträgers mit einem Glasschneider markiert und schließlich Fixogum und Deckglas entfernt.

Im Dunkeln wurden die Präparate dann zweimal 10 Minuten in SSC bei RT gewaschen. Die Posthybridisierungswaschung erfolgte in einer auf 72 °C vorgewärmten Waschlösung (2 x SSC/0,3 % NP-40) für 5 Minuten und anschließend in 2 x SSC für 10 Minuten bei RT.

Daraufhin erfolgte eine Dehydrierung für jeweils eine Minute in 70%igem, 85%igem und 100%igem Ethanol. Abschließend wurden die Präparate bei RT im Hängeschrank für mindestens 15 Minuten getrocknet, bevor eine Kerngegenfärbung der Schnitte mit 3,2 µl DAPI-Lösung und die erneute

Abdeckung mit einem Deckgläschen erfolgten. Die fertigen Objektträger wurden im Kühlschrank (4 °C) abgedunkelt aufbewahrt.

Die erhaltenen Präparate wurden mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss Axio Imagers; Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland) analysiert. In jedem Fall wurden dazu 100 Zellen bezüglich eines Auseinanderweichens eines physiologischerweise kolokalisierten Sondenpaars ermittelt. Ein solches Auseinanderweichen wurde als Nachweis eines Bruchereignisses in dem betreffenden Genort gewertet. Die Schwellenwerte für beide Probensets wurden an jeweils zehn reaktiven Tonsillen bestimmt (Median \pm 3 x Standardabweichung).

2.2.4 Vergleichende Klonalitätsanalysen

In Fällen, in denen ausreichend Gewebe des In-situ- sowie des manifesten Lymphoms zur Verfügung stand, wurde eine vergleichende molekularpathologische Klonalitätsanalyse durchgeführt, um zu bestimmen, ob es sich um zwei Manifestationen desselben Tumors oder um eine Vorläuferläsion und den resultierenden manifesten Tumor handelt. Dazu wurde aus 10 µm dünnen Paraffinschnitten nach Laser-Mikrodissektion (Palm Robot-Micro Beam, Wolfratshausen, Deutschland), Entparaffinierung und Proteinase-K-Verdau eine Standard-Phenol/Chloroform-DNA-Aufreinigung durchgeführt.

Anschließend wurde die PCR für die FR2- und FR3-Regionen des Immunglobulin-Schwerkettenlokus unter Einsatz von 0,5 IU Phusion Hot Start DNA-Polymerase und 200 ng genomischer DNA (Firma Finnzymes, Woburn, USA) (33) durchgeführt. Dabei wurden geringfügig modifizierte Amplifizierungsbedingungen mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 98 °C (30 Sekunden) und 40 Zyklen (10 Sekunden bei 98 °C, 30 Sekunden bei 60 °C, 30 Sekunden bei 72 °C) angewendet. Der JH-Primer wurde mit D4-Fluoreszenzfarben (Firma Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) modifiziert. Für die anschließende *Genescan*-Analyse wurden 0,5 µl der PCR-Produkte mit einer *Sample Loading Solution* gemischt, die 0,24 µl DNA Size Standard 400

MATERIAL UND METHODEN

(Firma Beckman Coulter, Brea, USA) enthielt. Die Produkte wurden mittels Kapillarelektrophorese auf dem GenomeLab GeXP Genetic Analysis System aufgetrennt und mit Hilfe der GenomeLab GeXP Software 10.2 (Firma Beckman Coulter, Brea, USA) analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Prävalenz von In-situ-Läsionen in Patienten mit bekanntem Follikulärem Lymphom

Im Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen wurden 132 Patienten aus den Jahren 2000 bis 2010 identifiziert, bei denen ein manifestes FL diagnostiziert wurde.

Von 30 dieser Patienten lagen weitere Gewebeproben vor, die lymphatisches Parenchym mit Keimzentrumsstrukturen aufwiesen. Es handelte sich dabei durchweg um lichtmikroskopisch reaktive und nichtneoplastische Keimzentren. In der immunhistochemischen Färbung für Bcl-2 konnten in insgesamt 6 dieser 30 Patienten auf reaktive Keimzentrumsstrukturen beschränkte, kräftig zytoplasmatisch Bcl-2 überexprimierende B-Zellen im Sinne eines FLIS identifiziert werden. In der ergänzend durchgeführten FISH mit das *BCL2*-Gen flankierenden Sonden fand sich in diesen immunhistochemisch stark Bcl-2-positiven Zellen ein Auseinanderweichen eines der beiden Sondenpaare. Dieses Ergebnis dient als Nachweis eines stattgefundenen Bruchereignisses im *BCL2*-Genlocus und dient somit als Indiz für die chromosomale Translokation t(14;18)(q32;q21).

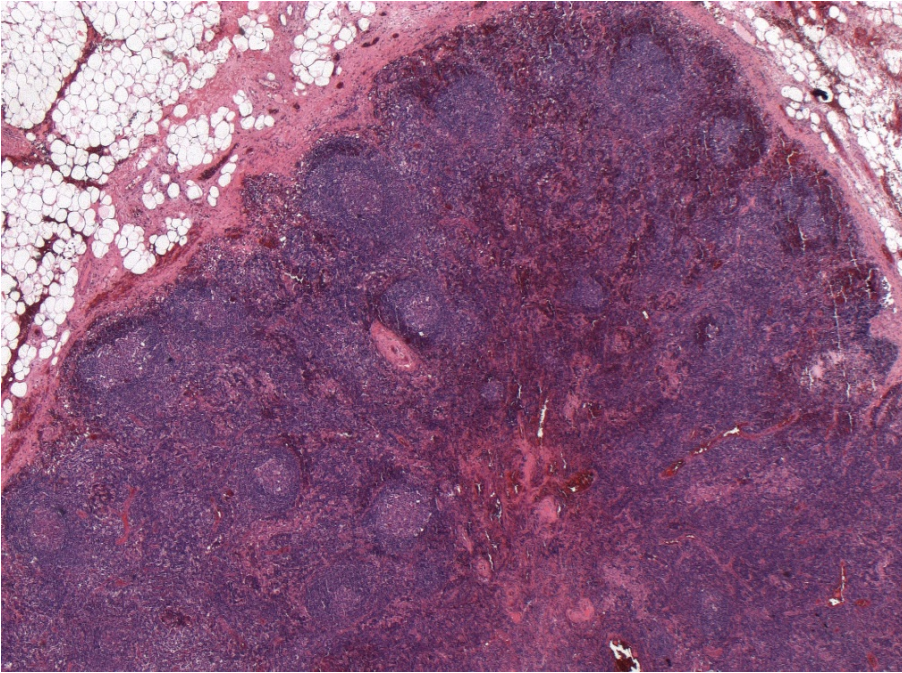


Abb. 1a. Konventionell-lichtmikroskopisch offenbaren die betreffenden Lymphknoten eine vollständig erhaltene Architektur mit regelhafter Gliederung in Mark und Rinde und regelhaft verteilten Foli­keln, die scharf abgegrenzte Mantelzonen erkennen lassen (HE-Färbung, 25 x).

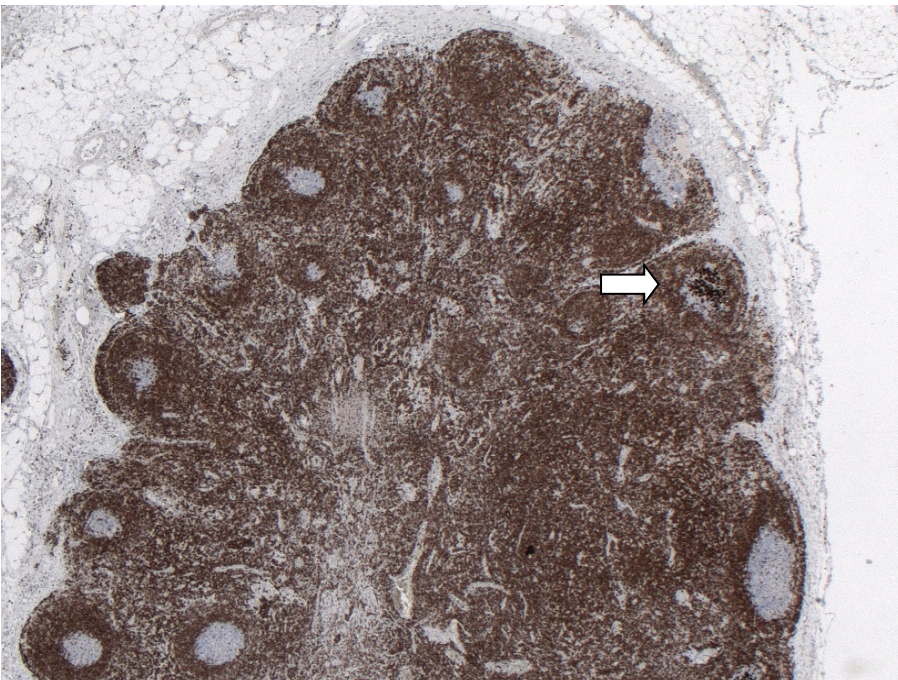


Abb. 1b. In der immunhistochemischen Färbung für das Bcl-2-Protein bleiben die reaktiven Keimzentren der Foli­kel negativ, während die lymphoiden Zellen außerhalb der Foli­kel eine

regelmäßige Bcl-2-Expression zeigen. Die Infiltrate des FLIS (Pfeil) fallen durch eine besonders starke Bcl-2-Expression auf und sind streng auf Keimzentrumstrukturen beschränkt.

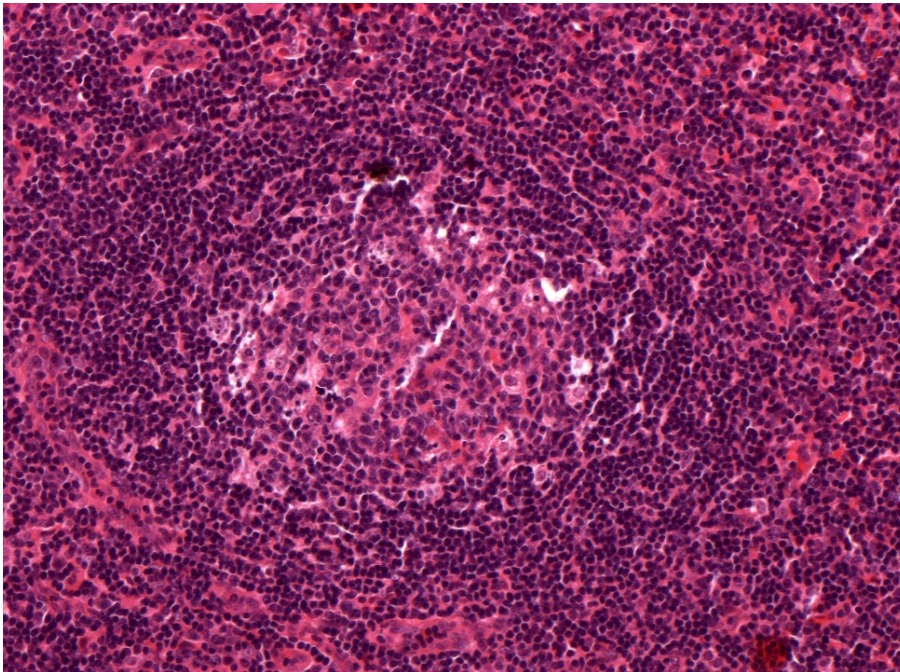


Abb. 2a. In der konventionellen Histologie lassen die reaktiven Follikel der Patienten mit bekanntem FL keine morphologisch fassbaren Auffälligkeiten erkennen (HE-Färbung, 200 x).

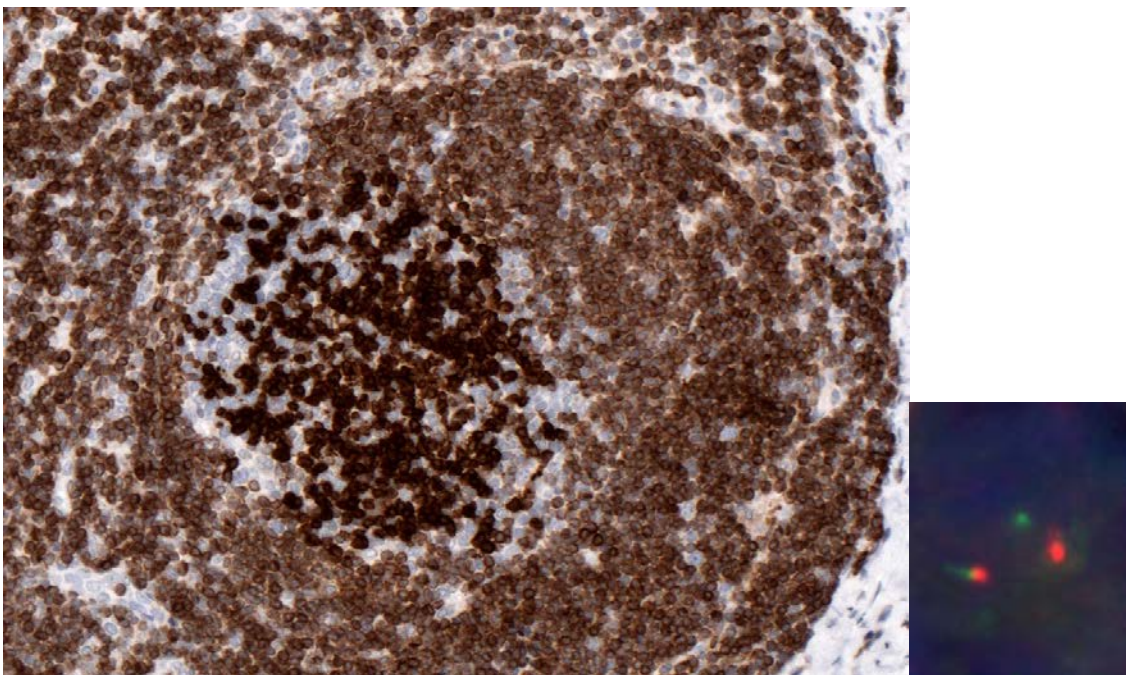


Abb. 2b. Erst in der immunhistochemischen Analyse sind innerhalb präexistenter Keimzentrumstrukturen B-Zellen nachweisbar, die eine atypisch kräftige Bcl-2-Expression

dokumentieren und einem typischen FLIS entsprechen. In der FISH-Analyse zeigt sich ein Bruchereignis im *BCL2*-Genlokus als Auseinanderweichen eines der beiden Sondenpaare als Hinweis auf die Translokation t(14;18) (kleine Abbildung).

3.1.1 Klinische Daten FLIS

Von den 6 Patienten, bei denen ein FLIS diagnostiziert werden konnte, waren 4 weiblich und 2 männlich mit einem Altersmedian von 61 Jahren zum Zeitpunkt der Diagnose.

Fall	Jahrgang/ Geschlecht	Lokalisation des FLIS	Zeitpunkt Diagnose FLIS	Zeitpunkt Diagnose FL	Grad FL	Andere Malignome; Begleit- erkrankungen
1	1958/w	Zervikaler LK	2006	2006	3	Keine
2	1949/m	Regionäre LK, Lungenober- lappen	2009	2008	1/2	Adenokarzinom der Lunge
3	1945/m	LK, Omentum majus	2006	2002	3a	Adenokarzinom, Magen und Ösophagus
4	1942/w	Zervikaler LK	2003	2003	1/2	EBV-negatives DLBCL; Tuberkulose
5	1928/w	LK, Mamma	2009	2004	1/2	Invasiv-duktales Mammakarzinom
6	1951/w	LK, sub- mandibulär	2006	2008	1/2	Keine

Tabelle 3. Klinische Daten der Patienten mit bekanntem manifestem FL, bei denen retrospektiv in weiteren Geweben ein FLIS nachgewiesen werden konnte. (FL: Follikuläres Lymphom, FLIS: Follikuläres Lymphom *in situ*, w: weiblich, m: männlich, LK: Lymphknoten, DLBCL: diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, Gradeinteilung nach WHO).

3.2 Prävalenz von In-situ-Läsionen in Patienten mit manifestem Mantelzell-Lymphom

Bei der retrospektiven Archivsuche der Jahre 2000 bis 2010 fanden sich insgesamt 138 (47 weibliche und 91 männliche) Patienten mit einem manifesten MCL.

Von diesen 138 Patienten waren von 59 Personen weitere Gewebeproben außer den Biopsien verfügbar, an denen die Diagnose gestellt worden war. In den Präparaten von 5 dieser Patienten waren Lymphfollikel nachweisbar. In der immunhistologischen Analyse dieser 5 Fälle fand sich ein Fall mit Infiltraten Cyclin-D1-positiver B-Zellen, die sich in der Mantelzone reaktiver Follikel ausbreiteten. Es handelte sich um ein Rektosigmoidresektat eines 76-jährigen Patienten mit einem mäßig differenzierten Adenokarzinom des Kolons (pT3, pN0, pMx, R0, G2). Die Cyclin-D1-positiven B-Zellen waren in den mesenterialen Lymphknoten und in der Mukosa der mitübersandten Appendix nachweisbar (s. Abb. 3b). Wegen der deutlichen Expansion der Mantelzone, die zu einer Alteration der Architektur des lymphatischen Parenchyms geführt hatte, wurde hier ein manifestes MCL mit Mantelzonenwachstum und kein MCLIS diagnostiziert. Letztere Diagnose setzt eine vollständig erhaltene und nicht expandierte Mantelzone voraus (32).

Ausgehend von dieser Beobachtung wurden ergänzend retrospektiv auch alle extranodalen lymphozytären Infiltrate der Patienten mit bekanntem MCL nach präklinischen MCL-Manifestationen mittels MCL-Immunhistochemie analysiert.

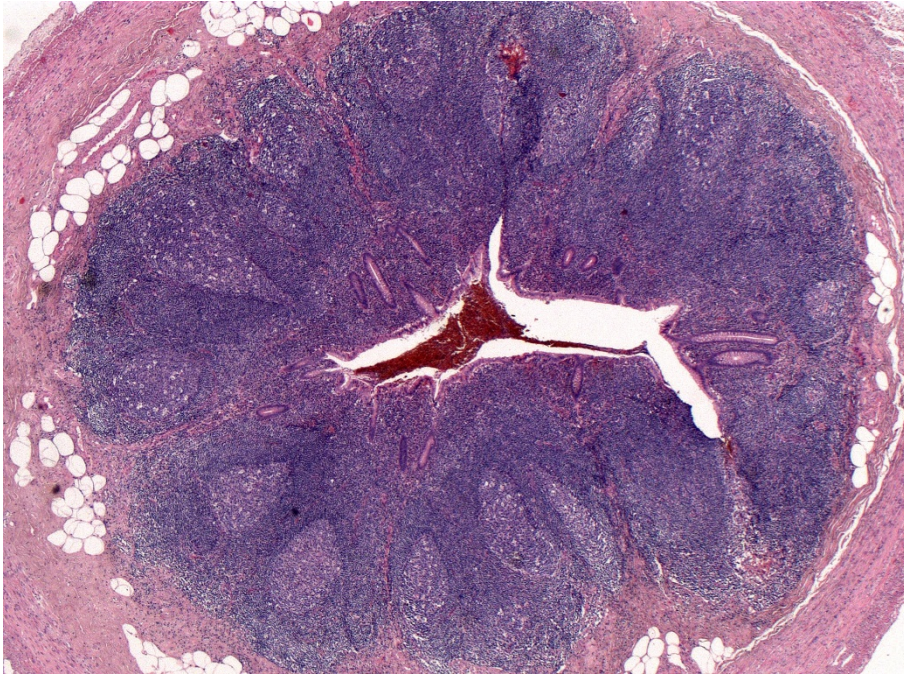


Abb. 3a. Das Appendektomiepräparat des Patienten mit Kolonkarzinom zeigte in der Übersichtshistologie eine vollständig erhaltene Architektur (HE-Färbung, 25 x).

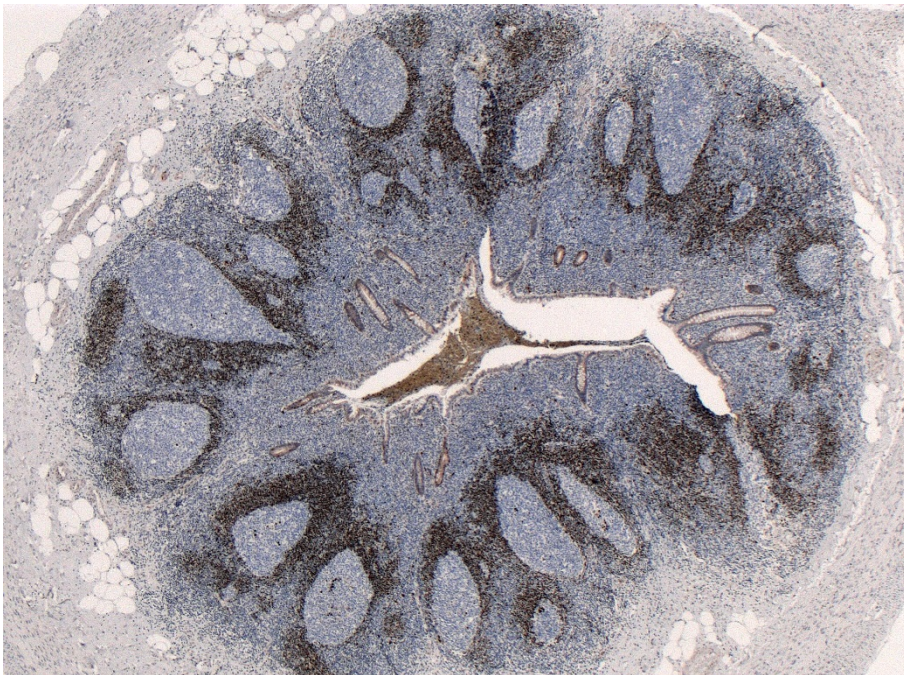


Abb. 3b. Erst in der immunohistochemischen Färbung für Cyclin D1 kommen die stark nukleär Cyclin D1 exprimierenden B-Zellen zur Darstellung, welche die Mantelzonenstrukturen reaktiver Lymphfollikel kolonisieren. Wegen der doch signifikanten Expansion der Mantelzonenstrukturen wurde die Läsion nicht als MCLIS, sondern als manifestes MCL mit Mantelzonenwachstum eingeordnet (Immunperoxidase Cyclin D1, 25 x).

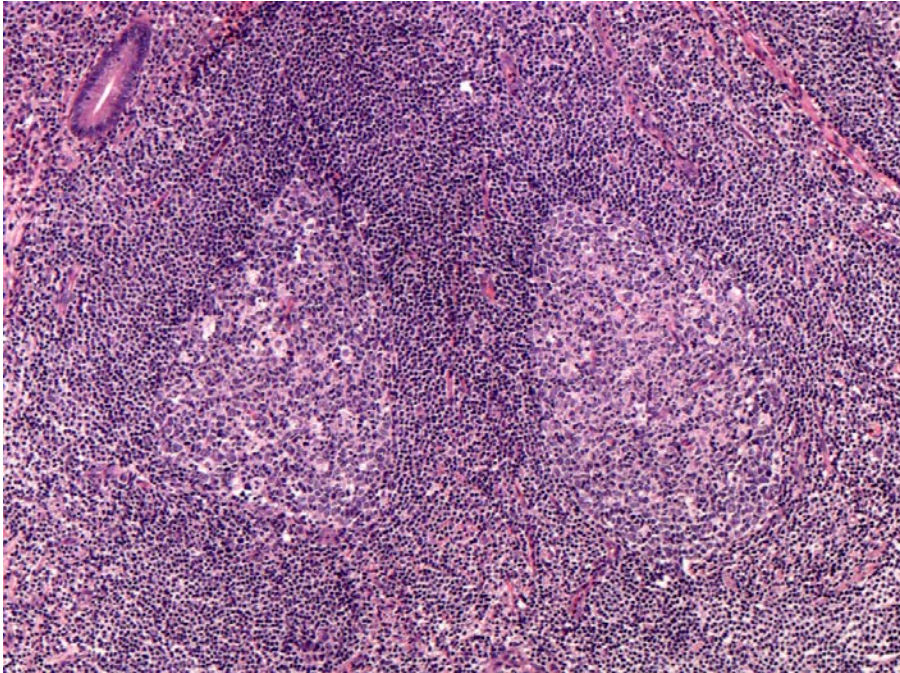


Abb. 3c. Auch in der Detailaufnahme zweier Follikel ist eine vollständig erhaltene Mikroarchitektur mit scharf abgegrenzter Mantelzone erkennbar (HE-Färbung, 100 x).

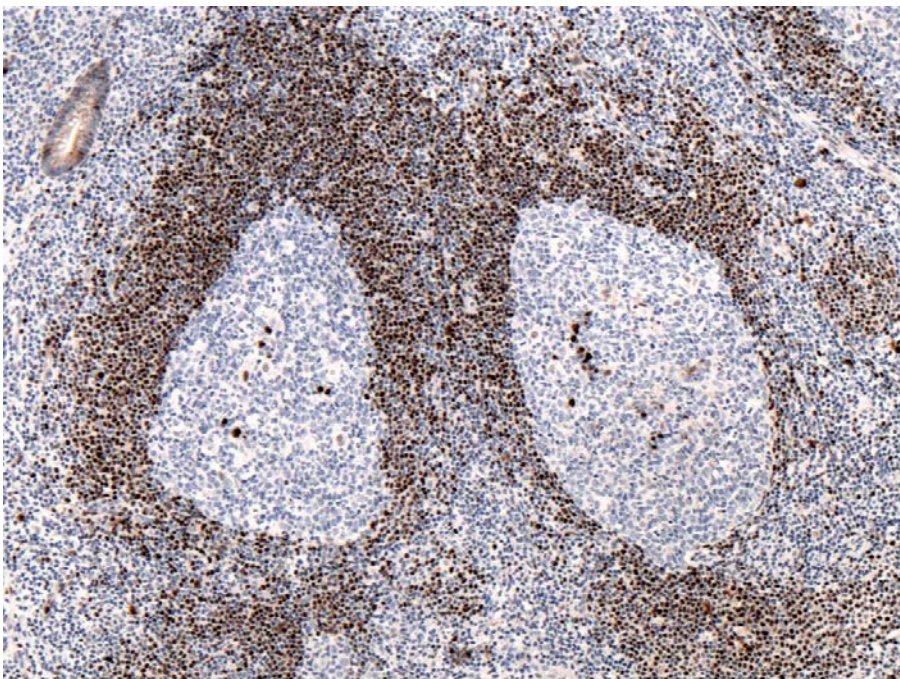


Abb. 3d. In der immunhistologischen Färbung für Cyclin D1 zeigen sich die auf die Mantelzonenstrukturen beschränkten Infiltrate, die allerdings zu einer Expansion dieser Strukturen geführt haben, welche nicht (mehr) mit der Diagnose eines MCLIS vereinbar ist.

3.2.1 Präklinische MCL-Manifestationen in extranodalen lymphatischen Infiltraten in Geweben von MCL-Patienten

Von insgesamt 15 der 138 MCL-Patienten (10,9 %) lagen zusätzliche Gewebeproben mit signifikanten extranodalen lymphozytären Infiltraten vor der Etablierung der MCL-Diagnose vor (insgesamt 33 Präparate; durchschnittlich 2,2 Schnittpräparate pro Patient).

In der durchgeführten immunhistochemischen Analyse fanden sich in 4 Fällen (je ein Schnittpräparat pro Patient) Cyclin-D1-positive Tumorzellen des jeweils bekannten Mantelzell-Lymphoms. Das quantitative Spektrum reichte dabei von einzelnen in ein reaktives chronisch-entzündliches Infiltrat eingestreuten Zellen bis zu dichten Infiltraten, die in der ursprünglichen Diagnostik als chronisches Entzündungsinfiltrat gewertet worden waren und nach der retrospektiven Detektion als „präklinische“ Manifestation des MCL angesehen werden müssen (vgl. Tabelle 4).

Fall	Jahrgang/ Geschlecht	Organ	Zeit- punkt Organ- befall	Lokalisation MCL	Zeitpunkt Diagnose manifest. MCL	Monate bis manifest. MCL
1	1919/w	Divertikulitis mit Adnexe manifest	Okt. 07	Beckenkamm- trepanat	Nov. 07	2
2	1928/w	Chron. Bursitis präpatell. manifest	Jan. 03	Zervikaler LK	Feb. 03	2
3	1939/m	Leiomyom. Blasentumor	Okt. 05	Beckenkamm- trepanat	Sep. 10	59
4	1944/m	Papill. Urothel- CA	Mrz. 02	Beckenkamm- trepanat	Mai 03	14

Tabelle 4. Klinische Daten der Fälle mit retrospektiv detektierter präklinischer MCL-Manifestation.

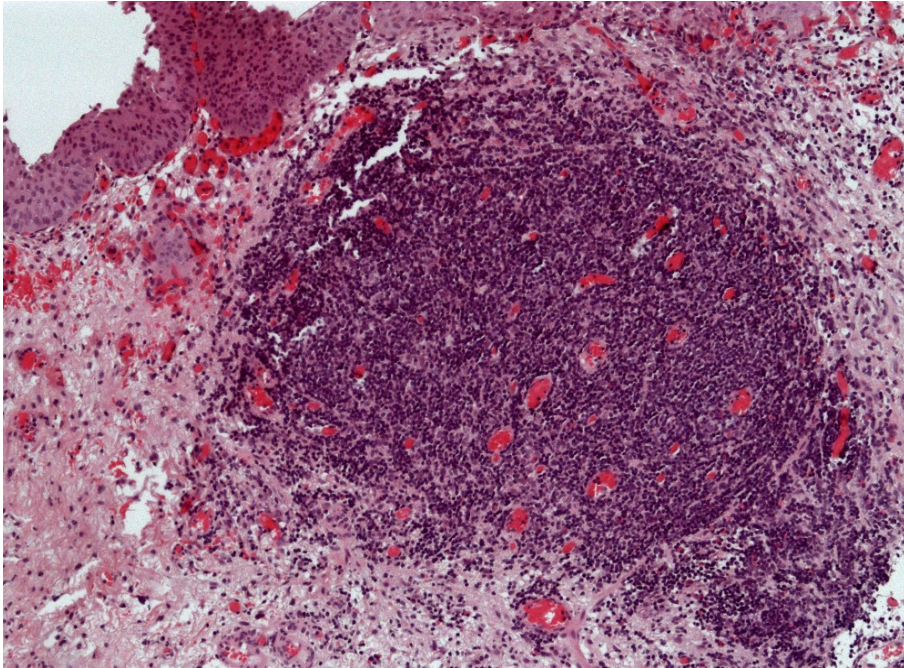


Abb. 4a. Ein lymphozytäres Infiltrat, das in der konventionellen histopathologischen Analyse als reaktiv befundet worden war (Fall 4; HE-Färbung, 100 x).

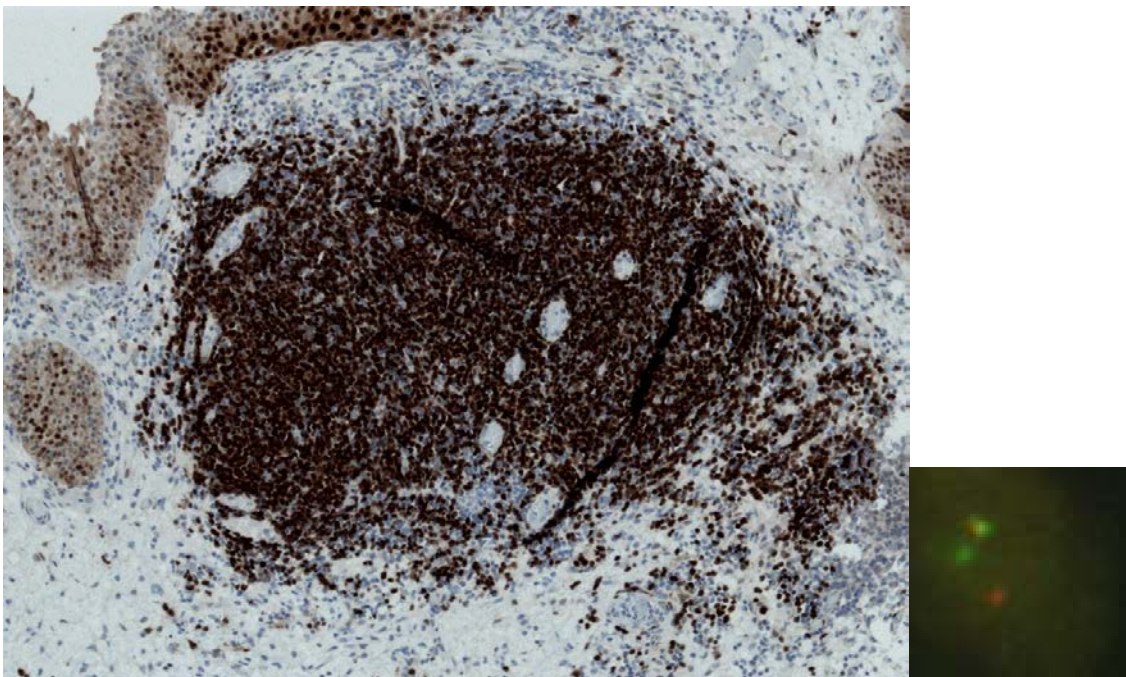


Abb. 4b. Wie in der immunhistochemischen Analyse erkennbar wird, besteht das Infiltrat überwiegend aus Cyclin D1 exprimierenden B-Zellen, entsprechend einer präklinischen Manifestation des erst 14 Monate später im Knochenmark diagnostizierten MCL (Fall 4; Immunperoxidase Cyclin D1, 100 x). In der FISH-Analyse zeigt sich ein Auseinanderweichen eines der beiden den Cyclin-D1-Genlokus flankierenden Sondenpaare als Hinweis auf eine Translokation t(11;14) mit Bruchereignis im Cyclin-D1-Genlokus (kleine Abbildung).

3.3 Molekularer Klonalitätsvergleich zwischen den retrospektiv detektierten präklinischen MCL-Infiltraten und dem jeweils korrespondierenden manifesten MCL

In Fall 4, dem einzigen der vier Fälle, in dem ausreichend Gewebe des präklinischen Infiltrates und des manifesten MCL übrig war, zeigte der durchgeführte molekulare Klonalitätsvergleich in beiden Gewebeproben ein identisches monoklonales Amplifikat (s. Abb. 5).

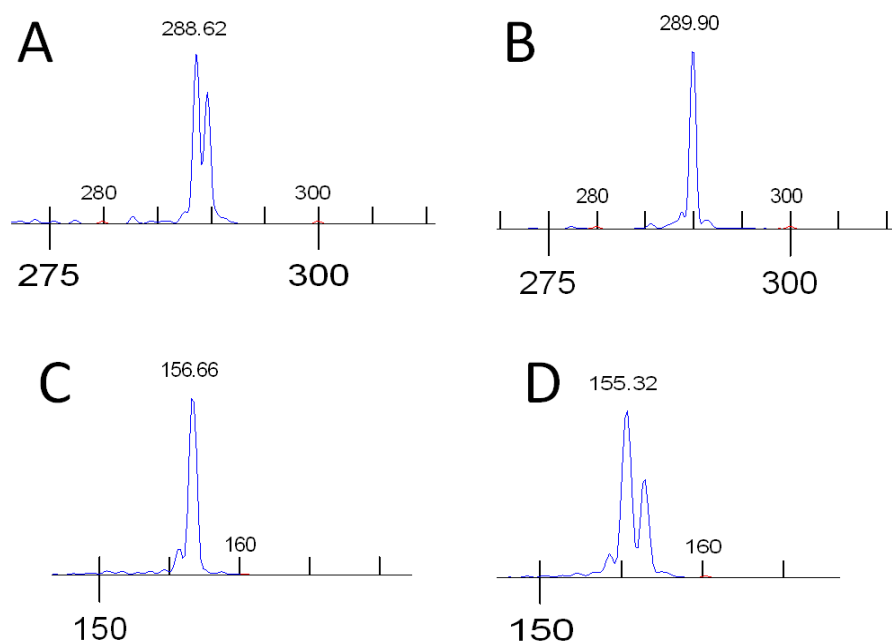


Abb. 5. Vergleichende Klonalitätsanalyse von Fall 4: Die Amplifikation der CDR2-Region des Immunglobulin-Schwerketten-Gens zeigte einen nahezu identischen monoklonalen Peak von 289 bzw. 290 Basenpaaren im präklinischen MCL-Infiltrat (A) und im manifesten MCL, das 14 Monate später diagnostiziert wurde (B). Die Amplifikation der CDR3-Region resultierte in einem monoklonalen Peak mit einer Länge von 156 Basenpaaren im präklinischen MCL-Infiltrat (C) und mit einer Länge von 155 Basenpaaren im manifesten MCL (D).

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasste sich erstmalig mit der Prävalenz sogenannter In-situ-Läsionen bei Patienten mit Follikulärem Lymphom (FL) und Mantelzell-Lymphom (MCL). Follikuläre Lymphome *in situ* (FLIS) und Mantelzell-Lymphome *in situ* (MCLIS) wurden erst in den vergangenen Jahren entdeckt (24, 29, 32). Sie sind jeweils als eine B-Zell-Population definiert, welche die genetischen und immunhistochemischen Charakteristika der jeweiligen Tumorzellen besitzt (chromosomale Translokation t(14;18)(q32;q21) mit resultierender konstitutioneller Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins beim FLIS bzw. chromosomale Translokation t(11;14)(q13;q32) mit Expression von Cyclin D1 beim MCLIS), aber im Gegensatz zu den manifesten Lymphomen FL und MCL keine Tumoren bildet, sondern streng auf ihr physiologisches Lymphknotenkompartiment beschränkt bleibt. Letzteres ist das Keimzentrum im Falle des FLIS bzw. die Follikel-Mantelzone im Falle des MCLIS. Konventionell-morphologisch ist dabei – als integraler Bestandteil der Diagnose einer In-situ-Läsion – keinerlei Alteration der Lymphknotenarchitektur zu erkennen. Das impliziert, dass die beschriebenen In-situ-Läsionen ausschließlich unter Zuhilfenahme immunhistochemischer Färbungen identifiziert werden können, bei denen man sich die durch die genannten chromosomalen Translokationen bedingte konstitutionelle Überexpression von Bcl-2 bzw. Cyclin D1 zunutze macht.

Das FLIS ist bereits seit über zehn Jahren als Läsion bekannt, die mit t(14;18)-positiven B-Zellen in engem Zusammenhang steht. Interessanterweise sind mit fortschreitendem Lebensalter in zunehmender Inzidenz auch t(14;18)-positive B-Zellen im peripheren Blut gesunder Individuen auffindbar, wobei in den meisten Fällen offenbar kein manifestes Lymphom auftritt. Solche zirkulierenden t(14;18)-positiven Zellen können mit einer Häufigkeit von 1 bis 853 Translokationen pro eine Million Zellen in 55 % der peripheren Blutlymphozyten und in 35 % des untersuchten Milzgewebes nachgewiesen werden (9).

Was Prävalenz des FLIS in der Normalbevölkerung jedoch selbst betrifft, so war hierüber bislang nur wenig bekannt (9, 24, 34). Erst kürzlich führten wir auf Basis einer Grundgesamtheit von 132 Patienten, die nicht aus hämatologischer Indikation operiert worden waren, eine eigene Studie durch (11). Hierbei konnten wir FLIS-Läsionen in den Lymphknoten dreier Patienten feststellen, was einer Prävalenz von 2,3 % entspricht. Keine dieser Personen hatte eine Anamnese oder eine aktuelle Manifestation eines Follikulären Lymphoms. Obwohl es sich bei der zugrunde liegenden Kohorte nicht um „gesunde“ Probanden handelte, stellen diese doch ein repräsentatives Kollektiv für die Normalbevölkerung dar, deren Lymphknoten natürlich nicht untersucht werden können.

Im Gegensatz zur soeben erwähnten Veröffentlichung (11) richtet diese Arbeit ihr Augenmerk nun auf die Prävalenz von FLIS-Läsionen in Patienten mit bekanntem manifestem FL. Die insgesamt 132 in die Studie eingeschlossenen Patienten entsprachen in Alters- und Geschlechtsverteilung (Altersmedian: 61,2 Jahre; 72 weiblich und 60 männlich) der bekannten Alters- und Geschlechtsverteilung des FL mit einer leichten weiblichen Prädominanz (1). Auf Grundlage von 42 verfügbaren Schnittpräparaten ließ sich bei insgesamt 30 dieser 132 Patienten (23 %) lymphatisches Parenchym mit enthaltenen Keimzentren identifizieren. In sechs dieser 30 Patienten (20 %) konnten in der immunhistochemischen Analyse stark Bcl-2-positive B-Zellen im Sinne einer FLIS-Läsion ausgewiesen werden, die entsprechend der Definition streng auf Keimzentrumsstrukturen beschränkt waren. Im Vergleich mit der von uns in der Normalbevölkerung gefundenen Prävalenz des FLIS von 2,3 % weisen die Patienten mit manifestem FL somit eine 8- bis 9-fach höhere Prävalenz dieser Läsion auf. Es ist jedoch anzunehmen, dass die tatsächliche Prävalenz noch deutlich höher liegt, da es zu berücksichtigen gilt, dass von jedem Probanden mit manifestem FL jeweils nur eine geringe Anzahl der Lymphknoten untersucht werden konnte. Dies trifft umso mehr zu, als es zunehmend Hinweise gibt, dass das FLIS als fakultative Vorläuferläsion eines manifesten FL angesehen werden muss (4). Allerdings scheint ein solcher Übergang in einen manifesten malignen Tumor nur selten vorzukommen. Wenn man die Inzidenz des FL mit jährlich

1:10.000 Einwohner annimmt und die Prävalenz des FLIS in der Normalbevölkerung bei 2,3 % liegt, so dürfte nur etwa jede tausendste FLIS-Läsion jemals in ein manifestes FL übergehen. Offenbar müssen für einen solchen Übergang weitere genetische Aberrationen in den t(14;18)-positiven Zellen in Betracht gezogen werden (4). Inwieweit auch immunologische Prozesse etwa im Rahmen einer (auto-?)antigengetriebenen Stimulation bei der Expansion eines (dann malignen) Klons eine Rolle spielen könnten, bedarf weiterer Untersuchungen.

In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung instruktiv, dass bei drei der sechs FL-Patienten mit nachgewiesenem FLIS ein solider Tumor als Zweitmalignom bestand. Im Einzelnen handelte es sich dabei um ein Adenokarzinom des Magens/Ösophagus, um eines der Lunge und um ein invasiv-duktales Mammakarzinom.

Innerhalb dieser Arbeit ließ sich kein MCLIS im strengen Sinne der Definition feststellen: Von insgesamt 138 Patienten mit diagnostiziertem MCL konnte bei fünf Personen weiteres Gewebe mit reaktiven Lymphknoten ermittelt werden. Bei keinem dieser Patienten fand sich ein MCLIS. Dieser Befund deckt sich mit der in der Literatur beschriebenen niedrigen Prävalenz t(11;14)-positiver B-Zellen im peripheren Blut der Normalbevölkerung, bei der in 1 – 7 % der zumeist männlichen Individuen solche MCL-ähnlichen Zellen nachweisbar sind, ohne dass eine Anamnese oder ein manifestes MCL vorläge (35). Ebenso konnten wir kürzlich in einer Studie über 1292 unselektionierte Lymphknoten von 131 Patienten, die in einer 3-Monats-Periode an das Institut für Pathologie der Universität Tübingen gesandt worden waren, keinen einzigen Fall eines MCLIS finden (14).

In einem Fall des hier untersuchten Kollektivs fand sich in mesenterialen Lymphknoten und einem Appendektomiepräparat eine Infiltration Cyclin-D1-positiver B-Zellen, die sich in der Mantelzone reaktiver Follikel ausbreiteten. Es handelte sich um ein Rektosigmoidresektat eines 76-jährigen Patienten mit einem mäßig differenzierten Adenokarzinom des Kolons. Aufgrund der deutlichen Expansion der Mantelzone, die zu einer geringfügigen Alteration der

Architektur des lymphatischen Parenchyms geführt hatte, wurde hier ein manifestes MCL mit Mantelzonenwachstum und kein MCLIS diagnostiziert. Letztere Diagnose setzt ja eine vollständig erhaltene und nicht expandierte Mantelzone voraus (32). Bezeichnenderweise wurde die MCL-Manifestation wegen der konventionell-morphologisch weitgehend unauffälligen Architektur ursprünglich nicht erkannt. Die MCL-Diagnose wurde erst 8 Monate nach der Karzinomdiagnose in einem zervikalen Lymphknoten gestellt. Erst retrospektiv konnte im Rahmen dieser Studie die bereits im Kolektomie- und Appendektomie-Präparat vorliegende Lymphominfiltration detektiert werden.

Im Anschluss an die Analyse reaktiver Lymphknoten von MCL-Patienten untersuchten wir sämtliche von diesen Patienten verfügbaren Gewebe mit extranodalen lymphozytären Infiltraten ebenfalls auf das Vorhandensein Cyclin-D1-positiver B-Zellen. Aus der Grundgesamtheit von 138 Patienten mit MCL waren von 15 Personen weitere Gewebe mit signifikanten lymphozytären Infiltraten verfügbar. Bei vier dieser 15 Patienten ließen sich Cyclin-D1-positive Zellen einzeln, verstreut oder in dichteren Aggregaten immunhistochemisch detektieren. Der Zeitraum, der zwischen der retrospektiv erfassten präklinischen Manifestation und der Diagnose des MCL lag, betrug zwischen 2 und 59 Monaten.

In Fall 4 konnte exemplarisch eine vergleichende Klonalitätsanalyse zwischen dem präklinischen Infiltrat und dem 14 Monate später in einem Beckenkammtrepanat diagnostizierten manifesten MCL durchgeführt werden. Hierbei konnte belegt werden, dass es sich bei beiden Manifestationen um Zellen desselben Tumorklons handelte, sodass präklinische Infiltrate des MCL retrospektiv bis zu 59 Monate (Fall 3) vor der eigentlichen Tumordiagnose detektiert werden konnten.

Obwohl die aufgespürten präklinischen Infiltrate quantitativ mit einem MCLIS vergleichbar waren, zeigte sich nicht das spezifische Infiltrationsmuster mit Beschränkung auf die innere Mantelzone reaktiver Lymphfollikel (36). Im Gegensatz zu der wohlbekanntem Prädilektion des Gastrointestinaltraktes, die das manifeste MCL aufweist, wurden in dieser Studie die präklinischen MCL-

Infiltrate auch in der Harnblase und in Gelenkstrukturen gefunden (37 – 38). Obwohl einschränkend gesagt werden muss, dass die genannten Lokalisationen sicherlich auch durch die Verfügbarkeit des Gewebes beeinflusst sein dürften, lässt sich doch konstatieren, dass sich MCL-Zellen bereits sehr früh und offenbar viele Monate vor der Etablierung der Diagnose „MCL“ („präklinisch“) im Organismus ausbreiten. Eigens hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang, dass die vorgestellten Patienten – soweit detektierbar – keine nodale Manifestation eines MCLIS aufwiesen.

In diesem Kontext ist die kürzlich beschriebene Beobachtung einzelner Cyclin-D1-positiver B-Zellen in der Kolon- und Magen-Mukosa nach der Diagnose eines manifesten MCL von besonderem Interesse (39 – 40). In der Studie über die Kolon-Manifestationen wurden die betreffenden Läsionen „MCL *in situ*“ genannt (39). Streng genommen handelt es sich bei den beschriebenen Infiltraten aber eher um „präklinische Manifestationen“, da der Terminus „MCL *in situ*“ in seiner strengen Definition eine Lokalisation Cyclin-D1-positiver B-Zellen in ihrem physiologischen Kompartiment, der Mantelzone reaktiver Follikel, impliziert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass In-situ-Läsionen beim FL offenbar fakultative Präkanzerosen sind, die nur in einem kleinen Teil der Fälle in ein manifestes FL übergehen, ein wesentlicher Teil der Patienten mit FL aber zumindest Reste entsprechender FLIS-Läsionen aufweist. Das MCLIS ist demgegenüber ein sehr seltenes Phänomen – sowohl in der Normalbevölkerung als auch bei Patienten mit manifestem MCL. „Präklinische“ Manifestationen beim MCL sind dagegen – methodisch bedingt zumeist erst retrospektiv – bei einer signifikanten Anzahl der Patienten mit MCL z. T. schon viele Monate vor Etablierung der klinischen MCL-Diagnose in verschiedenen Geweben als extranodale Infiltrate zu belegen.

5. Zusammenfassung

Das Follikuläre Lymphom (FL) und das Mantelzell-Lymphom (MCL) gehören zu der heterogenen Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome. Durch Anwendung immunhistochemischer und genetischer Analysen konnten in den letzten Jahren für diese Lymphomentitäten frühe Läsionen wie das Follikuläre Lymphom *in situ* (FLIS) und das Mantelzell-Lymphom *in situ* (MCLIS) identifiziert werden. In-situ-Lymphome stellen B-Zell-Populationen dar, welche die genetischen und immunhistochemischen Charakteristika der jeweiligen Tumorzellen besitzen, aber im Unterschied zu den tumorbildenden manifesten Lymphomen auf das korrespondierende physiologische Lymphknotenkompartiment beschränkt bleiben. Beim FLIS handelt es sich um klonale B-Zellen, welche die FL-typische rekurrente chromosomale Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ mit resultierender starker konstitutioneller Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins aufweisen und streng auf (reaktive) Keimzentrumsstrukturen lokalisiert sind. Das MCLIS ist eine neoplastische B-Zell-Population mit der MCL-typischen chromosomalen Translokation $t(11;14)(q13;q32)$, welche sich in einer Überexpression von Cyclin D1 äußert. Zudem befinden sich derartige B-Zellen ausschließlich in der inneren Mantelzone reaktiver Follikel.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Prävalenz dieser In-situ-Läsionen bei Patienten mit bekanntem manifestem Follikulärem bzw. Mantelzell-Lymphom unter Zuhilfenahme immunhistochemischer und zytogenetischer Analysen untersucht.

Dazu wurden aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen sämtliche Patienten ermittelt, bei denen in den Jahren 2000 bis 2010 ein FL bzw. ein MCL diagnostiziert wurde. Alle von diesen Patienten verfügbaren histologischen Gewebe, die lichtmikroskopisch lymphatisches Parenchym mit Sekundärfollikeln aufwiesen, wurden immunhistochemisch für Bcl-2 bzw. Cyclin D1 gefärbt. Für die Feststellung eines MCLIS in Geweben von Patienten mit bekanntem MCL wurden zusätzlich zu den vorhandenen Geweben mit lymphatischem Parenchym auch alle

Gewebe mit extranodalen Lymphozytenansammlungen herausgesucht und für Cyclin D1 gefärbt.

Der Nachweis der charakteristischen chromosomalen Bruchereignisse im *BCL2*-Genlokus beim FLIS bzw. im Cyclin-D1-Genlokus beim MCLIS erfolgte durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung am Paraffinmaterial. In Fällen, in denen ausreichend Gewebe des In-situ- sowie des manifesten Lymphoms zur Verfügung stand, wurde eine vergleichende molekularpathologische Klonalitätsanalyse durchgeführt.

Aus insgesamt 132 in die Studie eingeschlossenen Patienten, bei denen in der Vergangenheit ein manifestes FL diagnostiziert worden war, konnten 30 Fälle ermittelt werden, bei denen sich lymphatisches Parenchym mit enthaltenen Keimzentren finden ließ. In sechs dieser 30 Patienten (20 %) konnten in der immunhistochemischen Analyse stark Bcl-2-positive B-Zellen im Sinne einer FLIS-Läsion identifiziert werden.

Ein MCLIS, das der strengen Definition einer vollständig erhaltenen Lymphknotenarchitektur ohne jegliche Expansion der Mantelzonenstrukturen und einem nur in die unauffälligen Mantelzonen eingestreuten Infiltrat Cyclin-D1-positiver B-Zellen entspricht, konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Von 138 Patienten mit diagnostiziertem MCL konnte von 15 Patienten weiteres Gewebe mit reaktiven Lymphfollikeln aus dem Archiv bezogen werden. In vier Fällen fanden sich Cyclin-D1-positive Tumorzellen des jeweils bekannten Mantelzell-Lymphoms. Das Vorkommen reichte von einzelnen in ein reaktives chronisch-entzündliches Infiltrat eingestreuten Zellen bis hin zu dichten Infiltraten, die als „präklinische“ Manifestation des MCL angesehen werden können. Der ermittelte Zeitraum, der zwischen der retrospektiv erfassten präklinischen Manifestation und der Diagnose des MCL lag, erstreckte sich zwischen 2 und 59 Monaten.

Während FLIS-Läsionen offenbar eine Art fakultativer Präkanzerosen darstellen, die nur in einem kleineren Teil der Fälle in ein manifestes FL übergehen, tritt das MCLIS sowohl in der Normalbevölkerung als auch bei

Patienten mit manifestem MCL äußerst selten auf. „Präklinische“ Manifestationen beim MCL sind dagegen bei einer signifikanten Anzahl der Patienten mit MCL z. T. schon viele Monate vor Etablierung der klinischen MCL-Diagnose in verschiedenen Geweben als extranodale Infiltrate nachweisbar.

Die hohe Prävalenz der FLIS-Läsion in FL-Patienten bestätigt, dass ein FLIS als fakultative Vorläuferläsion eines manifesten FL eingeordnet werden kann. Welche Faktoren für solch einen (seltenen) Übergang eine Rolle spielen, ist bisher noch unklar und sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Literatur

1. Swerdlow S.H. CE, Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. (Eds.). World Health Organization Classification of Tumours. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2008.
2. Mann RB, Berard CW. Criteria for the cytologic subclassification of follicular lymphomas: a proposed alternative method. *Hematol Oncol.* 1983 Apr-Jun;1(2):187-92.
3. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood.* 1996 Jul 15;88(2):386-401.
4. Bonzheim I, Salaverria I, Haake A, Gastl G, Adam P, Siebert R, et al. A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma in situ to manifest follicular lymphoma. *Blood.* 2011 Sep 22;118(12):3442-4.
5. Lo Coco F, Gaidano G, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. p53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood.* 1993 Oct 15;82(8):2289-95.
6. Dreyling MH, Roulston D, Bohlander SK, Vardiman J, Olopade OI. Codeletion of CDKN2 and MTAP genes in a subset of non-Hodgkin's lymphoma may be associated with histologic transformation from low-grade to diffuse large-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998 May;22(1):72-8.
7. Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res.* 1999 Apr 1;59(7 Suppl):1693s-700s.
8. Dolken G, Illerhaus G, Hirt C, Mertelsmann R. BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. *J Clin Oncol.* 1996 Apr;14(4):1333-44.
9. Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, Cortopassi GA. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Sep 13;91(19):8910-4.
10. Schuler F, Hirt C, Dolken G. Chromosomal translocation t(14;18) in healthy individuals. *Semin Cancer Biol.* 2003 Jun;13(3):203-9.
11. Henopp T, Quintanilla-Martinez L, Fend F, Adam P. Prevalence of follicular lymphoma in situ in consecutively analysed reactive lymph nodes. *Histopathology.* 2011 Jul;59(1):139-42.

12. Swerdlow S.H. CE, Seto M., Müller-Hermelink H.K. (Eds.). Mantle cell lymphoma. In: Swerdlow S.H. CE, Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. (Eds.), ed. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 4th edition ed. Lyon: IARC Press, 2008:229-32.
13. Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Dave S, Wright G, Rosenwald A, et al. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood*. 2005 Dec 15;106(13):4315-21.
14. Adam P, Schiefer AI, Prill S, Henopp T, Quintanilla-Martinez L, Bosmuller HC, et al. Incidence of preclinical manifestations of mantle cell lymphoma and mantle cell lymphoma in situ in reactive lymphoid tissues. *Mod Pathol*. 2012 Dec;25(12):1629-36.
15. Vandenberghe E, De Wolf-Peeters C, van den Oord J, Wlodarska I, Delabie J, Stul M, et al. Translocation (11;14): a cytogenetic anomaly associated with B-cell lymphomas of non-follicle centre cell lineage. *J Pathol*. 1991 Jan;163(1):13-8.
16. Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Villamor N, et al. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood*. 1994 Oct 15;84(8):2726-32.
17. Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res*. 2000 Jul 15;60(14):3689-95.
18. Blagosklonny MV, Pardee AB. The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle*. 2002 Mar-Apr;1(2):103-10.
19. Mitnacht S, Lees JA, Desai D, Harlow E, Morgan DO, Weinberg RA. Distinct sub-populations of the retinoblastoma protein show a distinct pattern of phosphorylation. *Embo J*. 1994 Jan 1;13(1):118-27.
20. Meyerson M, Harlow E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol*. 1994 Mar;14(3):2077-86.
21. Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC, Landgren O, Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia*. 2010 Mar;24(3):512-20.
22. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, Hillmen P, Houlston RS, Kay N, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*. 2005 Aug;130(3):325-32.

-
23. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, Kwok M, Fenton JA, Plummer M, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2008 Aug 7;359(6):575-83.
24. Cong P, Raffeld M, Teruya-Feldstein J, Sorbara L, Pittaluga S, Jaffe ES. In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood*. 2002 May 1;99(9):3376-82.
25. Montes-Moreno S, Castro Y, Rodriguez-Pinilla SM, Garcia JF, Mollejo M, Castillo ME, et al. Intrafollicular neoplasia/in situ follicular lymphoma: review of a series of 13 cases. *Histopathology*. 2010 Apr;56(5):658-62.
26. Carbone A, Santoro A. How I treat: diagnosing and managing "in situ" lymphoma. *Blood*. 2011 Apr 14;117(15):3954-60.
27. Roulland S, Navarro JM, Grenot P, Milili M, Agopian J, Montpellier B, et al. Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J Exp Med*. 2006 Oct 30;203(11):2425-31.
28. Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, Heutte N, Nadel B, Gauduchon P. Long-term clonal persistence and evolution of t(14;18)-bearing B cells in healthy individuals. *Leukemia*. 2006 Jan;20(1):158-62.
29. Richard P, Vassallo J, Valmary S, Missouri R, Delsol G, Brousset P. "In situ-like" mantle cell lymphoma: a report of two cases. *J Clin Pathol*. 2006 Sep;59(9):995-6.
30. Espinet B, Sole F, Pedro C, Garcia M, Bellosillo B, Salido M, et al. Clonal proliferation of cyclin D1-positive mantle lymphocytes in an asymptomatic patient: an early-stage event in the development or an indolent form of a mantle cell lymphoma? *Hum Pathol*. 2005 Nov;36(11):1232-7.
31. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011 May 12;117(19):5019-32.
32. Aqel N, Barker F, Patel K, Naresh KN. In-situ mantle cell lymphoma--a report of two cases. *Histopathology*. 2008 Jan;52(2):256-60.
33. Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood*. 1991 Jul 1;78(1):192-6.
34. Lecluse Y, Lebailly P, Roulland S, Gac AC, Nadel B, Gauduchon P. t(11;14)-positive clones can persist over a long period of time in the peripheral blood of healthy individuals. *Leukemia*. 2009 Jun;23(6):1190-3.

35. Hirt C, Schuler F, Dolken L, Schmidt CA, Dolken G. Low prevalence of circulating t(11;14)(q13;q32)-positive cells in the peripheral blood of healthy individuals as detected by real-time quantitative PCR. *Blood*. 2004 Aug 1;104(3):904-5.
36. Carvajal-Cuenca A, Sua LF, Silva NM, Pittaluga S, Royo C, Song JY, et al. In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. *Haematologica*. 2011 Nov 4.
37. Geissmann F, Ruskone-Fourmestraux A, Hermine O, Bourquelot P, Belanger C, Audouin J, et al. Homing receptor alpha4beta7 integrin expression predicts digestive tract involvement in mantle cell lymphoma. *Am J Pathol*. 1998 Dec;153(6):1701-5.
38. Nakamura S, Matsumoto T, Takeshita M, Kurahara K, Yao T, Tsuneyoshi M, et al. A clinicopathologic study of primary small intestine lymphoma: prognostic significance of mucosa-associated lymphoid tissue-derived lymphoma. *Cancer*. 2000 Jan 15;88(2):286-94.
39. Neto AG, Oroszi G, Protiva P, Rose M, Shafi N, Torres R. Colonic in situ mantle cell lymphoma. *Ann Diagn Pathol*. 2011 Aug 11.
40. Dantoc MM, Eslick GD, Adams SS, Kalantar JS. Gastrointestinal Mantle Cell Lymphoma-A Tale of Two Endoscopies. *J Gastrointest Cancer*. 2011 May 10.

Danksagung

Mit der Fertigstellung der Dissertationsschrift ist es an der Zeit, allen denjenigen zu danken, die mich hierbei begleitet und unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Falko Fend und Herrn Prof. Dr. Patrick Adam für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. Patrick Adam, der die wissenschaftliche Betreuung meines Dissertationsprojektes übernommen und dessen Fortgang durch zahlreiche kritische Anregungen unterstützt hat, danke ich zudem für die wohlwollende Begleitung.

Frau Barbara Mankel danke ich herzlich für die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten.

Nicht zuletzt möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre stets großzügige Unterstützung bedanken.