

Technische Universität München  
Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie  
Direktor: Univ.- Prof. Dr. H. K. Höfler

Expression der B-Zell-Differenzierungs-Proteine APRIL, CD27,  
Blimp1 und BLNK und ihre Bedeutung beim  
Lymphoplasmazytischen Lymphom

Charlotte Sophie Sell

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:           1.     Priv.- Doz. Dr. M. A. Kremer  
  2.     Univ.- Prof. Dr. C. Peschel

Die Dissertation wurde am 22.12.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.05.2012 angenommen.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Verzeichnis der Abkürzungen</b>	S. 05
<b>2. Einleitung</b>	
2.1. Einführung in das Thema	S. 07
2.2. Das Lymphoplasmozytische Lymphom (LPL)	S. 08
2.2.1. Definition	
2.2.2. Einordnung und Epidemiologie	
2.2.3. Klinik und Prognose	
2.2.4. Therapie	
2.3. Weitere untersuchte B-Zell-Neoplasien	S. 15
2.3.1. Chronische Lymphatische Leukämie (CLL)	
2.3.2. Plasmazellneoplasien	
2.3.2.1. Multiples Myelom (MM)	
2.3.2.2. Extramedulläres Multiples Myelom (EMM)	
2.3.2.3. Extramedulläres Plasmozytom (EMP)	
2.4. Die verwendeten Marker	S. 20
2.4.1. Etablierte diagnostische Marker	
2.4.2. APRIL	
2.4.3. CD27	
2.4.4. Blimp1	
2.4.5. BLNK	
2.5. Die Zielsetzung der Arbeit	S. 35
<b>3. Material und Methoden</b>	
3.1. Auswahlkriterien für den Einschluss in die Studie	S. 37
3.2. Tissue Micro Array (TMA)	S. 38
3.3. Gewebeschnitte	S. 40
3.4. Immunhistochemie	S. 40
3.4.1. Manuelle immunhistochemische Austestung	
3.4.2. Automatischer Immunostainer	
3.5. Chromogene in situ Hybridisierung (CISH)	S. 45
3.6. Auswertung	S. 47

## **4. Ergebnisse**

- 4.1. Charakterisierung der Patienten und klinische Daten S. 49
  - 4.1.1. Lymphoplasmozytisches Lymphom
  - 4.1.2. Chronische Lymphatische Leukämie
  - 4.1.3. Multiples Myelom
  - 4.1.4. Extramedulläre Plasmazellneoplasien
- 4.2. Expressionsmuster der etablierten diagnostischen Marker S. 53
- 4.3. Expressionsmuster der Proteine APRIL, CD27, Blimp1, BLNK S. 55
  - 4.3.1. APRIL
  - 4.3.2. CD27
  - 4.3.3. Blimp1
  - 4.3.4. BLNK
  - 4.3.5. Überprüfung des Expressionsmusters auf Korrelationen
  - 4.3.6. Diskriminanzanalyse

## **5. Diskussion**

- 5.1. Immunphänotypisierung S. 67
- 5.2. Expressionsmuster der Proteine APRIL, CD27, Blimp1, BLNK S. 71
  - 5.2.1. APRIL und CD27
  - 5.2.2. Blimp1 und BLNK
  - 5.2.3. Diagnostische Einsetzbarkeit der Antikörper
- 5.3. Ausblick S. 85

## **6. Zusammenfassung** S. 87

## **7. Literaturnachweis** S. 89

## **8. Anhang** S.101

- 8.1. Graphische Darstellung der Ergebnisse
- 8.2. Danksagung

## 1. Verzeichnis der Abkürzungen

ABC	activated B cell-like
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Ak	Antikörper
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
APRIL	a proliferation-inducing ligand
BCAP	B-cell adaptor for phosphoinositide 3-kinase
Bcl	B-cell-Lymphoma
BCMA	B-cell maturation antigen
Blimp1	B-lymphocyte-induced maturation protein 1
BLNK	B-cell linker protein
BSAP	B-cell lineage-specific activator protein
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CT	Computertomographie
CTX	Chemotherapie
CVID	Common Variable Immunodeficiency Disorder
DLCBL	Diffuses Großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMM	Extramedulläres Multiples Myelom
EMP	Extramedulläres Plasmozytom
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GC	Keimzentrum
HCV	Hepatitis C-Virus
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
Int.	Färbeintensität
IRF	interferon regulatory factor
ISH	in situ Hybridisierung
k.A.	keine Angabe
KM	Knochenmark
KVD	keine verfügbaren Daten
L	Ligand
LME	lebt mit Erkrankung (nach AWD = alive with disease)
LOAE	lebt ohne Anzeichen der Erkrankung (nach AWND = alive with no evidence of disease)
LPL	Lymphoplasmozytisches Lymphom
m	männlich

MALT	mucosa associated lymphatic tissue
MGUS	Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
MM	Multiples Myelom
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
MZL	Marginalzonenlymphom
n	Fallzahl
NBT/BCIP	Nitrotetrazoliumblauschlorid/5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
n.d.	nicht durchgeführt
NF-kappaB	nuclear factor of kappa B
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NIK	NF-kappaB-inducing kinase
NLZ	„Nurse-like“-Zellen
Pax	paired box gene
PRDIBF1	positive regulatory domain I-binding factor 1
PRDM1	PR domain-containing protein 1
r	Spannweite
REAL-Klassifikation	Revised-European-American-Lymphoma-Klassifikation
RIZ	retinoblastoma zinc finger gene
s	löslich
SZT	Stammzelltransplantation
TACI	transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand-interactor
TBS	Tris-buffered-saline
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMA	Tissue Micro Array
TNF	Tumornekrosefaktor
VE	verstorben an der Erkrankung (nach DWD = dead with disease)
w	weiblich
WHO	World Health Organisation
XBP	X-box protein

## 2. Einleitung

### 2.1. Einführung in das Thema

Vor etwa 70 Jahren hat Jan Gosta Waldenström erstmals zwei Patienten mit einem Symptomkomplex bestehend aus oronasalen Blutungen, Lymphadenopathie, Anämie, Thrombozytopenie und hoher Serumviskosität bei radiologisch unauffälligem Knochenbefund beschrieben. Das Knochenmark zeigte eine Infiltration lymphoider Zellen und die hohe Serumviskosität konnte auf das Vorhandensein monoklonaler Immunglobuline zurückgeführt werden. (*Vijay and Gertz 2007*) Inzwischen ist das klinische Bild des Lymphoplasmozytischen Lymphoms (LPL), auch als Morbus Waldenström bezeichnet, genau beschrieben und wichtige pathologische Kriterien sind definiert, über die biologischen Mechanismen der Erkrankung ist jedoch noch wenig bekannt. (*Chng, Schop et al. 2006*) Darüber hinaus ist die Abgrenzung insbesondere vom Marginalzonenlymphom (MZL), aber auch von anderen lymphoproliferativen B-Zell-Erkrankungen sowie Plasmazellneoplasien schwierig, da keine für das LPL spezifischen morphologischen, immunphänotypischen oder genetischen Eigenheiten bekannt sind. (*Lin and Medeiros 2005; Vitolo, Ferreri et al. 2008*)

Trotz signifikanter Verbesserungen in der Therapie bleibt das LPL derzeit unheilbar. Es bedarf daher neuer effektiver Behandlungsansätze. Der Mangel kurativer Therapien lässt sich dabei womöglich durch das fehlende Verständnis bzgl. des Pathomechanismus, also z.B. verschiedener Signalwege, über die das Überleben und die Immunglobulin-Produktion der neoplastischen Zellen gefördert wird, erklären. (*Elsawa, Novak et al. 2006*) Dies macht weitere Untersuchungen des LPL zu einer essentiellen Aufgabe.

## 2.2. Das Lymphoplasmozytische Lymphom (LPL)

### 2.2.1. Definition

Das Lymphoplasmozytische Lymphom (LPL) ist eine lymphoproliferative Erkrankung monoklonaler B-Zellen verschiedener Reifestadien. Die morphologische Heterogenität der Tumorzellen reicht von kleinen, reifen B-Lymphozyten, ohne sichtbare Nukleoli, über lymphoplasmozytoide Zellen, also Zellen mit reichlich basophilem Zytoplasma, aber Lymphozyten-ähnlichen Nukleoli, bis hin zu Plasmazellen. Viele B-Zell-Lymphome, wie selten die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL), häufiger Marginalzonenlymphom (MZL) und follikuläres Lymphom, können plasmazytoide Lymphozyten bis hin zu reifen Plasmazellen zeigen. Die Diagnose LPL ist allein auf solche Tumoren beschränkt, denen spezifische Kriterien anderer Lymphome, wie zum Beispiel monozytoide Zellen und Pseudofollikel, fehlen. (*Vitolo, Ferreri et al. 2008*)

Häufig sieht man zusätzlich Immunoblasten, reaktive Histiocyten und diagnostisch wichtige, stark vermehrte Mastzellen in der Umgebung des Tumordinfiltrates. (*Vijay and Gertz 2007*) Für die Diagnosestellung ist darüber hinaus der Nachweis eines monoklonalen Ig-Proteins entscheidend. (*Owen, Treon et al. 2003*)

Die Infiltration des Knochenmarks kann sich sowohl nodulär als auch diffus darstellen. Im Lymphknoten liegt typischerweise ein diffuses Wachstumsmuster mit Aussparung der Sinus vor. Teilweise können auch im Blut neoplastische Zellen nachgewiesen werden, wobei die Leukozytenzahl in der Regel geringer bleibt als dies bei der CLL der Fall ist. Selten kann es zu einer Infiltration von Lunge, Haut sowie Gastrointestinaltrakt kommen, wobei insbesondere diese extranodalen Manifestationen des LPL schwer von der Differenzialdiagnose MZL abgrenzbar sind.

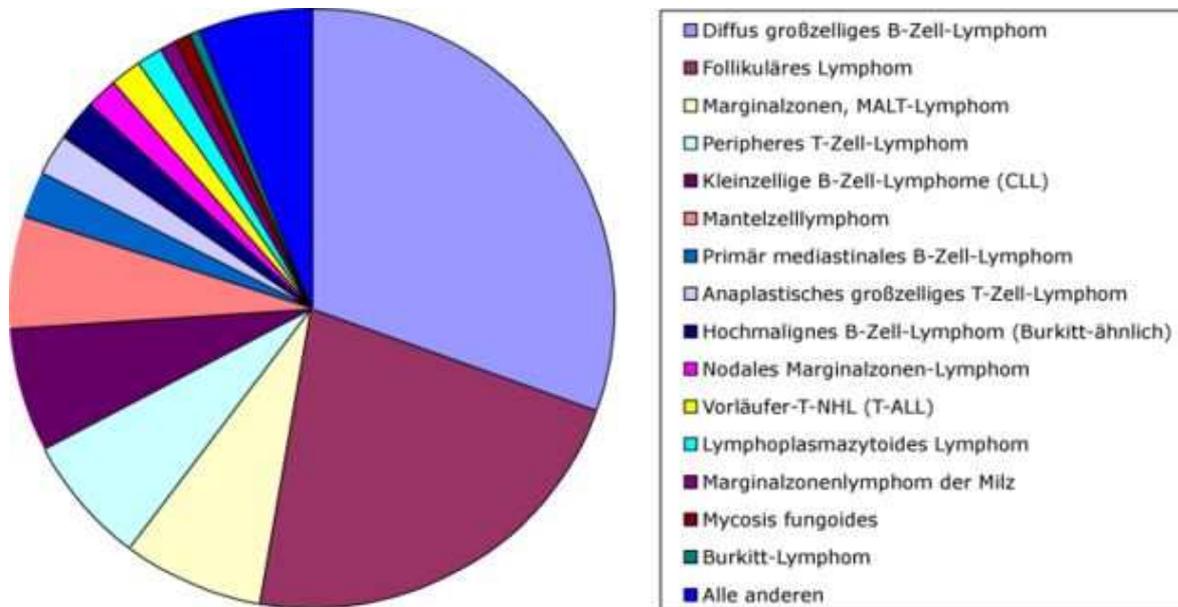
### 2.2.2. Einordnung und Epidemiologie

Das LPL gehört zu den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL).

Diese malignen Neoplasien des lymphatischen Gewebes entstehen durch klonale Expansion von Zellen der B- oder T-Zelllinie. Maligne Lymphome werden in Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) und Morbus Hodgkin unterteilt. Die genaue Einteilung der NHL erfolgt durch die WHO-Klassifikation für Tumoren der Hämatopoetischen und Lymphoiden Gewebe, die auf den bisher verwendeten Kiel- und Revised-European-American-Lymphoma (REAL)-Klassifikationen basiert. Die WHO-Klassifikation unterscheidet zwischen Lymphomen der B- und T-Zellreihe und der frühen oder späten Vorläuferzellen der Lymphopoese. Auf den zytologischen Malignitätsgrad als übergreifendes Einteilungsprinzip wird verzichtet. Durch die Kiel-Klassifikation wird aber weiterhin eine Einteilung in low- und high-grade Tumoren vorgegeben. Indolente low-grade NHL, zu denen unter anderen LPL, CLL und Follikuläres Lymphom gehören, werden in der Regel erst bei ausgeprägter klinischer Symptomatik oder raschem Krankheitsfortschreiten therapiert, wobei durch Chemotherapie keine vollständige Heilung möglich ist. Aggressive high-grade NHL, wie das Diffuse Großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL), enden ohne Therapie rasch tödlich und werden daher meistens nach Diagnosestellung sofort therapiert. Durch eine Chemotherapie kann hier jedoch teilweise eine Heilung erreicht werden.

Die Inzidenz von NHL liegt bei ca. zehn jährlich neu aufgetretenen Fällen pro 100.000 Einwohner, wobei die Häufigkeit gegenwärtig steigt. Männer sind 1,5-mal häufiger betroffen als Frauen. NHL können in jedem Lebensalter auftreten, der Häufigkeitsgipfel liegt aber im höheren Alter. Patienten mit AIDS haben eine bis zu 1000-fach erhöhte Inzidenz von NHL. Risikofaktoren für die Entwicklung eines NHL sind Autoimmundefekte, chronische Infektionen, Bestrahlung und Exposition gegenüber radioaktiven Stoffen.

**Abbildung 1: Relative Häufigkeiten der NHL**



Modifiziert nach (1997): „A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project“, *Blood*, 1997, 89: 3909-3918

1 - 2 % aller hämatologischen Neoplasien und 5 % aller NHL sind LPL, womit die Erkrankung zum Beispiel nur 25 % der Fallzahlen des Multiplen Myeloms (MM) aufweist. (Vitolo, Ferreri et al. 2008)

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 - 68 Jahren und 55 - 70 % der Betroffenen sind Männer. (Vijay and Gertz 2007)

Risikofaktoren für die Entwicklung eines LPL sind eine chronische Antigenstimulation, z.B. durch HCV-Infektion, Rickettsiose und Lyme-Borreliose, Immundefizienz (Common Variable Immunodeficiency Disorder (CVID)) und aschkenasische Abstammung. (Vitolo, Ferreri et al. 2008) Hauptrisiko ist eine vorbestehende IgM-MGUS (Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz) und deutlich erkennbar ist eine familiäre Häufung. So haben ca. 20 % der Patienten einen Verwandten ersten Grades mit einer B-Zell-Erkrankung. (Treon, Hunter et al. 2006; Vijay and Gertz 2007) Bei Patienten mit familiärer LPL tritt die Erkrankung früher auf und verläuft

aggressiver. (Treon, Hunter et al. 2006) Darüber hinaus besteht ein Zusammenhang mit genetischen Veränderungen. 30 - 50 % der Patienten haben eine Deletion des Chromosoms 6q21-25. (Schop, Kuehl et al. 2002; Chng, Schop et al. 2006) Diese Deletion ist sowohl in familiären, als auch in nicht familiären Fällen des LPL zu beobachten. Der diagnostische Wert der Deletion 6q21-25 zur Abgrenzung des LPL von der IgM-MGUS und der prognostische Wert ihres Nachweises wird kontrovers diskutiert. (Treon, Hunter et al. 2006) Weiterhin wird in der Literatur bei bis zu 50 % der Patienten ein Zusammenhang mit der Translokation t(9;14)(p13;q32) beschrieben und diskutiert. (George, Wrede et al. 2005; Vitolo, Ferreri et al. 2008)

### 2.2.3. Klinik und Prognose

Das LPL wird nur in seltenen Fällen zu einem frühen Zeitpunkt diagnostiziert, da selbst die fortgeschrittene Krankheit noch asymptomatisch verlaufen kann. Die am frühesten und häufigsten auftretenden Symptome sind Müdigkeit, Leistungsminderung und Anämie. Die Anämie ist vor allem bedingt durch eine Verdrängung des funktionsfähigen Knochenmarks durch das Tumordinfiltrat und durch Autoimmunhämolyse über Kälteagglutinine vom Typ IgM. (Treon 2009) Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) ist bei Patienten mit LPL sehr hoch. Die Makroglobuline beeinträchtigen die Thrombozytenagglutination und binden Gerinnungsfaktoren, wodurch es zu einer hämorrhagischen Diathese kommen kann. Darüber hinaus können die monoklonalen IgM-Globuline zu einem Hyperviskositätssyndrom führen, welches mit Sehstörungen und Raynaud-artigen akralen Durchblutungsstörungen einhergehen kann. (Treon, Hatjiharissi et al. 2008) Weiterhin wird in der Literatur eine IgM-assoziierte Neuropathie beschrieben, die bei ca. 20 % der Patienten mit LPL auftritt. Dabei reagieren die monoklonalen Immunglobuline mit spezifischen neuronalen Antigenen. (Levine, Pestronk et al. 2006) Teilweise wird bei den Patienten eine Osteoporose beobachtet, dagegen kommt es aber nicht zu Osteolysen und Hyperkalzämie, wie beim MM, und auch die Nieren werden sekundär bedeutend weniger geschädigt. Anders als bei den meisten niedrig

malignen NHL treten Lymphknotenschwellung und Hepatosplenomegalie selten (bei weniger als 15 %) auf. (Treon, Hatjiharissi et al. 2008; Treon 2009)

Insgesamt ist der klinische Verlauf des LPL sehr variabel. Somit unterscheidet sich auch die Prognose der einzelnen Patienten deutlich. Faktoren, die für eine schlechte Prognose sprechen, sind höheres Alter des Patienten (> 60 Jahre), B-Symptomatik, Anämie, niedriger Albumin-Serumspiegel (< 35 g/l), erhöhte Serum-GOT (> 41 U/l) und hohe beta-2-Mikroglobulin-Werte. (Papamichael, Norton et al. 1999; Dimopoulos, Kyle et al. 2005; Johnson, Birchall et al. 2006) In allen veröffentlichten Studien zeigten sich vor allem Hämoglobin und beta-2-Mikroglobulin als starke Prädiktoren auf das Überleben. (Garcia-Sanz, Montoto et al. 2001; Dhodapkar, Jacobson et al. 2003; Merlini, Baldini et al. 2003) Der Paraprotein-Spiegel im Serum hat keinen prognostischen Aussagewert, da dieser nachweislich nicht direkt mit der Knochenmarksinfiltration korreliert. (Owen, Treon et al. 2003) Weiterhin wurde gezeigt, dass der Serumspiegel von beta-2-Mikroglobulin und Thymidinkinase, der Karnofsky-Index und die Thrombozytenzahl unabhängig voneinander das progressionsfreie Überleben der LPL-Patienten, vor allem in frühen Krankheitsstadien, vorhersagen können. (Hallek, Wanders et al. 1996)

Zurzeit ist das LPL nicht heilbar und insgesamt liegt das mittlere Überleben nach Diagnosestellung bei fünf bis zehn Jahren. (Vijay and Gertz 2007; Vitolo, Ferreri et al. 2008)

#### 2.2.4. Therapie

Low-grade NHL und somit auch das LPL werden erst bei ausgeprägter klinischer Symptomatik und raschem Krankheitsprogress therapiert. Asymptomatische Patienten sollten engmaschig untersucht werden, wobei niedrige beta-2-Mikroglobulin-Spiegel (< 3 g/dl) und hohe Hämoglobin-Werte (> 12 g/dl) dafür sprechen, dass sie über einen längeren Zeitraum hinweg keine Therapie benötigen.

Therapieindikationen bestehen derzeit bei folgender Klinik:

- Durch die Erkrankung verursachter Hb < 10 g/dl,

- Thrombozytenzahl < 100.000 /mm<sup>3</sup>,
  - symptomatische Hyperviskosität (> 4,0 cp),
  - Adenopathie/ Organomegalie,
  - moderate bis ausgeprägte periphere Neuropathie,
  - andere schwerwiegende durch die Erkrankung verursachte Symptome.
- (*Kyle, Treon et al. 2003*)

Bei ausgeprägter symptomatischer Hyperviskosität sollte zunächst eine Plasmapherese durchgeführt werden, zeitnah gefolgt von einer Chemotherapie. Therapie der Wahl ist das BDR-Schema, bestehend aus Bortezomib, Prednison und Rituximab (Anti-CD20-Antikörper). Erstes Therapieansprechen ist hierbei nach einem Minimum von einem Monat zu erwarten und das Gesamtansprechen liegt bei 96 %. Bei 22 % der Patienten kann eine komplette Remission erreicht werden und 80 % bleiben ohne Krankheitsprogression innerhalb eines zweijährigen Beobachtungszeitraums. Als Alternative oder bei Patienten über 70 Jahren können CP-R (Cyclophosphamid, Prednison, Rituximab), R-CD (Rituximab, Cyclophosphamid, Dexamethason) oder FR (Fludarabin, Rituximab) eingesetzt werden, wobei das Gesamtansprechen bei 70 - 80 % liegt. (*Treon 2009*)

Bei Patienten, die eine weniger akute Symptomatik zeigen, ist CP-R oder R-CD Therapieoption der ersten Wahl. Als Alternative kann wiederum FR oder eine Rituximab-Monotherapie eingesetzt werden. Fludarabin sollte aufgrund des Risikos für Stammzellschäden oder Sekundärmalignome immer erst als Therapie der zweiten Wahl, beziehungsweise bei Versagen anderer Therapieverfahren eingesetzt werden. (*Treon 2009*) Eine Rituximab-Monotherapie muss bei Patienten mit Hyperviskosität vermieden werden, da nach einer solchen Therapie ein akuter Anstieg des IgM-Serumspiegels beobachtet werden kann. (*Treon, Branagan et al. 2004*)

Die Behandlung einer IgM-assoziierten Neuropathie basiert in der Regel auf Rituximab, welches bei fortgeschrittener Symptomatik auch in Kombinationsschemata wie CP-R oder R-CD eingesetzt werden kann. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang der Einsatz von Bortezomib oder Thalidomid in Kombination mit Rituximab. (*Treon, Ioakimidis et al. 2009*)

Rituximab wird darüber hinaus bei Patienten, die zuvor ein gutes Ansprechen zeigten, zur Erhaltungstherapie angewendet. (*Treon 2009*)

Ein erster symptomatischer Krankheitsrückfall nach über zweijährigem Intervall zur ersten Therapie wird erneut durch das zuvor angewandte Therapieschema behandelt. Bei erstem Krankheitsrückfall innerhalb einer Periode von zwei Jahren; multiplen Krankheitsrückfällen oder bei Nichtansprechen auf zuvor genannte Therapieoptionen werden weitere Substanzen, wie Alemtuzumab (Anti-CD52-Antikörper), Bendamustin (Hybrid-Alkylanz und Purinanalogon), Everolimus (mTOR-Inhibitor, wirkt als Immunsuppressivum) oder auch Nukleosid-Analoga eingesetzt.

Besonders bei jungen Patienten mit refraktärer Erkrankung kommt eine autologe Stammzelltransplantation (SZT) in Frage. Die Fünf-Jahres-Rate an progressionsfreiem Überleben und Gesamtüberleben liegt hier bei 33 % und 61 %. (*Treon 2009*) Darüber hinaus kann in ausgewählten Fällen mit sehr fortgeschrittener Erkrankung eine allogene SZT mit dosisreduzierter Konditionierungstherapie (nicht myeloablativ) durchgeführt werden und gute Therapieerfolge zeigen. (*Dimopoulos, Gertz et al. 2009*)

Therapieziel ist die komplette Remission, die durch folgende Kriterien definiert ist:

- Kein histologischer Nachweis eines Knochenmarksinfiltrates,
- kein Nachweis einer Paraproteinämie,
- keine Adenopathie/ Organomegalie (Nachweis durch CT-Bildgebung),
- keine durch das LPL verursachten Symptome.

Davon unterschieden werden „partial response“ (> 50 % Reduktion des IgM-Serumspiegels, > 50 % Abnahme der Adenopathie/ Organomegalie), „minor response“ (> 25 % aber < 50 % Reduktion des IgM-Serumspiegels, keine neuen Symptome), „stable disease“ (< 25 % Reduktion und < 25 % Zunahme des IgM-Serumspiegels, keine Zunahme der Symptome) sowie „progressive disease“ (> 25 % Zunahme des IgM-Serumspiegels, Zunahme der Symptome). (*Kimby, Treon et al. 2006*)

## 2.3. Weitere untersuchte B-Zell-Neoplasien

### 2.3.1. Chronische Lymphatische Leukämie (CLL)

Die CLL ist ein leukämisch verlaufendes niedrig malignes NHL. In den meisten Fällen handelt es sich um ein Lymphom vom B-Zell-Typ. Ausschließlich solche Fälle wurden in dieser Arbeit untersucht.

Die CLL ist die am häufigsten auftretende Leukämieform, deren Inzidenz mit dem Lebensalter stark zunimmt. Der Altersgipfel liegt nach dem 60. Lebensjahr und Männer sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen. (*Hulkkonen, Vilpo et al. 2002; Byrd, Stilgenbauer et al. 2004*)

Die neoplastischen Lymphozyten haben durch antiapoptotische Mechanismen eine verlängerte Überlebenszeit. (*Kay, Hamblin et al. 2002*) Im Verhältnis zu normalen Lymphozyten sind sie teilweise leicht vergrößert, mit klumpig wirkendem Chromatin und wenig Zytoplasma, welches klar bis leicht basophil erscheint. Nukleoli sind in der Regel nur undeutlich abgrenzbar oder nicht sichtbar. Die neoplastischen Zellen sind mechanisch instabil und zeigen häufig die typischen intrazellulären Kerntrümmer, die als Gumprecht'sche Kernschatten bezeichnet werden. Die mitotische Aktivität ist in der Regel sehr niedrig. In den Lymphknoten und der Milz von Patienten mit CLL sieht man eine Auflösung der normalen Architektur in ein pseudofollikuläres Muster. Über 30 % aller kernhaltigen Zellen des Knochenmarks sind reife Lymphozyten. Das Blutbild zeigt eine permanente Leukozytose mit einem Lymphozytenanteil von über 70 %. Ein vermehrtes Auftreten von Prolymphozyten korreliert mit aggressiver Erkrankung.

Ätiologisch sind genetische Faktoren von Bedeutung. So ist das Erkrankungsrisiko bei Kindern von Patienten mit CLL etwa dreifach erhöht und bei über 80 % der CLL-Patienten lässt sich eine chromosomale Veränderung nachweisen. Die Deletion 13q14 ist dabei mit einer relativen Häufigkeit von 55 % die am häufigsten auftretende genetische Aberration, die im Verlauf der Erkrankung für eine eher günstige Prognose spricht. Eine intermediäre Prognose haben die 15 % der Patienten, die eine Trisomie 12q zeigen. Bei 20 % der Patienten liegt eine Deletion 11q22-23 und bei 5 % eine Deletion

17q13 vor, was für eine ungünstige Prognose spricht. (*Dohner, Stilgenbauer et al. 2000; Kay, Hamblin et al. 2002*)

Die Diagnose wird meist als Zufallsbefund aufgrund erhöhter Lymphozytenzahlen und B-Symptomatik gestellt. (*Kay, Hamblin et al. 2002*) Initial haben ca. 50 % der Patienten und später nahezu alle Patienten eine symmetrische, derbe und indolente Lymphknotenschwellung. Eventuell treten ebenfalls Splenomegalie und geringe Lebervergrößerung aufgrund von periportal Lymphozyteninfiltration sowie verschiedenartige Hautbeteiligungen auf.

Durch Wärmeautoantikörper kommt es bei 10 % der Patienten zu einer autoimmunhämolytischen Anämie und eine ausgeprägte Lymphozytose kann zu einem Hyperviskositätssyndrom führen. Die häufigste Komplikation und Todesursache sind Infekte infolge Antikörpermangelsyndroms, Granulozytopenie und Chemotherapie. Bei 5 % der Patienten entwickelt sich eine Transformation der CLL in ein sekundär höher malignes NHL mit ungünstiger Prognose (Richter-Syndrom).

Mit der Gesamttumormasse korrelieren die Serumspiegel von beta-2-Mikroglobulin, Thymidinkinase und löslichem sCD23, welche daher einen Rückschluss auf die Prognose zulassen. (*Di Giovanni, Valentini et al. 1989; Hallek, Langenmayer et al. 1999; Keating 1999*) Für eine ungünstige Prognose sprechen ebenfalls LDH-Erhöhung und ZAP70-Expression. (*Byrd, Stilgenbauer et al. 2004*)

Bei Patienten mit einer so genannten „Smoldering CLL“ (RAI-Stadium 0, noduläre Knochenmarkinfiltration, Lymphozyten Verdopplungszeit im Blut > zwölf Monate, absolute Lymphozytenzahl < 30.000 / $\mu$ l, Hb > 13 g/dl) ist die Lebenserwartung annähernd normal. Sie werden nicht therapiert, da die toxischen Nebenwirkungen einer möglichen Chemotherapie in der Regel zu mehr Komplikationen führen, als die Erkrankung selbst. (*Kay, Hamblin et al. 2002*) Symptomatische Patienten im Stadium B nach Binet und alle Patienten im Stadium C sollten nach derzeitigem Kenntnisstand eine Chemotherapie erhalten. (*Kay, Hamblin et al. 2002*) Bei der Therapie eines Rezidivs sollte darüber hinaus die Möglichkeit einer allogenen Stammzelltransplantation diskutiert werden. (*Kay, Hamblin et al. 2002*)

Insgesamt ist die CLL unter allen Leukosen die deutlich gutartigste Erkrankung. Der klinische Verlauf ist extrem variabel, so dass die Überlebenszeiten von Monaten bis Jahrzehnten reichen, wobei das mittlere Gesamtüberleben bei sieben Jahren liegt. (Byrd, Stilgenbauer et al. 2004)

### 2.3.2. Plasmazellneoplasien

#### 2.3.2.1. Multiples Myelom (MM)

Das MM ist ein aggressives B-Zell-NHL. Ausgangspunkt ist ein Klon maligne transformierter, terminal differenzierter B-Zellen, die das Knochenmark diffus oder multilokulär infiltrieren. Makroskopisch imponieren die Infiltrationen im Knochenmark als graue bis hämorrhagische, gelatineartige Herde. Mikroskopisch findet man eine stark vermehrte Anzahl pleomorpher Plasmazellen, die über 30 % des Knochenmarkvolumens ausfüllen. Gegebenenfalls können die Infiltrationsherde von prominenten Osteoklasten umgeben sein. Die neoplastischen Plasmazellen verdrängen die normale Blutbildung und zerstören den Knochen, indem sie Osteoklasten stimulieren und die Osteoblastenfunktion hemmen, wodurch osteolytische Herde entstehen. Das Überleben und die Proliferation der neoplastischen Zellen werden durch von ihnen selbst und von Stromazellen des Knochenmarks produzierte Zytokine, wie zum Beispiel Interleukin 6, gefördert. Im Zytoplasma der neoplastischen Plasmazellen finden sich vermehrt endoplasmatische Reticula, die Immunglobuline enthalten. Nach diesen monoklonalen Immunglobulinen wird das MM in verschiedene Typen unterteilt.

Dem MM kann eine MGUS als prä-maligne Veränderung vorausgehen. Ca. 25 % der Patienten mit MGUS entwickeln ein MM oder eine andere lymphoproliferative Erkrankung, wobei das Intervall durchschnittlich zehn Jahre beträgt. Als weitere Risikofaktoren gelten Exposition gegenüber Agenzien wie Pestiziden, Asbest und Petroleum, radioaktive Strahlung sowie chronische Infektionen oder chronische Antigenstimulation.

Bei 50 - 70 % der Patienten mit MM besteht eine Translokationen, die den Immunglobulinschwerketten (IgH) Genlocus auf Chromosom 14q32 betrifft. Dadurch kommt es zu einer Dysregulation von Onkogenen der Translokationspartner-Region (z.B. Cyclin D1 auf 11q13 oder fgfr3/mmset auf 4q16.3). Eine weitere möglicherweise ursächliche chromosomale Veränderung ist die Deletion 13q, die bei der Hälfte der Patienten auftritt und durch die der Verlust eines kritischen Tumorsuppressorgens vermutet wird. (*Bink, Haralambieva et al. 2008*) Bei ca. 25 % der Patienten kann eine Deletion 17p13, die zu einem Verlust von p53 führt, nachgewiesen werden.

In Laboruntersuchungen zeigt sich eine stark beschleunigte BSG, ein erhöhtes Gesamteiweiß und ein M-Gradient in der Serumelektrophorese.

Typisch ist das Auftreten von B-Symptomatik und Knochenschmerzen sowie pathologischen Frakturen. Die weitere Symptomatik besteht aus Antikörpermangelsyndrom, Anämie, Hyperkalzämie mit Nephrokalzinose, Proteinurie bis hin zu Niereninsuffizienz, Polyneuropathie sowie Hyperviskositätssyndrom durch die Paraproteinämie und erhöhte Blutungsneigung durch Antikörper-Bindung der Gerinnungsfaktoren.

Ca. 10 % der MM zeigen einen langsamen komplikationslosen Verlauf ohne Anstieg der monoklonalen Immunglobuline. Diese werden als „Smoldering Myeloma“ bezeichnet, welche aufgrund einer niedrigen Tumorzellkinetik lange in einem Zustand geringer Proliferation verharren. Die Mehrzahl der Patienten hat jedoch ein progredientes MM welches ab Stadium 2, bei Leichtketten-Myelomen wegen der Gefahr der Nierenschädigung auch schon früher, therapiert werden sollte. Die ursächlichen chromosomalen Veränderungen, Tumorzellkinetik und -grading sowie Krankheitskomplikationen sind entscheidend für den Krankheitsverlauf. Insgesamt liegt das mittlere Überleben zwischen 64 Monaten in Stadium 1 und zwölf Monaten in Stadium 3.

### 2.3.2.2. Extramedulläres Multiples Myelom (EMM)

Das EMM ist entweder eine primär auftretende Sonderform des MM, oder eine sekundär entstandene Komplikation des MM. Bei 15 - 20 % der Patienten mit MM kann zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine Infiltration neoplastischer Plasmazellen in extramedulläre Gewebe festgestellt werden. Weitere 15 % der MM-Patienten entwickeln sekundär im Verlauf ihrer Erkrankung eine extramedulläre Infiltration. (Rosinol, Cibeira et al. 2004) Das EMM kann primär oder sekundär in fast jedem beliebigen Organ auftreten. Häufig sind Infiltrationen von Weichteilen nahe bestehender Knochenherde, vor allem im Bereich des Achsenskeletts. Oberflächliche Infiltrationsherde sind zum Teil palpabel, ansonsten werden sie durch bildgebende Verfahren nachgewiesen. Die Diagnose muss in jedem Fall histologisch mittels Biopsie gestellt werden. (Hörger, Brodoefel et al. 2006)

Die Klinik hängt hauptsächlich von der Lokalisation des Tumors ab und äußert sich oft als tumorbedingter Kompressionsschmerz. Verlauf und Prognose sind deutlich schlechter als beim MM.

### 2.3.2.3. Extramedulläres Plasmozytom (EMP)

Das EMP ist ein seltener, typischerweise solitär auftretender extraossärer Tumor, der durch eine Proliferation neoplastischer Plasmazellen entsteht, ohne dass eine Knochenmarksinfiltration nachweisbar ist. Über 80 % der EMP sind im oberen aerodigestiven Trakt lokalisiert, es können jedoch auch der untere Gastrointestinaltrakt, das Urogenitalsystem, Lunge, Haut oder Lymphknoten betroffen sein. (Alexiou, Kau et al. 1999) Ca. 4 % aller Plasmazellneoplasien sind EMP, wobei Männer etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen. (Kremer, Ott et al. 2005) Das bei einer Mehrzahl von MM-Fällen auftretende M-Protein liegt in nur 25 % der EMP vor.

Es besteht eine große Ähnlichkeit zu extranodalen Marginalzonen-Lymphomen (mucosa associated lymphatic tissue (MALT)-Lymphom). Daher wird diskutiert,

ob das EMP eine Sonderform des MALT-Lymphoms mit extremer plasmazellulärer Differenzierung darstellt. (*Hussong, Perkins et al. 1999*)

Bei der MGUS konnten viele der genetischen Veränderungen nachgewiesen werden, die auch beim MM von Wichtigkeit sind. Dies impliziert, dass die MGUS als frühe Vorstufe in der Pathogenese des MM betrachtet werden kann. (*Avet-Loiseau, Facon et al. 1999*) Beim EMP, einer anderen möglichen Vorstufe des MM, konnten im Gegensatz dazu keine übereinstimmenden zytogenetischen Alterationen nachgewiesen werden.

Gewöhnlicherweise haben EMP einen indolenten Verlauf mit gutem Ansprechen auf lokale Radiotherapie. Die Prognose des EMP ist nach Exzision und darauf folgender Bestrahlung gut, jedoch besteht die Tendenz zur Entwicklung von Lokalrezidiven, die bei ca. 5 - 30 % der Patienten auftreten. Selten kann ein EMP sogar zu einem MM konvertieren, hierfür gibt es jedoch keine sicheren prädiktiven Parameter.

## 2.4. Die verwendeten Marker

### 2.4.1. Etablierte diagnostische Marker

Anhand von durchflusszytometrischen oder immunhistochemischen Untersuchungen kann der Immunphänotyp verschiedener Zellen bestimmt werden, der häufig Rückschlüsse auf bestimmte Krankheitsentitäten zulässt. Der Immunphänotyp setzt sich dabei aus einem Expressionsmuster von CD-Antigenen (Cluster of Differentiation) und anderen Oberflächenmarkern zusammen, welche an verschiedenen Funktionen, wie zum Beispiel Zell-Zell-Interaktion, beteiligt sind und als Zytokinrezeptor, Ionenkanal oder Transporter dienen können. (*Kishimoto, Goyert et al. 1997*)

Typischerweise werden von LPL-Zellen, ebenso wie von CLL-Zellen, die Pan-B-Zell-Marker CD19, CD20, CD22, CD79a exprimiert. (*Vijay and Gertz 2007*) Dies sind Antigene, die fast ausschließlich auf B-Zellen verschiedener oder aller Reifestadien zu finden sind und unter anderem eine wichtige Rolle in der B-Zell-Aktivierung und Homöostase spielen. Die meisten MM sind für die B-

Zell-Antigene CD19 und CD20 negativ, wohingegen Plasmazellen physiologischerweise CD19 exprimieren. Ein weiterer Unterschied zwischen Plasmazellen und MM-Zellen besteht für CD56, ein Adhäsionsmolekül, welches in den neoplastischen Plasmazellen meist exprimiert wird (dies gilt nicht bei der Plasmazellleukämie).

Ebenfalls in fast allen Fällen des LPL kann die Expression von Surface-IgM nachgewiesen werden. (*Owen, Treon et al. 2003*) MM-Zellen exprimieren typischerweise monoklonale zytoplasmatische Immunglobuline, jedoch keine Oberflächenantikörper.

Zu anderen Proteinen findet man in der Literatur stark voneinander abweichende Daten. Zusammenfassend kann man sagen, dass CD25, FMC7, Bcl2 und CD52 gewöhnlicherweise von den lymphoplasmozytischen Zellen exprimiert werden. Allgemein wird CD25 auf aktivierten Immunzellen und regulatorischen T-Lymphozyten gefunden und ist der Rezeptor für den Wachstumsfaktor Interleukin-2. Bcl2 (B-Cell-Lymphoma 2) ist ein Onkogen, welches auf Chromosom 18q21 lokalisiert ist und mit der Entwicklung von B-Zell-Neoplasien in Zusammenhang steht. (*Tsujimoto, Finger et al. 1984*)

Die Datenlage bezüglich der Proteine CD5 und CD23 in LPL bleibt uneinheitlich. Einige Studien gehen von einer Negativität der LPL-Zellen aus, in anderen Studien konnte eine Expression von CD5 (in 5 - 20 % positiv) und CD23 (in 35 - 61 % positiv), den typischen Oberflächenmarkern der CLL, durch die lymphoplasmozytischen Zellen nachgewiesen werden. (*Hunter, Branagan et al. 2005; Konoplev, Medeiros et al. 2005; Vijay and Gertz 2007*) CD5 (Leu1) ist ein Glykoprotein der Oberfläche von T-Lymphozyten und einer Subpopulation der B-Lymphozyten, dessen Funktion die Bindung von CD72 ist. Das Chromosom 11q13 kodiert für das Antigen, welches mit verschiedenen Leukämieformen assoziiert ist. (*Kipps 1989*) Das Leukozyten-Differenzierungs-Antigen CD23 wird von B-Zellen, aktivierten Makrophagen und eosinophilen Granulozyten exprimiert. CD23 ist ein Schlüsselmolekül für die Aktivierung und das Wachstum von B-Zellen und dient als niedrig affiner IgE-Rezeptor bei IgE-vermittelten Immunreaktionen. Außerdem wirkt sezerniertes CD23 als potenter Wachstumsfaktor. CD23 kommt gemeinsam mit Cyclin D1, welches bei der CLL

nicht exprimiert wird, eine besonders wichtige Rolle in der Abgrenzung der CLL vom Mantelzell-Lymphom zu.

CD38 und CD138, das Kollagen-1-bindende Proteoglykan (Syndecan-1), welches für die Plasmazellbindung im Knochenmark entscheidend ist, sind Plasmazellmarker, die bei LPL selten nachweisbar sind, aber von den neoplastischen Zellen des MM sehr stark exprimiert werden. Die CLL-Zellen exprimieren kein CD38. Eine Ausnahme bilden CLL-Fälle mit nicht-mutiertem Gen für die variable Immunglobulin-Region, die eine CD38-Positivität zeigen können. Gegenläufig zu den Plasmazellmarkern nimmt Pax5 (paired box gene 5) mit plasmazellulärer Differenzierung der B-Zellen ab. Pax5, auch bezeichnet als BSAP (B-cell lineage-specific activator protein) ist ein Transkriptionsfaktor, der in der frühen, aber nicht der späteren Phase der B-Zell-Differenzierung exprimiert wird. (Walther, Guenet et al. 1991) Das Pax5-Gen ist auf der Region 9p13 lokalisiert, welche von der Translokation t(9;14)(p13;q32) betroffen ist. Diese Translokation tritt in bis zu 50 % der LPL auf und der Dysregulation der Pax5-Gentranskription wird in der Literatur Anteil an der Pathogenese des LPL zugeschrieben. (Busslinger, Klix et al. 1996)

Als typischerweise negativ oder nur sehr selten von sowohl LPL-Zellen als auch CLL-Zellen exprimiert, gelten CD10, Common acute lymphocytic leukemia antigen, welches von unreifen und einigen reifen B-Zellen, lymphoiden Vorläuferzellen und Granulozyten exprimiert wird, und CD103, das für verschiedene Zell- und Entwicklungsprozesse wichtig ist. (Owen, Treon et al. 2003; Vijay and Gertz 2007) MM-Zellen zeigen sich dagegen CD10 positiv.

In der Knochenmarkumgebung des LPL-Infiltrates befinden sich massiv vermehrte Mastzellen, die eine verstärkte Expression von CD154 zeigen. (Vijay and Gertz 2007) CD154, auch als CD40L (Ligand) bezeichnet, wirkt bei der Stimulierung von B-Zellen in Immunreaktionen mit. (DiSanto, Bonnefoy et al. 1993)

Darüber soll unser Kollektiv auf die Expression von Bcl6, Mum1 und p53 untersucht werden. Bcl6 (B-cell-Lymphoma 6) ist ein Protein, welches als Inhibitor der Gen-Transkription fungieren kann und eine wichtige Funktion bei der Formation der Keimzentren trägt. Eine Translokation des Genlocus von Bcl6 wird in bis zu 40 % der DLBCL beschrieben. (Cattoretti, Chang et al. 1995)

Mum1, auch bezeichnet als IRF4 (interferon regulatory factor 4), ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Entwicklung bestimmter Subgruppen von T-Helferzellen entscheidend ist und dem eine Schlüsselrolle als Regulator der B-Zell-Differenzierung und -Entwicklung zukommt. (*Di Bernardo, Crowther-Swanepoel et al. 2008; Staudt, Bothur et al. 2010*)

Auch p53 ist ein Transkriptionsfaktor. Das Protein reguliert Gene, die einen Stop des Zellzyklus induzieren und kontrolliert unter anderem Apoptose sowie DNA-Reparatur. Ein Aktivitätsverlust von p53, durch Mutationen oder up- bzw. downstream von p53 gelegene Signalweg-Dysregulationen, ist im Zusammenhang mit neoplastischen Erkrankungen nahezu ubiquitär nachweisbar. (*Toledo and Wahl 2006*)

#### 2.4.2. APRIL

APRIL steht für „a proliferation-inducing ligand“ und wird alternativ auch als TALL-2 oder TNFSF13 bezeichnet. Das Protein ist verwandt mit dem “B-cell activating factor of the TNF family” BAFF (= BLYS oder TALL-1). Während BAFF ein Protein der Zelloberfläche ist, wird APRIL im Zellinneren prozessiert und entwickelt seine Wirkung als sezernierter löslicher Faktor. Die Zelloberflächen-ständige Form von APRIL wird als TWE-PRIL bezeichnet. (*Daridon, Youinou et al. 2008*)

APRIL und BAFF gehören zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) und teilen viele Eigenschaften und Funktionen. (*Shu, Hu et al. 1999; Haiat, Billard et al. 2006*) Mitglieder der Familie der TNF induzieren pleiotrope biologische Prozesse. Dazu gehören unter anderem Zellproliferation und -differenzierung, programmierter Zelltod sowie die Modulation von Immunreaktionen.

APRIL wird unter anderem von Monozyten, dendritischen Zellen und Subpopulationen von Lymphozyten exprimiert. (*Chu, Enghard et al. 2007*) Während APRIL in physiologischen Geweben kaum detektierbar ist, wird es jedoch in vielen Tumorzellen, vor allem in Colon- und Schilddrüsenkarzinomen, sowie Neoplasien lymphatischer Gewebe hochreguliert und damit nachweisbar. (*Haiat, Billard et al. 2006*) Bereits bei der ersten Beschreibung des Proteins im

Jahr 1998 wurde sein Zusammenhang mit Krebserkrankungen aufgezeigt. So konnte in der Studie von Hahne et al. die Expression von APRIL mRNA in diversen Tumorzelllinien verschiedenen Ursprungs und eine Stimulation der Zellproliferation durch APRIL in vitro und in vivo nachgewiesen werden. Die APRIL-positiven Tumorzellen zeigten dabei eine deutlich erhöhte Wachstumsrate. (Hahne, Kataoka et al. 1998) Diese wachstumsfördernde Wirkung entwickelt APRIL über eine Induktion von c-Myc und Bcl-6 sowie eine Suppression von p53. (Haia, Billard et al. 2006)

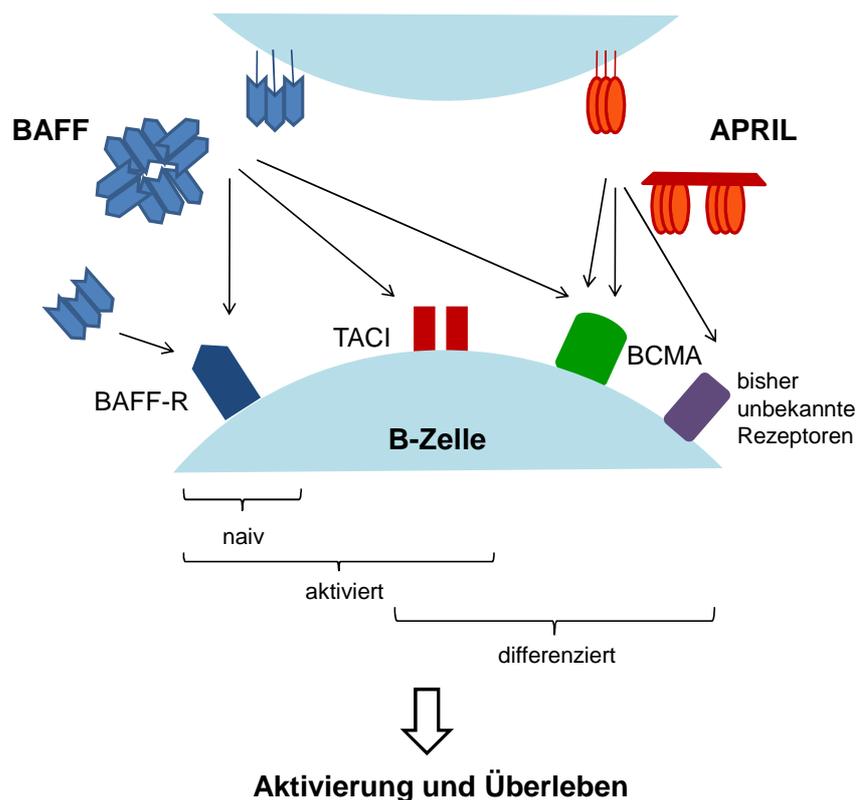
In weiteren Studien wurden die entscheidende Rolle von APRIL als Cofaktor beim Immunglobulin-Klassenwechsel und die damit verbundene wichtige Funktion in der humoralen Immunreaktion aufgezeigt. So konnte eine Dysregulation von APRIL mit signifikant erhöhten APRIL-Werten im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen, wie Lupus erythematodes, Morbus Reiter, rheumatoider Arthritis und Polymyositis nachgewiesen werden. (Roschke, Sosnovtseva et al. 2002; Mackay and Tangye 2004; Schwaller, Schneider et al. 2007)

APRIL und BAFF regulieren verschiedene Aspekte der B-Zell-Biologie. Dafür binden sie mit hoher Affinität an zwei Rezeptoren der TNF-Superfamilie BCMA (B-cell maturation antigen) und TACI (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand-interactor). BCMA wurde zunächst allein in Verbindung mit malignen T-Zell-Lymphomen nachgewiesen, wird jedoch von allen reifen Antikörper-bildenden B-Zellen und T-Zellen exprimiert. (Laabi, Gras et al. 1992) TACI kann auf Subpopulationen von B-Zellen und aktivierten T-Zellen nachgewiesen werden. Darüberhinaus interagiert APRIL mit weiteren bisher nicht identifizierten Rezeptoren, während BAFF zusätzlich an BAFF-R (= BR3) bindet. (Mackay and Tangye 2004; Endo, Nishio et al. 2007; Schwaller, Schneider et al. 2007)

Lösliche BAFF-Trimere, aber nicht APRIL, aktivieren den von naiven B-Zellen exprimierten BAFF-R, über welchen diese Signale zum Überleben erhalten. Außerdem wird über diesen Signalweg vermutlich die Größe des B-Zell-Pools reguliert. Durch B-Zell-Aktivierung, wie zum Beispiel über den B-Zell-Rezeptor (BZR) oder Toll-like-Rezeptoren (TLR) gesteuert, wird TACI induziert. Oligomere Formen von BAFF und APRIL (Membran-gebunden, 60-mer,

Proteoglykan-gebunden) binden an TACI, welches wahrscheinlich für die Entwicklung einiger Gruppen von Plasmazellen entscheidend ist. BCMA wird erst von reifen Antikörper-sezernierenden Zellen exprimiert. Während der Differenzierung der B-Zelle aus ihrem naiven Stadium in einen differenzierten, Antikörper-sezernierenden Zustand, wechseln die Rezeptoren für APRIL und BAFF von BAFF-R zu TACI und von TACI zu BCMA, was sich in einer vermehrten Wirksamkeit von APRIL und in einer Abnahme der Wirkung von BAFF widerspiegelt. (Schneider 2005; Bossen and Schneider 2006) Auf diese Weise fördern APRIL und BAFF das B-Zell-Überleben in unterschiedlichen Stadien ihrer Differenzierung.

**Abbildung 2:** BAFF und APRIL fördern das Überleben von B-Zellen



Modifiziert nach: [www.unil.ch/.../ib/shared/Schneider/PS\\_Fig1.gif](http://www.unil.ch/.../ib/shared/Schneider/PS_Fig1.gif).

BAFF und APRIL binden an verschiedene Rezeptoren der B-Zelle und fördern so ihr Überleben. Lösliche BAFF-Trimere binden an BAFF-R, welches ausschließlich auf der Oberfläche naiver B-Zellen nachweisbar ist. Membrangebundenes BAFF sowie BAFF-Oligomere aktivieren B-Zellen sowohl über BAFF-R als auch über TACI und BCMA.

*Membrangebundenes sowie lösliches Proteoglykan-gebundenes APRIL bindet an TACI, BCMA und bisher unbekannte weitere Rezeptoren der B-Zelle und fördert ihr Überleben daher erst in ihrem differenzierten Stadium.*

Viele Mitglieder der TNF-Superfamilie beeinflussen die Aktivierung von NF-kappaB (nuclear factor of kappa B). Aktuelle Studien zeigen, dass NF-kappaB über einen kanonischen und einen alternativen Signalweg aktiviert wird. *(Bonizzi and Karin 2004)* Über BAFF-R wird der alternative, dagegen über BCMA und TACI der kanonische NF-kappaB Signalweg aktiviert. Durch seine Bindung an BCMA und TACI und die daraus resultierende Aktivierung des kanonischen NF-kappaB-Signalwegs hat APRIL einen antiapoptotischen Effekt auf B-Zellen. Eine Überexpression von APRIL und BAFF wird aus diesen Gründen für die Entstehung von B-Zell-Neoplasien mitverantwortlich gemacht. *(Planelles, Medema et al. 2008)*

Nicht sicher geklärt bleibt dabei die Frage, ob APRIL vor allem von den Tumorzellen selbst oder hauptsächlich von Zellen der Tumorumgebung sezerniert wird. *(Haiat, Billard et al. 2006; Chu, Enghard et al. 2007)*

In der Literatur werden bezüglich der Funktion von APRIL in der Entstehung von B-Zell-Neoplasien unterschiedliche Aussagen getroffen. Einigen Studien zu Folge spielt APRIL keine Rolle in der Pathogenese von low-grade NHL, wohingegen ein Zusammenhang von APRIL mit der Entstehung von high-grade NHL, wie dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) und dem Burkitt-Lymphom beschrieben wird. *(Schwaller, Schneider et al. 2007)*

Endo et al. konnten allerdings BAFF-R, BCMA und TACI auf der Oberfläche von CLL-Zellen nachweisen. *(Endo, Nishio et al. 2007)* Weitere Studien zeigten einen Anstieg des Serumspiegels von APRIL bei Patienten mit CLL, vor allem im fortgeschrittenen Stadium RAI 3 - 4, und eine direkte Korrelation zwischen einer hohen APRIL-Expression und der Abnahme des Patientenüberlebens. *(Haiat, Billard et al. 2006; Planelles, Castillo-Gutierrez et al. 2007; Bojarska-Junak, Hus et al. 2009)* Die Ursache wird in der durch APRIL induzierten Expression von Mcl-1, einem antiapoptotisch wirksamen Protein, gesehen. *(Haiat, Billard et al. 2006)*

Bei MM konnten vermehrt BCMA und TACI auf der Oberfläche der MM-Zellen sowie eine Produktion von APRIL und BAFF durch ihr KM-Microenvironment

(Monozyten, Osteoklasten) nachgewiesen werden. Die MM-Zellen überexprimieren darüberhinaus Syndecan-1 (CD138), welches in viele Interaktionen mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen involviert ist. Über Syndecan-1 als Cofaktor kann vermehrt APRIL an die Tumorzellen gebunden werden, welches das Zellwachstum und -überleben positiv beeinflusst. (*Moreaux, Sprynski et al. 2009*)

Moreaux et al. zeigten außerdem eine verstärkte Expression von Mcl-1 und Bcl-2 von durch APRIL und BAFF stimulierten MM-Zellen. (*Moreaux, Legouffe et al. 2004*) CLL- und MM-Zellen exprimieren interessanterweise unabhängig von Translokationen des Bcl-2-Genlocus im Verhältnis zu normalen B-Lymphozyten vermehrt Mcl-1 und Bcl-2. Daraus lässt sich schließen, dass BAFF und APRIL an entscheidenden pathologischen Dysregulationen der neoplastischen Zellen des MM und der CLL beteiligt sein könnten. (*Mackay and Tangye 2004*)

Das Expressionsmuster der Rezeptoren BAFF-R, BCMA und TACI ist bei den Zellen des LPL vergleichbar mit dem der MM-Zellen. (*Elsawa, Novak et al. 2006*) Ein diagnostisches Kriterium des LPL ist die im KM vermehrte Anzahl von Mastzellen. Diese produzieren CD40L, APRIL und BLYS, die wiederum als Überlebenssignale auf die lymphoplasmozytischen Zellen wirken. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Microenvironment des Knochenmarks bei LPL von entscheidender Bedeutung ist und daher auch das TNF-Familienmitglied APRIL, dessen Rezeptoren auf der Zelloberfläche der LPL-Zellen nachgewiesen werden konnte, eine wichtige Funktion in der Pathologie des LPL trägt. (*Ho, Hatjiharissi et al. 2008*)

Diese Informationen lassen darauf schließen, dass eine Blockierung der Wirkung von APRIL, zum Beispiel mit Inhibitoren der Proteinkinase IKK $\beta$ , welche für die Aktivierung des kanonischen NF-kappaB-Signalwegs benötigt wird, eine Bedeutung in der Therapie von B-Zell-Neoplasien haben könnte. (*Endo, Nishio et al. 2007*) Bei LPL könnte durch diese Blockierung von APRIL, aber auch durch Therapien, die gegen CD40L und BAFF gerichtet sind, die Proliferation der neoplastischen lymphoplasmozytischen Zellen gezielt gestoppt werden. (*Ho, Hatjiharissi et al. 2008*)

### 2.4.3. CD27

CD27 gehört zur TNF-Rezeptor-Familie. Diese Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle beim Wachstum von Zellen, ihrer Differenzierung und Apoptose. (*Prasad, Ao et al. 1997*) CD27 ist ein glykosyliertes Transmembranprotein, welches von Chromosom 12p13 kodiert wird und von Natürlichen Killerzellen sowie Subpopulationen von T- und B-Lymphozyten exprimiert wird. Das Protein wurde als Costimulator von B- und T-Lymphozyten identifiziert. (*Borst, Hendriks et al. 2005*) Über eine Rekrutierung von NIK (NF-kappaB-inducing kinase) kann CD27 den kanonischen und alternativen NF-kappaB-Signalweg induzieren, welcher unter anderem einen antiapoptotischen Effekt auf die Zielzellen vermittelt. (*Ramakrishnan, Wang et al. 2004*)

Aus der Literatur ist CD27 als Oberflächenmarker von B-Gedächtniszellen bekannt. (*Agematsu 2000*) Es wird angenommen, dass die lymphoplasmozytischen Zellen des LPL aus B-Gedächtniszellen hervorgehen und somit besteht die Erwartung, CD27 ebenfalls als Oberflächenmarker der lymphoplasmozytischen Zellen nachzuweisen. (*Sahota, Babbage et al. 2009*)

Die lymphoplasmozytischen Zellen sezernieren ebenfalls lösliches sCD27. In rezenten Studien konnten bei Patienten mit LPL im Vergleich zu Kontrollen mit MGUS und MM erhöhte Serumspiegel des sCD27 gezeigt werden. (*Ho, Hatjiharissi et al. 2008*) Der sCD27-Serumspiegel verläuft parallel zur Krankheitslast der Patienten mit LPL. Während der IgM-Serumspiegel therapeutischen Schwankungen, z.B. verursacht durch Rituximab-Therapie oder Plasmapherese, unterliegt und daher nicht immer zuverlässig einen Progress der Erkrankung erkennen lässt, bleibt der sCD27-Serumspiegel in diesen Situationen aussagekräftig und ist daher ein vielversprechender Krankheitsverlaufsmarker in der Behandlung von Patienten mit LPL. (*Ho, Hatjiharissi et al. 2008; Ciccarelli, Yang et al. 2009*)

Ebenfalls in der Literatur publiziert sind erhöhte sCD27-Werte bei CLL, Morbus Hodgkin und verschiedenen Autoimmunerkrankungen. (*Ranheim, Cantwell et al. 1995; Font, Pallares et al. 1996; Tak, Hintzen et al. 1996*)

CD70, ebenfalls Mitglied der TNF-Superfamilie, ist der membrangebundene Rezeptorligand von CD27. Die Aktivität von CD27 wird über das Vorhandensein

seines Liganden gesteuert. CD70 wird von aktivierten Lymphozyten, natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen sowie Monozyten gebildet, wirkt proliferationsfördernd auf aktivierte Lymphozyten und hemmt die Plasmazelldifferenzierung. *(Borst, Hendriks et al. 2005)*

In der Pathogenese des LPL kommt dem Microenvironment des Knochenmarks eine entscheidende Rolle zu. Potentiell könnte über CD27 und CD70 eine Induktion von Mastzellen erfolgen, welche wiederum wachstumsfördernde Signale für die lymphoplasmozytischen Zellen bilden. Im Versuch am Mausmodell konnte durch eine Blockierung des CD27-CD70-Signalweges die Krankheitsprogression unterbunden werden, was zukünftig die Möglichkeit einer zielgerichteten Antikörpertherapie der Patienten mit LPL in Aussicht stellt. *(Ho, Hatjiharissi et al. 2008)*

#### 2.4.4. Blimp1

Blimp1 (B-lymphocyte-induced maturation protein 1), auch als PRDM1 (PR domain-containing protein 1) oder PRDIBF1 (positive regulatory domain I-binding factor 1) bezeichnet, ist Mitglied der Familie der Proteine mit PR-Domäne, zu der auch RIZ (retinoblastoma zinc finger gene) und MDS1-EVI1 (leukemia cancer gene) gehören. *(Mock, Liu et al. 1996)*

Blimp1 ist vor allem in Knochenmark, Milz und Lymphknoten nachweisbar. Es wird in Monozyten und Granulozyten, proportional zu ihrer zunehmenden Differenzierung exprimiert. Durchflusszytometrische Analysen zeigen, dass eine Blockierung der Blimp1-Expression die Differenzierung von Makrophagen verzögert oder inhibiert und somit ihre Ausbildung zur Phagozytosefähigkeit stört. *(Chang, Angelin-Duclos et al. 2000)*

B-Lymphozyten und Plasmazellen exprimieren ebenfalls Blimp1. *(Angelin-Duclos, Cattoretti et al. 2000)* Zellen, die durch eine gleichzeitige Expression von CD138, Mum1 (IRF-4) und zytoplasmatischem Ig, ohne Nachweisbarkeit von Bcl-6 gekennzeichnet sind, zeigen in der Regel die stärkste Blimp1-Expression. *(Angelin-Duclos, Cattoretti et al. 2000; Tate, Hirayama-Ohashi et al. 2007)*

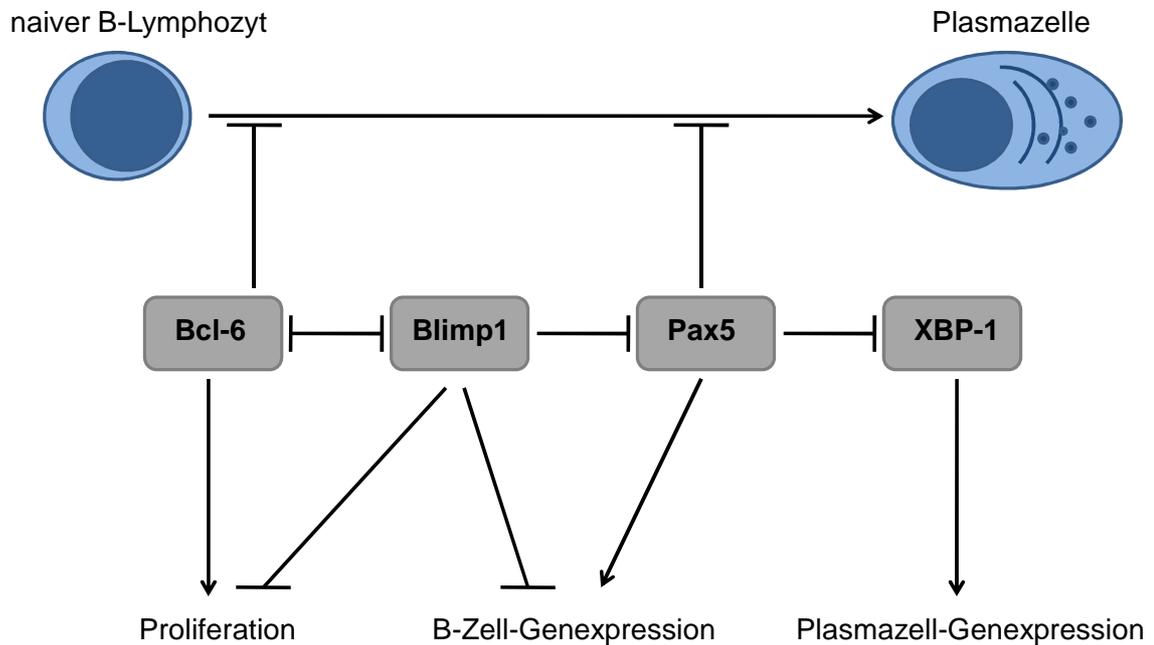
Das Protein wird durch Chromosom 6q21-q22.1 kodiert und wirkt als Tumorsuppressor. (*Tate, Hirayama-Ohashi et al. 2007*) Eine Deletion dieses chromosomalen Locus findet sich häufig bei verschiedenen Karzinomen, wie dem Magen-Karzinom und dem malignen Melanom, sowie insbesondere bei B-NHL. (*Mock, Liu et al. 1996; Pasqualucci, Compagno et al. 2006*)

Die Transkriptionsfaktoren Bcl-6, Blimp1, Pax5 und XBP-1 (X-box protein 1) bilden einen Regulationszyklus, über welchen die Differenzierung von naiven B-Zellen des Keimzentrums (GC) zu differenzierten, Antikörper-sezernierenden Plasmazellen kontrolliert wird. (*Shapiro-Shelef and Calame 2005*)

Bcl-6 blockiert die Expression von Blimp1, dem Regulator der Plasmazelldifferenzierung. (*Mora-Lopez, Reales et al. 2007*) Darüber hinaus fördert Bcl-6 die Zellproliferation, indem es die Expression des Zellzyklus-Inhibitor p27KIP1 supprimiert. Reziprok inhibiert Blimp1 die Expression von Bcl-6, wodurch das Programm der B-Zell-Genexpression abgeschaltet und die Expression von Proliferationsfaktoren unterdrückt wird. (*Schmidlin, Diehl et al. 2008*)

Ebenfalls supprimiert Blimp1 c-Myc und Pax5, wodurch die Zellteilung verlangsamt und die plasmazytische Differenzierung von B-Zellen ermöglicht wird. (*Tate, Hirayama-Ohashi et al. 2007; Fairfax, Kallies et al. 2008*) Darüber hinaus werden Id3, Spi-B, Syk, btk, CD19 und CD79A herunterreguliert und es kommt zu einer Unterdrückung des B-Zell-Rezeptor-Signals, was wiederum die B-Zell-Differenzierung steigert. (*Tate, Hirayama-Ohashi et al. 2007*) Somit ist Blimp1 wichtig für den Übergang von reifer B-Zelle zu Plasmazelle. (*Shapiro-Shelef, Lin et al. 2003*)

Blimp1 sowie XBP-1, welches die Expression von Genen fördert, die für die Plasmazellfunktionen, wie Ig-Sekretion, essentiell sind, und Mum1 steigen während der plasmazellulären Differenzierung signifikant an. (*Schmidlin, Diehl et al. 2008*) Ihre verminderte Expression oder eine vermehrte Antagonisierung von Blimp1 durch Spi-B, Bcl-6 und Pax5 führt zu einer unkontrollierten B-Zell-Proliferation. (*Mora-Lopez, Reales et al. 2007; Tate, Hirayama-Ohashi et al. 2007; Schmidlin, Diehl et al. 2008*)

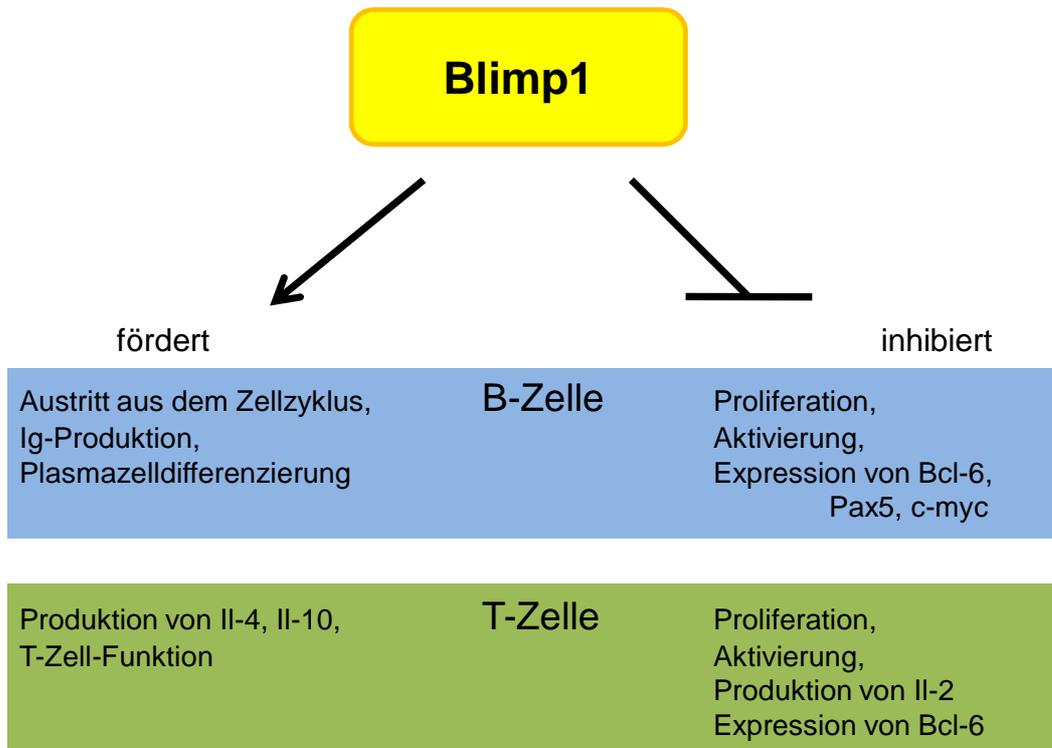
**Abbildung 3:** Regulation der B-Zell-Differenzierung

Modifiziert nach (Shaffer, Rosenwald et al. 2002).

Die Transkriptionsfaktoren *Bcl-6*, *Blimp1*, *Pax5* und *XBP-1* bilden einen Regulationszyklus, über welchen die Differenzierung von naiven B-Zellen des Keimzentrums zu differenzierten, Antikörper-sezernierenden Plasmazellen kontrolliert wird.

Dieses Modell zeigt, dass singuläre Abweichungen, wie zum Beispiel eine Deletion oder Translokation in der chromosomalen Region für die Proteine *Blimp1*, *Bcl-6* oder *Pax5* oder aber eine Dysregulation ihrer Wirkungsweise, das aufgezeigte Netzwerk aus seinem Gleichgewicht bringen und möglicherweise auf diesem Weg neoplastische Veränderungen des lymphatischen Systems entstehen können.

**Abbildung 4:** Die Funktionen von Blimp1



Modifiziert nach (Fink 2006).

*Blimp1 ist einer der Hauptregulatoren in der Entwicklung, Aktivierung und Differenzierung von B- und T-Zellen.*

Patienten mit LPL weisen gehäuft chromosomale Veränderungen des Genlocus von Blimp1 auf und die neoplastischen Zellen des LPL weisen eine Semidifferenzierung in einem Zwischenstadium aus Lymphozyten und Plasmazellen auf. (Schop, Kuehl et al. 2002; Chng, Schop et al. 2006)

Dies könnten Hinweise darauf sein, dass das B-Zell-Differenzierungsprotein Blimp1 und seine mögliche Dysregulation unter anderen Faktoren an der Pathogenese des LPL beteiligt sind.

#### 2.4.5. BLNK

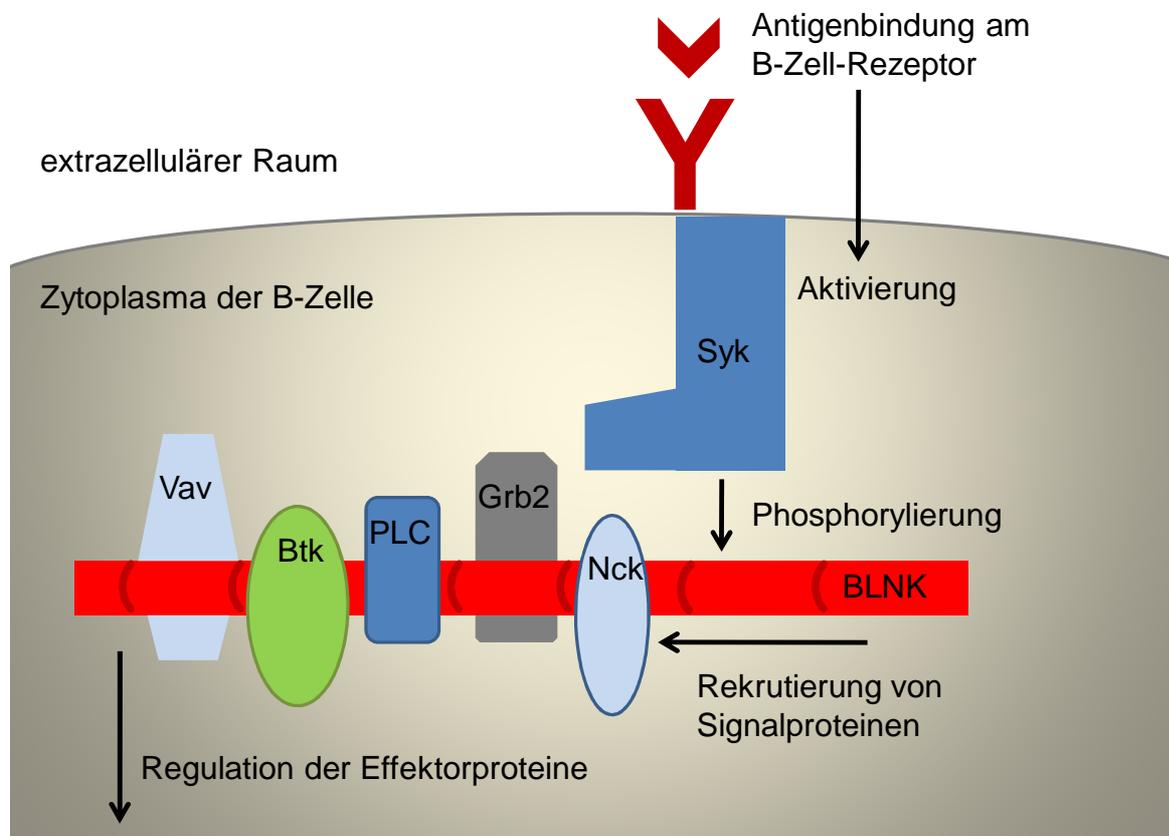
Die Aktivierung von Lymphozyten initiiert eine Reihe biochemischer Prozesse und den Ablauf einer Vielzahl distinkter Signalwege, welche zu Gentranskription, klonaler Expansion und zellulärer Differenzierung führen. (DeFranco 1997) Die durch den BZR regulierten Signalwege sind für eine normale B-Zell-Funktion entscheidend. Eine sequentielle Aktivierung verschiedener Kinasen, wie Syk und Btk, ist Voraussetzung für die Phosphorylierung von regulatorischen Effektorproteinen. (Fu, Turck et al. 1998) Studien konnten zeigen, dass in nichtlymphoiden Zellen BZR-aktiviertes Syk keine Phosphorylierung von Effektorproteinen bewirkt. (Richards, Gold et al. 1996) Daraus ergibt sich die Vermutung, dass der BZR in Lymphozyten mit Hilfe eines zellspezifischen Adaptorproteins die im Funktionskreis folgenden Effektorproteine reguliert. (Fu, Turck et al. 1998)

Als solches Adaptorprotein für BZR-aktivierte Kinasen konnte das B-cell linker protein (BLNK), auch als BASH oder SLP65 bezeichnet, identifiziert werden. BLNK wird von Chromosom 10q23.2 kodiert. BLNK mRNA wird hauptsächlich in der Milz, aber auch in Leber, Nieren und Pankreas exprimiert. Das BLNK-Protein wurde hauptsächlich in B-Zelllinien detektiert. (Fu, Turck et al. 1998)

Nach Antigenbindung aktiviert der BZR Syk, welches eine Phosphorylierung von BLNK bewirkt. Das phosphorylierte BLNK bietet Bindestellen für Signalproteine wie PLCgamma2, Btk, Vav, Grb2 und Nck, die dadurch zu aktivierten Rezeptoren rekrutiert werden, über welche die Effektorproteine des BZR reguliert werden. (Chiu, Dalton et al. 2002)

Als zentrales Adaptorprotein beeinflusst BLNK auf diese Weise die B-Zellfunktion, -Entwicklung und -Differenzierung.

**Abbildung 5:** BLNK als zentrales Element in der Signalleitung des BZR



Modifiziert nach einer Abbildung des Max-Planck-Instituts für Immunologie/Reth.

BLNK ist ein zentrales Adaptorprotein in der Signalleitung des B-Zell-Rezeptors. Damit stellt BLNK eine Verbindung zwischen dem B-Zell-Rezeptor und seinen Effektorproteinen dar, welche B-Zellfunktion, -Entwicklung und -Differenzierung steuern.

Untersuchungen zeigen, dass Menschen mit homozygotem Splicing-Defekt des Genlocus von BLNK eine normale Anzahl früher B-Zellen haben, jedoch keine prä-B-Zellen oder reifen B-Zellen daraus entstehen. Dies impliziert, dass BLNK eine kritische Rolle in der Entwicklung der pro- zur prä-B-Zelle zukommt. (Minegishi, Rohrer et al. 1999; Chiu, Dalton et al. 2002) Das Immunsystem dieses Patientenkollektivs zeigt sich normal entwickelt, so dass BLNK eine hoch spezifische Funktion zu haben scheint. (Minegishi, Rohrer et al. 1999) BLNK wird darüber hinaus die Funktion eines Tumorsuppressors zugeschrieben. (Gupta, Delrow et al. 2008; Nakayama, Yamamoto et al. 2009)

Rel/NF-kappaB-Dysregulationen spielen eine entscheidende Rolle bei Immun-, Entzündungs- und Stressreaktionen sowie in der Onkogenese. Rel/NF-kappaB Transkriptionsfaktoren supprimieren BLNK und BCAP (B-cell adaptor for phosphoinositide 3-kinase), woraufhin eine maligne Transformation von Lymphozyten beobachtet werden kann. Dieser Pathomechanismus ist bekannt bei DLBCL und Morbus Hodgkin. (*Gupta, Delrow et al. 2008*)

Mutationen, die zu BLNK-Verlusten führen, haben eine Aktivierung des JAK3/Stat5-Signalwegs als Folge, über den die Leukämogenese gefördert wird. (*Nakayama, Yamamoto et al. 2009*) So konnte an BLNK-defizienten Mäusen die Entstehung einer prä-B-Zell-Leukämie nachgewiesen werden und darüberhinaus wird ein Zusammenhang von Veränderungen im Bereich von BLNK mit der Entstehung von Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) im Kindesalter diskutiert. (*Jumaa, Bossaller et al. 2003; Nakayama, Yamamoto et al. 2009*) Weiterhin wurde bei 25 % untersuchter Fälle mit prä-B-Zell-Leukämie und bei 19 % mit B-Zell-Lymphom eine veränderte Expression von BLNK nachgewiesen. (*Sprangers, Feldhahn et al. 2006*)

Laut Literatur besteht ebenfalls ein möglicher Zusammenhang zwischen Veränderungen von BLNK und der Pathogenese des LPL, wobei hierzu genauer Untersuchungen noch ausstehen. (*Gutierrez, Ocio et al. 2007*)

## 2.5. Die Zielsetzung der Arbeit

Trotz beschriebener Definition und Diagnosekriterien des LPL bleibt seine Abgrenzung zu anderen NHL, insbesondere dem MZL mit plasmazellulärer Differenzierung, aber durchaus auch der CLL und dem MM unscharf. Die Datenlage zur Charakterisierung des LPL ist bisher unzureichend und uneinheitlich. Auch auslösende Ursachen, Risikofaktoren und chromosomale Veränderungen, die mit der Entstehung des LPL in Zusammenhang gebracht werden, sind nicht vollständig geklärt und bieten viel Raum für Diskussionen.

In dieser Arbeit sollen die Diagnosekriterien des LPL anhand der bereits bekannten Marker in unserem Patienten-Kollektiv überprüft werden. Dies umfasst unter anderem die Bestimmung der Oberflächenmarker CD23 und

CD5, für die in der Literatur stark voneinander abweichende Daten gefunden werden können.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob in rezenten Studien beschriebene Antigene der B-Zell-Differenzierung und -Homöostase einen Beitrag zur Diagnosefindung leisten können. So soll die Expression ausgewählter Proteine, APRIL, CD27, Blimp1 und BLNK, an unserem Kollektiv bestimmt und auf signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Krankheitsentitäten überprüft werden.

BLNK ist wichtig für die Kontrolle von Proliferation, Differenzierung und Apoptose der B-Zellen und scheint bei seiner Dysregulation an Prozessen der Leukämogenese beteiligt zu sein. Die meisten Untersuchungen hierzu erfolgten jedoch an frühen B-Zellen. Es stellt sich also die Frage, wie sich BLNK in den weiter differenzierten lymphoplasmozytischen Zellen bis hin zu Plasmazellen verhält.

Blimp1 ist ein Marker der plasmazellulären Differenzierung, der von 6q21-q22.1, also der Genregion, deren Deletion häufig mit der Entstehung des LPL in Zusammenhang gebracht wird, kodiert wird. Daher soll in unserem Kollektiv seine Expression bestimmt und damit die Eignung als neuer diagnostischer Marker geprüft werden.

Weiterhin soll die Expression von CD27 und APRIL untersucht werden. Diese Proteine scheinen eine entscheidende Rolle in der Entstehung des LPL zu spielen und erlauben daher eventuelle Rückschlüsse auf seinen Pathomechanismus. Die Proteine sind Inhalt vieler neuer Studien, wobei es aber bislang keine genauen Angaben über die Expression von APRIL beim LPL gibt. Die Aussagekraft des sCD27-Serumspiegels als Verlaufsparemeter in der Behandlung des LPL konnte nachgewiesen werden, während sie beim Oberflächenmarker von Tumorzellen umstritten bleibt und in unserer Studie überprüft werden soll.

Abschließend soll das Verhalten dieser Marker zueinander und ihre eventuelle Korrelation mit der Prognose der Patienten ausgewertet werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Auswahlkriterien für den Einschluss in die Studie

Für die vorliegende Arbeit wurden in Paraffin eingebettete Gewebeproben, die über das Computersystem PAS-Net aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München ausgewählt wurden, und zwei bereits erstellte und in zum Teil veröffentlichten Studien eingesetzte Tissue Micro Arrays aus den Beständen des Instituts verwendet. (*Kremer, Ott et al. 2005; Bink, Haralambieva et al. 2008*) Untersucht wurden Proben von Patienten mit folgenden Krankheitsentitäten: Lymphoplasmozytisches Lymphom (LPL), Chronische Lymphatische Leukämie (B-CLL), Extramedulläres Plasmozytom (EMP), Multiples Myelom (MM), Extramedulläres Myelom (EMM). Probenmaterial, das vor 1998 gewonnen wurde, konnte nicht berücksichtigt werden, da das Material bis zu diesem Zeitpunkt mit 1 % Formaldehyd/ 0,5 % Glutaraldehyd (pH 7,4) fixiert wurde, was die Immunhistochemie mit bestimmten Antikörpern negativ beeinflusst. Es wurden ausschließlich Gewebeproben verwendet, die gemäß des Standardprotokolls des Instituts unmittelbar nach ihrer Gewinnung für 24 Stunden in vierprozentiger, neutraler Formalinlösung fixiert und anschließend in neutraler (pH 7,0), gepufferter Natrium-EDTA-Lösung entkalkt worden waren (zweites gilt für alle Knochenmark-Biopsien). Alle Fälle von LPL und B-CLL wurden hinsichtlich der Diagnose und des Infiltrationsausmaßes anhand von histologischen und immunhistochemischen Standardfärbungen (HE, Giemsa, Gomori, PAS, Eisen, CD20, CD5, CD23, CD25) reevaluiert, nach WHO-Kriterien reklassifiziert und aufgrund der Resultate in die Studie aufgenommen bzw. ausgeschlossen. Die auf diese Weise ausgewählten LPL-Fälle wurden mit den Patientendaten der 3. Medizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München und anderer Kooperationspartner abgeglichen, wobei vor allem klinische Daten zu Diagnosestellung, Durchflusszytometrie, primärer Klinik, Laborwerten, Therapie und Verlauf erhoben wurden. Bei den untersuchten Fällen von EMP, MM, EMM war alle Evaluation hinsichtlich der Einschlusskriterien bereits erfolgt, da sie Bestandteil

weiterer, zum Teil publizierter Studien waren. (Kremer, Ott et al. 2005; Bink, Haralambieva et al. 2008)

**Tabelle 1: Diagnose, Patientenzahl, Einschlusskriterien**

LPL	25	KM-Infiltration > 50 %, klinische Parameter
B-CLL	43	KM-Infiltration > 50 %
EMP	24	keine Entwicklung eines MM < 12 Monaten, KM negativ
MM	19	KM-Infiltration > 50 %
EMM	8	gesichertes MM mit extramedullärer Komponente

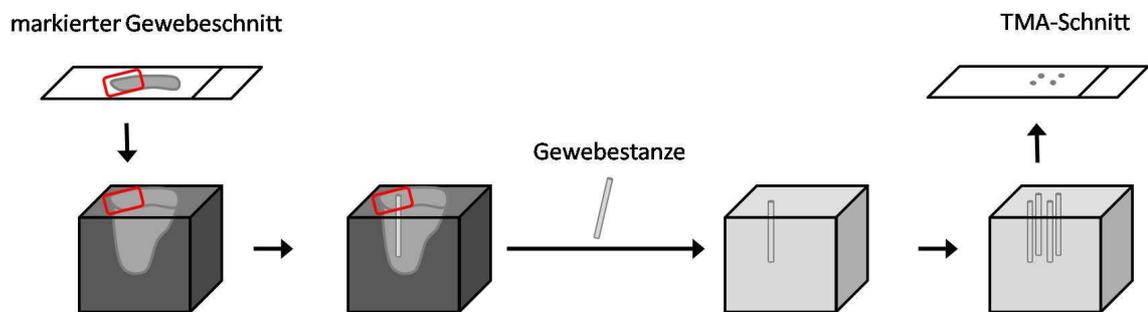
### 3.2. Tissue Micro Array (TMA)

Aus alle ausgewählten Proben des LPL und der B-CLL wurden zwei TMA hergestellt; je ein TMA für die jeweilige Krankheitsentität.

Zunächst erfolgte eine Begutachtung der in genannten Standardfärbungen (vgl. 3.1.) gefärbten Vollschnitte dieser Fälle. Eindeutig neoplastische Areale mit möglichst höchster Infiltrationsdichte wurden unter dem Mikroskop aufgesucht und auf dem Deckglas des jeweiligen Schnittes markiert. Diese Markierungen wurden bei makroskopischer Begutachtung des Gewebes auf das korrespondierende Areal im Paraffinblock übertragen. Zur eigentlichen Anfertigung des TMA wurde ein Tissue Micro Arrayer (MTA-1 2005, AlphaMetrix Biotech GmbH, Rödermark, Deutschland) verwendet. Mit diesem wurden über eine Hohnadel Gewebezylinder einer definierten Größe von 1,0 mm Durchmesser aus den zuvor markierten Arealen der Paraffinblöcke entnommen. Nach Aushärtung eines neu eingegossenen leeren Paraffinblocks (Tiefe 5 - 10 mm) wurden aus diesem geringfügig kleinere Paraffinstanzen entnommen. In die dadurch entstandenen Stanzkanäle wurden nach vorher festgelegtem und als Lageplan zur Wiederidentifizierung aufgezeichnetem Schema die Gewebezylinder eingebracht. Zwischen den zu untersuchenden Proben wurden auch Gewebezylinder aus physiologischen Lymphknoten in den Paraffinblock eingebracht, die als Positivkontrolle dienten. Damit sich keine

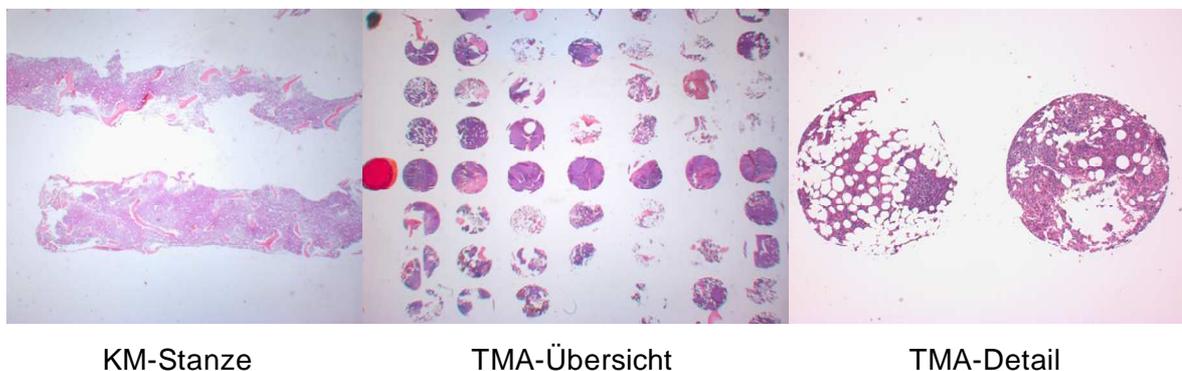
Risse bildeten, wurde ein ausreichender Abstand zum Rand des Paraffinblocks und zwischen den einzelnen Stanzen eingeplant. Um eine Lösung der Gewebestanzten aus dem Paraffinblock zu verhindern, muss eine gute Verbindung der einzelnen Stanzen mit dem umliegenden Paraffin sichergestellt werden. Hierfür wurde der neu erstellte Block für 2 - 3 Stunden bei 37°C erwärmt. Abschließend wurde die Oberfläche des erwärmten TMA mit Hilfe eines Objektträgers auf eine gleichmäßige Höhe gebracht.

**Abbildung 6:** Herstellung der Tissue Micro Arrays



Ein ausgewähltes Areal des Tumordinfiltrates wird im Gewebeschnitt markiert, diese Markierung wird auf den Paraffinblock übertragen und aus diesem Bereich wird eine Stanze entnommen. Die Gewebestanzten werden anschließend in einen leeren Paraffinblock übertragen. Ein von dem auf diese Weise hergestelltes TMA gewonnener Schnitt zeigt ausgewähltes Material einer Vielzahl zu untersuchender Proben.

**Abbildung 7:** Fotografien der Zwischenschritte der TMA-Generierung



### 3.3. Gewebeschnitte

Für alle histologischen und immunhistochemischen Färbungen sowie die ISH wurden stets frisch angefertigte Schnitte verwendet. Aus den Paraffinblöcken wurden mittels konventionellen Mikrotoms (HM335E, Mikrom, Walldorf, Deutschland) Gewebeschnitte gefertigt. Die Schichtdicke betrug bei Vollschnitten 2 - 3  $\mu\text{m}$ , während die TMA in einer möglichst noch geringeren Schichtdicke geschnitten wurden, um einen Verlust von Gewebestanden, der vor allem in dickeren Schnitten auftreten kann, zu verhindern. Die Schnitte der TMA wurden in ein Wasserbad mit einer Temperatur von maximal 38 - 39°C gelegt, damit sich die einzelnen Gewebezyylinder nicht aus dem umliegenden Paraffin herauslösten, und anschließend auf silanisierte Glasobjektträger (Menzel-Gläser, Superfrost plus, Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) gezogen. Durch Silanisierung des Objektträgers wird die Adhäsion des Gewebes an diesem verbessert. Zur weiteren Fixierung wurden die Schnitte für mindestens 30 Minuten bei 60°C getrocknet. Die TMA von Knochenmarksstanzen zeigten sich besonders fragil. Von großer Bedeutung war daher eine gute Fixierung am Objektträger, die durch eine schonende und längere Trocknung über zwei Tage bei 37°C erreicht wurde.

### 3.4. Immunhistochemie

Zur Immunphänotypisierung der verschiedenen neoplastischen Infiltrate, wurden Färbungen mit einer Palette diagnostisch eingesetzter Antikörper im automatischen Immunostainer (Ventata Medical Systems Inc., Tucson, USA) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Darüber hinaus wurden neue Antikörper gegen APRIL, CD27, Blimp1, und BLNK ausgetestet und anschließend zur manuellen immunhistochemischen Färbung der Proben verwendet.

Für alle angewandten Antikörper wurde durch Positivkontrollen eine adäquate Färbequalität verifiziert.

Tabelle 2 zeigt die verwendeten Antikörper.

**Tabelle 2: Antikörper, Verdünnung, Kontrolle, Färbemethode**

AK gegen		Klon	Hersteller	Verdünnung LK/KM	Positivkontrolle	Färbemethode
CD20	Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy	L26	Dako, Glostrup, Dänemark	1:500/1:2000	Tonsille	Automatischer Immunostainer
CD25	Monoclonal Mouse Anti-Human CD25	IL-2R	DCS, Hamburg, Deutschland	1:10	Appendix	Automatischer Immunostainer
CD5	Monoclonal Mouse Anti-Human CD5	4C7	Novocastra, Newcastle, UK	1:20	Appendix	Automatischer Immunostainer
CD23	Monoclonal Mouse Anti-Human CD23	FPC1	Novocastra, Newcastle, UK	1:50	Tonsille	Automatischer Immunostainer
Pax5	Purified Mouse Anti-Pax-5	24	BD Biosciences, San Jose, USA	1:20	Tonsille	Automatischer Immunostainer
CD138	Monoclonal Mouse Anti-Human CD138	MI15	Dako, Glostrup, Dänemark	1:25	Tonsille	Automatischer Immunostainer
Bcl-6	Monoclonal Mouse Anti-Human Bcl-6	PG-B6p	Novocastra, Newcastle, UK	1:20	Tonsille	Automatischer Immunostainer
MUM1	Monoclonal Mouse Anti-Human MUM1	MUM-1p	Dako, Glostrup, Dänemark	1:50	Tonsille	Automatischer Immunostainer
p53	Monoclonal Mouse Anti-Human p53	Do-7	Dako, Glostrup, Dänemark	1:200	P53 +	Automatischer Immunostainer
APRIL	Rekombinant Human Anti-APRIL	6D126	Biomol, Hamburg, Deutschland	1:200	Tonsille, KM	Manuelle Austestung
Blimp1			erhalten von Prof. Miguel Piris, Madrid, Spanien	1:1	Tonsille, KM	Manuelle Austestung
BLNK	Polyclonal Rabbit Anti-Human BLNK	Y491	Epitomics, Burlingame, USA	1:20	Tonsille, KM	Manuelle Austestung
CD27	Monoclonal Mouse Anti-Human CD27	137B4	Abcam, Cambridge, USA	1:20	Tonsille, KM	Manuelle Austestung

Zunächst wurden von den aus einzelnen Biopsien hergestellten TMA, wie in 3.3. beschrieben, Schnitte hergestellt und auf Objektträger aufgebracht. Auf diesen Objektträgern wurde das Gewebe nun folgendermaßen entparaffiniert und rehydriert:

2 x 10 Minuten in Xylol

2 x 5 Minuten in 100 % Ethanol

2 x 5 Minuten in 96 % Ethanol

2 x 5 Minuten in 70 % Ethanol

3 Minuten in Aqua destillata

#### 3.4.1. Manuelle immunhistochemische Austestung

Für die verwendeten Antikörper gegen APRIL, CD27, Blimp1 und BLNK lagen uns keine etablierten Protokolle für immunhistochemische Färbungen an paraffiniertem Gewebe vor. Daher musste das genaue Vorgehen und die Verdünnung der Antikörper zunächst ausgetestet werden. Als Negativkontrolle dienten jeweils Schnitte von physiologischen Lymphknotenbiopsien, die während des gesamten Versuchsablaufs mitgeführt, jedoch nicht mit einem Primär-Antikörper inkubiert wurden. Positivkontrollen wurden sowohl an Präparaten aus Lymphknoten als auch aus Knochenmark durchgeführt und genauso behandelt wie die zu untersuchenden Proben.

Die im Folgenden beschriebene immunhistochemische Färbung wurde zur Austestung der Antikörper zunächst an physiologischen Lymphknoten- und Knochenmark-Vollschnitten durchgeführt. Dabei wurde der Ablauf des Versuchsprotokolls und die Verdünnungen der Antikörper so variiert, bis die Färbeergebnisse optimal waren und das Verfahren möglichst schonend durchgeführt werden konnte, was für die Färbung von TMA von großer Bedeutung ist. Das für die immunhistochemische Färbung der TMA ausgetestete und angewendete Verfahren wird im Folgenden beschrieben.

Nach der wie in 3.4. durchgeführten Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte wurden diese mit TBS (Tris-buffered-saline: 1 M Tris-NaCl

(pH 7,6), 1:9 mit Aqua destillata verdünnt; Tris: Pufferan, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gespült. Während der Fixierung der Präparate mit Formaldehyd kommt es zu Quervernetzungen von DNA und Proteinen, so dass diese, als Zielstrukturen für die Antikörperbindung bei der immunhistochemischen Färbung, nur eingeschränkt zugänglich sind. Um eine optimale Antikörperbindung zu ermöglichen, müssen diese Quervernetzungen aufgebrochen werden. Dies gelingt durch ein als „Antigen-Demaskierung“ („antigen retrieval“) bezeichnetes Verfahren, bei dem das fixierte Gewebe hohen Temperaturen ausgesetzt wird. (*Regitnig, Reiner et al. 2002*) Hierfür wurde eine Küvette mit verdünntem Puffer (1:9 entsprechend 20 ml Target Retrieval Solution, 10x Konzentrat (DakoCytomation, Dako, Glostrup, Dänemark) ad 180 ml Aqua destillata) gefüllt, mit Alufolie abgedeckt und für 20 Minuten in einem Dampfgarer erwärmt. Die vorbehandelten Schnitte wurden nun für 30 Minuten in der Küvette gekocht, wobei stets darauf geachtet wurde, dass sich die Schnitte nicht berühren, anschließend erneut in TBS gestellt und bis zur vollständigen Abkühlung belassen.

Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, muss eine Blockierung der endogenen Peroxidase durchgeführt werden. Dies erfolgte durch eine 15-minütige Inkubation in Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) 3 % (Labvision, Fremont, USA). Anschließend wurde wieder mit TBS gespült.

Die folgenden Schritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Noch bevor ein biotinylierter Antikörper aufgetragen wird, können einige Komponenten des Avidin-Biotin-Systems gebunden werden. Diese unspezifischen Bindungen können z.B. durch im Gewebe enthaltene Biotine, biotinbindende Proteine oder Lektine verursacht werden. Daher folgte als nächster Schritt ein Avidin-Biotin-Block, bei dem die Gewebeschnitte jeweils für 15 Minuten zunächst mit Avidin und darauf folgend mit Biotin vorbehandelt wurden (Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) und anschließend 100  $\mu$ l Normalserum 5 % (Goat Serum, Dako) auf jeden Schnitt aufgebracht und dort für eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen wurde. Ziel ist die spezifische Bindung der Antikörper an ihre Bindungsstelle und somit eine Reduktion der Hintergrundfärbung.

Daraufhin wurden aus den Antikörpern gegen APRIL, CD27, Blimp1, BLNK und einem Antikörper-Verdünnungsmittel (Antibody diluent, Dako) die jeweils ausgetestete Verdünnungsstufe hergestellt und gut vermischt (siehe Tabelle 2 in 3.4.). Von den verdünnten Primär-Antikörpern wurden auf jeden Schnitt je 100 µl eines Antikörpers aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug ca. 20 Stunden bei 4°C, danach wurde dreimalig mit TBS gespült.

Die Empfindlichkeit des Antigennachweises wurde durch die LSAB-Verstärkermethode erhöht. Dafür wurde je 100 µl Sekundär-Antikörper (Dako REAL Biotinylated Secondary Antibodies, Dako) aufgetragen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30-minütiger Inkubation mit je 100 µl Komplexbildner (Dako REAL Streptavidin Peroxidase, Dako) erfolgte die Visualisierung mit Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Lösung (Dako REAL DAB+ Chromogen, Dako) gelöst in HRP-Substratpuffer (Dako REAL HRP Substrate Buffer, Dako). Nach kurzer Spülung in Aqua destillata folgte die Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer (ca. 10 Sekunden) und anschließende Bläuung durch fünfminütige Spülung in Leitungswasser.

Abschließend wurden die Schnitte zur Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe geschwänkt (2 x 70 % Ethanol, 2 x 96 % Ethanol, 2 x 100 % Ethanol, 2 x 10 Minuten Xylol) und mit einem wässrigen Einbettmedium (Aquatex, Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt.

#### 3.4.2. Automatischer Immunostainer

Alle Färbungen mit den bereits diagnostisch eingesetzten Antikörpern aus Tabelle 2, wurden mit einem automatischen Immunostainer (Ventata Medical Systems Inc.) gemäß Herstellerprotokollen durchgeführt.

Zunächst wurden die Schnitte nach folgendem Protokoll entparaffiniert und rehydriert:

2 x 5 Minuten in Xylol

2 x 5 Minuten in 100 % Ethanol

2 Minuten in 96 % Ethanol

2 Minuten in 80 % Ethanol

3 Minuten in fließendem Leitungswasser

Die Antigen-Demaskierung wurde nach Anweisung der Hersteller durch Kochen der Schnitte in der Mikrowelle durchgeführt. Dazu wurde mit 2,1 g Zitronensäuremonohydrat pro Liter Aqua destillata (0,01 mol/L) ein Zitratpuffer hergestellt, der mit 2 N-NaOH auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt wurde. Die entparaffinierten Schnitte wurden in einer Glasschaukel in einen Behälter gestellt, der mit 1,5 l Zitratpuffer gefüllt war, und 40 Minuten bei 800 Watt in der Mikrowelle gekocht. Zur Abkühlung und ersten Blockung wurden die Schnitte anschließend sofort in 20°C warmes TBS mit 3 % Ziegen serum (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gestellt und mindestens 20 Minuten inkubiert. Etiketten mit Fallnummer, Monat und Jahr, verwendetem Antikörper sowie dessen Verdünnung wurden zur Dokumentation auf die Objektträger geklebt. Die Primär-Antikörper wurden mit Antikörper-Verdünnungsmittel (Antibody Diluent, Dako) auf die entsprechende Verdünnung gebracht und auf den Objektträger aufgetragen, wo sie über Nacht bei Raumtemperatur zur Inkubation belassen wurden. Die Durchführung der Schritte Sekundär-Antikörper, Avidin-Biotin Komplex, Farbentwicklung sowie Gegenfärbung erfolgten entsprechend dem Protokoll für den jeweiligen Antikörper automatisiert im Immunostainer. Abschließend wurden die Schnitte, wie in 3.4.1. beschrieben, in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und mit einem wässrigen Einbettmedium (Aquatex, Merck) eingedeckelt.

### 3.5. Chromogene in situ Hybridisierung (CISH)

Die chromogene in situ Hybridisierung (CISH) wurde ausschließlich an Schnitten des TMA-Blockes mit LPL-Fällen durchgeführt. Da der Nachweis einer Leichtkettenrestriktion durch immunhistochemische Färbungen gegen kappa und lambda weniger genau ist, wurde hierfür die CISH eingesetzt. Verwendet wurde eine DNA-Sonde gegen kappa und lambda (ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda CISH Kit, T-1005, ZytoVision, Bremerhaven, Deutschland)

für den simultanen Nachweis von Ig-kappa und Ig-lambda mRNA. Die Sonde besteht aus spezifisch gegen Ig-kappa mRNA gerichteten Digoxigenin-markierten Oligonukleotiden sowie spezifisch gegen Ig-lambda mRNA gerichteten Biotin-markierten Oligonukleotiden.

Wie in 3.4.2. beschrieben wurde die Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte durchgeführt. Anschließend wurde die Probe in einer sauren Pepsin-Lösung (Pepsin-Solution, ZytoFast CISH Kit, Zytovision) für 20 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer zur Proteolyse angedaut. Zum Stoppen der Pepsin-Wirkung wurden die Schnitte für 10 Sekunden in 100 % Alkohol gestellt. Anschließend wurden die Proben in Aqua destillata getaucht und an der Luft getrocknet.

Auf die trockenen Schnitte wurden 10 µl der Sonde aufgetragen. Mitgeführt wurden zusätzlich eine Positivkontrolle, bestehend aus gegen poly(A)-Enden von mRNA gerichteten Oligonukleotiden, und eine Negativkontrolle, bestehend aus verschiedenen Oligonukleotiden ohne bekannte Homologie zu natürlich vorkommenden Sequenzen. Dazu wurden auf Objektträger mit dem Untersuchungsmaterial je 10 µl einer Kontrollsonde (ZytoFast RNA (+) Control Probe und ZytoFast RNA (-) Control Probe, ZytoFast CISH Kit, Zytovision) aufgetragen. Die Sonden wurden gleichmäßig auf der gesamten Zielfläche verteilt, mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt und mit Fixogum luftdicht versiegelt. Die Objektträger wurden anschließend zur DNA-Denaturierung und somit endgültigen Zugänglichkeit für die Sonden für 5 Minuten auf einer Wärmeplatte bei 75°C gelagert. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte dann über eine Stunde bei 55°C in einem Hybridizer (Dako, Glostrup, Dänemark). Anschließend wurden Kleber sowie Deckgläser vorsichtig entfernt und die Gewebeschnitte für 5 Minuten in auf 55°C vorgewärmtem 1x TBS-Waschpuffer (Wash Buffer TBS (20x) im Verhältnis 1:19 mit destilliertem Wasser verdünnt, ZytoFast CISH Kit, Zytovision) und anschließend 5 Minuten in 1x TBS-Waschpuffer bei Raumtemperatur gespült und der Sondenüberstand abgewaschen.

Zum Nachweis einer Duplexbildung der Digoxigenin-markierten-Sonde wurden die Schnitte mit je 3 - 4 Tropfen eines anti-Digoxigenin-Antikörpers (HRP-anti-Digoxigenin, ZytoFast CISH Kit, Zytovision) für 30 Minuten bei 37°C im

Hybridizer inkubiert und im Anschluss 2 x 2 Minuten in 1x TBS-Waschpuffer und 1 x 2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Zur Detektion wurden 3 - 4 Tropfen einer 3-Amino-9-Ethylcarbazol-Lösung (AEC Solution, ZytoFast CISH Kit, Zytovision) auf die Objektträger geträufelt und für 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die enzymatische Umsetzung von AEC führt zur Entstehung roter Signale. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.

Zum Nachweis einer Duplexbildung der Biotin-markierten-Sonde wurden die Schnitte mit je 3 - 4 Tropfen einer Streptavidin-Lösung (AP-Streptavidin, ZytoFast CISH Kit, Zytovision) für 30 Minuten bei 37°C im Hybridizer inkubiert und im Anschluss erneut 2 x 2 Minuten in 1x TBS-Waschpuffer und 1 x 2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Zur Detektion wurden 3 - 4 Tropfen einer Nitrotetrazoliumblausäurechlorid/5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-Lösung (NBT/BCIP, ZytoFast CISH Kit, Zytovision) auf die Objektträger geträufelt und für 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die enzymatische Umsetzung von NBT/BCIP führt zur Entstehung blau-violetter Signale. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.

Zum Abschluss wurden die Gewebeschnitte mit einem wässrigen Einbettmedium (Aquatex, Merck) eingedeckelt.

### 3.6. Auswertung

Die Auswertung der Untersuchungsmaterialien erfolgte an einem Lichtmikroskop. Zunächst wurden die Positivkontrollen zur Sicherstellung eines adäquaten Färbeergebnisses und einer guten Auswertbarkeit sowie die Negativkontrollen zum Ausschluss von Fehlern im Versuchsablauf und unspezifischer Färbeergebnisse beurteilt.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden von zwei Auswertern semiquantitativ mit einem Rasterokkular bewertet. Dabei wurden 100 Tumorzellen identifiziert und der prozentuale Anteil positiver Tumorzellen bestimmt. Der Grenzwert wurde bei 20 % positiver Zellen festgesetzt, was

heißt, dass bei weniger als 20 % positiv gefärbter Zellen die Probe insgesamt als negativ bewertet wurde. Außerdem wurde die Färbeintensität der als positiv bewerteten Tumorzellen in drei Abstufungen (1 = schwach, 2 = moderat, 3 = stark) angegeben.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mit den Antikörpern gegen APRIL, CD27, Blimp1 und BLNK wurden statistisch analysiert.

Die prozentuale Positivität der einzelnen Proteine wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Dabei wurde jeweils die prozentuale Positivität eines Proteins in den Entitäten CLL, MM, EMP, EMM einzeln mit der entsprechenden prozentualen Positivität bei LPL verglichen und auf signifikante Unterschiede überprüft.

Davon getrennt wurde die Färbeintensität der einzelnen Antikörper in den Entitäten CLL, MM, EMP, EMM mit der entsprechenden Färbeintensität bei LPL mittels des Exakten Tests nach Fisher verglichen und auf signifikante Unterschiede überprüft. Für die Analyse der Ergebnisse der Färbeintensität erfolgte eine Gruppenbildung. Der Gruppe 1 wurden die Fälle mit der Färbeintensität null bis eins und der Gruppe 2 die Fälle mit der Färbeintensität zwei bis drei zugeordnet. Durch diese Gruppenbildung lassen sich innerhalb des für statistische Analysen kleinen Kollektivs deutlichere Unterschiede in der Verteilung der Ergebnisse zeigen.

Die Korrelation der Ergebnisse zweier verschiedener Antikörper innerhalb einer Krankheitsgruppe wurde ebenfalls einzeln für die prozentuale Positivität und die Färbeintensität überprüft. Dabei wurden die Korrelation der prozentualen Positivität nach Spearman-Rho und die Korrelation der Färbeintensität nach Kendall-Tau-b analysiert.

Weiterhin wurde durch eine Diskriminanzanalyse die Möglichkeit der Diskriminierung zwischen den Krankheitsgruppen anhand des Expressionsmusters von APRIL, CD27, Blimp1 und BLNK überprüft. In der Diskriminanzanalyse können nur rein quantitative Daten erfasst werden, so dass hierfür ausschließlich die prozentuale Positivität berücksichtigt wurde.

Alle statistischen Analysen erfolgten mit der Statistiksoftware IBM SPSS Statistics (IBM SPSS, Chicago, USA) und in Unterstützung durch Dr. Tibor Schuster (Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie, TU-München).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Charakterisierung der Patienten und klinische Daten

#### 4.1.1. LPL

Von den zunächst 30 ausgewählten Patienten mit diagnostiziertem LPL und einer Knochenmarksinfiltration von  $> 50\%$  wurden fünf Fälle aus technischen Gründen, wegen Materialverlusts bei der Übertragung in den TMA-Block, ausgeschlossen. Die übrigen 25 Fälle bilden die Gruppe von bona fide LPL, die in unsere Studie eingeschlossen wurden.

Von diesen 25 Patienten sind 14 männlich und elf weiblich. Das durchschnittliche Alter der Patienten bei Diagnosestellung lag bei 67 Jahren (Spannweite 47 - 85 Jahre). Bei 18 Patienten lagen Daten zum Stadium der Erkrankung vor, wobei sich alle zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in Stadium 4 nach Ann-Arbor-Klassifikation befanden. Eine Verlaufsbeobachtung ist bei 16 Patienten verfügbar (durchschnittlicher Beobachtungszeitraum 57 Monate, Spannweite 5 - 162 Monate). Innerhalb des beobachteten Zeitraums wurden 15 der 16 Patienten chemotherapeutisch behandelt, während eine Patientin keine Therapie erhielt. Zwei der 16 Patienten verstarben innerhalb dieser Zeit an der Erkrankung, bei einer Patientin war die Erkrankung nach Therapie nicht mehr nachweisbar und alle weiteren 13 Patienten überlebten den beobachteten Zeitraum mit nachweisbarer Erkrankung.

Die klinischen Daten sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3: Klinische Daten der LPL-Fälle**

Fall	Alter (Jahre)	Geschlecht	M- Gradient	Ig- Typ	Stadium nach Ann-Arbor	Therapie	Verlauf	Beobachtungs- zeitraum (Monate)
1	56	m	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	KVD	
2	76	m	ja	IgM	4A	CTX	LME	5
3	78	w	ja	IgM	4B	keine	LME	33
4	69	m	ja	IgM	4A	CTX	LME	90
5	63	m	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	KVD	
6	62	m	nein	IgM	4	CTX	LME	50
7	51	w	ja	IgM	4	CTX	VE	36
8	68	m	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	KVD	
9	57	m	k.A.	IgG	4	CTX	LME	45
10	83	w	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	KVD	
11	73	m	ja	IgM	4	CTX	LME	42
12	71	m	ja	IgM	4B	CTX	LME	162
13	47	w	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	KVD	
14	77	w	ja	IgM	4	CTX	LME	147
15	68	m	ja	IgM	4B	CTX	LME	24
16	68	w	ja	IgM	4	CTX	LME	30
17	85	m	k.A.	k.A.	4	k.A.	KVD	
18	79	w	k.A.	k.A.	4	k.A.	KVD	
19	64	w	ja	IgM	4B	CTX	LME	70
20	56	m	k.A.	k.A.	4	k.A.	KVD	
21	66	w	ja	IgA	4B	CTX	LME	132
22	65	m	nein	IgA	4B	CTX	VE	10
23	59	w	ja	IgM	4	CTX	LME	17
24	56	m	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	KVD	
25	83	w	nein	k.A.	k.A.	CTX	LOAE	12

#### 4.1.2. CLL

Bei den zunächst 47 Patienten mit diagnostizierter B-CLL und einer Knochenmarksinfiltration von > 50 % konnte in allen Fällen die Diagnose nach immunhistochemischen Kriterien bestätigt werden. Vier Fälle wurden wegen Materialverlusts bei der Übertragung in den TMA-Block ausgeschlossen. Die übrigen 43 Fälle wurden in unsere Studie eingeschlossen und bilden die Gruppe der CLL.

Von diesen 43 Patienten sind 31 männlich und zwölf weiblich. Das durchschnittliche Alter der Patienten bei Diagnosestellung lag bei 68 Jahren (Spannweite 50 - 88 Jahre).

Weitere klinische Daten wurden für diese Gruppe nicht erhoben.

#### 4.1.3. MM

In unsere Studie wurden 19 Fälle eines MM mit einer Knochenmarksinfiltration von > 50 % eingeschlossen. Von diesen 19 Patienten sind zwölf männlich und sieben weiblich. Das durchschnittliche Alter der Patienten bei Diagnosestellung lag bei 62 Jahren (Spannweite 32 - 84 Jahre). Alle Patienten befanden sich innerhalb der Stadien 1a - 3b nach Durie und Salmon und wurden mittels Radio- und/oder Chemotherapie behandelt. Für 16 Patienten liegt eine Verlaufsbeobachtung von im Mittel 65 Monaten (Spannweite 4 - 228 Monate) vor. Sieben Patienten verstarben nach durchschnittlich 54 Monaten (Spannweite 13 - 88 Monate) an der Erkrankung, während zwei Patienten aus anderer Ursache verstarben. Die anderen sieben Patienten überlebten den beobachteten Zeitraum mit nachweisbarer Erkrankung. Keiner der Patienten entwickelte innerhalb des beobachteten Zeitraums eine extramedulläre Infiltration.

#### 4.1.4. Extramedulläre Plasmazellneoplasien

Von den zunächst untersuchten 37 Patienten mit diagnostiziertem extramedullärem Plasmazelltumor, wurden neun Fälle wegen gleichzeitiger Knochenmarksinfiltration beziehungsweise eines anamnestisch vorbekannten MM als EMM klassifiziert. Die übrigen 28 Patienten zeigten zum Zeitpunkt der Diagnose oder während einer Verlaufsbeobachtung von mindestens sechs Monaten keinen Hinweis auf eine Knochenmarksinfiltration und radiologisch waren keine osteolytischen Knochenherde nachweisbar. Von diesen 28 Fällen konnten vier wegen Materialverlusts im TMA-Block nicht weiter untersucht werden, die übrigen 24 Fälle wurden in die Studie eingeschlossen und bilden die Gruppe der EMP.

Von den 24 Patienten sind 17 männlich und sieben weiblich. Das durchschnittliche Alter der Patienten bei Diagnosestellung lag bei 54 Jahren (Spannweite 28 - 81 Jahre). Lokalisationen der untersuchten EMP sind Nasen- und Mundhöhle, zervikale Lymphknoten, Larynx, Pharynx sowie Haut. Bei 20

Patienten war eine Verlaufsbeobachtung verfügbar (durchschnittlicher Beobachtungszeitraum 51 Monate, Spannweite 8 - 188 Monate). Die Patienten wurden operativ und mittels Radiotherapie behandelt. Innerhalb des beobachteten Zeitraums verstarb keiner der Patienten an der Erkrankung. Sechs Patienten erlitten nach einem durchschnittlichen Intervall von 38 Monaten (Spannweite 12 - 96 Monate) ein Lokalrezidiv. Ein Patient entwickelte 36 Monaten nach Diagnosestellung des EMP ein MZL, bei einem weiteren Patient wurde nach 45 Monaten ein MM nachgewiesen. Zum Ende des beobachteten Zeitraums war die Erkrankung bei 13 Patienten nicht mehr nachweisbar, drei Patienten lebten mit nachweisbarem EMP und vier Patienten waren auf Grund anderer Erkrankungen verstorben.

Von den neun Fällen eines EMM konnte einer ebenfalls wegen Materialverlusts im TMA-Block nicht weiter untersucht werden, die anderen acht wurden in die Studie eingeschlossen und bilden die Gruppe der EMM.

Davon sind jeweils vier Patienten männlich und weiblich. Das durchschnittliche Alter der Patienten bei Diagnosestellung lag bei 60 Jahren (Spannweite 46 - 73 Jahre). Lokalisationen der untersuchten EMM sind Larynx, Weichteilgewebe und Milz. Die Patienten wurden operativ sowie mittels Radio- oder Chemotherapie behandelt. Eine Verlaufsbeobachtung liegt bei vier Patienten vor, die alle innerhalb eines durchschnittlichen Zeitraums von 50 Monaten (Spannweite 2 - 104 Monate) an der Erkrankung verstarben.

#### 4.2. Expressionsmuster der etablierten diagnostischen Marker

Zunächst wurden zur genauen Charakterisierung des LPL in Abgrenzung der anderen untersuchten NHL-Entitäten immunhistochemische Untersuchungen mit etablierten diagnostischen Markern (CD20, CD25, CD5, CD23, Pax5, Bcl-6, CD138, Mum1 und p53) sowie eine CISH zum Nachweis einer Leichtkettenrestriktion von kappa und lambda, welche in allen Fällen des LPL positiv war, durchgeführt. Dadurch sollen eine genaue Beschreibung unseres untersuchten Kollektivs sowie eine Überprüfung der in der Literatur sehr unterschiedlichen diesbezüglichen Angaben erfolgen.

An den Fällen von CLL, LPL und MM wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen den B-Zell-Marker CD20 durchgeführt. Alle Fälle des LPL und 88 % der CLL waren positiv für CD20 und nur vier der 19 Fälle (21 %) des MM zeigten sich bei mittlerer Intensität positiv.

Der Plasmazellmarker CD138 war dagegen bei keinem der CLL-Fälle nachweisbar, zehn der 25 (40 %) LPL-Fälle zeigten sich bei mittlerer Intensität positiv für CD138, ebenfalls bei mittlerer Intensität waren 70 % der EMP und 88 % der EMM positiv für CD138 und die stärkste CD138-Expression mit einer mittleren Intensität von 2,8 ließ sich bei 100 % der MM-Fälle nachweisen.

CD25 zeigte in der CLL und im LPL eine gleichmäßige Expression von 100 % positiver Fälle bei einer Färbeintensität von im Mittel 1,6.

CD5 und CD23 wurden ebenfalls ausschließlich an CLL und LPL untersucht. Keiner der LPL-Fälle zeigte eine CD5-Expression, während 42 der 43 (98 %) CLL-Fälle positiv für CD5 waren. CD23 war in fünf von 25 (20 %) LPL-Fällen und bei gleicher mittlerer Färbeintensität von 1,4 in 27 von 42 (64 %) CLL-Fällen nachweisbar.

Mum1 zeigte sich in 70% der LPL-Fälle bei starker Intensität und in 33 % der CLL-Fälle bei schwächerer Intensität positiv. p53 war im LPL nicht nachweisbar, aber in 12 % der CLL-Fälle, 39% der MM-Fälle sowie in 18 % der EMP-Fälle und 38 % der EMM-Fälle mit eher schwacher Färbeintensität positiv. Eine Bcl-6-Expression war in keiner der untersuchten Entitäten nachweisbar. 100 % der LPL- und CLL-Fälle zeigten bei einer mittleren Färbeintensität von 1,3 bzw. 1,5 eine Positivität für Pax5, während die Expression in den

plasmazellulär differenzierten Entitäten mit 5 % der MM-Fälle, 13 % der EMM-Fälle bei schwacher Färbeintensität deutlich geringer ausfiel und bei EMP nicht nachweisbar war.

Die beschriebenen Ergebnisse der Immunphänotypisierung sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4:** Immunhistochemie (etablierte diagnostische Marker)

	CD20	CD25	CD5	CD23	Pax5	CD138	Mum1	p53	Bcl-6
<b>CLL</b> n=43	88 % MW= 72 (r 20-100) Int. 1,2	100 % MW=100 (r100-100) Int. 1,6	98 % MW= 88 (r 20-100) Int. 1,5	64 % MW= 62 (r 20-100) Int. 1,4	100 % MW=78 (r 20-100) Int. 1,3	negativ	33 % MW= 27 (r 20- 50) Int. 1,9	12 % MW= 26 (r 20- 40) Int. 1,6	negativ
<b>LPL</b> n=25	100 % MW= 99 (r100-100) Int. 1,5	100 % MW= 98 (r 50-100) Int. 1,6	negativ	20 % MW= 44 (r 30- 50) Int. 1,4	100 % MW= 63 (r 20- 90) Int. 1,5	40 % MW= 62 (r 20-100) Int. 1,8	70 % MW= 61 (r 30-100) Int. 2,6	negativ	negativ
<b>MM</b> n=19	21 % MW= (r 30-100) Int. 1	n.d.	n.d.	n.d.	5 % MW= 30 (r 30-30) Int. 1	100 % MW= 95 (r 50-100) Int. 2,8	n.d.	39 % MW= 43 (r 20- 80) Int. 1,3	negativ
<b>EMP</b> n=24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	negativ	70 % MW= 57 (r 20-100) Int. 1,9	n.d.	18 % MW=25 (r 20- 40) Int. 1,5	negativ
<b>EMM</b> n=8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	13 % MW= 40 (r 40- 40) Int. 1	88 % MW= 79 (r 50-100) Int. 2	n.d.	38 % MW= 67 (r 20- 90) Int. 1,3	negativ

Angegeben werden die Prozentzahl der positiven Fälle, der Mittelwert der prozentualen Positivität (%), die Spannweite (%) und die mittlere Färbeintensität.

Die Abbildungen 8 - 10 (S. 60 - 65) zeigen Fotos der Färbeergebnisse.

### 4.3. Expressionsmuster der Proteine APRIL, CD27, Blimp1, BLNK

#### 4.3.1. APRIL

In 19 der 21 (91 %) LPL-Fälle war eine Expression von APRIL nachweisbar. Im Durchschnitt waren dabei 64 % der Tumorzellen APRIL-positiv (Spannweite 30 - 100 %). Die Färbeintensität wurde im Mittel mit 1,7 bewertet, dabei entfielen 33 % der Fälle auf die Gruppe 1 (mit Färbeintensität 0 - 1) und 67 % auf die Gruppe 2 (mit Färbeintensität 2 - 3).

Auch in allen anderen untersuchten NHL-Entitäten war die Expression von APRIL nachweisbar. So zeigten sich 86 % der CLL-Fälle mit einem Mittelwert von 71 % der Zellen (Spannweite 30 - 100 %) positiv für APRIL. Dabei wurde die mittlere Färbeintensität mit 1,1 bewertet, 91 % der Fälle gehörten zu Gruppe 1 und 9 % zu Gruppe 2. 72 % der MM-Fälle zeigten eine APRIL-Expression mit einem Mittelwert von 63 % der Zellen (Spannweite 20 - 90 %). Die mittlere Färbeintensität wurde mit 1,3 bewertet, wobei 78 % der Fälle zu Gruppe 1 und 22 % zu Gruppe 2 zählten. Weiterhin konnten wir in 78 % der EMP-Fälle mit einem Mittelwert von 81 % der Zellen (Spannweite 20 - 100 %) eine APRIL-Positivität nachweisen. Die mittlere Färbeintensität lag bei 1,7 und 57 % der Fälle gehörten zu Gruppe 1 sowie 43 % zu Gruppe 2. Die EMM-Fälle waren in 75 % mit einem Mittelwert von 77 % der Zellen (Spannweite 60 - 90 %) APRIL-positiv. Hier wurde die Färbeintensität im Mittel mit 1,2 bewertet, wobei 88 % der Fälle auf Gruppe 1 und 12 % auf Gruppe 2 entfielen. Damit zeigen die Färbeintensitäten von APRIL insgesamt deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Krankheitsentitäten. Ein signifikanter Unterschied der Färbeintensität besteht dabei nach dem Exakten Test von Fisher zwischen LPL und CLL ( $p=0,000$ ), zwischen LPL und MM ( $p=0,010$ ) und zwischen LPL und EMM ( $p=0,014$ ), jeweils mit der deutlich stärkeren Färbeintensität auf Seiten des LPL. Nach dem Mann-Whitney-U-Test besteht zwischen keiner der Krankheitsentitäten ein signifikanter Unterschied der prozentualen Positivität. In Tabelle 5 (S. 59) und den Abbildungen 11 - 13 (S. 99 - 100) findet sich eine Zusammenfassung sowie graphische Darstellung der Ergebnisse.

#### 4.3.2. CD27

In zwölf der 25 (48 %) LPL-Fälle war eine Expression von CD27 nachweisbar. Im Durchschnitt waren dabei 73 % der Tumorzellen CD27-positiv (Spannweite 20 - 100 %). Die Färbeintensität wurde im Mittel mit 1,8 bewertet, wobei 72 % der Fälle der Gruppe 1 zugeordnet wurden und 28 % der Gruppe 2.

In der Umgebung des Tumordinfiltrates fanden sich vermehrt Plasmazellen, die in über 90 % eine starke Expression von CD27 zeigten.

Auch in allen anderen untersuchten NHL-Entitäten war die Expression von CD27 nachweisbar. So zeigten sich 39 % der CLL-Fälle mit einem Mittelwert von 59 % der Zellen (Spannweite 40 - 80 %) positiv für CD27. Dabei wurde die mittlere Färbeintensität mit 1,4 bewertet, 86 % der Fälle gehörten zu Gruppe 1 und 14 % zu Gruppe 2. 19 % der MM-Fälle zeigten eine CD27-Expression mit einem Mittelwert von 67 % der Zellen (Spannweite 50 - 90 %). Die mittlere Färbeintensität wurde mit 2,0 bewertet, wobei 87,5 % der Fälle zu Gruppe 1 und 12,5 % zu Gruppe 2 zählten. Weiterhin konnten wir in 58 % der EMP-Fälle mit einem Mittelwert von 76 % der Zellen (Spannweite 20 - 100 %) eine CD27-Positivität nachweisen. Die mittlere Färbeintensität lag bei 1,8 und 62,5 % der Fälle gehörten zu Gruppe 1 sowie 37,5 % zu Gruppe 2. Die EMM-Fälle waren in 50 % mit einem Mittelwert von 100 % der Zellen CD27-positiv. Hier wurde die Färbeintensität im Mittel mit 1,8 bewertet, wobei 75 % der Fälle auf Gruppe 1 und 25 % auf Gruppe 2 entfielen. Nach dem Exakten Test von Fisher bestehen keine signifikanten Unterschiede der Färbeintensität zwischen den Krankheitsentitäten. Allerdings zeigt die prozentuale Positivität von CD27 deutliche Abweichungen zwischen den verschiedenen untersuchten Gruppen. Nach dem Mann-Whitney-U-Test besteht dabei zwischen LPL und MM ein signifikanter Unterschied der prozentualen Positivität ( $p=0,049$ ) mit dem höheren Positivität auf Seiten des LPL.

In Tabelle 5 (S. 59) und den Abbildungen 11, 14 - 15 (S. 99, 101) findet sich eine Zusammenfassung sowie graphische Darstellung der Ergebnisse.

### 4.3.3. Blimp1

In 20 der 21 (95 %) LPL-Fälle war eine Expression von Blimp1 nachweisbar. Im Durchschnitt waren dabei 68 % der Tumorzellen Blimp1-positiv (Spannweite 20 - 90 %). Die Färbeintensität wurde im Mittel mit 1,4 bewertet, wobei 62 % der Gruppe 1 und 38 % der Gruppe 2 zugeordnet wurden.

Auch in allen anderen untersuchten NHL-Entitäten war die Expression von Blimp1 nachweisbar. So zeigten sich 92 % der CLL-Fälle mit einem Mittelwert von 11 % der Zellen (Spannweite 20 - 100 %) positiv für Blimp1. Dabei wurde die mittlere Färbeintensität mit 1,0 bewertet, alle Fälle gehörten somit zu Gruppe 1. 82 % der MM-Fälle zeigten eine Blimp1-Expression mit einem Mittelwert von 68 % der Zellen (Spannweite 30 - 95 %). Die mittlere Färbeintensität wurde mit 1,7 bewertet, wobei 41 % der Fälle zu Gruppe 1 und 59 % zu Gruppe 2 zählten. Weiterhin konnten wir in 70 % der EMP-Fälle mit einem Mittelwert von 68 % der Zellen (Spannweite 40 - 100 %) eine Blimp1-Positivität nachweisen. Die mittlere Färbeintensität lag bei 1,3 und 83 % der Fälle gehörten zu Gruppe 1 sowie 17 % zu Gruppe 2. Die EMM-Fälle waren in 63 % mit einem Mittelwert von 76 % der Zellen (Spannweite 50 - 100 %) Blimp1-positiv. Hier wurde die Färbeintensität im Mittel mit 1,2 bewertet, wobei 87,5 % der Fälle auf Gruppe 1 und 12,5 % auf Gruppe 2 entfielen. Damit zeigen sich deutliche Unterschiede der Blimp1-Expression lediglich zwischen LPL und CLL. Nach dem Exakten Test von Fisher besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Färbeintensität von LPL und CLL ( $p=0,000$ ) und nach dem Mann-Whitney-U-Test konnte zwischen diesen beiden Krankheitsentitäten ein signifikanter Unterschied der prozentualen Positivität gezeigt werden ( $p=0,016$ ), mit der stärkeren Färbeintensität sowie prozentualen Positivität auf Seiten des LPL.

In Tabelle 5 (S. 59) und den Abbildungen 11, 16 - 17 (S. 99, 102) findet sich eine Zusammenfassung sowie graphische Darstellung der Ergebnisse.

#### 4.3.4. BLNK

In 15 der 21 (71 %) LPL-Fälle war eine Expression von BLNK nachweisbar. Im Durchschnitt waren dabei 59 % der Tumorzellen BLNK-positiv (Spannweite 20 - 90 %). Die Färbeintensität wurde im Mittel mit 1,6 bewertet, wobei 57 % der Gruppe 1 und 43 % der Gruppe 2 zugeordnet wurden.

Auch in allen anderen untersuchten NHL-Entitäten war die Expression von BLNK nachweisbar. So zeigten sich 44 % der CLL-Fälle mit einem Mittelwert von 61 % der Zellen (Spannweite 20 - 80 %) positiv für BLNK. Dabei wurde die mittlere Färbeintensität mit 1,0 bewertet, alle Fälle gehörten somit zu Gruppe 1. 56 % der MM-Fälle zeigten eine BLNK-Expression mit einem Mittelwert von 77 % der Zellen (Spannweite 20 - 100 %). Die mittlere Färbeintensität wurde mit 2,1 bewertet, wobei 56 % der Fälle zu Gruppe 1 und 44 % zu Gruppe 2 zählten. Weiterhin konnten wir in 73 % der EMP-Fälle mit einem Mittelwert von 76 % der Zellen (Spannweite 20 - 100 %) eine BLNK-Positivität nachweisen. Die mittlere Färbeintensität lag bei 1,5 und 73 % der Fälle gehörten zu Gruppe 1 sowie 27 % zu Gruppe 2. Die EMM-Fälle waren in 88 % mit einem Mittelwert von 57 % der Zellen (Spannweite 20 - 90 %) BLNK-positiv. Hier wurde die Färbeintensität im Mittel mit 1,3 bewertet, wobei 75 % der Fälle auf Gruppe 1 und 25 % auf Gruppe 2 entfielen. Ein signifikanter Unterschied der Färbeintensität besteht dabei nach dem Exakten Test von Fisher zwischen LPL und CLL ( $p=0,000$ ), mit der stärkeren Färbeintensität auf Seiten des LPL. Nach dem Mann-Whitney-U-Test besteht zwischen keiner der Krankheitsentitäten ein signifikanter Unterschied der prozentualen Positivität.

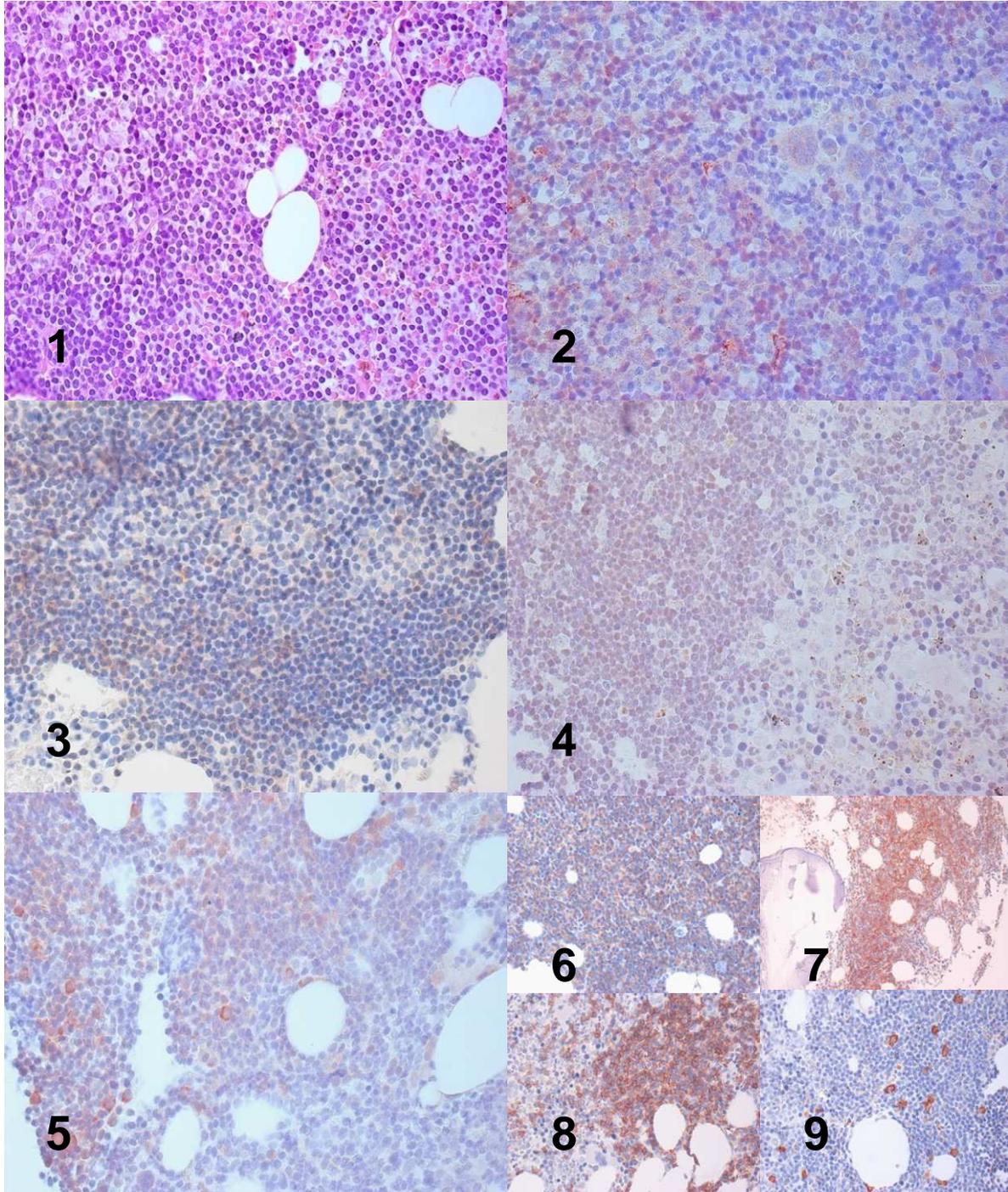
In Tabelle 5 (S. 59) und den Abbildungen 11, 18 - 19 (S. 99, 103) findet sich eine Zusammenfassung sowie graphische Darstellung der Ergebnisse.

**Tabelle 5:** Immunhistochemie (APRIL, CD27, Blimp1, BLNK)

	<b>APRIL</b>	<b>CD27</b>	<b>Blimp1</b>	<b>BLNK</b>
<b>CLL</b> n=43	86 % MW=71 (r 30-100) <b>Int. 1,1</b>	39 % <b>MW=59</b> (r 40-80) Int. 1,4	92 % <b>MW=11</b> (r 20-100) <b>Int. 1,0</b>	44 % MW=61 (r 20-80) <b>Int. 1</b>
<b>LPL</b> n=25	90 % MW=64 (r 20-90) Int. 1,6	48 % MW=73 (r 20-100) Int. 1,8	95 % MW=68 (r 20-90) Int. 1,4	71 % MW=59 (r 20-90) Int. 1,6
<b>MM</b> n=19	72 % MW=63 (r 20-90) <b>Int. 1,3</b>	19 % <b>MW=67</b> (r 50-90) Int. 2	82 % MW=68 (r 30-95) Int. 1,7	56 % MW=77 (r 20-100) Int. 2,1
<b>EMP</b> n=24	78 % MW=81 (r 20-100) Int. 1,7	58 % MW=76 (r 20-100) Int. 1,8	70 % MW=68 (r 40-100) Int. 1,3	73 % MW=76 (r 20-100) Int. 1,5
<b>EMM</b> n=8	75 % MW=77 (r 60-90) <b>Int. 1,2</b>	50 % MW=100 (r 100-100) Int. 1,8	63 % MW=76 (r 50-100) Int. 1,2	88 % MW=57 (r 20-90) Int. 1,3

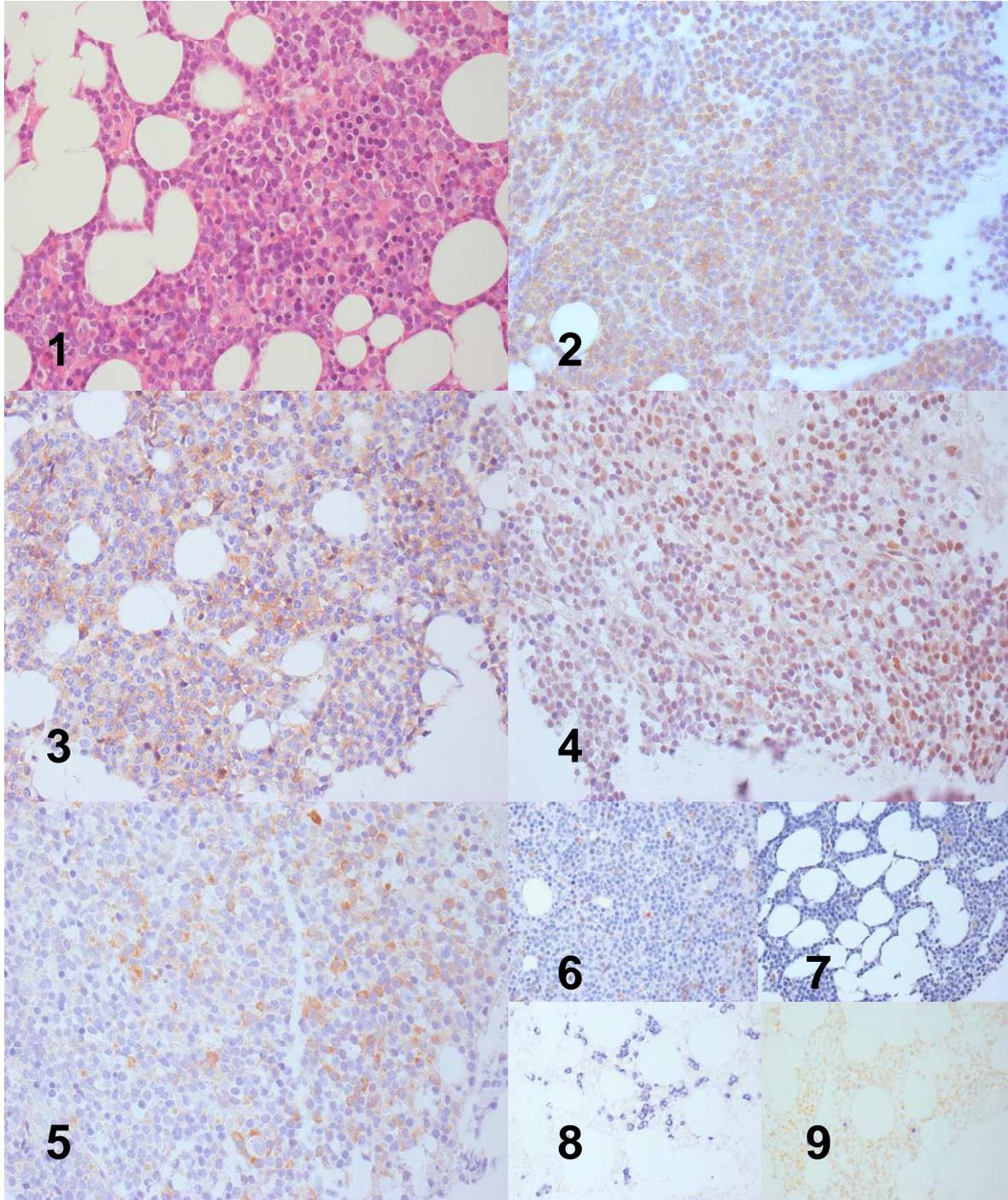
Angegeben werden die Prozentzahl der positiven Fälle, der Mittelwert der prozentualen Positivität (%), die Spannweite (%) und die mittlere Färbeintensität. Die Werte mit signifikanter Abweichung in Bezug zu LPL sind rot gedruckt. Die Abbildungen 8 - 10 (S. 60 - 65) zeigen Fotos der Färbeergebnisse.

**Abbildung 8:** Fotografien der Immunhistochemie der B-CLL



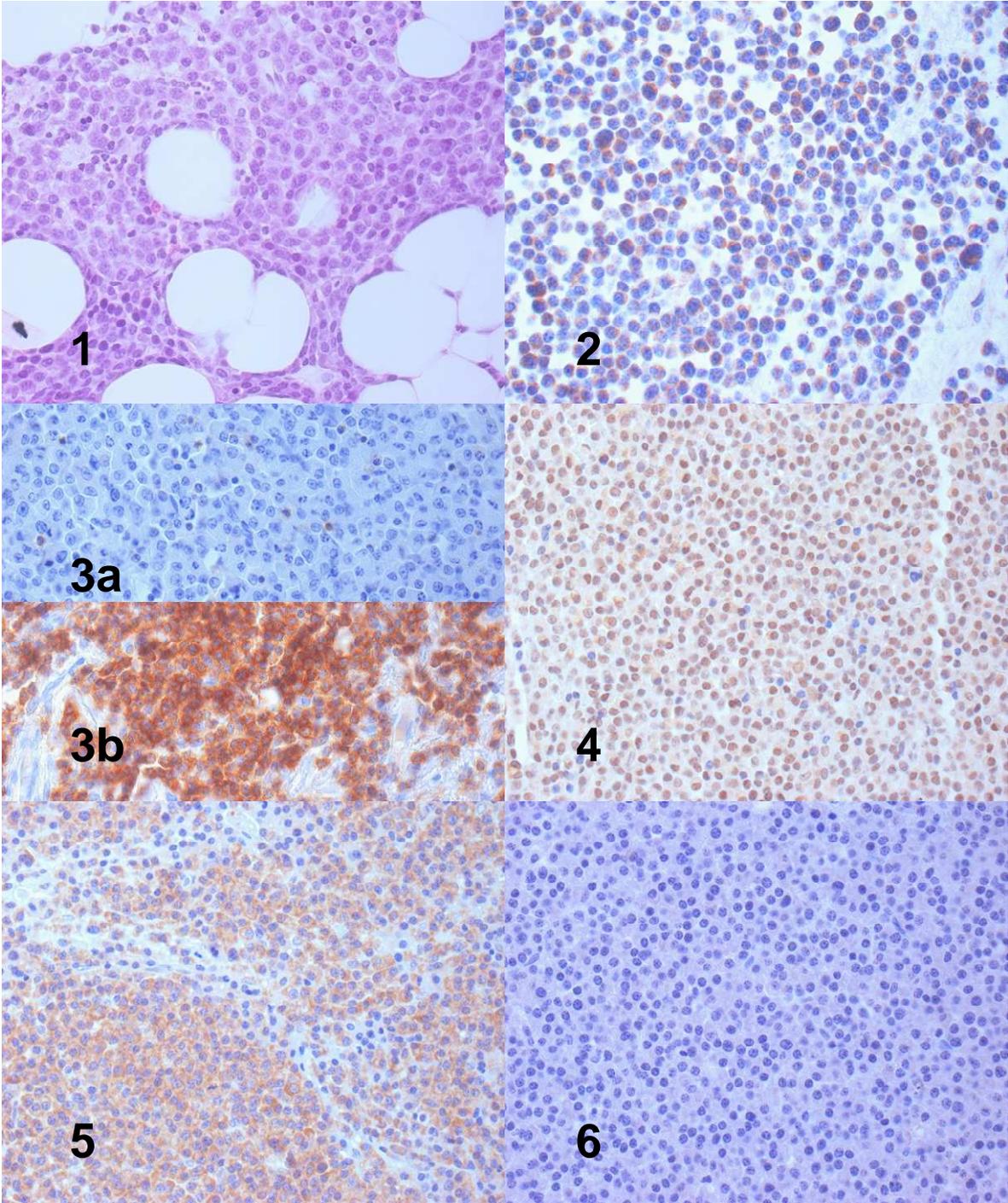
Dargestellt ist ein exemplarischer Fall aus der Gruppe der B-CLL (Fallnummer: H/2003/7892). **Bild 1** zeigt neben einigen Fettzellen eine vor allem im linken Bildabschnitt ausgeprägte Infiltration des Knochenmarks mit kleinen lymphoiden Zellen in HE-Färbung (300fache Vergrößerung). In **Bild 2** erkennt man die Tumorzellen an ihrer membranösen Färbung mittlerer Intensität bei der IHC-Untersuchung mit dem Ak gegen APRIL (400fache Vergrößerung). Ebenfalls eine membranöse Färbung in hellem Braunton ergab die IHC mit dem Ak gegen CD27, sichtbar bei einem Teil der Tumorzellen in **Bild 3** (300fache Vergrößerung). **Bild 4** zeigt eine schwache nukleäre Färbung der Tumorzellen über leicht bräunlicher Hintergrundfärbung bei der IHC mit dem Ak gegen Blimp1 (300fache Vergrößerung). Die IHC mit dem Ak gegen BLNK ist in **Bild 5** abgebildet (400fache-Vergrößerung). Die Tumorzellen zeigen eine schwache membranöse Färbung. Daneben sieht man vereinzelt größere Plasmazellen mit starker Färbung. Die Bilder 6 - 9 zeigen die IHC mit den diagnostischen Markern für die Identifizierung der B-CLL. Starke Positivität sieht man für CD5 in **Bild 6** sowie in diesem Fall auch für CD23 in **Bild 7** (beide in 300facher Vergrößerung). Typischerweise sind die B-CLL-Zellen CD20-positiv, dargestellt in **Bild 8** und CD138-negativ, dargestellt in **Bild 9** (beide in 400facher Vergrößerung).

**Abbildung 9:** Fotografien der Immunhistochemie und chromogenen *in situ* Hybridisierung des LPL



Dargestellt ist in den Bildern 1 - 8 ein exemplarischer Fall aus der Gruppe der LPL (Fall: H/2004/8499). Alle Fotografien wurden mit einer 300fachen Vergrößerung aufgenommen. **Bild 1** zeigt eine HE-Färbung des Knochenmarks mit lymphoplasmozytischem Infiltrat. Zwischen den randständigen Fettzellen sieht man die vermehrte Anzahl kleiner lymphoider Zellen, plasmazytoider Zellen und Plasmazellen. In **Bild 2** zeigen diese morphologisch verschiedenartigen Tumorzellen eine membranöse Färbung in einem hellen Braunton bei der IHC-Untersuchung mit dem Ak gegen APRIL. Eine ebenfalls membranöse Färbung der Tumorzellen ergab die IHC-Untersuchung mit dem Ak gegen CD27, abgebildet in **Bild 3**. In **Bild 4** kann man eine kräftige rotbraune nukleäre Färbung fast aller abgebildeter Tumorzellen bei der IHC-Untersuchung mit dem Ak gegen Blimp1 erkennen. Die IHC-Untersuchung mit dem Ak gegen BLNK, dargestellt in **Bild 5**, erbrachte eine membranöse Färbung bei einer hier geringeren Anzahl positiver Tumorzellen. Die Bilder 6 und 7 zeigen die in der Diagnostik des LPL eingesetzten IHC-Untersuchungen mit Ak gegen CD5 und CD23. In **Bild 6** erkennt man eine CD5-Negativität und in **Bild 7** sieht man einige in diesem Fall schwach CD23-positive Tumorzellen. Die Bilder 8 und 9 zeigen Fotografien der CISH-Untersuchung. In **Bild 8** ist dabei das Ergebnis des auch in den vorherigen Bildern dargestellten Falles zu sehen. Die blauen Signale weisen die Bindung der gegen Ig-lambda mRNA gerichteten Sonde nach. Zum Vergleich ist in **Bild 9** ein anderer Fall (Fall: H/2004/8010) mit rotem Signal bei Bindung der gegen Ig-kappa mRNA gerichteten Sonde dargestellt.

Abbildung 10: Fotografien der Immunhistochemie des MM



Dargestellt ist in den Bildern 1 - 3a und 4 - 6 ein exemplarischer Fall aus der Gruppe der MM (Fall: H/2004/16502). **Bild 1** zeigt eine KM-Biopsie mit Infiltrat eines MM in HE-Färbung (400fache Vergrößerung). Zwischen den Fettzellen sieht man typische neoplastische Plasmazellen, die die normalen hämatopoetischen Zellen des KM verdrängen. **Bild 2** zeigt eine deutliche membranöse Rotbraunfärbung der MM-Zellen bei der IHC mit dem Ak gegen APRIL (400fache Vergrößerung). Komplett negativ ist in diesem Fall die IHC mit dem Ak gegen CD27, dargestellt in **Bild 3a** (400fache Vergrößerung). Zum Vergleich ist in **Bild 3b** bei gleicher Vergrößerung ein stark CD27-positiver Fall abgebildet (Fall: H/1999/6285). **Bild 4** zeigt eine nukleäre Färbung fast aller MM-Zellen bei der IHC mit dem Ak gegen Blimp1 (300fache Vergrößerung). In diesem exemplarischen Fall ergibt die IHC mit dem Ak gegen BLNK darüber hinaus eine gleichmäßige membranöse Färbung des Infiltrates, abgebildet in **Bild 5** (300fache Vergrößerung). Die diagnostische IHC mit Pax5-Ak, dargestellt in **Bild 6**, zeigt die typische Pax5-Negativität der MM-Zellen (300fache Vergrößerung).

#### 4.3.5. Überprüfung des Expressionsmusters auf Korrelationen

Die Ergebnisse der prozentualen Positivität und der Färbeintensität von einerseits APRIL und CD27 sowie andererseits Blimp1 und BLNK wurden innerhalb der einzelnen Krankheitsgruppen auf ihre Korrelation überprüft.

Nach Kendall-Tau-b besteht eine schwache positive Korrelation zwischen der Färbeintensität von APRIL und CD27 (Korrelationskoeffizient=0,168;  $p=0,05$ ). Eine Korrelation zwischen der prozentualen Positivität von APRIL und CD27 war dagegen nicht nachzuweisen.

Darüber hinaus besteht nach Kendall-Tau-b eine moderate positive Korrelation zwischen der Färbeintensität von Blimp1 und BLNK (Korrelationskoeffizient=0,259;  $p=0,003$ ) sowie nach Spearman-Rho eine schwache positive Korrelation zwischen der prozentualen Positivität von Blimp1 und BLNK (Korrelationskoeffizient=0,212;  $p=0,02$ ).

#### 4.3.6. Diskriminanzanalyse

Durch eine Diskriminanzanalyse wurde überprüft, ob anhand des Expressionsmusters von APRIL, CD27, Blimp1 und BLNK eine Diskriminierung zwischen den verschiedenen untersuchten Krankheitsentitäten möglich ist. Hierdurch soll ihre Einsetzbarkeit in der Diagnostik bewertet werden. In der Diskriminanzanalyse können nur rein quantitative Daten erfasst werden, so dass hierfür ausschließlich die prozentuale Positivität berücksichtigt wurde.

Die Zufallswahrscheinlichkeit der richtigen Zuordnung eines untersuchten Falles aus einer der fünf untersuchten Krankheitsentitäten in seine Gruppe beträgt 20 %. Die Diskriminanzanalyse zeigt, dass unsere Untersuchungen mit den Antikörpern gegen APRIL, CD27, Blimp1 und BLNK die Wahrscheinlichkeit der richtigen Zuordnung bei CLL auf 56 % und bei MM auf 43 % steigern. Für die Krankheitsentitäten LPL, EMP und EMM konnte dies nicht gezeigt werden.

## 5. Diskussion

### 5.1. Immunphänotypisierung

Der Nachweis klonaler B-Zellen mit lymphoplasmozytischer Differenzierung im Knochenmark und monoklonaler IgM-Proteine im Serum ist nicht pathognomonisch für das LPL. IgM-Paraproteine können in allen Subtypen lymphoproliferativer Erkrankungen mit reifen B-Zellen auftreten und lymphoplasmozytische Zellen können ebenfalls in anderen Erkrankungen, wie MZL oder CLL, gefunden werden. (*Owen, Barrans et al. 2001; Vijay and Gertz 2007*) Das LPL kann darüber hinaus auch in einer nichtsekretorischen Form oder mit monoklonalem IgG- beziehungsweise IgA-Protein auftreten. Daher bleibt die Abgrenzung des LPL zu seinen Differenzialdiagnosen schwierig. (*Owen, Barrans et al. 2001*)

Immunhistochemische Untersuchungen sind essentiell für die Diagnosestellung. Jedoch bleiben die diesbezüglichen Daten aus der Literatur im Hinblick auf einige Oberflächenmarker uneinheitlich.

Owens et al. konnten in ihrer Studie zur Entwicklung exakter diagnostischer Kriterien für das LPL in über 90 % der untersuchten LPL-Fälle einen einheitlichen Immunphänotyp, bestehend aus einer Positivität von CD19 und CD20 sowie einer Negativität von CD5, CD10 und CD23, nachweisen. (*Owen, Barrans et al. 2001*)

Typischerweise exprimieren die LPL-Zellen die Pan-B-Zell-Marker CD19, CD20, CD22. (*Owen, Barrans et al. 2001*) Wir konnten ebenfalls in allen untersuchten LPL-Fällen eine CD20-Expression mittlerer Intensität nachweisen. Diese einheitliche CD20-Expression der LPL-Zellen ist auch in therapeutischer Hinsicht interessant. So konnten Therapieansätze mit dem CD20-Antikörper Rituximab gute Erfolge erzielen. (*Foran, Rohatiner et al. 2000*)

Widersprüchlich bleiben dagegen die Daten zur Expression von CD5, CD23 und CD138.

In dem Review von Vijay et al. wird die Abgrenzung zwischen LPL und MM auf der Grundlage der CD38- und CD138-Negativität der LPL-Zellen sowie zwischen LPL und CLL auf der Grundlage der CD5- und CD23-Negativität der

LPL-Zellen beschrieben. (*Vijay and Gertz 2007*) Auch dem Review von Vitolo et al. folgend sind die LPL-Zellen CD5- und CD23-negativ. (*Vitolo, Ferreri et al. 2008*)

Unsere Untersuchungen zeigen jedoch keine solch eindeutigen und krankheitsspezifischen Expressionsmuster dieser Proteine. Während wir in CLL erwartungsgemäß in 98 % der Fälle eine CD5-Expression nachweisen konnten, zeigten sich die LPL-Zellen, wie von Vijay et al. und Vitolo et al. beschrieben, in allen Fällen negativ. Weniger eindeutig waren aber unsere Ergebnisse bezüglich der CD23-Expression. In CLL fanden wir bei 64 % eine CD23-Positivität mit mittlerer Expressionsstärke. In LPL konnten wir jedoch bei gleicher Expressionsstärke ebenfalls eine CD23-Positivität, hier in 20 % der Fälle nachweisen. Auch Hunter et al. fanden in einem Teil der LPL eine CD5- und CD23-Expression. Nach ihren Daten wird CD5 in 9 % der Fälle und CD23 in 35 % der Fälle von den lymphoplasmozytischen Zellen exprimiert. (*Hunter, Branagan et al. 2005*)

Der Nachweis der Proteine CD5 und CD23 als Oberflächenmarker von B-Zellen ist damit nicht allein typisch für CLL und sollte die Diagnose LPL nicht ausschließen. Darüber hinaus ist möglicherweise gerade die CD23-Expression charakteristischer Oberflächenmarker einer distinkten Subgruppe der LPL, welche sich durch signifikant stärker erhöhte IgM-Serumspiegel von den CD23-negativen LPL abhebt. (*Hunter, Branagan et al. 2005*)

Auch bezüglich des Plasmazellmarkers CD138 zeigen unsere Untersuchungen andere Ergebnisse als oben aus dem Review von Vijay et al. wiedergegeben. Dabei wiesen wir erwartungsgemäß in 100 % der MM-Fälle eine starke CD138-Expression nach und auch die weiteren untersuchten Plasmazellneoplasien EMP und EMM waren positiv für CD138 (in 70 % und 88 % der Fälle). Die CLL-Zellen zeigten keine CD138-Expression, während wir jedoch auf 40 % der LPL-Zellen eine Positivität von CD138 nachweisen konnten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass der Plasmazellmarker CD138 ebenfalls von den plasmazellulär-differenzierten LPL-Zellen exprimiert wird. In der Literatur finden sich ebenfalls Daten, die diese CD138-Expression der LPL-Zellen bestätigen. (*Liu, Zhang et al. 2010*)

Eine CD138-Positivität schließt die Diagnose LPL also nicht aus und damit bleibt auch die Abgrenzung zu MM oder der häufigsten Differenzialdiagnose IgM-MGUS allein auf der Basis der CD138-Expression nicht eindeutig. Besonders schwierig ist hierbei die Abgrenzung des LPL vom lymphoplasmazytischen MM, welches sich durch eine gleichzeitige CD138- sowie CD20-Positivität, bei ebenfalls bestehender CyclinD1-Expression auszeichnet. (*Heerema-McKenney, Waldron et al. 2010*)

Untersuchungen der Pax5-Expression können hier hilfreich sein. Während die Plasmazellneoplasien MM, EMM, EMP in unseren Untersuchungen keine oder nur eine sehr geringe Pax5-Expression zeigten, wiesen wir in 100 % der LPL-Fälle eine moderate Pax5-Expression nach.

Pax5 und Bcl-6 sind Transkriptionsfaktoren, die für die Aufrechterhaltung der B-Zell-Identität wichtig sind. Während der Differenzierung zur Plasmazelle kommt es zu einem Verlust von Pax5 und Bcl-6. (*Fairfax, Kallies et al. 2008; Schmidlin, Diehl et al. 2008*) Entgegengesetzt zu Pax5 und Bcl-6 steigt Mum1, ein Regulator der B-Zell-Differenzierung und -Entwicklung, mit plasmazellulärer Differenzierung an. (*Schmidlin, Diehl et al. 2008*) Bcl-6 war in allen untersuchten NHL-Entitäten negativ. Mum1 konnten wir in 33 % der CLL-Fälle bei moderater Expressionsstärke und im Vergleich dazu deutlich vermehrt in 70 % der LPL-Fälle nachweisen.

Die starke CD20- und Pax5-Positivität der LPL-Zellen, ihre mittlere CD138- und Mum1-Expression sowie ihre Bcl-6-Negativität unterstreicht die Einordnung des LPL als NHL-Entität bestehend aus B-Zellen intermediärer Differenzierung.

CD25 ist ein weiterer diagnostischer Marker, der unter anderem in der Abgrenzung des LPL zum MZL hilfreich ist. Ocio et al. schlagen zur Differenzierung zwischen diesen beiden Krankheitsentitäten die Kombination aus den immunhistochemischen Untersuchungen auf CD22 und CD25 vor. Während MZL-Zellen CD22 überexprimieren und gleichzeitig eine schwache CD25-Expression zeigen, konnten Ocio et al. in LPL eine signifikant schwächere CD22-Positivität und dagegen in 88 % der LPL eine CD25-Positivität nachweisen. (*Ocio, Hernandez et al. 2005*) Unsere Ergebnisse zeigen eine moderate Expression von CD25 in allen untersuchten LPL und bestätigen damit die CD25-Expression in der Mehrheit der LPL-Zellen.

p53, auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, hält beim Auftreten von Fehlern während der Transkription die DNA-Replikation an und hat damit eine wichtige Funktion als Tumorsuppressor. Der Aktivitätsverlust von p53 steht mit vielen verschiedenen neoplastischen Erkrankungen in Zusammenhang.

Döhner et al. wiesen in 7 % der von ihnen untersuchten CLL eine Deletion von 17p13.1, dem Genlocus von p53, nach. Bei der Untersuchung genetischer Aberrationen in MM konnten Fonseca et al. ebenfalls bei 10 % der Fälle diese Deletion nachweisen. Sowohl in CLL als auch in MM lässt die Deletion von 17p auf einen schlechten Krankheitsverlauf und ein kürzeres Gesamtüberleben der Patienten schließen. (*Döhner, Stilgenbauer et al. 2000; Fonseca, Blood et al. 2003*) Auch in Untersuchungen an LPL konnte im Folgenden in 9 % der Fälle die Deletion 17p13.1 nachgewiesen werden. (*Chang, Samiee et al. 2004*)

Da die Deletion jedoch in der Regel nicht biallelisch auftritt, ist in unseren immunhistochemischen Untersuchungen kein Äquivalent nachweisbar. Die Immunhistochemie kann jedoch Hinweise darauf geben, inwiefern Dysregulationen von p53 an der Pathogenese des LPL beteiligt sein könnten.

p53 hat eine sehr kurze Halbwertszeit und ist damit in der Regel nicht immunhistochemisch nachweisbar. Erst eine Verlängerung der Halbwertszeit von p53, zum Beispiel durch genetische Aberrationen in einigen Tumorgeweben, macht dieses nachweisbar. In unseren Untersuchungen fanden wir eine geringe Positivität von p53 in allen untersuchten NHL-Entitäten, allein die LPL waren in allen Fällen negativ. Damit scheint p53 in der Pathogenese des LPL nicht von Bedeutung zu sein.

Zusammenfassend fanden wir in den immunhistochemischen Untersuchungen damit weitestgehend im Konsens mit den Daten der Literatur einen Immunphänotyp des LPL bestehend aus einer Positivität von CD20, Pax5 und CD25, entweder einer Positivität oder Negativität von CD23, CD138 und Mum1 sowie einer Negativität von CD5, p53 und Bcl-6.

## 5.2. Expressionsmuster der Proteine APRIL, CD27, Blimp1, BLNK

### 5.2.1. APRIL und CD27

APRIL ist ein Protein, das unter anderem von Monozyten, dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten, Osteoklasten und Subpopulationen von Lymphozyten exprimiert wird. (Chu, Enghard et al. 2007; Schwaller, Schneider et al. 2007; Moreaux, Sprynski et al. 2009) Es ist Mitglied der Familie der TNF und steht durch seine stimulierende Wirkung auf die Zellproliferation mit der Entwicklung von Krebserkrankungen im Zusammenhang. (Hahne, Kataoka et al. 1998) Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von APRIL und dem verwandten Protein BAFF die Entstehung von B-Zell-Neoplasien induziert. (Planelles, Carvalho-Pinto et al. 2004)

Schwaller et al. beschrieben eine APRIL-Überexpression in high-grade Lymphomen, wie DLBCL und Burkitt-Lymphom, während sie diese in low-grade Lymphomen nicht nachweisen konnten. (Schwaller, Schneider et al. 2007)

Unsere Ergebnisse zeigen eine starke APRIL-Expression in allen untersuchten NHL-Entitäten. Gerade in den low-grade NHL CLL und LPL zeigten sich dabei die höchsten Positivitätsraten.

APRIL schützt die Tumorzellen vor spontaner und medikamentös-induzierter Apoptose. (Haiat, Billard et al. 2006) Die Wirkungsweise von APRIL passt damit vollständig in das pro antiapoptotische Konzept der low-grade NHL, welches beschreibt, dass die Vermehrung der Tumorzellen bei low-grade NHL nicht durch eine starke Proliferation des neoplastischen Klons, sondern durch seine Fähigkeit des Apoptose-Entzugs begründet ist.

Der Zusammenhang von APRIL mit low-grade NHL kann durch weitere Studien bestätigt werden. (Haiat, Billard et al. 2006; Planelles, Castillo-Gutierrez et al. 2007) Planelles et al. fanden bei Patienten mit CLL einen deutlich erhöhten APRIL-Serumspiegel und zeigten, dass dieser mit einer schlechteren Prognose korreliert. (Planelles, Castillo-Gutierrez et al. 2007)

Die stärkste APRIL-Positivität mit 90 % positiver Fälle konnten wir bei LPL nachweisen. Hierzu gibt es bisher kaum publizierte Daten. ElSawa et al. wiesen auf der Oberfläche von LPL-Zellen das gleiche Expressionsmuster der

Rezeptoren für APRIL und BAFF nach wie auf MM-Zellen und beschrieben darüber hinaus erhöhte BAFF-Serumspiegel bei LPL-Patienten. (*Elsawa, Novak et al. 2006*) Weiterhin konnten Ho et al. eine APRIL-Produktion durch die stark vermehrten Mastzellen in der Knochenmarksumgebung des LPL-Infiltrates nachweisen. (*Ho, Hatjiharissi et al. 2008*) Passend dazu war in unseren immunhistochemischen Untersuchungen die Färbeintensität bei LPL signifikant stärker als bei CLL und MM.

APRIL wird nach Datenlage dabei nicht von den Tumorzellen selbst produziert, sondern von Zellen ihrer unmittelbaren Umgebung, die somit das Überleben der Tumorzellen fördern. Bei LPL wird, wie schon erwähnt, den Mastzellen die APRIL-Produktion zugeschrieben, bei DLBCL sind es neutrophile Granulozyten, bei MM Monozyten sowie Osteoklasten und bei CLL „Nurse-like“-Zellen. (*Moreaux, Cremer et al. 2005; Nishio, Endo et al. 2005; Schwaller, Schneider et al. 2007; Ho, Hatjiharissi et al. 2008*) Von diesen Zellen wird APRIL in löslicher Form freigesetzt und ist daher auch im Serum der Patienten nachweisbar. (*Planelles, Medema et al. 2008*)

In unseren Untersuchungen des Tumordinfiltrates haben wir nicht die Zellen nachgewiesen, die selbst APRIL exprimieren, wie dies bei den anderen eingesetzten Markern der Fall war. Wir konnten auch nicht das lösliche APRIL direkt nachweisen. Unsere Ergebnisse liefern aber Auskunft über das an die entsprechenden Rezeptoren gebundene APRIL an der Zelloberfläche der Tumorzellen und lassen damit indirekt Rückschlüsse auf die Menge des vom Microenvironment produzierten APRIL, das Vorhandensein der Rezeptoren an der Oberfläche der Tumorzellen und damit auch die Rolle von APRIL im Krankheitsgeschehen zu. Dass diese Methode aussagekräftig ist, lässt sich durch die signifikanten Ergebnisse in Bezug auf die Unterschiede in der Färbeintensität unterstreichen.

APRIL ist wie auch BAFF an der humoralen Immunantwort beteiligt. Eine Dysregulation von APRIL wird mit der Entstehung von verschiedenen Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang gebracht. (*Roschke, Sosnovtseva et al. 2002; Mackay and Tangye 2004; Schwaller, Schneider et al. 2007*)

Dies ist deshalb so interessant für unsere Arbeit, da die Pathogenese des LPL ebenfalls mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung steht. So werden

Autoimmunerkrankungen, Immundefizienz oder auch chronische Antigenstimulation wie z.B. durch eine Hepatitis C-Erkrankung als Ursachen für die Entstehung eines LPL genannt. (*Planelles, Medema et al. 2008; Vitolo, Ferreri et al. 2008*)

Schwaller et al. zeigten, dass in DLBCL APRIL hauptsächlich durch ein entzündliches Infiltrat von neutrophilen Granulozyten in der Tumorumgebung produziert wird. Die dabei beobachtete Rolle von APRIL als Stimulus für Tumorzellproliferation, -überleben und Antiapoptose unterstreicht das neue Verständnis bezüglich vielfach beschriebener Entzündungsreaktionen in der Tumorumgebung, die damit vermutlich nicht rein reaktiv auftreten, sondern essentiell zum Tumorgeschehen dazugehören. (*Schwaller, Schneider et al. 2007*)

Dies lässt die Hypothese zu, dass eine enge Verknüpfung zwischen der Pathogenese des LPL und zum Einen Fehlfunktionen des Immunsystems auf der Grundlage von Dysregulationen im APRIL-Wirkungskreislauf sowie zum Anderen Veränderungen im Microenvironment des Knochenmarks bestehen und in der Zukunft näher betrachtet werden sollten.

Nach Studienlage korreliert eine hohe APRIL-Expression mit aggressiver Erkrankung und einer Abnahme des Gesamtüberlebens der Patienten. (*Planelles, Castillo-Gutierrez et al. 2007; Schwaller, Schneider et al. 2007*) Von den untersuchten NHL-Entitäten hat das EMM die deutlich schlechteste Prognose. Dies könnte zu der Annahme führen, dass hier die APRIL-Expression am stärksten ist. Im Gegensatz dazu zeigen unsere Ergebnisse bei EMM aber eine mit 75 % Positivitätsrate und einer mittleren Färbeintensität von 1,2 im Vergleich zu LPL eher schwache APRIL-Expression. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt im Fehlen des spezifischen Knochenmark-Microenvironments. Hierzu muss allerdings erwähnt werden, dass wir bei EMP, welche ebenfalls nicht im Knochenmark lokalisiert sind, eine stärkere APRIL-Expression nachweisen konnten (78 % Positivität, mittlere Färbeintensität 1,7). Nishio et al. beschrieben, dass bei der CLL so genannte „Nurse-like“-Zellen (NLZ) die stärkste APRIL-Expression aufweisen. NLZ entwickeln sich in der Pathogenese der CLL aus mononukleären Zellen des Blutes und fördern das Überleben der Tumorzellen. (*Nishio, Endo et al. 2005*) Dies zeigt, dass nicht

allein das Microenvironment des Knochenmarks für die APRIL-Expression entscheidend ist, sondern dass diese in den einzelnen Krankheitsentitäten auf verschiedenem Wege erfolgt.

Auf dieser Grundlage lassen sich auch die unterschiedlichen Expressionsniveaus von APRIL bei den extramedullären Plasmazellneoplasien EMP und EMM erklären. Welches Microenvironment bzw. welche Zellen hier die tumorstimulierende Expression von APRIL übernehmen, bleibt zu untersuchen.

Daraus ergibt sich, dass die APRIL-Expression nicht krankheitsübergreifend als Marker einer schlechten Prognose verwendbar ist, sondern allein in Bezug auf eine einzelne Entität Aussagekraft besitzt.

Aus unseren Ergebnissen und klinischen Verlaufsdaten ist kein Zusammenhang zwischen einer hohen APRIL-Expression und einem kürzeren Überleben der Patienten mit LPL erkennbar. Dies kann aber eventuell durch den im Verhältnis zum Gesamtüberleben kurzen Beobachtungszeitraum und die für diesen Auswertungszweck mangelnde Gruppengröße begründet sein.

CD27 gehört zur Familie der TNF und wird von natürlichen Killerzellen sowie Subgruppen von B- und T-Lymphozyten exprimiert. (Ho, Hatjiharissi et al. 2008) In der Gruppe der B-Zellen ist CD27 auf B-Lymphozyten des Keimzentrums, post-Keimzentrums-B-Lymphozyten sowie Plasmazellen und Gedächtniszellen nachweisbar, während es auf naiven B-Zellen fehlt. (Xiao, Hendriks et al. 2004; Borst, Hendriks et al. 2005; Moreau, Robillard et al. 2006)

Bei CLL konnten wir in 39 % der Fälle eine Positivität von CD27 nachweisen. Die CLL-Zellen können entweder von einem neoplastischen Klon abstammen, der noch nicht in das Keimzentrum eingetreten ist, oder von einem, der das Keimzentrum bereits passiert hat. So sind etwa in der Hälfte der CLL-Fälle die Ursprungszellen bereits in das Keimzentrum eingetreten. Da post-Keimzentrums-B-Zellen CD27 exprimieren, erwarten wir in diesen zuletzt genannten Fällen eine Nachweisbarkeit von CD27. Mit einer Positivität von 39 % entspricht das Ergebnis dieser Annahme.

Döhner et al. konnten in ihrer Studie eine signifikant schlechtere Prognose der Patienten mit einer von naiven prä-Keimzentrums B-Zellen abstammenden CLL

nachweisen. (*Dohner, Stilgenbauer et al. 2000*) Dies sind unserem Erklärungsmodell nach die CD27-negativen CLL-Fälle. Daraus lässt sich folgern, dass die CD27-Expression Einfluss auf die Tumorzellbiologie und den Krankheitsverlauf der CLL-Patienten haben könnte.

Bei LPL fanden wir eine CD27-Expression in 48 % der Fälle. Nach dem Verständnis über die physiologische CD27-Expression müsste CD27 hier in allen Fällen nachweisbar sein. Ähnliche Ergebnisse fanden jedoch Ho et al., die in ihrer Studie mittels Durchflusszytometrie bei 42 % der untersuchten LPL-Fälle eine CD27-Expression auf den Tumorzellen nachweisen. (*Ho, Hatjiharissi et al. 2008*)

Die lymphoplasmozytischen Zellen entwickeln sich aus Gedächtniszellen, die typischerweise CD27 positiv sind. (*Agematsu 2000; Sahota, Babbage et al. 2009*) Hier stellt sich also die Frage, ob die LPL-Zellen aus veränderten CD27-negativen Gedächtniszellen hervorgehen, oder ob sie den Oberflächenmarker während der neoplastischen Entwicklung verlieren.

Auch bei MM wäre eine hohe Positivität von CD27 zu erwarten, da ausdifferenzierte Plasmazellen physiologischerweise CD27 exprimieren.

Von allen untersuchten NHL-Entitäten zeigte sich bei MM aber die geringste CD27-Positivität. Nur in 19 % der MM-Fälle konnten wir eine Expression von CD27 nachweisen. Eine geringe CD27-Positivität der MM-Zellen konnte auch in anderen Studien gezeigt werden. (*Moreau, Robillard et al. 2006; Rawstron, Orfao et al. 2008*)

Dies kann durch einen Verlust von CD27 während der malignen Transformation der Zellen, also dem Übergang von physiologischen Plasmazellen in neoplastische MM-Zellen, erklärt werden. Dabei scheint sich im Folgenden ein Selektionsvorteil für die CD27-negativen Zellen gegenüber CD27-positiven Zellen zu ergeben, was unter anderem durch einen Apoptoseentzug der CD27-negativen Zellen begründet ist. (*Moreau, Robillard et al. 2006*) Moreau et al. beschrieben den Verlust von CD27 dabei als ein Malignitätskriterium der MM-Zellen, welches im Krankheitsverlauf wie auch die korrelierenden Faktoren CD221-Positivität und t(4;14) für eine schlechte Prognose spricht. (*Moreau, Robillard et al. 2006*)

Dieser Mechanismus ist vermutlich auf das LPL übertragbar. Demnach vermuten wir einen CD27-Verlust der lymphoplasmozytischen Zellen während der neoplastischen Entwicklung, der allerdings geringer ausfällt, als dies bei MM der Fall ist. Der geringere Verlust von CD27 in den LPL-Zellen könnte dabei zum Beispiel durch die niedrigere Proliferationsrate der neoplastischen Zellen dieser Krankheitsentität im Vergleich zu MM begründet sein.

Offen bleibt die Frage warum CD27 bei EMP und EMM stärker exprimiert wird als bei MM. Die neoplastischen Zellen des EMM durchlaufen im Vergleich zu MM eine weitere Entdifferenzierung, so dass gerade hier eine noch niedrigere CD27-Expression als bei MM zu erwarten wäre.

Die LPL-Zellen tragen nicht nur den Oberflächenmarker CD27, sondern sezernieren auch lösliches sCD27. (Ho, Hatjiharissi et al. 2008; Ciccarelli, Yang et al. 2009) In der Literatur werden diesbezüglich unterschiedliche Angaben gemacht. Ho et al. zeigten, dass gerade die LPL-Zellen sCD27 freisetzen, die nach PCR-Analyse CD27-Transkripte exprimieren und denen gleichzeitig der Oberflächenmarker CD27 fehlt. Daraus wird geschlossen, dass der Verlust von CD27 an der Zelloberfläche zu einer Freisetzung des löslichen Proteins führt. (Ho, Hatjiharissi et al. 2008)

Ranheim et al. konnten dagegen eine konkordante Regulation des Oberflächenmarker CD27 und des löslichen sCD27 nachweisen und somit zeigen, dass beide miteinander korrelierend von derselben Zelle produziert werden. (Ranheim, Cantwell et al. 1995) Unser Nachweis des Oberflächenmarkers ließe demnach ebenso Rückschlüsse auf die Expression von sCD27 zu.

In der Umgebung des Tumoringfiltrates von LPL haben wir vermehrt stark CD27-positive Plasmazellen nachweisen können. Es stellt sich die Frage, ob diese Plasmazellen als reaktiv einzuordnen sind oder ob sie zum neoplastischen Geschehen selbst gehören. Diese Frage kann allerdings derzeit nicht beantwortet werden, da ein Malignitätsmarker zur zweifelsfreien Identifikation des Tumorzellklons nicht verfügbar ist.

Den CD27-positiven Plasmazellen der Tumorumgebung könnte dabei ebenso wie dem von den lymphoplasmozytischen Zellen freigesetztem sCD27 die Funktion der Stimulation von Mastzellen im Knochenmark über eine Interaktion

mit CD70 zukommen. Diese Mastzellen fördern wiederum über die Freisetzung von APRIL, BAFF und CD40L das Überleben der neoplastischen Zellen, die mit BAFF-R, TACI, BCMA und CD40 die entsprechenden Rezeptoren für die Faktoren auf ihrer Oberfläche tragen. (*Tournilhac, Santos et al. 2006; Ho, Hatjiharissi et al. 2008*)

Diese Theorie wird durch die Korrelation bezüglich der Expressionsstärke von CD27 und APRIL in unseren Ergebnissen unterstützt. CD27 scheint also nach unseren Ergebnissen und aktuellen Erkenntnissen die APRIL-Produktion zu regulieren. (*Ho, Hatjiharissi et al. 2008*)

Bei recht hoher Anzahl CD27-positiver Fälle sind unsere APRIL-Ergebnisse bei EMP und EMM im Vergleich zu CLL, LPL und MM von geringerer Positivität. Der Abstand zwischen der CD27- und APRIL-Positivität ist damit bei EMP und EMM auffällig geringer als bei CLL, LPL und MM (siehe Abbildung 11, S. 99). Daraus ergibt sich die Frage, ob sCD27 für die Induktion von APRIL noch weitere Faktoren benötigt und der Regelkreis nicht allein durch diese beiden Proteine gesteuert wird.

Entscheidend dabei könnte wiederum das Microenvironment des Knochenmarks sein, das bei EMP und EMM fehlt. In der Knochenmarksumgebung könnten weitere, bisher nicht bekannte Faktoren die Wirkung von sCD27 auf die APRIL-Produktion der Mastzellen verstärken. Dies könnten unter anderem Zytokine wie Interleukin-8 oder Interleukin-10 sein, deren Dysregulation in rezenten Studien in Zusammenhang mit der CLL beschrieben wurden oder auch Interleukin-4, welches zusammen mit Interleukin-10 eine regulierende Wirkung auf die B-Zell-Differenzierung hat. (*Arens, Nolte et al. 2004; Kara, Sahin et al. 2007*)

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich ein wichtiges und zukünftig weiter zu untersuchendes Modell eines Kreislaufs der Selbstinduktion der neoplastischen Zellen.

Diese Erkenntnisse könnten zu neuen effektiven Therapieoptionen führen. Eine Unterbrechung des tumorfördernden Regelkreislaufs durch gezielte Antikörper-Therapie ist ein vielversprechender Gedanke. Studien zeigen, dass die Mastzellen-induzierte Expansion der LPL-Zellen durch Proteine, die die Wirkung von APRIL, BAFF und CD40L blockieren, unterbunden werden kann.

Auch eine Therapie mit Alemtuzumab und Imatinib, die die Mastzellen selbst als Angriffspunkt nutzt und deren Apoptose induziert, konnte bei Patienten mit LPL zur Remission der Erkrankung führen. (*Tournilhac, Santos et al. 2006; Ho, Hatjiharissi et al. 2008*) Darüber hinaus könnte die CD27-CD70-Interaktion medikamentös blockiert werden. Im Mausmodell ist eine solche Behandlung bereits erprobt worden und erzielte gute Ergebnisse. (*Ho, Hatjiharissi et al. 2008*) Die Übertragung auf den Menschen bleibt dabei aber schwierig, da der Erhalt eines funktionsfähigen Immunsystems kritische Voraussetzung ist. (*Borst, Hendriks et al. 2005*)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass APRIL von Zellen der Tumorumgebung exprimiert wird und eine tumorstimulierende Wirkung hat. Bei LPL konnten wir eine starke Positivität von APRIL nachweisen. Dies bedingen die stark vermehrten Mastzellen im Knochenmarks-Microenvironment, die somit entscheidend an der Pathogenese des LPL beteiligt sind.

Die LPL-Zellen exprimieren CD27 und sCD27. Unsere Ergebnisse zeigen eine Korrelation der Expressionsstärke von CD27 und APRIL.

Aus der Literatur und unseren Daten ergibt sich die Schlussfolgerung, dass sCD27 APRIL reguliert, indem es die APRIL-Produktion durch Mastzellen induziert. Dies lässt auf ein Modell eines Selbstinduktionskreislaufs der Tumorzellen schließen, dessen Blockierung eine wichtige therapeutische Option mit sich bringt.

Damit haben CD27 und APRIL wichtige Funktionen in der Pathogenese des LPL, der Serumspiegel von sCD27 ist als Verlaufsparemeter in der Therapie von LPL-Patienten aussagekräftig und die CD27-CD70-Interaktion sowie APRIL sind Angriffspunkt für neue Therapieverfahren. (*Ho, Hatjiharissi et al. 2008*)

### 5.2.2. Blimp1 und BLNK

Die B-Zell-Differenzierung über das Keimzentrumsstadium bis hin zu Gedächtnis- oder Plasmazellen ist ein streng regulierter Prozess. Blimp1 ist ein wichtiger Regulator dieses Differenzierungsvorgangs. Als Inhibitor der

Transkription bindet Blimp1 direkt an die DNA und rekrutiert weitere Co-Inhibitoren mit denen es gemeinsam das Genexpressionsprogramm der frühen B-Lymphozyten-Stadien supprimiert. (*Shapiro-Shelef, Lin et al. 2003; Lossos 2010*)

Mit diesem Wissen über Blimp1 und darüber hinaus seine Beziehung zu anderen Transkriptionsfaktoren konnten grundlegende molekulare Vorgänge der B-Zell-Differenzierung aufgeklärt werden.

Der Eintritt und Ablauf der Differenzierung wird über zwei gegensätzliche Gruppen von Transkriptionsfaktoren, auf der einen Seite Blimp1 und Xbp1 und auf der anderen Seite Pax5 und Bcl-6, und ihr Wirkungsgleichgewicht gesteuert. Pax5 und Bcl-6 sind dabei wichtig für die Aufrechterhaltung der B-Zell-Identität und damit Gegenspieler von Blimp1. Ein Anstieg der Blimp1-Expression führt zu einem Anstieg des Genexpressionsprogramm der Plasmazelle und einem Verlust von Pax5 und Bcl-6. (*Fairfax, Kallies et al. 2008; Schmidlin, Diehl et al. 2008*)

In einem Editorial von Lossos et al. wird beschrieben, dass Blimp1 durch Deletionen, Missensmutationen und Trunkationen verloren gehen kann. Mausexperimente haben bei biallelischer Deletion von Chromosom 6q21, dem Genlocus von Blimp1, einen vollständigen Verlust des Proteins nachweisen können. (*Mandelbaum, Bhagat et al. 2010*) Blimp1 wird die Funktion eines Tumorsuppressors zugeschrieben, dessen Verlust zur Lymphomgenese führt, wobei die genauen Mechanismen hierbei noch unbekannt sind. (*Tate, Hirayama-Ohashi et al. 2007; Calado, Zhang et al. 2010; Lossos 2010; Mandelbaum, Bhagat et al. 2010*)

Nach unseren Untersuchungen ist das Protein Blimp1 in allen Differenzierungsstadien der B-Zelle nachweisbar. So fand sich eine mittlere bis hohe Prozentzahl Blimp1-positiver B-Zellen in allen untersuchten NHL-Entitäten sowie Lymphknoten- und Knochenmarkskontrollen.

Wir konnten Blimp1 erwartungsgemäß in 95 % der LPL mit einer durchschnittlichen Intensität von 1,4 nachweisen. Gleichzeitig fanden wir auch eine durchgehende Pax5-Positivität. Auch bei der CLL war eine Blimp1-Expression in 93 % der Fälle in schwacher Intensität nachweisbar. Hier bestand gleichzeitig eine starke Pax5-Expression. Die neoplastischen Plasmazellen des

MM zeigten in 82 % der Fälle eine starke Blimp1-Expression, während nur in einem der 19 Fälle eine Pax5-Positivität nachweisbar war.

Die Blimp1-Intensität ist bei Blimp1-positiven LPL damit deutlich niedriger als in MM. Dies wird dadurch erklärt, dass Blimp1 bei der Differenzierung zur Plasmazelle quantitativ hochreguliert wird. Insgesamt findet sich eine deutlich stärkere Expression von Blimp1 in plasmazellulär differenzierten Zellen als in Vor- bzw. Keimzentrumszellen. Dies unterstreicht die wichtige Funktion von Blimp1, welches nach Passage des Keimzentrums die B-Zellen in der Differenzierung zur Plasmazelle reguliert. (*Shapiro-Shelef, Lin et al. 2003; Tate, Hirayama-Ohashi et al. 2007*)

Bei LPL ist in ca. 30 - 50 % der Fälle die Deletion 6q21 nachweisbar. (*Schop, Kuehl et al. 2002; Chng, Schop et al. 2006*) Auf diesem Chromosom befindet sich der Genlocus von Blimp1. Eine von uns durchgeführte Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zum Nachweis der Deletion in unserem Kollektiv, erbrachte leider keine aussagekräftigen Ergebnisse. Warum nun Blimp1 beim LPL nicht häufiger negativ ist, wie es wegen der oben beschriebenen Deletion zu erwarten wäre, kann durch das Fehlen einer biallelischen Deletion, wie sie im Zusammenhang mit einer Subgruppe der DLBCL (ABC= activated B cell-like) nachgewiesen wurde, erklärt werden. (*Mandelbaum, Bhagat et al. 2010*)

Unterstützt werden die Ergebnisse für Blimp1 durch das Pax5-Expressionsmuster in den untersuchten NHL-Entitäten. Die Pax5-Positivität ist erwartungsgemäß in der CLL am stärksten und nimmt über das LPL hin bis zu den plasmazellulär differenzierten Entitäten MM, EMP und EMM in denen sie nahezu fehlt, ab, während die mittlere Blimp1-Expressionsstärke von CLL über LPL zu MM ansteigt. Gutierrez et al. konnten dieses Expressionsmuster von Pax5 mit einem intermediären Expressionsniveau im LPL ebenfalls nachweisen. (*Gutierrez, Ocio et al. 2007*)

In der Literatur wird immer wieder die gegenseitige Regulation von Pax5 und Blimp1 betont. (*Mora-Lopez, Reales et al. 2007; Tate, Hirayama-Ohashi et al. 2007*) Zu dieser Theorie passen unsere gegenläufigen Expressionsstärken von Blimp1 und Pax5.

Neben der Suppression von Pax5 ist auch eine Unterdrückung von Bcl-6 für die Plasmazelldifferenzierung notwendig. In der Literatur wird der Verlust von Bcl-6

und demzufolge des B-Lymphozyten Genexpressionsprogramms bei gleichzeitigem Anstieg von Blimp1 beschrieben. (Fairfax, Kallies et al. 2008) Welcher Faktor dabei die Initiierung des Prozesses verursacht, ist ungeklärt. Laut Literatur wird von einem Verlust von Pax5 als Startfaktor darauffolgender Änderungen im Regulationskreislauf ausgegangen. (Mora-Lopez, Reales et al. 2007; Fairfax, Kallies et al. 2008)

In das Gesamtbild passend und mit den Daten der Literatur übereinstimmend ist unsere Beobachtung, dass bei den Entitäten CLL, LPL und MM sowie EMP und EMM bei durchgängiger Blimp1-Positivität keine Bcl-6-Expression nachweisbar ist.

Bei den plasmazellulär differenzierten Tumoren EMP und EMM findet sich entgegen unserer Erwartungen die Expression von Blimp1 nur in 70 % bzw. 63 %.

Beim EMM nehmen dabei sowohl die Positivität als auch die Intensität von MM zu EMM ab. Dies ist möglicherweise durch eine partielle Dedifferenzierung der neoplastischen Zellen des EMM sowie zusätzliche, bisher nicht untersuchte, Mutationen, Deletionen oder Trunkationen am Blimp1-Gen bzw. Amplifikationen des Genlocus von Bcl-6 oder Bcl-2, Blimp1-regulierende Proteine, wie sie auch bei ABC-DLBCL nachgewiesen werden konnten, zu erklären. (Mandelbaum, Bhagat et al. 2010)

Warum Blimp1 allerdings in EMP schwächer nachweisbar ist, bleibt offen. Erwartungsgemäß müsste Blimp1 hier in allen Fällen stark positiv sein. Als Erklärungsmöglichkeiten könnten Fehler in der Plasmazelldifferenzierung durch den neoplastischen Prozess herangezogen werden.

BLNK ist ein Protein, das vor allem in Zellen der B-Zelllinie nachweisbar ist. (Fu, Turck et al. 1998) Es dient als Adaptorprotein für die Signalwege des BZR und hat somit eine wichtige Funktion in der B-Zell-Biologie. (Chiu, Dalton et al. 2002)

In verschiedenen Studien konnte BLNK als wichtiger Tumorsuppressor identifiziert werden. So wiesen Gupta et al. den Zusammenhang zwischen der Expression von Rel-Oncoproteinen und einer Suppression von BLNK nach, die zu einer malignen Transformation von Lymphozyten führt. (Gupta, Delrow et al.

2008) Nakayama et al. und Jumaa et al. bestätigten die Tumor-supprimierende Wirkung von BLNK im Rahmen von Untersuchungen der prä-B-Zell-Leukämie. BLNK-defiziente Mäuse entwickeln spontan prä-B-Zell-Leukämien und die Tumorzellen von Kindern mit prä-B-Zell-Leukämie zeigen häufig einen BLNK-Verlust. (Jumaa, Bossaller et al. 2003; Nakayama, Yamamoto et al. 2009) Darüber hinaus ist aus der Literatur ebenfalls eine Suppression von BLNK bei DLBCL und M.Hodgkin bekannt. (Gupta, Delrow et al. 2008)

Es stellt sich also die Frage, ob in den von uns untersuchten NHL-Entitäten ebenfalls BLNK-Dysregulationen oder -Verluste nachweisbar und an der Pathologie der Erkrankung beteiligt sind.

Unsere Ergebnisse zeigen eine deutliche Positivität von BLNK in allen untersuchten NHL-Entitäten. Damit ist ein vollständiger BLNK-Verlust als eine der Ursachen ihrer Pathogenese auszuschließen.

Mit 44 % positiven Fällen und der schwächsten Färbeintensität von 1 haben wir in der CLL die geringste BLNK-Expression nachgewiesen. Die Färbeintensität steigt über das LPL zum MM deutlich an.

In der Literatur wird BLNK als Marker früher B-Lymphozyten beschrieben, der während der plasmazellulären Differenzierung supprimiert wird und dessen Transkription von Pax5 abhängig ist. (Schebesta, Pfeffer et al. 2002; Gutierrez, Ocio et al. 2007) Dies müsste sich in einer gleichgerichteten Expressionsintensität von Pax5 und BLNK widerspiegeln.

Unsere Ergebnisse zeigen dagegen einen signifikanten BLNK-Intensitätsanstieg mit plasmazellulärer Differenzierung der B-Zellen bis hin zu einer starken BLNK-Expression in Plasmazellen. Damit weisen unsere Ergebnisse entgegen der genannten Studien keine Gleichläufigkeit der Pax5- und BLNK-Expression nach.

Gutierrez et al. beschreiben beim LPL trotz der begonnenen plasmazellulären Differenzierung eine verminderte Pax5-Repression. So kann beim LPL die Pax5-abhängige Induktion von CD79, BLNK und Syk begründet werden, die zu einer verstärkten BLNK-Expression in den lymphoplasmozytischen Zellen führt. (Gutierrez, Ocio et al. 2007) Dies erklärt jedoch nicht unsere signifikant höheren BLNK-Werte beim LPL im Vergleich zur CLL.

Bei MM, EMP und EMM fanden wir keine Pax5-Expression und konnten trotzdem eine Expression von BLNK nachweisen, die sogar deutlich stärker ausfiel, als in der Pax5-positiven CLL.

Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse ist, dass BLNK in Abwesenheit von Pax5 unabhängig von Pax5 exprimiert wird. Dieses Modell könnte auch die intermediäre BLNK-Expression beim LPL besser erklären als der zuvor beschriebene Ansatz.

Die in der Literatur aufgezeigte BLNK-Suppression bei zunehmender Differenzierung der B-Zellen trifft damit in unserem Kollektiv nicht zu.

Die meisten Untersuchungen bezüglich der BLNK-Expression der B-Zelllinie erfolgten an sehr frühen B-Zellen im pro- und prä-B-Lymphozyten-Stadium und die Ergebnisse sind deshalb nicht ohne Weiteres auf unsere Arbeit übertragbar. Dies könnte die gegensätzlichen Resultate unserer Untersuchungen begründen.

Unsere Ergebnisse zeigen eine Korrelation sowohl bezüglich der Positivität als auch der Färbeintensität von Blimp1 und BLNK. Die Expression beider steigt mit plasmazellulärer Differenzierung an. Jedoch finden sich in der Literatur, anders als bei APRIL und CD27, keine Hinweise auf eine gegenseitige Regulation dieser Proteine. Eine solche Regulation ist jedoch nicht auszuschließen und müsste gegebenenfalls überprüft werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Blimp1 bei LPL in einer mittleren Intensität exprimiert wird, was die Einordnung des LPL als eine Postkeimzentrums-, zum Teil plasmazellulär differenzierte Entität unterstreicht. Die unerwartet niedrigeren Positivitätsraten von Blimp1 bei MM, EMP und EMM werden im Rahmen der neoplastischen Transformation und durch Zugewinn von Deletion, Mutation und Missensmutationen beziehungsweise chromosomalen Alterationen erklärt. Hier verweisen wir auf die Arbeiten von Mandelbaum, Lossos und Shapiro-Shelef. (*Shapiro-Shelef, Lin et al. 2003; Lossos 2010; Mandelbaum, Bhagat et al. 2010*)

Wir fanden eine Korrelation von Blimp1 und BLNK, für deren gegenseitige Regulation es jedoch keine Hinweise gibt.

Die BLNK-Expression steigt damit ebenso wie die Blimp1-Expression bei plasmazellulärer Differenzierung an. Daraus ergibt sich die Annahme, dass BLNK in Plasmazellen unabhängig von Pax5 exprimiert wird.

### 5.2.3. Diagnostische Einsetzbarkeit der Antikörper

Die Abgrenzung des LPL zu seinen Differenzialdiagnosen ist schwierig. Dies ist durch das Fehlen pathognomonischer klinischer Parameter und morphologischer Kennzeichen begründet. (*Owen, Barrans et al. 2001; Vijay and Gertz 2007*)

Auch der Immunphänotyp etablierter diagnostischer Marker ist nach unseren Ergebnissen nicht krankheitsspezifisch.

Hilfreich wären daher neue Marker, mit deren Zuhilfenahme die Diagnosefindung erleichtert wird oder welche eventuell sogar krankheitsspezifische Ergebnisse liefern, so dass auf dieser Basis die bisher durchgeführte Diagnostik ergänzt werden könnte.

Unter diesem Aspekt der diagnostischen Einsetzbarkeit haben wir die von uns untersuchten Proteine APRIL, CD27, Blimp1 und BLNK mit einer Diskriminanzanalyse überprüft.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Expressionsmuster der vier Proteine ausschließlich bei der Abgrenzung von CLL sowie MM von den anderen untersuchten Krankheitsentitäten behilflich ist.

Diagnostische Marker sind besonders wertvoll und sicher einsetzbar, wenn sie Untersucher-unabhängig verlässliche Ergebnisse liefern, welche deutlich zwischen verschiedenen Differenzialdiagnosen diskriminieren.

Gerade hier lassen sich jedoch Schwächen bei der immunhistochemischen Untersuchung von APRIL, CD27, Blimp1 und BLNK erkennen. Während die Ergebnisse Aufschluss über verschiedene biologische Mechanismen des Krankheitsgeschehens geben, sind sie jedoch auf Grund der geringen Ergebnisunterschiede zwischen den Differenzialdiagnosen sowie der Notwendigkeit einer Beurteilung der Färbeintensität, welche nicht ohne

Weiteres Untersucher-unabhängig reproduzierbar ist, als diagnostische Marker nur sehr eingeschränkt einsetzbar.

Die Beurteilung des Expressionsmusters von APRIL, CD27, Blimp1 und BLNK kann ausschließlich als Zusatzkriterium im Zusammenhang mit weiteren etablierten Diagnostikmethoden in ausgewählten Fällen eine Hilfe für die Diagnosefindung darstellen.

### 5.3. Ausblick

Das LPL wurde vor etwa 70 Jahren erstmals beschrieben und seitdem konnten viele Erkenntnisse über die Krankheitsentität gewonnen werden.

Genaue pathologische und diagnostische Kriterien wurden im Rahmen des „International Workshop on Waldenström’s Macroglobulinemia“ definiert, jedoch bleibt die Diagnosestellung noch immer eine Herausforderung.

Um die diffizile Diagnostik zu erleichtern, wären neue diagnostische Mittel wünschenswert. Solche hilfreichen diagnostischen Marker oder Untersuchungsmethoden sind jedoch derzeit nicht in Aussicht. Bis auf Weiteres wird sich daher keine Änderung an der zurzeit notwendigen Standarddiagnostik ergeben.

Neue Erkenntnisse über die biologischen Mechanismen der Erkrankung liefern gleichzeitig die Hoffnung auf effektivere Behandlungsansätze. Therapiekonzepte, die zum Teil in den Regulationskreislauf der von uns untersuchten Proteine eingreifen, befinden sich in Erprobung. Zielgerichtete Antikörper-Therapien, wie mit dem schon erfolgreich eingesetzten Rituximab, scheinen dabei eine vielversprechende Option zu sein. So werden derzeit unter anderem Studien zur Erprobung einer gezielten Antikörper-Blockierung von APRIL und BAFF, CD40L sowie der CD27-CD70-Interaktion durchgeführt.

Die fördernde Wirkung von APRIL und BAFF auf die Tumorprogression, führte zu der Annahme, dass ihre Blockierung eine neue Therapiestrategie darstellen könnte. Eine solche zielgerichtete Blockierung von APRIL und BAFF ist mit TACI-Ig, auch als Atacicept bezeichnet, möglich. Diese Antikörpertherapie wird sowohl in klinischen Studien zur Behandlung von Autoimmun- als auch

Krebserkrankungen erprobt. Eine Phase-1-Studie mit Atacicept in der Behandlung von refraktären MM und LPL zeigt derzeit vielversprechende Ergebnisse. (*Rossi, Moreaux et al. 2009*)

Die Mastzellen in der Knochenmarksumgebung des LPL-Infiltrates stimulieren die Tumorprogression darüber hinaus durch die Expression von CD40L. Mit dem rekombinanten Protein CD40:Fc kann der CD154-CD40-Signalweg blockiert werden. Dies wird in rezenten Studien an Zelllinien von LPL-Patienten erprobt. (*Tournilhac, Santos et al. 2006*)

Ho et al. konnten nachweisen, dass eine Blockierung von CD70, dem Rezeptor von CD27, mit dem Antikörper SGN-70 die über CD27 vermittelte Induktion von CD40L und APRIL unterdrückt. So kommt es zu einer geringeren Expression von CD40L und APRIL, welche auf diese Weise nicht als Überlebenssignale für die LPL-Zellen zur Verfügung stehen. Eine solche medikamentöse Blockierung der CD27-CD70-Interaktion wird im Mausmodell bereits getestet und erzielt einen Stop der Krankheitsprogression. (*Ho, Hatjiharissi et al. 2008*) Dies stellt damit eine attraktive Therapieoption für die Zukunft dar, wobei die Übertragung auf den Menschen noch schwierig bleibt, da der Erhalt eines funktionsfähigen Immunsystems dabei gewährleistet sein muss. (*Borst, Hendriks et al. 2005*)

Zusammenfassend besteht also die Annahme und berechtigte Hoffnung, dass sich in den nächsten Jahren deutliche Neuerungen und damit verbundene Verbesserungen in der Therapie des LPL ergeben könnten.

## 6. Zusammenfassung

Das LPL ist eine seltene Erkrankung, die zu den niedrig malignen NHL gehört. Die neoplastischen Zellen sind B-Zellen verschiedener Reifestadien, von reifen B-Lymphozyten über lymphoplasmozytische Zellen bis hin zu Plasmazellen. Zu den klassischen Befunden des LPL gehört der Nachweis eines monoklonalen IgM-Proteins, wobei das LPL in einigen Fällen auch in einer nicht-sezernierenden Form oder mit monoklonalem IgG- sowie IgA-Protein auftreten kann. Diagnostisch entscheidend sind darüber hinaus vermehrte Mastzellen in der Umgebung des Tumorfiltrates.

Risikofaktoren für die Entwicklung eines LPL sind eine vorbestehende IgM-MGUS, Autoimmunerkrankungen, Immundefizienz oder auch chronische Antigenstimulation. Außerdem zeigt sich eine deutliche familiäre Häufung der Erkrankung, wobei das familiäre LPL früher auftritt und aggressiver verläuft. In einer großen Zahl der Fälle besteht ein Zusammenhang mit genetischen Aberrationen, wie del6q21-25 oder t(9;14)(p13;q32).

Das LPL verläuft lange Zeit asymptomatisch. Die häufigsten Symptome sind Leistungsminderung und Anämie, im Verlauf kann es weiterhin zu einem Hyperviskositätssyndrom, einer Neuropathie oder Osteoporose kommen. Erst symptomatische Patienten werden mittels Chemotherapie behandelt, wobei das LPL derzeit nicht heilbar ist und das mittlere Überleben zwischen fünf und zehn Jahren liegt.

Da für das LPL keine spezifischen pathognomonischen klinischen, morphologischen, immunphänotypischen oder genetischen Eigenschaften bekannt sind, ist die Abgrenzung des LPL zu anderen B-NHL, insbesondere CLL, MZL und lymphoplasmozytischem MM häufig diffizil. Unser LPL-Kollektiv sollte daher in Abgrenzung zur CLL und den Plasmazellneoplasien MM, EMP und EMM immunhistochemisch untersucht werden. Die von uns durchgeführten Untersuchungen ergaben, weitestgehend im Konsens mit entsprechender Datenlage rezenter Studien, einen Immunphänotyp des LPL bestehend aus einer Positivität von CD20, Pax5 und CD25, entweder einer Positivität oder Negativität von CD23, CD138 und Mum1 sowie einer Negativität von CD5, p53 und Bcl-6. Damit konnten wir keinen einheitlichen krankheitsspezifischen

Immunphänotyp des LPL finden. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass entgegen einiger Angaben in der Literatur eine CD23- oder CD138-Positivität die Diagnose LPL nicht ausschließt.

Weiterhin führten wir immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen APRIL, CD27, Blimp1 und BLNK durch. Dies sind in rezenten Studien beschriebene Proteine der B-Zell-Differenzierung und -Homöostase, deren Dysregulation möglicherweise in Zusammenhang mit der Entwicklung des LPL steht. Dabei konnten wir eine starke APRIL-Positivität bei LPL nachweisen. APRIL wird von den Mastzellen der Tumorumgebung sezerniert und hat eine tumorstimulierende Wirkung. Damit ist das Knochenmark-Microenvironment scheinbar entscheidend an der Pathogenese des LPL beteiligt. Die LPL-Zellen exprimieren CD27 und sCD27. Unsere Ergebnisse zeigen eine Korrelation zwischen der Expressionsstärke von CD27 und APRIL. Dabei scheint sCD27 die APRIL-Produktion der Mastzellen zu stimulieren, was auf ein Modell einer Selbstinduktion der Tumorzellen schließen lässt. Unsere Ergebnisse der Blimp1-Expression konnten die Einordnung des LPL als eine Postkeimzentrums- zum Teil plasmazellulär differenzierte Entität unterstreichen. Dabei zeigte sich eine Korrelation zwischen der Expression von Blimp1 und BLNK, was zu der Annahme führt, dass BLNK in Plasmazellen unabhängig von Pax5, einem wichtigen Protein der B-Zell-Identität, exprimiert wird. Dysregulationen der untersuchten Proteine APRIL, CD27, Blimp1 und BLNK scheinen damit die Pathogenese des LPL zu beeinflussen, ihr immunhistochemischer Nachweis ist in der Diagnostik jedoch nur eingeschränkt einsetzbar.

Aus neuen Kenntnissen über die biologischen Mechanismen des LPL ergibt sich die Hoffnung auf neue effektive Therapieansätze. Antikörpertherapien, die unter anderem in den Regulationskreis der Proteine APRIL und CD27 eingreifen, werden derzeit in Studien erprobt und liefern vielversprechende Ergebnisse.

## 7. Literaturnachweis

- (1997). "A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project." *Blood* 89(11): 3909-3918.
- Agematsu, K. (2000). "Memory B cells and CD27." *Histol Histopathol* 15(2): 573-576.
- Alexiou, C., Kau R. J., Dietzfelbinger, H., Kremer, M., Spiess, J. C., Schratzenstaller, B., Arnold, W. (1999). "Extramedullary plasmacytoma: tumor occurrence and therapeutic concepts." *Cancer* 85(11): 2305-2314.
- Angelin-Duclos, C., Cattoretti, G., Lin, K. I., Calame, K. (2000). "Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo." *J Immunol* 165(10): 5462-5471.
- Arens, R., Nolte, M. A., Tesselaar, K., Heemskerk, B., Reedquist, K. A., van Lier, R. A., van Oers, M. H. (2004). "Signaling through CD70 regulates B cell activation and IgG production." *J Immunol* 173(6): 3901-3908.
- Avet-Loiseau, H., Facon, T., Daviet, A., Godon, C., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Grosbois, B., Bataille, R. (1999). "14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. Intergrupe Francophone du Myelome." *Cancer Res* 59(18): 4546-4550.
- Bink, K., Haralambieva, E., Kremer, M., Ott, G., Beham-Schmid, C., de Leval, L., Peh, S. C., Laeng, H. R., Jutting, U., Hutzler, P., Quintanilla-Martinez, L., Fend, F. (2008). "Primary extramedullary plasmacytoma: similarities with and differences from multiple myeloma revealed by interphase cytogenetics." *Haematologica* 93(4): 623-626.
- Bojarska-Junak, A., Hus, I., Chocholska, S., Wasik-Szczepanek, E., Sieklucka, M., Dmoszynska, A., Rolinski, J. (2009). "BAFF and APRIL expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with biological and clinical features." *Leuk Res* 33(10): 1319-1327.
- Bonizzi, G. and Karin, M. (2004). "The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity." *Trends Immunol* 25(6): 280-288.
- Borst, J., Hendriks, J., Xiao, Y. (2005). "CD27 and CD70 in T cell and B cell activation." *Curr Opin Immunol* 17(3): 275-281.
- Bossen, C. and Schneider, P. (2006). "BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling." *Semin Immunol* 18(5): 263-275.

- Busslinger, M., Klix, N., Pfeffer, P., Graninger, P. G., Kozmik, Z. (1996). "Deregulation of PAX-5 by translocation of the Emu enhancer of the IgH locus adjacent to two alternative PAX-5 promoters in a diffuse large-cell lymphoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12): 6129-6134.
- Byrd, J. C., Stilgenbauer, S., Flinn, I. W. (2004). "Chronic lymphocytic leukemia." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 163-183.
- Calado, D. P., Zhang, B., Srinivasan, L., Sasaki, Y., Seagal, J., Unitt, C., Rodig, S., Kutok, J., Tarakhovsky, A., Schmidt-Suppran, M., Rajewsky, K. (2010). "Constitutive canonical NF-kappaB activation cooperates with disruption of BLIMP1 in the pathogenesis of activated B cell-like diffuse large cell lymphoma." *Cancer Cell* 18(6): 580-589.
- Cattoretti, G., Chang, C. C., Cechova, K., Zhang, J., Ye, B. H., Falini, B., Louie, D. C., Offit, K., Chaganti, R. S., Dalla-Favera, R. (1995). "BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells." *Blood* 86(1): 45-53.
- Chang, D. H., Angelin-Duclos, C., Calame, K. (2000). "BLIMP-1: trigger for differentiation of myeloid lineage." *Nat Immunol* 1(2): 169-176.
- Chang, H., Samiee, S., Li, D., Patterson, B., Chen, C. I., Stewart, A. K. (2004). "Analysis of IgH translocations, chromosome 13q14 and 17p13.1(p53) deletions by fluorescence in situ hybridization in Waldenstrom's macroglobulinemia: a single center study of 22 cases." *Leukemia* 18(6): 1160-1162.
- Chiu, C. W., Dalton, M., Ishiai, M., Kurosaki, T., Chan, A. C. (2002). "BLNK: molecular scaffolding through 'cis'-mediated organization of signaling proteins." *EMBO J* 21(23): 6461-6472.
- Chng, W. J., Schop, R. F., Price-Troska, T., Ghobrial, I., Kay, N., Jelinek, D. F., Gertz, M. A., Dispenzieri, A., Lacy, M., Kyle, R. A., Greipp, P. R., Tschumper, R., C., Fonseca, R., Bergsagel, P. L. (2006). "Gene-expression profiling of Waldenstrom macroglobulinemia reveals a phenotype more similar to chronic lymphocytic leukemia than multiple myeloma." *Blood* 108(8): 2755-2763.
- Chu, V. T., Enghard, P., Riemekasten, G., Berek, C. (2007). "In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells." *J Immunol* 179(9): 5947-5957.
- Ciccarelli, B. T., Yang, G., Hatjiharissi, E., Ioakimidis, L., Patterson, C. J., Manning, R. J., Xu, L., Liu, X., Tseng, H., Gong, P., Sun, J., Zhou, Y., Treon, S. P. (2009). "Soluble CD27 is a faithful marker of disease burden and is unaffected by the rituximab-induced IgM flare, as well as by plasmapheresis, in patients with Waldenstrom's macroglobulinemia." *Clin Lymphoma Myeloma* 9(1): 56-58.

- Daridon, C., Youinou, P., Pers, J. O. (2008). "BAFF, APRIL, TWE-PRIL: who's who?" *Autoimmun Rev* 7(4): 267-271.
- DeFranco, A. L. (1997). "The complexity of signaling pathways activated by the BCR." *Curr Opin Immunol* 9(3): 296-308.
- Dhodapkar, M. V., Jacobson, J. L., Gertz, M. A., Crowley, J. J., Barlogie, B. (2003). "Prognostic factors and response to fludarabine therapy in Waldenstrom's macroglobulinemia: an update of a US intergroup trial (SW0G S9003)." *Semin Oncol* 30(2): 220-225.
- Di Bernardo, M. C., Crowther-Swanepoel, D., Broderick, P., Webb, E., Sellick, G., Wild, R., Sullivan, K., Vijayakrishnan, J., Wang, Y., Pittman, A. M., Sunter, N., J., Hall, A. G., Dyer, M. J., Matutes, E., Dearden, C., Mainou-Fowler, T., Jackson, G. H., Summerfield, G., Harris, R. J., Pettitt, A. R., Hillmen, P., Allsup, D. J., Bailey, J. R., Pratt, G., Pepper, C., Fegan, C., Allan, J. M., Catovsky, D., Houlston, R. S. (2008). "A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia." *Nat Genet* 40(10): 1204-1210.
- Di Giovanni, S., Valentini, G., Carducci, P., Giallonardo, P. (1989). "Beta-2-microglobulin is a reliable tumor marker in chronic lymphocytic leukemia." *Acta Haematol* 81(4): 181-185.
- Dimopoulos, M. A., Gertz, M. A., Kastritis, E., Garcia-Sanz, R., Kimby, E. K., Leblond, V., Femand, J. P., Merlini, G., Morel, P., Morra, E., Ocio, E. M., Owen, R., Ghobrial, I. M., Seymour, J., Kyle, R. A., Treon, S. P. (2009). "Update on treatment recommendations from the Fourth International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia." *J Clin Oncol* 27(1): 120-126.
- Dimopoulos, M. A., Kyle, R. A., Anagnostopoulos, A., Treon, S. P. (2005). "Diagnosis and management of Waldenstrom's macroglobulinemia." *J Clin Oncol* 23(7): 1564-1577.
- DiSanto, J. P., Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F., Fischer, A., de Saint Basile, G. (1993). "CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM." *Nature* 361(6412): 541-543.
- Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Dohner, K., Bentz, M., Lichter, P. (2000). "Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia." *N Engl J Med* 343(26): 1910-1916.
- Elsawa, S. F., Novak, A. J., Grote, D. M., Ziesmer, S. C., Witzig, T. E., Kyle, R. A., Dillon, S. R., Harder, B., Gross, J. A., Ansell, S. M. (2006). "B-lymphocyte stimulator (BLyS) stimulates immunoglobulin production and malignant B-cell growth in Waldenstrom macroglobulinemia." *Blood* 107(7): 2882-2888.

- Endo, T., Nishio, M.,ENZLER, T., Cottam, H. B., Fukuda, T., James, D. F., Karin, M., Kipps, T. J. (2007). "BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway." *Blood* 109(2): 703-710.
- Fairfax, K. A., Kallies, A., Nutt, S. L., Tarlinton, D. M. (2008). "Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches." *Semin Immunol* 20(1): 49-58.
- Fink, P. J. (2006). "T cells join the Blimp-1 brigade." *Nat Immunol* 7(5): 445-446.
- Fonseca, R., Blood, E., Rue, M., Harrington, D., Oken, M. M., Kyle, R. A., Dewald, G. W., Van Ness, B., Van Wier, S. A., Henderson, K. J., Bailey, R. J., Greipp, P. R. (2003). "Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma." *Blood* 101(11): 4569-4575.
- Font, J., Pallares, L., Martorell, J., Martinez, E., Gaya, A., Vives, J., Ingelmo, M. (1996). "Elevated soluble CD27 levels in serum of patients with systemic lupus erythematosus." *Clin Immunol Immunopathol* 81(3): 239-243.
- Foran, J. M., Rohatiner, A. Z., Cunningham, D., Popescu, R. A., Solal-Celigny, P., Ghielmini, M., Coiffier, B., Johnson, P. W., Gisselbrecht, C., Reyes, F., Radford, J. A., Bessell, E. M., Souleau, B., Benzohra, A., Lister, T. A. (2000). "European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma." *J Clin Oncol* 18(2): 317-324.
- Fu, C., Turck, C. W., Kurosaki, T., Chan, A. C. (1998). "BLNK: a central linker protein in B cell activation." *Immunity* 9(1): 93-103.
- Garcia-Sanz, R., Montoto, S., Torrequebrada, A., de Coca, A. G., Petit, J., Sureda, A., Rodriguez-Garcia, J. A., Masso, P., Perez-Aliaga, A., Monteagudo, M. D., Navarro, I., Moreno, G., Toledo, C., Alonso, A., Besses, C., Besalduch, J., Jarque, I., Salama, P., Rivas, J. A., Navarro, B., Blade, J., Miguel, J. F. (2001). "Waldenstrom macroglobulinaemia: presenting features and outcome in a series with 217 cases." *Br J Haematol* 115(3): 575-582.
- George, T. I., Wrede, J. E., Bangs, C. D., Cherry, A. M., Warnke, R. A., Arber, D. A. (2005). "Low-grade B-Cell lymphomas with plasmacytic differentiation lack PAX5 gene rearrangements." *J Mol Diagn* 7(3): 346-351.
- Gupta, N., Delrow, J., Drawid, A., Sengupta, A. M., Fan, G., Gelinas, C. (2008). "Repression of B-cell linker (BLNK) and B-cell adaptor for phosphoinositide 3-kinase (BCAP) is important for lymphocyte transformation by rel proteins." *Cancer Res* 68(3): 808-814.

- Gutierrez, N. C., Ocio, E. M., de Las Rivas, J., Maiso, P., Delgado, M., Ferminan, E., Arcos, M. J., Sanchez, M. L., Hernandez, J. M., San Miguel, J. F. (2007). "Gene expression profiling of B lymphocytes and plasma cells from Waldenstrom's macroglobulinemia: comparison with expression patterns of the same cell counterparts from chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and normal individuals." *Leukemia* 21(3): 541-549.
- Hahne, M., Kataoka, T., Schroter, M., Hofmann, K., Irmeler, M., Bodmer, J. L., Schneider, P., Bornand, T., Holler, N., French, L. E., Sordat, B., Rimoldi, D., Tschopp, J. (1998). "APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth." *J Exp Med* 188(6): 1185-1190.
- Haiat, S., Billard, C., Quiney, C., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Kolb, J. P. (2006). "Role of BAFF and APRIL in human B-cell chronic lymphocytic leukaemia." *Immunology* 118(3): 281-292.
- Hallek, M., Langenmayer, I., Nerl, C., Knauf, W., Dietzfelbinger, H., Adorf, D., Ostwald, M., Busch, R., Kuhn-Hallek, I., Thiel, E., Emmerich, B. (1999). "Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia." *Blood* 93(5): 1732-1737.
- Hallek, M., Wanders, L., Ostwald, M., Busch, R., Senekowitsch, R., Stern, S., Schick, H. D., Kuhn-Hallek, I., Emmerich, B. (1996). "Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma." *Leuk Lymphoma* 22(5-6): 439-447.
- Heerema-McKenney, A., Waldron, J., Hughes, S., Zhan, F., Sawyer, J., Barlogie, B., Shaughnessy, J. D., Jr. (2010). "Clinical, immunophenotypic, and genetic characterization of small lymphocyte-like plasma cell myeloma: a potential mimic of mature B-cell lymphoma." *Am J Clin Pathol* 133(2): 265-270.
- Ho, A. W., Hatjiharissi, E., Ciccarelli, B. T., Branagan, A. R., Hunter, Z. R., Leleu, X., Tournilhac, O., Xu, L., O'Connor, K., Manning, R. J., Santos, D. D., Chemaly, M., Patterson, C. J., Soumerai, J. D., Munshi, N. C., McEarchern, J. A., Law, C. L., Grewal, I. S., Treon, S. P. (2008). "CD27-CD70 interactions in the pathogenesis of Waldenstrom macroglobulinemia." *Blood* 112(12): 4683-4689.
- Horger, M., Brodoefel, H., Driessen, C. (2006). "[Extramedullary myeloma manifestations: imaging findings]." *Rofo* 178(8): 747-751.
- Hulkkonen, J., Vilpo, L., Hurme, M., Vilpo, J. (2002). "Surface antigen expression in chronic lymphocytic leukemia: clustering analysis, interrelationships and effects of chromosomal abnormalities." *Leukemia* 16(2): 178-185.

- Hunter, Z. R., Branagan, A. R., Manning, R., Patterson, C. J., Santos, D. D., Tournilhac, O., Dorfman, D. M., Treon, S. P. (2005). "CD5, CD10, and CD23 expression in Waldenstrom's macroglobulinemia." *Clin Lymphoma* 5(4): 246-249.
- Hussong, J. W., Perkins, S. L., Schnitzer, B., Hargreaves, H., Frizzera, G. (1999). "Extramedullary plasmacytoma. A form of marginal zone cell lymphoma?" *Am J Clin Pathol* 111(1): 111-116.
- Johnson, S. A., Birchall, J., Luckie, C., Oscier, D. G., Owen, R. G. (2006). "Guidelines on the management of Waldenstrom macroglobulinaemia." *Br J Haematol* 132(6): 683-697.
- Jumaa, H., Bossaller, L., Portugal, K., Storch, B., Lotz, M., Flemming, A., Schrappe, M., Postila, V., Riikonen, P., Pelkonen, J., Niemeyer, C. M., Reth, M. (2003). "Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B-cell acute lymphoblastic leukaemia." *Nature* 423(6938): 452-456.
- Kara, I. O., Sahin, B., Gunesacar, R. (2007). "Expression of soluble CD27 and interleukins-8 and -10 in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with disease stage and prognosis." *Adv Ther* 24(1): 29-40.
- Kay, N. E., Hamblin, T. J., Jelinek, D. F., Dewald, G. W., Byrd, J. C., Farag, S., Lucas, M., Lin, T. (2002). "Chronic lymphocytic leukemia." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 193-213.
- Keating, M. J. (1999). "Chronic lymphocytic leukemia." *Semin Oncol* 26(5 Suppl 14): 107-114.
- Kimby, E., Treon, S. P., Anagnostopoulos, A., Dimopoulos, M., Garcia-Sanz, R., Gertz, M. A., Johnson, S., LeBlond, V., Femand, J. P., Maloney, D. G., Merlini, G., Morel, P., Morra, E., Nichols, G., Ocio, E. M., Owen, R., Stone, M., Blade, J. (2006). "Update on recommendations for assessing response from the Third International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia." *Clin Lymphoma Myeloma* 6(5): 380-383.
- Kipps, T. J. (1989). "The CD5 B cell." *Adv Immunol* 47: 117-185.
- Kishimoto, T., Goyert, S., Kikutani, H., Mason, D., Miyasaka, M., Moretta, L., Ohno, T., Okumura, K., Shaw, S., Springer, T. A., Sugamura, K., Sugawara, H., von dem Borne, A. E., Zola, H. (1997). "CD antigens 1996." *Blood* 89(10): 3502.
- Konoplev, S., Medeiros, L. J., Bueso-Ramos, C. E., Jorgensen, J. L., Lin, P. (2005). "Immunophenotypic profile of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia." *Am J Clin Pathol* 124(3): 414-420.
- Kremer, M., Ott, G., Nathrath, M., Specht, K., Stecker, K., Alexiou, C., Quintanilla-Martinez, L., Fend, F. (2005). "Primary extramedullary plasmacytoma and

- multiple myeloma: phenotypic differences revealed by immunohistochemical analysis." *J Pathol* 205(1): 92-101.
- Kyle, R. A., Treon, S. P., Alexanian, R., Barlogie, B., Bjorkholm, M., Dhodapkar, M., Lister, T. A., Merlini, G., Morel, P., Stone, M., Branagan, A. R., Leblond, V. (2003). "Prognostic markers and criteria to initiate therapy in Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia." *Semin Oncol* 30(2): 116-120.
- Laabi, Y., Gras, M. P., Carbonnel, F., Brouet, J. C., Berger, R., Larsen, C. J., Tsapis, A. (1992). "A new gene, BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by a t(4;16)(q26;p13) translocation in a malignant T cell lymphoma." *EMBO J* 11(11): 3897-3904.
- Levine, T., Pestronk, A., Florence, J., Al-Lozi, M. T., Lopate, G., Miller, T., Ramneantu, I., Waheed, W., Stambuk, M., Stone, M. J., Choksi, R. (2006). "Peripheral neuropathies in Waldenstrom's macroglobulinaemia." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77(2): 224-228.
- Lin, P. and Medeiros, L. J. (2005). "Lymphoplasmacytic lymphoma/waldenstrom macroglobulinemia: an evolving concept." *Adv Anat Pathol* 12(5): 246-255.
- Liu, E. B., Zhang, P. H., Li, Z. Q., Sun, Q., Yang, Q. Y., Fang, L. H., Sun, F. J., Qiu, L. G. (2010). "[Clinicopathologic features of lymphoplasmacytic lymphoma]." *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 39(5): 308-312.
- Lossos, I. S. (2010). "BLIMP1 against lymphoma: The verdict is reached." *Cancer Cell* 18(6): 537-539.
- Mackay, F. and Tangye, S. G. (2004). "The role of the BAFF/APRIL system in B cell homeostasis and lymphoid cancers." *Curr Opin Pharmacol* 4(4): 347-354.
- Mandelbaum, J., Bhagat, G., Tang, H., Mo, T., Brahmachary, M., Shen, Q., Chadburn, A., Rajewsky, K., Tarakhovsky, A., Pasqualucci, L., Dalla-Favera, R. (2010). "BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma." *Cancer Cell* 18(6): 568-579.
- Merlini, G., Baldini, L., Brogna, C., Comelli, M., Goldaniga, M., Palladini, G., Deliliers, G. L., Gobbi, P. G. (2003). "Prognostic factors in symptomatic Waldenstrom's macroglobulinemia." *Semin Oncol* 30(2): 211-215.
- Minegishi, Y., Rohrer, J., Coustan-Smith, E., Lederman, H. M., Pappu, R., Campana, D., Chan, A. C., Conley, M. E. (1999). "An essential role for BLNK in human B cell development." *Science* 286(5446): 1954-1957.

- Mock, B. A., Liu, L., LePaslier, D., Huang, S. (1996). "The B-lymphocyte maturation promoting transcription factor BLIMP1/PRDI-BF1 maps to D6S447 on human chromosome 6q21-q22.1 and the syntenic region of mouse chromosome 10." *Genomics* 37(1): 24-28.
- Mora-Lopez, F., Reales, E., Brieva, J. A., Campos-Caro, A. (2007). "Human BSAP and BLIMP1 conform an autoregulatory feedback loop." *Blood* 110(9): 3150-3157.
- Moreau, P., Robillard, N., Jago, G., Pellat, C., Le Gouill, S., Thoumi, S., Avet-Loiseau, H., Harousseau, J. L., Bataille, R. (2006). "Lack of CD27 in myeloma delineates different presentation and outcome." *Br J Haematol* 132(2): 168-170.
- Moreaux, J., Cremer, F. W., Reme, T., Raab, M., Mahtouk, K., Kaukel, P., Pantesco, V., De Vos, J., Jourdan, E., Jauch, A., Legouffe, E., Moos, M., Fiol, G., Goldschmidt, H., Rossi, J. F., Hose, D., Klein, B. (2005). "The level of TACI gene expression in myeloma cells is associated with a signature of microenvironment dependence versus a plasmablastic signature." *Blood* 106(3): 1021-1030.
- Moreaux, J., Legouffe, E., Jourdan, E., Quittet, P., Reme, T., Lugagne, C., Moine, P., Rossi, J. F., Klein, B., Tarte, K. (2004). "BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone." *Blood* 103(8): 3148-3157.
- Moreaux, J., Sprynski, A. C., Dillon, S. R., Mahtouk, K., Jourdan, M., Ythier, A., Moine, P., Robert, N., Jourdan, E., Rossi, J. F., Klein, B. (2009). "APRIL and TACI interact with syndecan-1 on the surface of multiple myeloma cells to form an essential survival loop." *Eur J Haematol* 83(2): 119-129.
- Nakayama, J., Yamamoto, M., Hayashi, K., Satoh, H., Bundo, K., Kubo, M., Goitsuka, R., Farrar, M. A., Kitamura, D. (2009). "BLNK suppresses pre-B-cell leukemogenesis through inhibition of JAK3." *Blood* 113(7): 1483-1492.
- Nishio, M., Endo, T., Tsukada, N., Ohata, J., Kitada, S., Reed, J. C., Zvaifler, N. J., Kipps, T. J. (2005). "Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha." *Blood* 106(3): 1012-1020.
- Ocio, E. M., Hernandez, J. M., Mateo, G., Sanchez, M. L., Gonzalez, B., Vidriales, B., Gutierrez, N. C., Orfao, A., San Miguel, J. F. (2005). "Immunophenotypic and cytogenetic comparison of Waldenstrom's macroglobulinemia with splenic marginal zone lymphoma." *Clin Lymphoma* 5(4): 241-245.
- Owen, R. G., Barrans, S. L., Richards, S. J., O'Connor, S. J., Child, J. A., Parapia, L. A., Morgan, G. J., Jack, A. S. (2001). "Waldenstrom

- macroglobulinemia. Development of diagnostic criteria and identification of prognostic factors." *Am J Clin Pathol* 116(3): 420-428.
- Owen, R. G., Treon, S. P., Al-Katib, A., Fonseca, R., Greipp, P. R., McMaster, M. L., Morra, E., Pangalis, G. A., San Miguel, J. F., Branagan, A. R., Dimopoulos, M. A. (2003). "Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia." *Semin Oncol* 30(2): 110-115.
- Papamichael, D., Norton, A. J., Foran, J. M., Mulatero, C., Mathews, J., Amess, J. A., Bradburn, M., Lister, T. A., Rohatiner, A. Z. (1999). "Immunocytoma: a retrospective analysis from St Bartholomew's Hospital-1972 to 1996." *J Clin Oncol* 17(9): 2847-2853.
- Pasqualucci, L., Compagno, M., Houldsworth, J., Monti, S., Grunn, A., Nandula, S. V., Aster, J. C., Murty, V. V., Shipp, M. A., Dalla-Favera, R. (2006). "Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma." *J Exp Med* 203(2): 311-317.
- Planelles, L., Carvalho-Pinto, C. E., Hardenberg, G., Smaniotto, S., Savino, W., Gomez-Caro, R., Alvarez-Mon, M., de Jong, J., Eldering, E., Martinez, A. C., Medema, J. P., Hahne, M. (2004). "APRIL promotes B-1 cell-associated neoplasm." *Cancer Cell* 6(4): 399-408.
- Planelles, L., Castillo-Gutierrez, S., Medema, J. P., Morales-Luque, A., Merle-Beral, H., Hahne, M. (2007). "APRIL but not BlyS serum levels are increased in chronic lymphocytic leukemia: prognostic relevance of APRIL for survival." *Haematologica* 92(9): 1284-1285.
- Planelles, L., Medema, J. P., Hahne, M., Hardenberg, G. (2008). "The expanding role of APRIL in cancer and immunity." *Curr Mol Med* 8(8): 829-844.
- Prasad, K. V., Ao, Z., Yoon, Y., Wu, M. X., Rizk, M., Jacquot, S., Schlossman, S. F. (1997). "CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(12): 6346-6351.
- Ramakrishnan, P., Wang, W., Wallach, D. (2004). "Receptor-specific signaling for both the alternative and the canonical NF-kappaB activation pathways by NF-kappaB-inducing kinase." *Immunity* 21(4): 477-489.
- Ranheim, E. A., Cantwell, M. J., Kipps, T. J. (1995). "Expression of CD27 and its ligand, CD70, on chronic lymphocytic leukemia B cells." *Blood* 85(12): 3556-3565.
- Rawstron, A. C., Orfao, A., Beksac, M., Bezdickova, L., Brooimans, R. A., Bumbea, H., Dalva, K., Fuhler, G., Gratama, J., Hose, D., Kovarova, L., Lioznov, M., Mateo, G., Morilla, R., Mylin, A. K., Omede, P., Pellat-

- Deceunynck, C., Perez Andres, M., Petrucci, M., Ruggeri, M., Rymkiewicz, G., Schmitz, A., Schreder, M., Seynaeve, C., Spacek, M., de Tute, R. M., Van Valckenborgh, E., Weston-Bell, N., Owen, R. G., San Miguel, J. F., Sonneveld, P., Johnsen, H. E. (2008). "Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders." *Haematologica* 93(3): 431-438.
- Regitnig, P., Reiner, A., Dinges, H. P., Hofler, G., Muller-Holzner, E., Lax, S. F., Obrist, P., Rudas, M., Quehenberger, F. (2002). "Quality assurance for detection of estrogen and progesterone receptors by immunohistochemistry in Austrian pathology laboratories." *Virchows Arch* 441(4): 328-334.
- Richards, J. D., Gold, M. R., Hourihane, S. L., DeFranco, A. L., Matsuuchi, L. (1996). "Reconstitution of B cell antigen receptor-induced signaling events in a nonlymphoid cell line by expressing the Syk protein-tyrosine kinase." *J Biol Chem* 271(11): 6458-6466.
- Roschke, V., Sosnovtseva, S., Ward, C. D., Hong, J. S., Smith, R., Albert, V., Stohl, W., Baker, K. P., Ullrich, S., Nardelli, B., Hilbert, D. M., Migone, T. S. (2002). "BLyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases." *J Immunol* 169(8): 4314-4321.
- Rosinol, L., Cibeira, M. T., Blade, J., Esteve, J., Aymerich, M., Rozman, M., Segarra, M., Cid, M. C., Filella, X., Montserrat, E. (2004). "Extramedullary multiple myeloma escapes the effect of thalidomide." *Haematologica* 89(7): 832-836.
- Rossi, J. F., Moreaux, J., Hose, D., Requirand, G., Rose, M., Rouille, V., Nestorov, I., Mordenti, G., Goldschmidt, H., Ythier, A., Klein, B. (2009). "Atacicept in relapsed/refractory multiple myeloma or active Waldenstrom's macroglobulinemia: a phase I study." *Br J Cancer* 101(7): 1051-1058.
- Sahota, S. S., Babbage, G., Weston-Bell, N. J. (2009). "CD27 in defining memory B-cell origins in Waldenstrom's macroglobulinemia." *Clin Lymphoma Myeloma* 9(1): 33-35.
- Schebesta, M., Pfeffer, P. L., Busslinger, M. (2002). "Control of pre-BCR signaling by Pax5-dependent activation of the BLNK gene." *Immunity* 17(4): 473-485.
- Schmidlin, H., Diehl, S. A., Nagasawa, M., Scheeren, F. A., Schotte, R., Uittenbogaart, C. H., Spits, H., Blom, B. (2008). "Spi-B inhibits human plasma cell differentiation by repressing BLIMP1 and XBP-1 expression." *Blood* 112(5): 1804-1812.
- Schneider, P. (2005). "The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation." *Curr Opin Immunol* 17(3): 282-289.

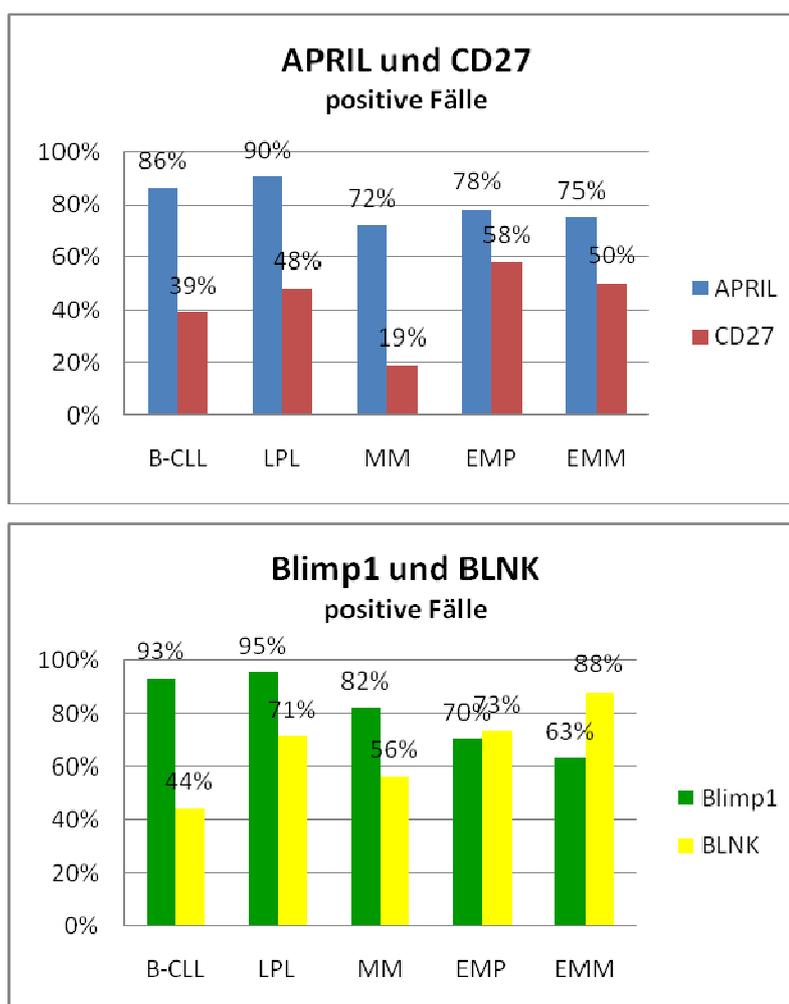
- Schop, R. F., Kuehl, W. M., Van Wier, S. A., Ahmann, G. J., Price-Troska, T., Bailey, R. J., Jalal, S. M., Qi, Y., Kyle, R. A., Greipp, P. R., Fonseca, R. (2002). "Waldenstrom macroglobulinemia neoplastic cells lack immunoglobulin heavy chain locus translocations but have frequent 6q deletions." *Blood* 100(8): 2996-3001.
- Schwaller, J., Schneider, P., Mhawech-Fauceglia, P., McKee, T., Myit, S., Matthes, T., Tschopp, J., Donze, O., Le Gal, F. A., Huard, B. (2007). "Neutrophil-derived APRIL concentrated in tumor lesions by proteoglycans correlates with human B-cell lymphoma aggressiveness." *Blood* 109(1): 331-338.
- Shaffer, A. L., Rosenwald, A., Staudt, L. M. (2002). "Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation." *Nat Rev Immunol* 2(12): 920-932.
- Shapiro-Shelef, M. and Calame, K. (2005). "Regulation of plasma-cell development." *Nat Rev Immunol* 5(3): 230-242.
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K. I., McHeyzer-Williams, L. J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M. G., Calame, K. (2003). "Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells." *Immunity* 19(4): 607-620.
- Shu, H. B., Hu, W. H., Johnson, H. (1999). "TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens." *J Leukoc Biol* 65(5): 680-683.
- Sprangers, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Jumaa, H., Siebert, R., Muschen, M. (2006). "SLP65 deficiency results in perpetual V(D)J recombinase activity in pre-B-lymphoblastic leukemia and B-cell lymphoma cells." *Oncogene* 25(37): 5180-5186.
- Staudt, V., Bothur, E., Klein, M., Lingnau, K., Reuter, S., Grebe, N., Gerlitzki, B., Hoffmann, M., Ulges, A., Taube, C., Dehzad, N., Becker, M., Stassen, M., Steinborn, A., Lohoff, M., Schild, H., Schmitt, E., Bopp, T. (2010). "Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells." *Immunity* 33(2): 192-202.
- Tak, P. P., Hintzen, R. Q., Teunissen, J. J., Smeets, T. J., Daha, M. R., van Lier, R. A., Kluin, P. M., Meinders, A. E., Swaak, A. J., Breedveld, F. C. (1996). "Expression of the activation antigen CD27 in rheumatoid arthritis." *Clin Immunol Immunopathol* 80(2): 129-138.
- Tate, G., Hirayama-Ohashi, Y., Kishimoto, K., Mitsuya, T. (2007). "Novel BLIMP1/PRDM1 gene mutations in B-cell lymphoma." *Cancer Genet Cytogenet* 172(2): 151-153.
- Toledo, F. and Wahl, G. M. (2006). "Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas." *Nat Rev Cancer* 6(12): 909-923.

- Tournilhac, O., Santos, D. D., Xu, L., Kutok, J., Tai, Y. T., Le Guill, S., Catley, L., Hunter, Z., Branagan, A. R., Boyce, J. A., Munshi, N., Anderson, K. C., Treon, S. P. (2006). "Mast cells in Waldenstrom's macroglobulinemia support lymphoplasmacytic cell growth through CD154/CD40 signaling." *Ann Oncol* 17(8): 1275-1282.
- Treon, S. P. (2009). "How I treat Waldenstrom macroglobulinemia." *Blood* 114(12): 2375-2385.
- Treon, S. P., Branagan, A. R., Hunter, Z., Santos, D., Tournilhac, O., Anderson, K. C. (2004). "Paradoxical increases in serum IgM and viscosity levels following rituximab in Waldenstrom's macroglobulinemia." *Ann Oncol* 15(10): 1481-1483.
- Treon, S. P., Hatjiharissi, E., Merlini, G. (2008). "Waldenstrom's macroglobulinemia/ lymphoplasmacytic lymphoma." *Cancer Treat Res* 142: 211-242.
- Treon, S. P., Hunter, Z. R., Aggarwal, A., Ewen, E. P., Masota, S., Lee, C., Santos, D. D., Hatjiharissi, E., Xu, L., Leleu, X., Tournilhac, O., Patterson, C. J., Manning, R., Branagan, A. R., Morton, C. C. (2006). "Characterization of familial Waldenstrom's macroglobulinemia." *Ann Oncol* 17(3): 488-494.
- Treon, S. P., Ioakimidis, L., Soumerai, J. D., Patterson, C. J., Sheehy, P., Nelson, M., Willen, M., Matous, J., Mattern, J., 2<sup>nd</sup>, Diener, J. G., Keogh, G. P., Myers, T. J., Boral, A., Birner, A., Esseltine, D. L., Ghobrial, I. M. (2009). "Primary therapy of Waldenstrom macroglobulinemia with bortezomib, dexamethasone, and rituximab: WMCTG clinical trial 05-180." *J Clin Oncol* 27(23): 3830-3835.
- Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C., Croce, C. M. (1984). "Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation." *Science* 226(4678): 1097-1099.
- Vijay, A. and Gertz, M. A. (2007). "Waldenstrom macroglobulinemia." *Blood* 109(12): 5096-5103.
- Vitolo, U., Ferreri, A. J., Montoto, S. (2008). "Lymphoplasmacytic lymphoma-Waldenstrom's macroglobulinemia." *Crit Rev Oncol Hematol* 67(2): 172-185.
- Walther, C., Guenet, J. L., Simon, D., Deutsch, U., Jostes, B., Goulding, M. D., Plachov, D., Balling, R., Gruss, P. (1991). "Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes." *Genomics* 11(2): 424-434.
- Xiao, Y., Hendriks, J., Langerak, P., Jacobs, H., Borst, J. (2004). "CD27 is acquired by primed B cells at the centroblast stage and promotes germinal center formation." *J Immunol* 172(12): 7432-7441.

## 8. Anhang

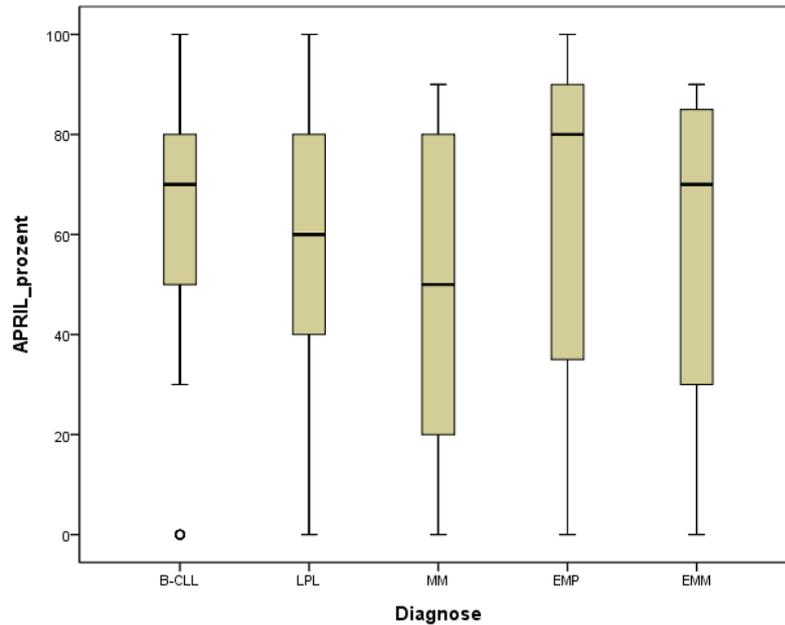
### 8.1. Graphische Darstellung der Ergebnisse

**Abbildung 11: Verteilung der positiven Fälle (%)**



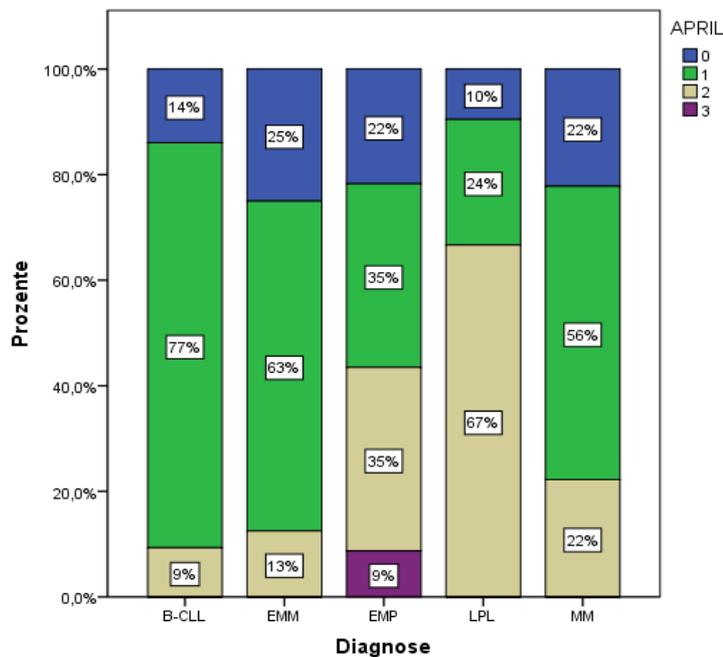
Die Diagramme zeigen den prozentualen Anteil positiver Fälle von APRIL und CD27 sowie Blimp1 und BLNK an der Gesamtzahl untersuchter Fälle der jeweiligen Krankheitsentität. Die Bewertung als positiv erfolgte bei einer im Rasterokkular nachgewiesenen Färbung von mindestens 20 % der Tumorzellen.

**Abbildung 12: Prozentuale Positivität von APRIL**

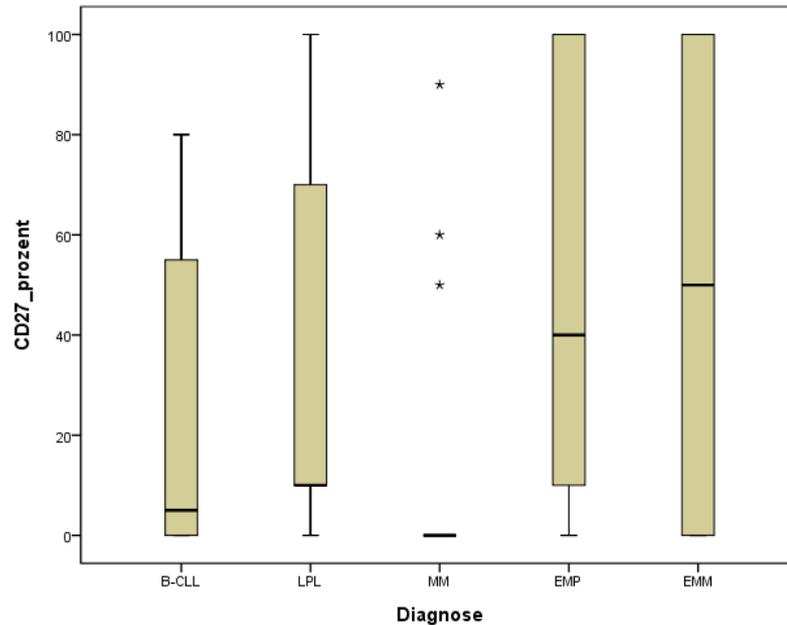


Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil der bei der Untersuchung mit dem Ak gegen APRIL positiv gefärbten Tumorzellen in den einzelnen Krankheitsentitäten. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und Spannweite.

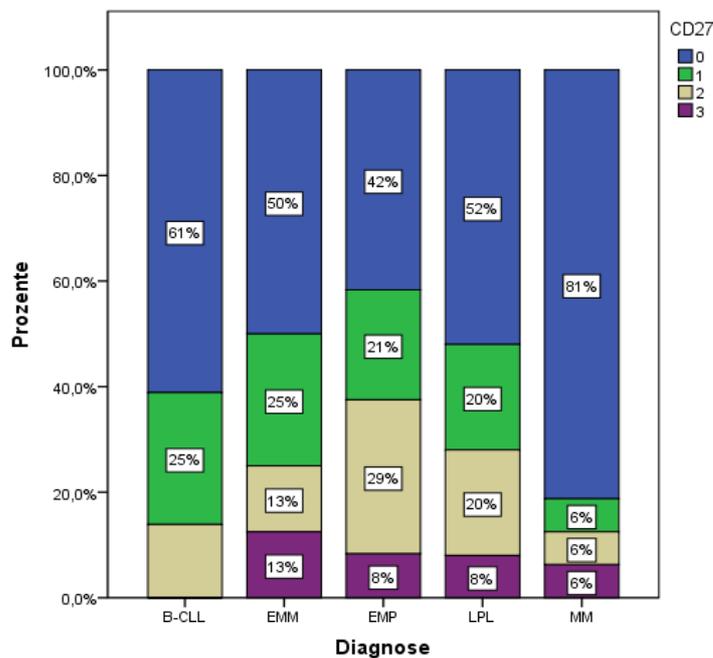
**Abbildung 13: Verteilung der Färbeintensität von APRIL**



Das Diagramm stellt die Verteilung der Färbeintensitäten in den einzelnen Krankheitsentitäten bei der Untersuchungen mit dem Ak gegen APRIL dar.

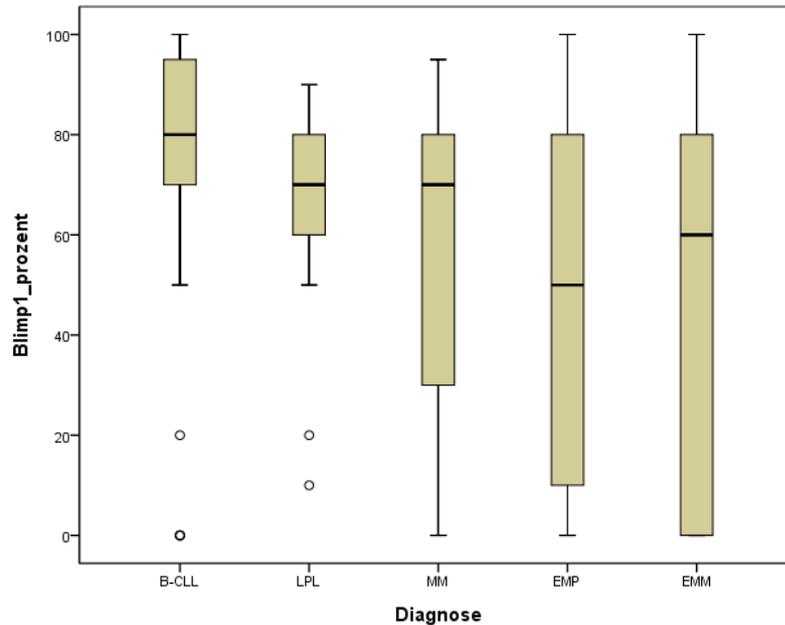
**Abbildung 14:** Prozentuale Positivität von CD27

Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil der bei der Untersuchung mit dem Ak gegen CD27 positiv gefärbten Tumorzellen in den einzelnen Krankheitsentitäten. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und Spannweite. Das MM zeigte sich bis auf die drei mit Sternen angegebenen Fälle CD27-negativ.

**Abbildung 15:** Verteilung der Färbeintensität von CD27

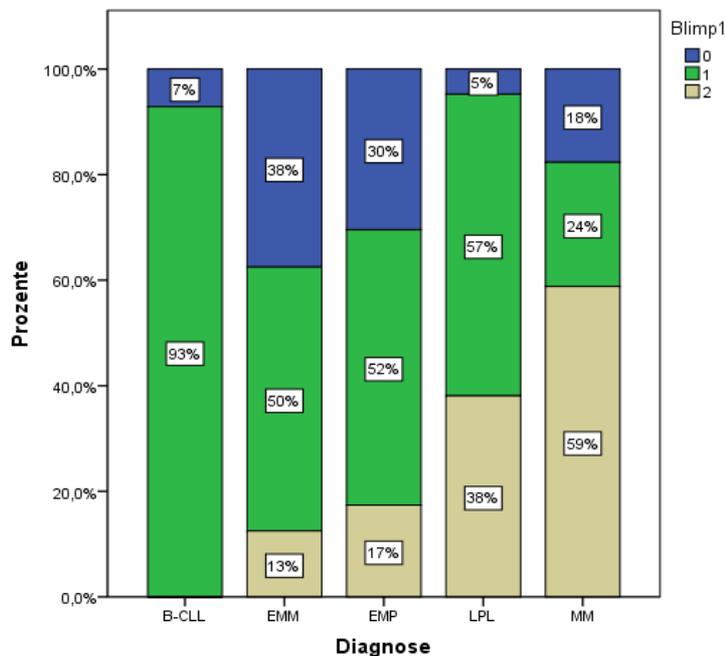
Das Diagramm stellt die Verteilung der Färbeintensitäten in den einzelnen Krankheitsentitäten bei der Untersuchungen mit dem Ak gegen CD27 dar.

**Abbildung 16:** Prozentuale Positivität von Blimp1

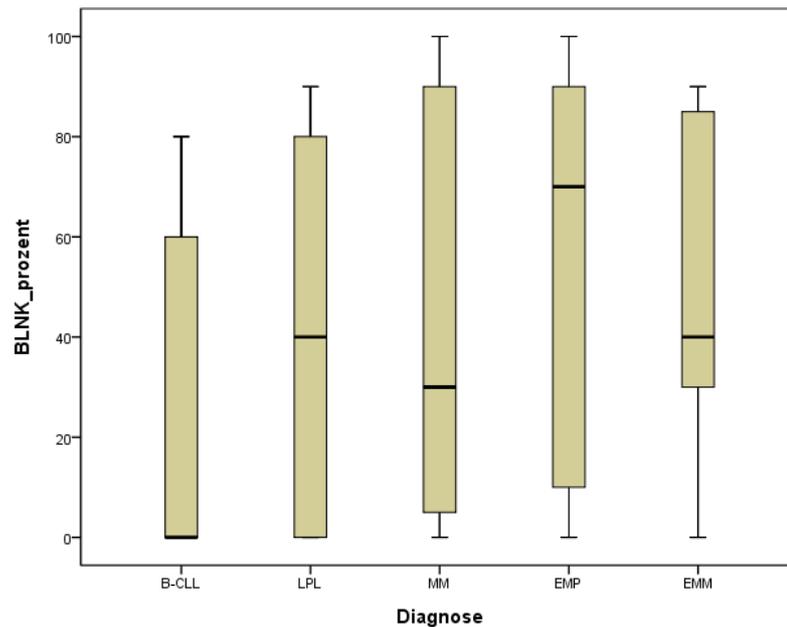


Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil der bei der Untersuchung mit dem Ak gegen Blimp1 positiv gefärbten Tumorzellen in den einzelnen Krankheitsentitäten. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und Spannweite.

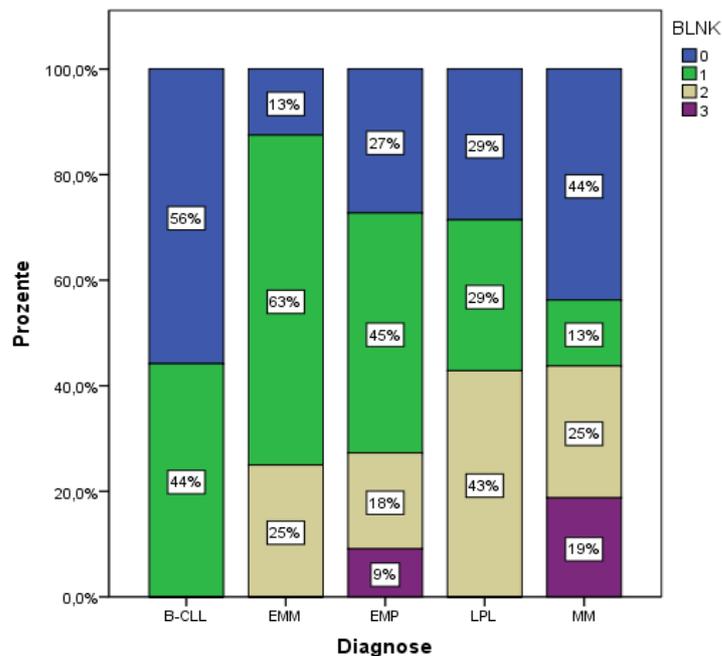
**Abbildung 17:** Verteilung der Färbeintensität von Blimp1



Das Diagramm stellt die Verteilung der Färbeintensitäten in den einzelnen Krankheitsentitäten bei der Untersuchungen mit dem Ak gegen Blimp1 dar.

**Abbildung 18:** Prozentuale Positivität von BLNK

Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil der bei der Untersuchung mit dem Ak gegen BLNK positiv gefärbten Tumorzellen in den einzelnen Krankheitsentitäten. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und Spannweite.

**Abbildung 19:** Verteilung der Färbeintensität von BLNK

Das Diagramm stellt die Verteilung der Färbeintensitäten in den einzelnen Krankheitsentitäten bei der Untersuchungen mit dem Ak gegen BLNK dar.



## 8.2. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Im Besonderen möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Marcus Kremer für die Überlassung des Themas, die sehr gute Betreuung bei der Durchführung der Dissertation, seine wissenschaftlichen Anmerkungen und seine Hilfe während der gesamten Zeit bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der TU-München, die mir bei der Durchführung der Experimente mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein immer offenes Ohr hatten meine Eltern und meine Schwester. Hierfür und für alle Aufmunterung und Unterstützung während des gesamten Studiums und der Erstellung dieser Arbeit gilt Euch mein großer Dank.