

Aus dem Institut für Pathologie Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Immunphänotyp und Mutationsstatus der chronischen  
lymphatischen Leukämie mit plasmazellulärer Differenzierung

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nora Bolz, geb. Keller

aus Berlin

Datum der Promotion: 25.10.2013

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abstrakt</b> .....	<b>7</b>
1.1. Einleitung .....	7
1.2. Methodik.....	7
1.3. Ergebnisse .....	7
1.4. Schlussfolgerung .....	8
<b>2. Abstract</b> .....	<b>9</b>
2.1. Introduction.....	9
2.2. Methods.....	9
2.3. Results.....	9
2.4. Conclusion .....	10
<b>3. Einleitung</b> .....	<b>11</b>
3.1. Die chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp .....	11
3.2. Morphologie .....	13
3.3. Immunphänotyp.....	14
3.3.1. ZAP 70 .....	16
3.4. Molekularpathologie.....	16
3.4.1. Monoklonalität .....	17
3.4.2. Mutationsstatus .....	18
3.5. Plasmazelluläre Differenzierung .....	20
3.6. Prognostische Faktoren.....	20
3.6.1. Knochenmarksinfiltration .....	21
3.6.2. Lymphozytenverdopplungszeit.....	21
3.6.3. Mutationsstatus .....	21
3.6.4. Chromosomale Aberrationen .....	22
3.6.5. Transformation .....	22
3.7. Fragestellung .....	23

<b>4. Material und Methode .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1. Studiendesign .....</b>	<b>25</b>
<b>4.2. Patientengut.....</b>	<b>25</b>
4.2.1. Altersverteilung.....	26
4.2.2. Geschlechtsverteilung .....	26
<b>4.3. Morphologie .....</b>	<b>26</b>
<b>4.4. Immunphänotyp.....</b>	<b>27</b>
4.4.1. Verwendete Materialien und Ansatz von Lösungen .....	30
4.4.2. Ablauf der Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase-Methode .....	31
2.4.3 Ablauf der Avidin-Biotin-Komplex-Methode.....	32
2.4.4 Ablauf der Labeled Streptavidin-Biotin-Methode.....	32
2.4.5 Auswertung der Immunhistochemischen Färbungen .....	33
<b>4.5. Molekularpathologie.....</b>	<b>34</b>
4.5.1. Monoklonalität .....	34
4.5.2. Verwendete Materialien und Ansatz von Lösungen .....	35
4.5.3. Ablauf der IgH-PCR.....	36
4.5.4. Ablauf des GeneScanning.....	36
4.5.5. Sequenzierung .....	36
4.5.6. Mutationsstatus .....	37
<b>4.6. Erhebung und Erfassung klinischer Daten .....</b>	<b>38</b>
4.6.1. Stadieneinteilung.....	38
4.6.2. Verlauf .....	38
4.6.3. Therapieerfolg .....	38
4.6.4. Laborwerte .....	38
4.6.5. Knochenmarks-Histologie/ -Zytologie.....	39
4.6.6. Immunphänotypisierung .....	39
<b>4.7. Statistische Auswertung.....</b>	<b>39</b>
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1. Altersverteilung .....</b>	<b>40</b>
<b>5.2. Morphologie .....</b>	<b>41</b>
<b>5.3. Immunphänotyp.....</b>	<b>43</b>

5.3.1.	Expression von B-CLL typischen Markern .....	43
5.3.2.	Expression der Immunglobulin-Leichtketten kappa und lambda .....	45
5.3.3.	Expression von Markern plasmazellulärer Differenzierung .....	46
5.3.4.	Expression von ZAP70 .....	50
5.3.5.	Expression von IgM und IgD .....	53
<b>5.4.</b>	<b>Molekularpathologie.....</b>	<b>54</b>
<b>5.5.</b>	<b>Überlebenswahrscheinlichkeit.....</b>	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>59</b>
6.1.	Morphologie und Immunhistochemie.....	59
6.2.	Mutationsstatus und ZAP70 .....	61
6.3.	Mutationsstatus und plasmazelluläre Differenzierung .....	61
6.4.	Prognostische Relevanz .....	65
<b>7.</b>	<b>Appendix .....</b>	<b>67</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>69</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>70</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>77</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Phasenspezifität der Plasmazell-Marker.....	15
Abb. 2: Schematische Darstellung der B-Zell-Differenzierung mit neoplastischer Entartung .....	19
Abb. 3: Schematische Darstellung der Fragestellung .....	24
Abb. 4: Schematische Darstellung der APAAP-Methode.....	28
Abb. 5: Schematische Darstellung der ABC-Methode .....	29
Abb. 6: Schematische Darstellung der LSAB-Methode.....	29
Abb. 7: Altersverteilung der Patienten zum Zeitpunkt der Charakterisierung.....	40
Abb. 8a: Lymphknoten mit B-CLL/B-SLL und pseudofollikulärem Wachstumsmuster.....	41
Abb. 8b: Stärkere Vergrößerung einer B-CLL/B-SLL .....	41
Abb. 9a: CLL/SLL mit plasmazellulärer Differenzierung.....	42
Abb. 9b: CLL/SLL mit plasmazellulärer Differenzierung.....	42
Abb. 10: Typischer Immunphänotyp der B-CLL/B-SLL .....	45
Abb. 11: B-CLL/B-SLL mit monotypische Leichtkettenexpression .....	46
Abb. 12: Immunhistologische Expression der fünf untersuchten Plasmazell-Marker.....	47
Abb. 13: Immunhistologische Doppelmarkierung.....	48
Abb. 14: Immunfluoreszenzoptische Mehrfachmarkierung einer B-CLL/B-SLL mit Expression von CD23 .....	49
Abb. 15: Immunhistochemische Expressionsanalyse von ZAP 70 .....	50
Abb. 16: Expression von ZAP70 in Korrelation mit dem Mutationsstatus .....	51
Abb. 17: Übereinstimmung ZAP70 Expression mit dem IgH-Mutationsstatus .....	52
Abb. 18: Immunhistochemischer Nachweis einer Expression der Immunglobulinschwerkette IgM in einer unmutierten B-CLL/B-SLL mit plasmazellulärer Differenzierung .....	53
Abb. 19: Mutationsstatus von Fall H203-00 .....	54
Abb. 20: Verteilung Mutationsstatus.....	55
Abb. 21: Plasmazelluläre Differenzierung in Korrelation mit dem Mutationsstatus .....	56
Abb. 22: Kaplan-Meier-Kurve der Patienten mit B-CLL (n=46) in Abhängigkeit vom Mutationsstatus .....	57

Abb. 23: Kaplan-Meier-Kurve der Patienten mit B-CLL (n=46) in Abhängigkeit vom Vorhandensein einer plasmazellulären Differenzierung.....	58
Abb. 24 Schematische Darstellung der zellulären Herkunft der Fälle mit plasmazellulärer Differenzierung.....	62
Abb. 25: Schematische Darstellung der Abstammung der unmutierten Fälle mit und ohne plasmazelluläre Differenzierung.....	64

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 In der Studie verwendete Primärantikörper.....	30
Tabelle 2 Morphologische Charakterisierung der CLL-Fälle.....	43
Tabelle 3 Oberflächenmarker B-CLL.....	44
Tabelle 4 Plasmazelluläre Differenzierung.....	46
Tabelle 5 Expression von Markern plasmazellulärer Differenzierung.....	47
Tabelle 6 Expression von IgM und IgD in Korrelation mit dem Mutationsstatus und dem Vorhandensein einer plasmazellulären Differenzierung.....	53

## **1. Abstrakt**

### **1.1. Einleitung**

Die chronische lymphatische Leukämie ist ein niedrigmalignes, leukämisches Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zellreihe, das mit einer Inzidenz von 2-6 pro 100.000 Einwohner die häufigste Leukämie der westlichen Hemisphäre darstellt.

Die B-CLL kann in zwei Gruppen mit unterschiedlicher zellulärer Herkunft unterteilt werden: eine Gruppe, die von naiven Prä-Keimzentrums-B-Zellen ausgeht und mit einem aggressiveren klinischen Verlauf assoziiert ist, und eine Gruppe, die von Post-Keimzentrums-Gedächtnis- oder Effektor-B-Zellen ausgeht und einen milderen klinischen Verlauf zu erwarten hat. Ein Teil der B-CLL-Fälle weist eine plasmazelluläre Differenzierung auf.

Das Ziel dieser Arbeit ist die immunhistologische und molekularpathologische Charakterisierung der plasmazellulär differenzierten B-CLL und ihre Korrelation mit dem klinischen Verlauf.

### **1.2. Methodik**

Immunhistochemische (CD5, CD20, CD23, CD43, MUM1/IRF4, VS38c, CD138, Blimp-1, XBP1, Kappa/lambda, ZAP70, IgD, IgM, IgG) und molekularpathologische (IgH-PCR mit anschließender Kapillarelektrophorese und Sequenzierung) Charakterisierung von 63 Fällen, anschließende Ermittlung von Überlebensdaten und statistische Auswertung.

### **1.3. Ergebnisse**

In dieser Arbeit wiesen 28% der B-CLL/B-SLL Fälle (18/63) Zeichen einer plasmazellulären Differenzierung auf. Durch immunhistologische und

fluoreszenzoptische Mehrfachmarkierungen konnte gezeigt werden, dass die plasmazellulär differenzierte Zellpopulation der Tumorzellpopulation zugehörig ist.

Ausserdem konnten wir zeigen, dass die plasmazelluläre Differenzierung der neoplastischen B-Zellen mit einer Expression von Plasmazellmarkern (MUM1, VS38c, Blimp-1, XBP1) korreliert. Eine Expression von mehr als zwei Plasmazellmarkern konnte in 67% der Fälle (12/18) nachgewiesen werden, die zuvor morphologisch als plasmazellulär differenziert identifiziert worden waren.

Überraschenderweise sind 69% der B-CLL/B-SLL-Fälle mit plasmazellulärer Differenzierung keine Träger somatischer Mutationen, stammen von unmutierten naiven Prä-Keimzentrums-B-Zellen ab und sind somit nicht den klassischen Weg der B-Zell-Differenzierung gegangen.

Wir konnten zeigen, dass der Nachweis einer plasmazellulären Differenzierung bei B-CLL/B-SLL mit einer signifikant kürzeren Überlebenszeit ( $p= 0,012$ ) im Vergleich zu den Fällen, bei denen keine plasmazelluläre Differenzierung nachgewiesen werden konnte, assoziiert ist und somit möglicherweise ein aggressiveres therapeutisches Vorgehen erfordert.

#### **1.4. Schlussfolgerung**

Wir konnten zeigen, dass plasmazellulär differenzierte B-Zellen der chronischen lymphatischen Leukämie keine Träger somatischer Mutationen sind, und Fälle der B-CLL mit plasmazellulärer Differenzierung mit aggressiveren klinischen Verläufen assoziiert sind.

Diese Ergebnisse sind bemerkenswert, da man eher erwarten würde, dass plasmazellulär differenzierte B-Zellen als Post-Keimzentrumszellen und (prä)-terminal differenzierte Form der B-Zelle Träger somatischer Mutationen sind und somit einen weniger aggressiven klinischen Verlauf nahe legen.

Der Nachweis einer plasmazellulären Differenzierung der B-CLL ist somit von prognostischer Relevanz und sollte als zusätzlicher Parameter für eine möglichst individuelle Therapieplanung in Betracht gezogen werden.

## **2. Abstract**

### **2.1. Introduction**

Chronic lymphocytic leukaemia is a low grade leukaemic Non-Hodgkin Lymphoma of B-cell origin. With an incident rate of 2-6 cases per 100.000 person per year it is the most common leukaemia in the Western Hemisphere.

CLL can be divided into two groups with different cellular origin. One group originates from naive pre-germinal center B cells and is associated with more aggressive clinical courses, while the second group descends from post-germinal center B cells and shows more indolent clinical courses.

Some cases of CLL show plasmacellular differentiation.

Aim of this thesis was to perform immunohistochemical and molecular analysis of CLL with plasmacellular differentiation in correlation with clinical outcome.

### **2.2. Methods**

Immunohistochemical (CD5, CD20, CD23, CD43, MUM1/IRF4, VS38c, CD138, Blimp-1, XBP1, Kappa/lambda, ZAP70, IgD, IgM, IgG) and molecular (IgH-PCR, GeneScan and sequencing) analysis of 63 cases. Survival analysis and statistical evaluation.

### **2.3. Results**

28% of all CLL/SLL cases (18/63) showed signs of plasmacellular differentiation. Through immunohistochemical and immunofluorescence multimarkers we could show that these plasmacells belong to the tumor cell population. Furthermore we could show that plasmacellular differentiation of neoplastic B cells correlates with the expression of plasma cell markers (MUM1, VS38c, Blimp-1, XBP1). An expression of more than two plasma cell markers could be detected in 67% of all cases (12/18)

morphologically identified as plasmacellularly differentiated. Surprisingly we could not detect somatic mutations in 69% of all CLL/SLL cases with plasmacellular differentiation. Therefore these cells originate from unmutated naive pre-germinal center B cells and did not take the usual pathway of B cell differentiation.

The detection of plasmacellular differentiation was associated with a significantly shorter survival time ( $p= 0,012$ ) compared to cases without plasmacellular differentiation and therefore possibly requires a more aggressive therapeutical approach.

## **2.4. Conclusion**

We could demonstrate that plasmacellularly differentiated B cells in cases of CLL do not show somatic mutations and that CLL cases with plasmacellular differentiation are associated with more aggressive clinical courses. These results are remarkable since one would expect that plasmacellularly differentiated B cells as post-germinal center cells and pre-terminally differentiated B cells show somatic mutations and are associated with a more indolent clinical course. The detection of plasmacellular differentiation in cases of CLL is prognostically important and may be taken into account as an additional parameter for an individual therapy planning.

### **3. Einleitung**

#### **3.1. Die chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp**

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist laut WHO-Klassifikation ein niedrigmalignes, leukämisches Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zellreihe (Swerdlow, Campo et al. 2008). Mit einer Inzidenz von 2-6 pro 100.000 Einwohner ist sie die häufigste Leukämie der westlichen Hemisphäre (Faguet 1994; Montserrat and Rozman 1995; Rozman and Montserrat 1995; Swerdlow, Campo et al. 2008). Obwohl die CLL als Leukämie des höheren Lebensalters gilt, ist die Anzahl junger CLL-Patienten gestiegen (Finch and Linet 1992). Ungefähr 30% aller Patienten sind bei Erstdiagnose jünger als 55 Jahre (Montserrat, Gomis et al. 1991; de Lima, O'Brien et al. 1998; Mauro, Foa et al. 1999). Häufigere routinemäßige Blutbilduntersuchungen bei jüngeren Menschen sind möglicherweise die Erklärung für die früheren Diagnosestellungen (Hallek, Bergmann et al. 2002). Das mediane Erkrankungsalter beträgt 65 Jahre (Hallek, Schmitt et al. 2001; Hallek, Schmitt et al. 2001). Männer erkranken häufiger als Frauen (1,5-2:1) (Swerdlow, Campo et al. 2008).

Bei der Erkrankung kommt es zu einer monoklonalen Expansion monomorpher, kleinzelliger B-Lymphozyten im peripheren Blut, im Knochenmark und im lymphatischen Gewebe. Fälle ohne leukämische Beteiligung mit ansonsten CLL-typischer Morphologie und Immunphänotyp werden als lymphozytisches Lymphom/„small lymphocytic lymphoma (SLL)“ bezeichnet (Swerdlow, Campo et al. 2008). Im Verlauf der Krankheit kommt es neben Organvergrößerungen von Leber und Milz zur Insuffizienz der normalen Hämatopoese und anschließend zu Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie. Es gibt kein verlässliches Leitsymptom der CLL. Während die frühen Stadien meist asymptomatisch verlaufen, sind vergrößerte Lymphknoten im Verlauf das häufigste Symptom (Hallek, Schmitt et al. 2001; Hallek, Bergmann et al. 2002; Swerdlow, Campo et al. 2008).

*Per definitonem* sind zur Sicherung der Diagnose die Beteiligung des Knochenmarks und des peripheren Blutes sowie eine permanent erhöhte absolute Lymphozytenzahl von  $> 10 \times 10^9/l$  gefordert. Auch mit einer Lymphozytenzahl von  $< 10 \times 10^9/l$  kann die Diagnose B-CLL gestellt werden, vorausgesetzt die Morphologie und der Immunphänotyp sind charakteristisch für die B-CLL (Swerdlow, Campo et al. 2008). Die B-CLL ist bezüglich Prognose und klinischem Verlauf eine sehr heterogene Erkrankung. Langsam verlaufende Formen der CLL mit nahezu normaler Lebenserwartung bis hin zu rasch progredienten Verlaufsformen mit schlechter Prognose können beobachtet werden (Rozman and Montserrat 1995). Die Überlebenszeit erstreckt sich von wenigen Monaten bis hin zu 20 Jahren.

Um das Ausmaß der Erkrankung jedes individuellen Patienten besser einschätzen zu können, wurden verschiedene Klassifikationssysteme entwickelt. Zwei Einteilungen haben sich im Laufe der Zeit durchgesetzt: die Binet- und die Rai-Klassifikation (Rai, Sawitsky et al. 1975; Binet, Auquier et al. 1981; Chiorazzi, Rai et al. 2005). Beide stützen sich auf das durch Palpation erfasste Ausmaß der Lymphadenopathie, Splenomegalie und Hepatomegalie und die mittels Blutbild bestimmte Anämie und Thrombozytopenie. Sie wurden in den letzten Jahren durch zusätzliche Parameter ergänzt (Lymphozytenverdopplungszeit, verschiedene zytogenetische Aberrationen, Serumparameter und Knochenmarkshistologie), um die individuelle Prognose bezüglich Therapienotwendigkeit und Progression der Erkrankung besser einschätzen zu können (Rai, Sawitsky et al. 1975; Binet, Auquier et al. 1981; Apeltgren, Hasselblom et al. 2006).

Während die CLL früher als Erkrankung homogenen Ursprungs betrachtet wurde, die von immuninkompetenten B-Lymphozyten ausgeht (Rozman and Montserrat 1995), ist man sich heute ihrer Heterogenität sicher. Sequenzanalysen haben ergeben, dass die CLL in zwei Gruppen mit unterschiedlicher zellulärer Herkunft unterteilt werden kann: eine, die von unmutierten naiven Prä-Keimzentrums-B-Zellen ausgeht und eine, die von mutierten Post-Keimzentrums-Gedächtnis- oder Effektor-B-Zellen ausgeht. Beide Gruppen unterscheiden sich bezüglich Krankheitsverlauf, Prognose und Therapiebedarf (Chiorazzi, Rai et al. 2005).

Die Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome wurde bis in die 90er Jahre im europäischen Raum nach der von Lennert et al. entwickelten Kiel-Klassifikation

(Lennert, Stein et al. 1975; Lennert 1990; Lennert 1992; Lennert 1995) und im amerikanischen Raum nach der Working Formulation (WorkingFormulation 1982) durchgeführt. Die Klassifikationssysteme wurden 1994 in der REAL-Klassifikation (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms) und 2001 in der WHO-Klassifikation vereinheitlicht, da erhebliche Schwierigkeiten im Vergleich wissenschaftlicher Studien aufgrund der zum Teil unterschiedlichen Krankheitsdefinitionen aufgetreten waren (Harris, Jaffe et al. 1994; 1997; Coupland, Dallenbach et al. 2000). Weltweit richtet sich die Einteilung der Non-Hodgkin Lymphome nun nach der aktuellen Auflage der WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2008 (Swerdlow, Campo et al. 2008).

### **3.2. Morphologie**

Das charakteristische histologische Bild der Lymphknoteninfiltration bei CLL/SLL ist gekennzeichnet von einer aufgehobenen Lymphknotenarchitektur mit Verlust der Keimzentren und Akkumulation kleiner lymphatischer Zellen mit verklumptem Chromatin, meist rundem Kern und gelegentlich kleinen Nucleoli. Die mitotische Aktivität dieser Zellen ist normalerweise sehr niedrig. In 90% der Fälle zeigt die CLL im vollständig befallenen Lymphknoten ein pseudofollikuläres Wachstumsmuster. In 10% der Fälle ist das Wachstumsmuster diffus. Die Pseudofollikel oder auch Proliferationszentren entstehen durch die Ansammlung größerer, hellerer Zellen, den so genannten Prolymphozyten und Paraimmunoblasten. Die Prolymphozyten sind Zellen mittlerer Größe mit lockerem Chromatin und kleinen Nucleoli. Paraimmunoblasten sind mittelgroße bis große Zellen mit runden bis ovalen Nuclei, vesikulärem Chromatin, prominenten Nucleoli und basophilem Zytoplasma (Bonato, Pittaluga et al. 1998; Coupland, Dallenbach et al. 2000; Swerdlow, Campo et al. 2008).

In der Milz werden die weiße und die rote Pulpa infiltriert. Pseudofollikel können beobachtet werden, sind jedoch weniger auffällig als in den Lymphknoten.

In peripheren Blut- und Knochenmarksausstrichen sind die typischen B-CLL-Zellen kleine Lymphozyten mit dichtem Chromatin und schmalem leicht basophilem

Zytoplasmasaum. Nucleoli sind meist nicht erkennbar. Diese Zellen ähneln reifen B-Lymphozyten und sind nur unwesentlich größer. Normalerweise beträgt der Anteil von Prolymphozyten im Blutaussstrich weniger als 2%. Höhere Prozentsätze korrelieren mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf (Swerdlow, Campo et al. 2008).

Die Beteiligung des Knochenmarks kann nodulär, interstitiell, diffus oder eine Kombination der drei Formen sein. Während das noduläre und das interstitielle Wachstumsmuster eher im Anfangsstadium der CLL zu beobachten sind, weist die diffuse Infiltration auf ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium hin (Swerdlow, Campo et al. 2008).

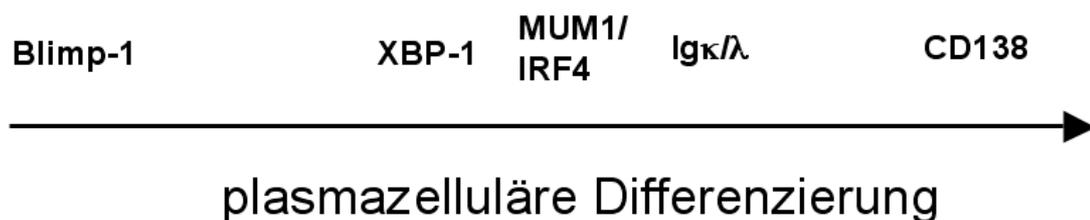
### **3.3. Immunphänotyp**

Aufgrund ihres charakteristischen Antigenprofils lässt sich die B-CLL gut von anderen leukämischen Erkrankungen abgrenzen. Die Tumorzellen der B-CLL exprimieren nur schwach das Oberflächenmembranimmunoglobulin IgM oder IgM/IgD je nach Differenzierungszustand. Eine schwache Positivität für CD20, CD22 und CD11c in Verbindung mit der Expression der B-Zell-assoziierten Membranantigene CD23 und CD19 sowie CD5, CD43 und CD79a ist für die B-CLL typisch (Dunphy, Wheaton et al. 1997; Coupland, Dallenbach et al. 2000; Chiorazzi, Rai et al. 2005).

Neben den B-CLL typischen Oberflächenmarkern wurden in dieser Studie auch Marker näher betrachtet, die auf eine plasmazelluläre Differenzierung hinweisen: CD138 (Syndecan), Mum1/IRF4 (Multiple Myeloma-1/Interferon Regulatory Factor-4), VS38C, Blimp-1 (*B lymphocyte induced maturation protein-1*), XBP-1 (*X box binding protein-1*) (Sanderson, Lalor et al. 1989; Turley, Jones et al. 1994; Jeco, Robillard et al. 1999; Falini, Fizzotti et al. 2000; Tsuboi, Iida et al. 2000; Calame, Lin et al. 2003; Lin, Tunyaplin et al. 2003). Die verschiedenen Plasmazell-Marker können in unterschiedlichen Stadien der plasmazellulären Differenzierung nachgewiesen werden (Abb. 1).

Das CD138-Molekül ist ein transmembranäres Proteoglykan, das sich auf Epithelzellen und im hämatopoetischen System auf Plasmazellen befindet. Es wird

phasenspezifisch im Rahmen der B-Zell-Differenzierung exprimiert. Während CD138 in besonders frühen Stadien der B-Zell-Entwicklung nachgewiesen werden kann, wird es im Laufe der weiteren Differenzierung nicht mehr exprimiert, um dann im Plasmazell-Stadium wieder reexprimiert zu werden (Sanderson, Lalor et al. 1989). Mum1/IRF4 ist ein Transkriptionsfaktor, der in den späten Stadien der B-Zell-Differenzierung von Bedeutung ist (Falini, Fizzotti et al. 2000). Blimp-1 und XBP-1 sind wichtige Bestandteile des Regulationsmechanismus der Plasmazelldifferenzierung, da sie die Transkriptionsfaktoren Bcl-6 und Pax5 unterdrücken und somit zum Zellzyklusarrest und folglich zur Irreversibilität der plasmazellulären Differenzierung führen. Zusätzlich induzieren sie die Synthese und Sekretion von Immunglobulinen (Calame, Lin et al. 2003).



**Abb. 1: Phasenspezifität der Plasmazell-Marker**

Die Expression der verschiedenen Plasmazell-Marker kann in unterschiedlichen Stadien der plasmazellulären Differenzierung nachgewiesen werden. Das Schema ist modifiziert nach Calame et al. (Calame, Lin et al. 2003).

Außerdem wurde der immunhistologische Nachweis einer Expression einer Immunglobulinleichtkette als ein Kriterium für eine plasmazellulären Differenzierung verwendet. Ein Fall galt demnach als plasmazellulär differenziert, wenn mindestens 10% der Tumorzellen eindeutig eine monotypische Expression einer Immunglobulinleichtkette (kappa oder lambda) zeigten.

### **3.3.1. ZAP 70**

Das zeta-assoziierte Protein 70 (ZAP 70) gilt als Surrogatmarker des IgV<sub>H</sub> Mutationsstatus der B-CLL (Rosenwald, Alizadeh et al. 2001; Wiestner, Rosenwald et al. 2003). Es ist ein intrazelluläres Protein aus der Familie der Syk-ZAP-70 Tyrosinkinasen, das der Signaltransduktion von T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen dient, normalerweise aber kaum in B-Zellen nachgewiesen werden kann. Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie können allerdings ZAP70<sup>+</sup> positive B-Zellen aufweisen (Chen, Widhopf et al. 2002; Chen, Apgar et al. 2005; Schroers, Griesinger et al. 2005). Studien zeigen eine Korrelation zwischen der Expression von ZAP70 und der Mutation der variablen Region des Immunglobulinschwerkettengens (Crespo, Bosch et al. 2003; Orchard, Ibbotson et al. 2004; Rassenti, Huynh et al. 2004).

Da das Vorhandensein somatischer Mutationen von klinischer und prognostischer Relevanz ist, wird ZAP70 als prognostischer Marker verwendet. Selbst wenn die Technik zur IgV<sub>H</sub> Sequenzanalyse zur Verfügung steht, sprechen der hohe Kosten- und Zeitaufwand gegen eine routinemäßige Einführung dieser Methode. Aus diesem Grund ist ZAP70 als Surrogatmarker des Mutationsstatus von großem wissenschaftlichem Interesse, um risikoadaptierte Behandlungspläne zu entwickeln (Crespo, Bosch et al. 2003; Durig, Nuckel et al. 2003; Schroers, Griesinger et al. 2005). Obwohl keine hundertprozentige Übereinstimmung der Expression von ZAP70 mit dem Mutationsstatus nachgewiesen werden konnte, scheint die Expression des Proteins ein Indikator eines aggressiveren klinischen Verlaufs zu sein. Patienten mit ZAP70-negativer CLL haben leichtere Krankheitsverläufe und längere Überlebensraten (Wiestner, Rosenwald et al. 2003).

## **3.4. Molekularpathologie**

B-Lymphozyten entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, schwimmen in das periphere Blut aus und akkumulieren in Lymphknoten.

Von der Progenitor-B-Zelle (Pro-B-Zelle) ausgehend, findet im Knochenmark die Umlagerung der Immunglobulin-Gene statt. Zuerst erfolgt die Umlagerung der

Immunglobulinschwerkette ( $V_H D_H J_H$  Gen), anschließend die Umlagerung der leichten Kette ( $V_L J_L$  Gen) (Tonegawa 1983). So wird aus der Pro-B-Zelle über die Prä-B-Zelle die unreife B-Zelle. Sie ist IgM-positiv und verlässt das Knochenmark, um auf dem Blutweg ins periphere lymphatische Gewebe zu wandern. In Form von Primärfollikeln und später Follikelmänteln besiedelt sie dann die Rindenregion der Lymphknoten während sie parallel zusätzlich IgD exprimiert. Diese IgM- und IgD-positive Zelle, die bisher noch keinen Antigenkontakt hatte, wird nun als reife naive B-Zelle bezeichnet.

Trifft eine reife naive B-Zelle auf ein Antigen, das von ihrem Immunglobulinrezeptor gebunden werden kann, proliferiert und differenziert sie einerseits in kurzlebige Plasmazellen, die IgM-Antikörper sezernieren und andererseits wandern die aktivierten B-Zellen in das Keimzentrum eines Lymphfollikels, wo sie als Zentroblasten in eine Phase mitotischer Teilungen eintreten.

Dieser Vorgang führt zur somatischen Mutation der  $V_H D_H J_H$ - und  $V_L J_L$ - Gene, die die Bindungsstelle des Immunglobulinrezeptors codieren (Kelsoe 1994; Coupland, Hummel et al. 2000; Chiorazzi, Rai et al. 2005). Diese Mutationen führen zu einer Affinitätssteigerung der Ig-Rezeptoren gegenüber dem immunisierenden Antigen mit nachfolgender positiver Selektion (Antigenselektion) und weiterer Differenzierung. Anschließend verlassen diese Zellen das Keimzentrum als Gedächtnis-B-Zellen oder als Plasmazellen (Abb. 2).

Zellen, deren Immunglobulinrezeptoren nach der somatischen Mutation fehlerhaft sind, reduzierte Antigenbindungsfähigkeiten zeigen oder Autoantigene binden werden im Rahmen der Antigenselektion mittels Apoptose beseitigt.

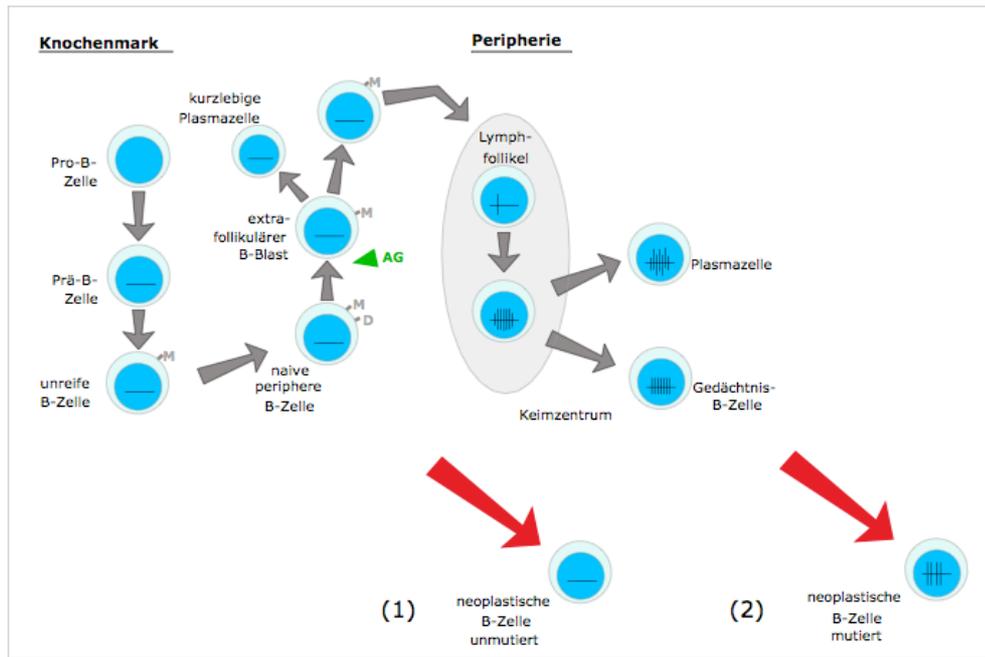
#### **3.4.1. Monoklonalität**

Lymphozytenvermehrungen, die aus derselben Progenitorzelle hervorgegangen sind, werden als Klon bezeichnet. Sie tragen den selben Ig-Rezeptor und erkennen dasselbe Antigen. Bei der B-CLL handelt es sich um eine maligne Erkrankung, deren Tumorzellen von einem einzigen transformierten B-Lymphozyten abstammen und deshalb dieselbe  $V_H-N-D_H-N'-J_H$ -Sequenz und  $V_L-N-J_L$ -Sequenz enthalten. Der molekularpathologische Nachweis der Monoklonalität wird als Indikator der malignen Entartung eingesetzt (Chiorazzi, Rai et al. 2005).

### **3.4.2. Mutationsstatus**

Da somatische Mutationen im Keimzentrum ablaufen, kann deren Nachweis Aufschluss über die Differenzierungsstufe von neoplastischen B-Zellen geben. B-CLL-Fälle können in zwei Gruppen mit unterschiedlichem Mutationsstatus und somit unterschiedlicher zellulärer Herkunft eingeteilt werden: eine Gruppe, die entsprechend des Fehlens von Ig-Mutationen von Prä-Keimzentrums-B-Zellen abstammt und keine somatischen Mutationen aufweist und eine Gruppe mit somatischen Mutationen, die von Post-Keimzentrums-B-Zellen abstammt (Chiorazzi and Ferrarini 2003; Stevenson and Caligaris-Cappio 2004). Beide Gruppen unterscheiden sich bezüglich Prognose, Krankheitsverlauf und Therapiebedarf (Fais, Ghiotto et al. 1998; Damle, Wasil et al. 1999; Hamblin, Davis et al. 1999). Während Patienten, deren Tumorzellen von unmutierten Prä-Keimzentrums-B-Zellen abstammen, einen aggressiveren Verlauf der Erkrankung zu erwarten haben, ist die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten, deren Tumorzellen von mutierten Post-Keimzentrums-B-Zellen abstammen größer (Shanafelt, Geyer et al. 2004; Zenz, Mertens et al. 2008). Da die Einteilung der B-CLL in ihre Untergruppen von klinischer und prognostischer Relevanz ist, erhofft man sich auf diesem Wege die Optimierung risikoadaptierter Behandlungspläne.

Durch den Vergleich der DNA-Sequenzen von B-Zellen mit den korrespondierenden Sequenzen der Keimbahn, können Mutationen festgestellt werden. Bei einer Abweichung von zwei Prozent oder mehr gilt die Sequenz definitionsgemäß als mutiert. Die 2-Prozent-Grenze wurde gewählt, um mögliche polymorphe Varianten auszuschließen (Schroeder and Dighiero 1994; Chiorazzi, Rai et al. 2005; Ghia, Stamatopoulos et al. 2007).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der B-Zell-Differenzierung mit neoplastischer Entartung**

Im Knochenmark findet die Umlagerung der Immunglobulin-Gene statt (horizontale Linien). Zuerst wird die schwere Kette umgelagert, dann die leichte Kette. In den verschiedenen Entwicklungsstadien findet sich unterschiedliche Expression der Immunglobulinschwerketten IgM bzw. IgD (symbolisiert durch ein „M“ bzw. „D“ an der Zellmembran). Nach Antigenkontakt (symbolisiert durch einen grünen Pfeil „AG“) der naiven peripheren B-Zelle erfolgen im Keimzentrum des Lymphfollikels somatische Mutationen der variablen Regionen der Immunglobuline (vertikale Linien). Die roten Pfeile markieren die zwei Subgruppen der B-CLL: jene, deren Tumorzellen von unmutierten Prä-Keimzentrums-B-Zellen abstammen (1) und jene, deren Tumorzellen von mutierten Post-Keimzentrums-B-Zellen abstammen (2).

### **3.5. Plasmazelluläre Differenzierung**

Ein Teil der B-CLL-Fälle weist eine plasmazelluläre Differenzierung auf und es lässt sich eine Tumorzellpopulation mit exzentrisch gelegenen Kernen und breitem basophilem Zytoplasma erkennen (sog. lymphoplasmozytoides Lymphom nach Kiel-Klassifikation). Diese Fälle ähneln morphologisch dem lymphoplasmozytischen Lymphom der Kiel-Klassifikation (Immunozytom / Morbus Waldenström) bzw. dem Marginalzonenlymphom mit plasmazellulärer Differenzierung, welche jedoch typischerweise CD5- und CD23-negativ sind (Lennert 1990; Coupland, Dallenbach et al. 2000). In der WHO-Klassifikation und in der REAL-Klassifikation werden Lymphome mit plasmazellulärer Differenzierung und gleichzeitig B-CLL-typischer Morphologie und Immunphänotyp als Variante der B-CLL eingeordnet (Swerdlow, Campo et al. 2008).

Bisher wurde noch nicht untersucht, ob die Tumorzellen der plasmazellulär differenzierten CLL-Fälle Träger somatischer Mutationen sind und somit dem Schema der normalen B-Zell-Differenzierung entsprechen oder womöglich keine somatischen Mutationen aufweisen und folglich nicht den Weg durch das Keimzentrum gegangen sind. Außerdem stellt sich die Frage, ob die klinischen Verläufe von Patienten mit plasmazellulär differenzierter CLL den mildereren Verläufen von Fällen mit somatischen Mutationen ähneln, oder eher den aggressiveren Verläufen von Fällen ohne Mutationen entsprechen.

### **3.6. Prognostische Faktoren**

Obwohl die B-CLL klinisch indolent verläuft, wird sie als nicht heilbar betrachtet. Die mediane Überlebenszeit beträgt 7 Jahre (Swerdlow, Campo et al. 2008).

Um den heterogenen Krankheitsverlauf der CLL besser einschätzen zu können, haben Rai et al. und Binet et al. Klassifikationssysteme entwickelt, die B-CLL Patienten in prognostische Subgruppen einteilen (Rai, Sawitsky et al. 1975; Binet, Auquier et al. 1981). Die Klassifikationssysteme erlauben lediglich eine orientierende Abschätzung von Prognose und Krankheitsverlauf. Um die individuelle Prognose

und Therapienotwendigkeit besser einschätzen zu können, wurden sie in den letzten Jahren durch zusätzliche prognostische Faktoren ergänzt.

### **3.6.1. Knochenmarksinfiltration**

Das Infiltrationsmuster des Knochenmarks korreliert weitgehend mit dem Krankheitsstadium. Bezüglich der prognostischen Relevanz kann die Knochenmarksinfiltration der B-CLL in zwei Gruppen unterteilt werden: die diffuse und die nicht-diffuse Infiltration (Lipshutz, Mir et al. 1980; Rozman, Hernandez-Nieto et al. 1981; Montserrat and Rozman 1987; Mauro, De Rossi et al. 1994; Rozman and Montserrat 1995). Patienten mit diffuser Knochenmarksinfiltration befinden sich meist in einem fortgeschritteneren Krankheitsstadium als Patienten mit nicht-diffuser Knochenmarksinfiltration (Han, Barcos et al. 1984). Ausserdem haben Patienten, die in frühen klinischen Stadien ein diffuses Infiltrationsmuster aufweisen, einen aggressiveren Krankheitsverlauf zu erwarten.

Hierbei fasst der Begriff „nicht-diffuse Infiltration“ die Infiltrationsmuster nodulär, interstitiell und Mischformen (nodulär und interstitiell) zusammen.

### **3.6.2. Lymphozytenverdopplungszeit**

Die Lymphozytenverdopplungszeit beschreibt die Zeitdauer, in der sich die absolute Zahl der Lymphozyten im Blut verdoppelt. Patienten mit kürzeren Lymphozytenverdopplungszeiten haben schlechtere Überlebenschancen als Patienten mit längeren Lymphozytenverdopplungszeiten (Montserrat, Sanchez-Bisono et al. 1986; Molica and Alberti 1987; Molica, Reverter et al. 1990; Montserrat, Gomis et al. 1991).

### **3.6.3. Mutationsstatus**

Derzeit wird der Mutationsstatus der variablen Region der Immunglobulin-Schwerkette als einer der aussagekräftigsten prognostischen Faktoren der B-CLL betrachtet. Die B-CLL kann bezüglich ihres Mutationsstatus in zwei prognostische Gruppen unterteilt werden. Eine Gruppe, die von unmutierten Prä-Keimzentrums-B-Zellen abstammt und aggressivere klinische Verläufe aufweist und eine Gruppe, die von mutierten Post-Keimzentrums-B-Zellen abstammt, milder verläuft und bessere

Überlebenschancen hat (Damle, Wasil et al. 1999; Hamblin, Davis et al. 1999; Shanafelt, Geyer et al. 2004; Schroers, Griesinger et al. 2005; Huttmann, Klein-Hitpass et al. 2006).

Der Vergleich der DNA-Sequenzen von B-Zellen mit den korrespondierenden Sequenzen der Keimbahn kann Mutationen feststellen und ist somit von prognostischer Relevanz (Chiorazzi, Rai et al. 2005).

#### **3.6.4. Chromosomale Aberrationen**

Chromosomale Aberrationen sind ebenfalls von prognostischem Wert. Während die Trisomie 12 mit einer atypischen Morphologie und aggressiven klinischen Verläufen korreliert, ist die Deletion 13q14 mit mildereren Verläufen assoziiert. Fälle mit 11q22-23-Deletionen und Fälle mit TP53-Abnormalitäten haben häufig eine ausgeprägte Lymphadenopathie und eine kürzere Lebenserwartung. Während früher in ungefähr 40-50% der B-CLL Fälle chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden konnten, haben neue molekularbiologische Methoden wie die FISH (Floureszenz-in-situ-Hybridisierung) den Nachweis verbessert, so dass in über 80% der B-CLL-Fälle Aberrationen nachgewiesen werden können (Dohner, Stilgenbauer et al. 2000; Migliazza, Bosch et al. 2001; Calin, Dumitru et al. 2002; Stilgenbauer, Bullinger et al. 2002; Zenz, Mertens et al. 2008).

#### **3.6.5. Transformation**

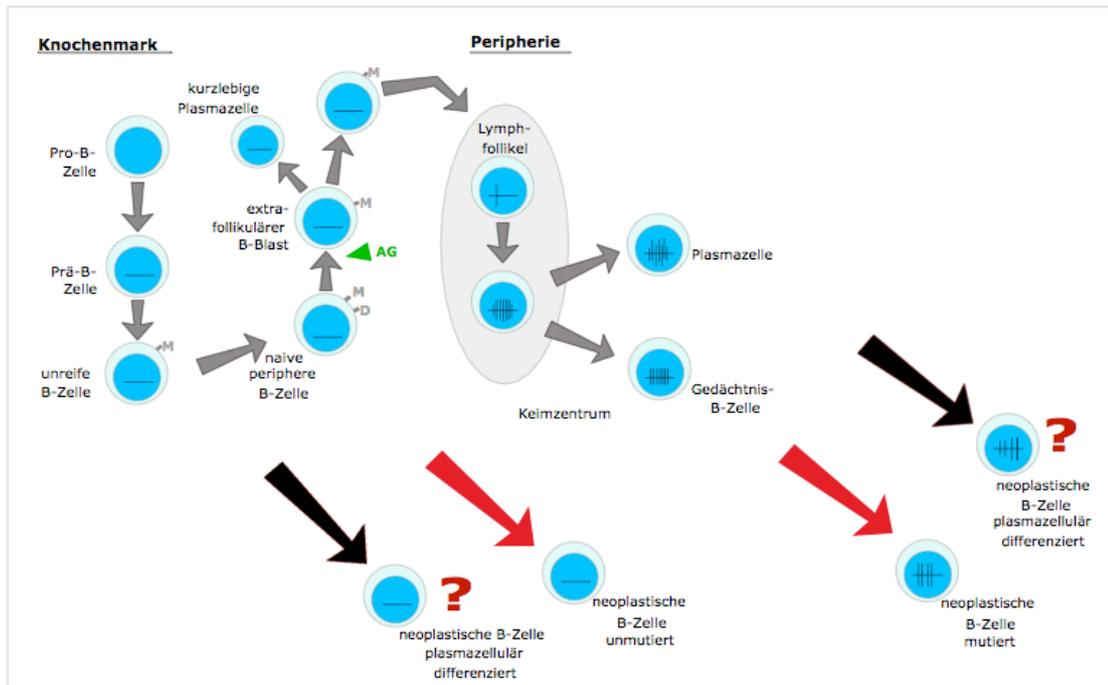
Die Transformation der B-CLL in ein aggressives Lymphom im Sinne eines Richter-Syndroms ereignet sich selten (ca. 3,5% aller Fälle). Molekulargenetische Analysen haben ergeben, dass ungefähr 50% dieser sogenannten *high grade* Lymphome die Transformation des ursprünglichen neoplastischen Klons repräsentieren, die anderen 50% aber unabhängige Neoplasien sind (Robertson, Pugh et al. 1993; Chiorazzi, Rai et al. 2005; Swerdlow, Campo et al. 2008).

### 3.7. Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit ist die immunhistologische und molekularpathologische Charakterisierung der plasmazellulär differenzierten B-CLL und ihre Korrelation mit dem klinischen Verlauf.

Hierbei ergeben sich folgende Fragen:

1. Geht die plasmazelluläre Differenzierung der CLL mit einer immunhistologischen Expression von Plasmazellmarkern (CD138, Mum1/IRF4, VS38C, Blimp-1, XBP1) einher?
2. Stammt die CLL mit plasmazellulärer Differenzierung – wie die anderen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome mit plasmazellulärer Differenzierung (Lymphoplasmazytisches Lymphom/Marginalzonenlymphom mit plasmazellulärer Differenzierung) von Post-Keimzentrums-B-Zellen mit somatischen Mutationen ab?
3. Entspricht der klinische Verlauf der Patienten mit plasmazellulär differenzierter CLL den milderen Verläufen von Fällen mit somatischen Mutationen oder eher den aggressiveren Verläufen von Fällen ohne Mutationen?



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Fragestellung**

Entsprechen die neoplastischen B-Zellen mit plasmazellulärer Differenzierung mutierten Postkeimzentrum-B-Zellen und sind somit den bekannten Weg der B-Zell-Differenzierung gegangen oder entsprechen sie unmutierten Präkeimzentrum-B-Zellen?

## **4. Material und Methode**

### **4.1. Studiendesign**

In unserer Studie wurden zwei Patientenkollektive aus insgesamt 63 Patienten (21 weibliche, 42 männliche, Altersmittelwert 67 Jahre) mit chronischer lymphatischer Leukämie/lymphozytischem Lymphom vom B-Zelltyp (B-CLL/B-SLL) aufgenommen. Das erste Patientenkollektiv besteht aus konsekutiven Fällen von Lymphknotenbiopsien mit CLL/SLL aus dem Archiv des Konsultations- und Referenzzentrums für Lymphknoten- und Hämatopathologie der Charité und umfasst 50 Patienten. Zur Validierung der Ergebnisse wurde ein zweites Patientenkollektiv von 13 Patienten herangezogen, deren CLL/SLL eine plasmazelluläre Differenzierung aufwies.

Die CLL/SLL-Biopsien der Patienten wurden morphologisch, immunhistologisch und molekularpathologisch charakterisiert. Zusätzlich wurden die Überlebensdaten über einen Verlaufszeitraum von 10 Jahren erhoben und mit den morphologischen, immunhistologischen und molekularpathologischen Befunden korreliert.

Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf die Bedeutung der plasmazellulären Differenzierung gerichtet.

### **4.2. Patientengut**

Die erste Studiengruppe setzt sich aus unselektierten konsekutiven Fällen aus dem Archiv des Institutes für Pathologie am Campus Benjamin Franklin, Konsultations- und Referenzzentrum für Lymphknotendiagnostik (Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. Harald Stein) mit gesicherter B-CLL/B-SLL zusammen. Sie umfasst 50 Patienten. Das zweite Patientenkollektiv wurde zur Validierung der Ergebnisse und zur Erhöhung der Zahl an B-CLL/B-SLL Fällen mit plasmazellulärer Differenzierung zusätzlich in die Studie aufgenommen. Die zweite Studiengruppe umfasst 13 Patienten, die alle an einer B-CLL/B-SLL mit plasmazellulärer Differenzierung (lymphoplasmozytoides

Lymphom nach Kiel-Klassifikation) erkrankt waren. Das Untersuchungsmaterial stammt aus den Jahren 1996-2001.

#### **4.2.1. Altersverteilung**

Das Studienkollektiv hatte einen Altersmedian von 67 Jahren zum Zeitpunkt der Charakterisierung im Konsultations- und Referenzzentrum für Lymphknotendiagnostik mit einer Bandbreite von minimal 27 Jahren und maximal 99 Jahren.

#### **4.2.2. Geschlechtsverteilung**

In der Studiengruppe befanden sich 21 Frauen und 42 Männer.

### **4.3. Morphologie**

Morphologisch beurteilt wurden das Wachstumsmuster, die Beschaffenheit der Kerne sowie das Vorhandensein von Paraimmunoblasten und residuellen Keimzentren. Das Wachstumsmuster wurde als pseudofollikulär oder als diffus eingestuft, die Kernmorphologie als rund oder irregulär beschrieben, das Vorhandensein von Paraimmunoblasten semiquantitativ mit +, ++ oder +++ und jenes von residuellen Keimzentren mit 0, + oder ++ bewertet. Ausserdem wurden die Fälle auf das Vorhandensein einer plasmazellulären Differenzierung morphologisch beurteilt.

Wenn über zehn Prozent der Tumorzellen die morphologischen Zeichen einer plasmazellulären Differenzierung (exzentrische Kerne, basophiles Zytoplasma, Dutcher/Russel-Körperchen) und eine monotypische Expression der Immunglobulin-Leichtketten aufwiesen, wurde dieser Fall als plasmazellulär differenziert eingestuft (Coupland, Dallenbach et al. 2000; Swerdlow, Campo et al. 2008).

#### 4.4. Immunphänotyp

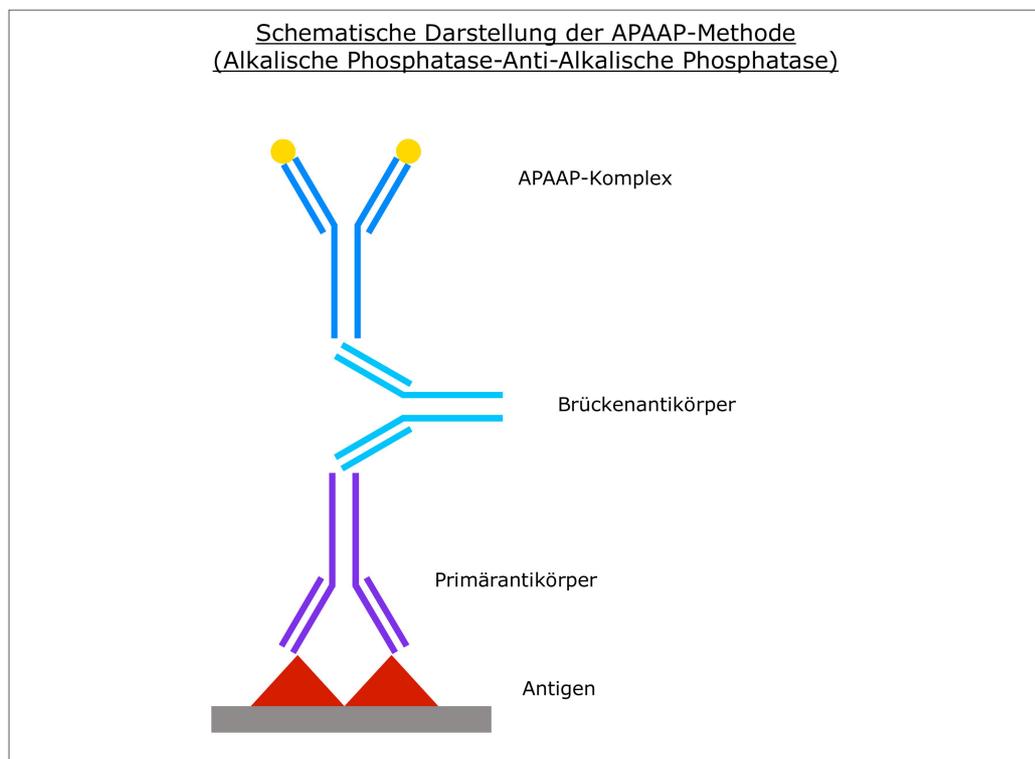
Zur immunhistochemischen Charakterisierung wurden drei Nachweismethoden verwendet: die Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase-Methode (APAAP-Methode), die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) und die Labeled Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode).

Die APAAP-Methode gehört zu den indirekten Komplexmethoden. Ein Brückenantikörper reagiert einerseits mit dem gegen das zu untersuchende Antigen gerichteten Primärantikörper und andererseits mit dem APAAP-Komplex. Im APAAP-Komplex sind monoklonale Maus-IgG-Antikörper gegen alkalische Phosphatase spezifisch mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert. Es handelt sich hierbei um einen Enzym-anti-Enzym-Komplex. Mit Hilfe einer chromogenen Substratlösung für das Enzym alkalische Phosphatase kann die Reaktion sichtbar gemacht werden (Abb. 4). Im Gegensatz zur ABC-Methode kann die APAAP-Methode wiederholt und so eine Verstärkung des Farbsignals erzeugt werden. Ausserdem zeichnet sich die Methode durch eine höhere Verdünnbarkeit des Primärantikörpers im Gegensatz zu direkten Nachweismethoden aus (Noll 2000).

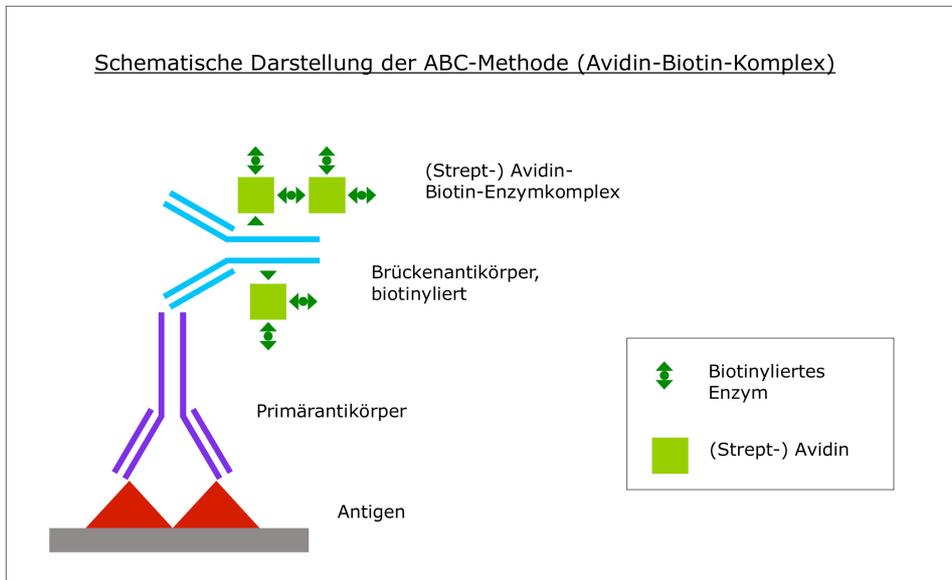
Die Avidin-Biotin-Komplex-(ABC) Methode basiert auf der starken Affinität von Biotin gegenüber Avidin bzw. Streptavidin. Das Glykoprotein Avidin besitzt vier Bindungsstellen für das wasserlösliche Vitamin Biotin (Guesdon, Ternynck et al. 1979). Die Substitution von Avidin durch das aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isolierte Streptavidin verlängert die Haltbarkeit der Streptavidin-Enzym-Komplexe und reduziert den unspezifischen Hintergrund (Elias, Margiotta et al. 1989). Der immunhistologische Nachweis mit dieser Methode ist sehr sensitiv, daher können Primär- und Sekundärantikörper in höheren Verdünnungen eingesetzt werden als z.B. bei der Peroxidase-Anti-Peroxidase-Methode (Hsu, Raine et al. 1981; Hsu, Raine et al. 1981). Ein biotinylierter Brückenantikörper reagiert sowohl mit dem Primärantikörper, der gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet ist, als auch mit dem ABC-Komplex. Der Komplex entsteht dadurch, dass an drei von vier Bindungsstellen des Avidin ein Molekül Biotin bindet, das wiederum an ein

Enzym gekoppelt ist (Abb. 5). Hierbei kann es sich sowohl um alkalische Phosphatase als auch um Peroxidase handeln. Meistens wird mit einer Suspension aus Brückenantikörpern verschiedener Tierspezies gearbeitet, die als Multi-Link-Antikörper bezeichnet werden (Noll 2000).

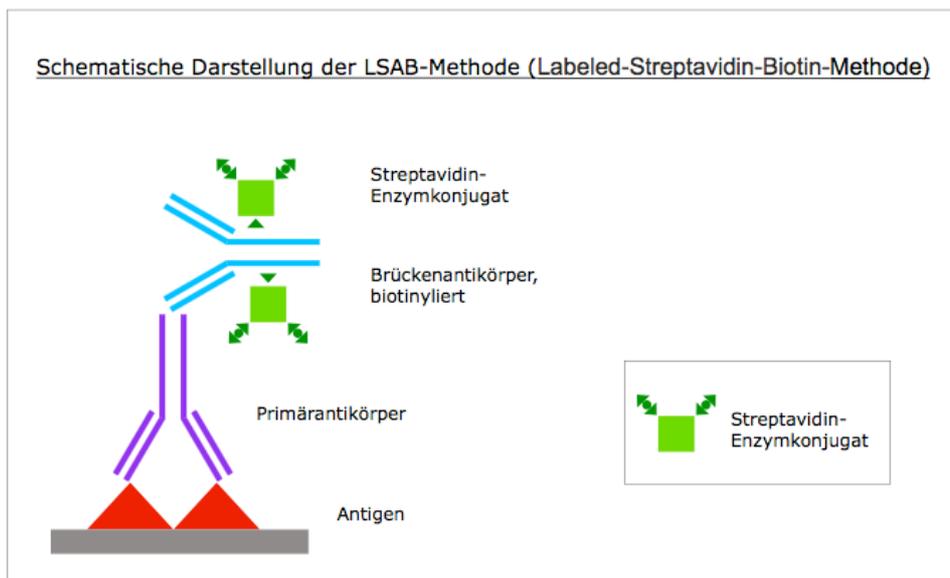
Die LSAB-Methode basiert ebenfalls auf der oben erläuterten Affinität von Avidin zu Biotin (Guesdon, Ternynck et al. 1979). Es wird der gleiche biotinylierte Brückenantikörper verwendet und in einem dritten Schritt ein direkt mit einem Enzym (in der Vorliegenden Arbeit Peroxidase) gebundenes (*labeled*) Avidin aufgetragen. Alle vier Bindungsstellen des Avidins sind für das am Brückenantikörper vorhandene Biotin frei. Als Vorteil gegenüber der ABC-Methode entstehen hierbei kleinere Reaktionskomplexe, die weniger zu räumlichen Behinderungen führen und somit deutlichere positive Signale erzeugen (Giorno 1984). Zur Freilegung der Epitope wurde ein „heat-induced-epitope-retrieval“ angewendet.



**Abb. 4: Schematische Darstellung der APAAP-Methode**



**Abb. 5: Schematische Darstellung der ABC-Methode**



**Abb. 6: Schematische Darstellung der LSAB-Methode**

#### 4.4.1. Verwendete Materialien und Ansatz von Lösungen

##### Primärantikörper

**Tabelle 1** In der Studie verwendete Primärantikörper

Antigen	Antikörper (Klon)	Verdünnung	Hersteller
CD20	L26	1:50	Dako
CD5	4C7	1:25	Novocastra
CD23	1B12	1:20	Novocastra
CD43	DFT1	1:50	Dako
Ig kappa-Leichtkette	Kaninchen, polyklonal	1:100000	Dako
Ig lambda-Leichtkette	HP6054	1:16000	Dako
IgD	Kaninchen, polyklonal	1:2000	Dako
IgM	Kaninchen, polyklonal	1:2000	Dako
IgG	Kaninchen, polyklonal	1:30000	Dako
VS38C	VS38c	1:50-1:100	Novocastra
Syndecan (CD138)	B-B4	1:10	Serotec
MUM1/IRF4	MUM1p	1:20	Dako
ZAP 70	2F3.2	1:1000	upstate cell signaling
Blimp-1	k.A.	1:4	zur Verfügung gest. von MA Piris
XBP1	k.A.	1:20	zur Verfügung gest. von MA Piris

##### **TBS (Tris Buffered Saline)**

34,25 g Tris-HCl

4,5 g Tris-Base

43,9 g NaCl

5 ml Tween wurden in 1000 l Aqua dest. gelöst und auf 5 Liter aufgefüllt.

(pH 7,4-7,6)

##### **Entwicklungspuffer**

Wurde von der Firma Dako hergestellt (S169984)

**Zitratpuffer**

10,5 g Zitronensäure

60 ml 2N NaOH wurden in 1000 l Aqua dest. gelöst und auf 5 Liter aufgefüllt.

(pH 6,0)

**Verdünnungsreagenz**

Antibody Diluent S202230, Firma Dako

**4.4.2. Ablauf der Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase-Methode**

- Anfertigung von 2-3 µm dicken Schnitten
- Entparaffinieren mit Xylol mindestens 10 Min.
- absteigende Alkoholreihe jeweils 2 Minuten, kurzzeitige Immersion in Aqua dest., Verbleib in TBS
- Hitze-Demaskierung („*Heat induced epitope retrieval*“) im Schnellkochtopf in Zitratpuffer, je nach Antikörper 2-5 Minuten
- Kühlung unter fließendem Wasser, Verbleib in TBS
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 Minuten
- Inkubation mit dem Primärantikörper 30 Minuten
- Inkubation mit Sekundärantikörper (rabbit anti-mouse) 30 Minuten
- Inkubation mit APAAP Immunkomplex 30 Minuten
- Inkubation mit Sekundärantikörper (rabbit anti-mouse) 10 Minuten
- Inkubation mit APAAP Immunkomplex 10 Minuten
- Inkubation mit Entwickler-Lösung
- Gegenfärbung: Aqua dest., Hämalaun, Leitungswasser
- Negativkontrolle: Weglassen des Primärantikörpers

### 2.4.3 Ablauf der Avidin-Biotin-Komplex-Methode

- Anfertigung von 2-3 µm dicken Schnitten
- Entparaffinieren mit Xylol mindestens 10 Minuten
- absteigende Alkoholreihe jeweils 2 Minuten, kurzzeitige Immersion in Aqua dest., Verbleib in TBS
- Hitze-Demaskierung („*Heat induced epitope retrieval*“) im Schnellkochtopf in Citratpuffer, je nach Antikörper 2-5 Minuten
- Kühlung unter fließendem Wasser, Verbleib in TBS
- Inkubation mit dem Primärantikörper 30 Minuten
- Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (anti-mouse+anti-rabbit) 30 Minuten
- Inkubation mit Streptavidin-Alkalische Phosphatase 30 Minuten
- Inkubation mit Entwickler-Lösung
- Gegenfärbung: Aqua dest., Hämalaun, Leitungswasser
- Negativkontrolle: Weglassen des Primärantikörpers

### 2.4.4 Ablauf der Labeled Streptavidin-Biotin-Methode

- Anfertigung von 2-3 µm dicken Schnitten
- Entparaffinieren mit Xylol mindestens 10 Minuten
- absteigende Alkoholreihe jeweils 2 Minuten, kurzzeitige Immersion in Aqua dest., Verbleib in TBS
- Hitze-Demaskierung („*Heat induced epitope retrieval*“) im Schnellkochtopf in Citratpuffer, je nach Antikörper 2-5 Minuten
- Kühlung unter fließendem Wasser, Verbleib in TBS
- Inkubation mit Peroxidase Block 5 Minuten
- Inkubation mit dem Primärantikörper 10 Minuten
- Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper 10 Minuten
- Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase 10 Minuten
- Färbung mit DAB (Diaminobenzidin) 5-10 Minuten

- Gegenfärbung: Aqua dest., Hämatoxilyn, Leitungswasser 2-5 Minuten
- Negativkontrolle: Weglassen des Primärantikörpers

#### **2.4.5 Auswertung der Immunhistochemischen Färbungen**

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde die Zahl der Tumorzellen mit Expression der verschiedenen verwendeten Antikörper in die Kategorien 0, <50%, >50% (CD5, CD23, CD43, MUM1, VS38c, CD138) und die Färbeintensität semiquantitativ in schwach, stark, schwach/stark (CD20) sowie negativ, schwach (+) , mittel (++) und stark (+++) (Blimp-1, XBP1) eingeteilt.

## **4.5. Molekularpathologie**

### **4.5.1. Monoklonalität**

Die IgH-PCR mit anschließender Kapillarelektrophorese (GeneScan) wurde eingesetzt, um Aussagen über die Klonalität der untersuchten B-Zellen treffen zu können.

Vorbereitend für die IgH-PCR wurden 20 µm dicke Schnitte des in Paraffin eingebetteten Gewebes angefertigt und die DNA mit dem QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Empfehlungen des Herstellers aufgereinigt. Zur Amplifikation der umgelagerten IgH-Gene wurden drei 5'-V<sub>H</sub> Primersets, die mit den V<sub>H</sub> Framework-Regionen korrespondieren (BioMed-2 FR1, FR2 und FR3) separat mit einem 3'-JH-Konsensus-Primer (JH22) eingesetzt. Die PCR-Bedingungen waren 35 Zyklen Denaturierung (95°C, 25 sec.), Primer-Annealing (60°C, 40 sec.) und Extension (72°C, 45 sec.).

Zum GeneScanning der PCR-Produkte müssen die Primer der PCR mit einem Fluorchrom markiert sein, um die Amplifikationsprodukte sichtbar zu machen. Die Fluorchrom-markierten, einzelsträngigen PCR-Produkte werden hierbei in einem kapillären Elektrophoresesystem (Applied Biosystems, Model 310A) nach ihrer Größe getrennt und anschließend automatisiert mit einem Laser detektiert. Entspricht das Ergebnis einer Gausschen Verteilung mit vielen Peaks unterschiedlicher PCR-Produkte, sind die Amplifikationsprodukte polyklonal. Ein einziger Peak hingegen, der nur aus einem PCR-Produkt besteht, spricht für eine monoklonale Zellproliferation (van Dongen, Langerak et al. 2003).

## 4.5.2. Verwendete Materialien und Ansatz von Lösungen

### Ausgangslösungen für IgH-PCR

10x Puffer (ABI-Puffer II oder ABI-Gold-Puffer, Applied Biosystems, Foster City, USA)

MgCl<sub>2</sub> [25 mmolar]

dNTP [100 mmolar]

Primer FR1 [100 pmol/μl] - bereits gemischt

Primer FR2 [100 pmol/μl] - bereits gemischt

Primer FR3 [100 pmol/μl] - bereits gemischt

Primer JH22 0 [100 pmol/μl]

Taq-Polymerase 5 Units/ μl (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems, Foster City, USA)

H<sub>2</sub>O

Verschiedene DNA-Lösungen [100ng/μl]

### 50ul Ansätze

1x Puffer

MgCl<sub>2</sub> [1,5mmolar]

dNTP 800 [μmolar]

FR1 – Primer 70 pmol

FR2 – Primer 70 pmol

FR3 – Primer 70 pmol

Primer JH22: 30 pmol

1 Unit Taq-Polimerase

DNA 100 ng

### Primerkombinationen

1. FR1-JH22
2. FR2-JH22
3. FR3-JH22

### **4.5.3. Ablauf der IgH-PCR**

#### **Thermocycling**

1. 10 min 95°C Aktivierung der Taq-Polymerase

2. 35 Zyklen:

- Denaturierung: 95°C, 25 sec.
- Primer-Annealing: 60°C, 40 sec.
- Extension: 72°C, 45 sec.

3. 10 min 72°C finale Extension

### **4.5.4. Ablauf des GeneScanning**

1. Vorbereitung des PCR-Produktes: 1 µl PCR-Produkt mit 9,5 µl (Hi-Di) Formamid und 0,5 µl ROX-400 Größenstandard bei 95°C zwei Minuten denaturiert und anschließend eine Stunde bei 4°C abgekühlt
2. 45 Minuten Elektrophorese (Polymer: 3100 POP4-Polymer, Puffer: 1x3100 EDTA-Puffer)
3. Messung der Probe bei einer Fluoreszenz-Signalintensität von bis zu 10 000 Fluoreszenz-Einheiten

### **4.5.5. Sequenzierung**

Die Sequenzierung der klonalen PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems).

- 10-50 ng PCR-Produkt mit 50 ng/µl Reamplifikationsprimer und 8µl Big Dye Terminator Mix mit aqua dest. auf 20µl auffüllen
- PCR in einem TC 9600 Cycler (Applied Biosystems) bei 95°C 2min, 25x (96°C 15 sec, 45°C 15 sec, 60°C 4 min, ramp 45 sec)
- Abtrennung der PCR-Produkte durch Aufreinigung über Sephadex G50 Superfine Säulen (Amershan Bioscience)
- Trocknen der DNA, anschließend Aufnahme in Formamidmix
- Resuspension im Dunkeln unter Schütteln
- Denaturierung 95°C 2 min
- Auftragen von 2µl der Probe auf ein 4,5%iges denaturierendes Sequenzgel

- Analyse in einem ABI PRISM 377 DNA Sequenzer (Applied Biosystems)

#### **4.5.6. Mutationsstatus**

Um den Mutationsstatus der Patienten bestimmen zu können, wurden die DNA-Sequenzen der klonalen PCR-Produkte zunächst durch den Vergleich der Sequenz eines DNA-Fragments der komplementären Stränge ermittelt (Sequence Navigator Vers. 1.0, Applied Biosystems) und anschliessend mit den korrespondierenden Sequenzen der Keimbahn in der IMGT Datenbank verglichen (Robinson, Halliwell et al.). Bei einer Abweichung von zwei Prozent oder mehr wurde die Sequenz als mutiert gewertet (Schroeder and Dighiero 1994; Chiorazzi, Rai et al. 2005).

## **4.6. Erhebung und Erfassung klinischer Daten**

Um die Daten der Studienteilnehmer zu erfassen und zu dokumentieren, wurde ein Erhebungsbogen entworfen, der an die Einsender der Proben verschickt wurde (s. Appendix). Der Erhebungsbogen erfasst den Namen, das Geburtsdatum des Patienten, das Binet-Stadium, das Rai-Stadium, die Lokalisation vergrößerter Lymphknoten, den Verlauf, die Therapie, den Therapieerfolg, die Laborwerte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, knochenmarkshistologische bzw. knochenmarkszytologische Daten und die Immunphänotypisierung des peripheren Blutes und des Knochenmarks.

### **4.6.1. Stadieneinteilung**

Zur Stadieneinteilung wurden die Binet-Klassifikation und die Rai-Klassifikation herangezogen (Rai, Sawitsky et al. 1975; Binet, Auquier et al. 1981).

### **4.6.2. Verlauf**

Der Abschnitt „Verlauf“ hält fest, ob der Patient noch am Leben oder bereits verstorben ist und ob bei der klinischen Untersuchung Organvergrößerungen von Leber und Milz oder B-Symptome (Fieber, Nachtschweiss, Gewichtsverlust) festgestellt wurden. Unter dem Begriff „Sonstiges“ konnten hier außerdem Angaben über das Vorliegen anderer maligner oder benignen Grund- und Begleiterkrankungen und gegebenenfalls ihrer Therapie gemacht werden.

### **4.6.3. Therapieerfolg**

Der Abschnitt „Therapieerfolg“ erfasst vollständige Remissionen, Teilremissionen, Rezidive, das Nichtansprechen auf eine Therapie, Transformationen (Richter-Syndrom), progressionsfreies Überleben und Progressionen im klinischen Verlauf der Patienten.

### **4.6.4. Laborwerte**

Die Laborwerte Leukozyten ( $10^3/\mu\text{l}$ ), Lymphozyten (%), Lymphozytenverdopplungszeit, Hämoglobin (g/dl), Thrombozyten ( $10^3/\mu\text{l}$ ), S-LDH

U/l, Serum-Immunglobuline (IgA, IgM, IgG), Serum- $\beta$ 2-Mikroglobulin (mg/l), Serum-Thymidinkinase (U/l) und Serum-Albumin zum Zeitpunkt der Diagnose der B-CLL wurden erhoben.

#### **4.6.5. Knochenmarks-Histologie/ -Zytologie**

Die Knochenmarksinfiltration wurde als diffus oder nicht-diffus erfasst, wobei der Begriff „nicht-diffus“ für die Formen nodulär, interstitiell oder für Mischformen steht. Des Weiteren konnte der Infiltrationsgrad in Prozent angegeben werden.

#### **4.6.6. Immunphänotypisierung**

Bei der Immunphänotypisierung wurden die mononukleären Zellen in Prozent angegeben, die für die folgenden Marker positiv waren: die Oberflächenmembranimmunglobuline IgM und IgD, die Leichtketten kappa und lambda, die Oberflächenmarker CD20, CD5, CD23, CD43, CD21, ZAP70 sowie die plasmazellulären Marker CD138 und MUM.1.

### **4.7. Statistische Auswertung**

Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe des *Statistical Package of Social Science (SPSS)* in der Version 18 erstellt. Das Gesamtüberleben der Patienten wurde vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Tod oder bis zu dem Zeitpunkt berechnet, ab dem es nicht mehr möglich war, klinische Daten zu dem jeweiligen Patienten zu ermitteln. Überlebenskurven wurden nach der Kaplan-Meier-Methode erstellt und mit dem log-rank Test verglichen. Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf  $p=0,05$  gesetzt.

Es wurden die Gruppen CLL mutiert vs. CLL unmutiert sowie CLL normal vs. CLL plasmazellulär differenziert bezüglich des Überlebens miteinander verglichen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Altersverteilung

Das Alter der 63 untersuchten Patienten lag zum Zeitpunkt der Charakterisierung im Konsultations- und Referenzzentrum für Lymphknotendiagnostik der Charité zwischen 27 und 99 Jahren, mit einem Median von 67 Jahren. Das Alter von 46 Patienten (73%) betrug zu diesem Zeitpunkt mehr als 60 Jahre, 17 Patienten (27%) waren älter oder gleich 60 Jahre alt.

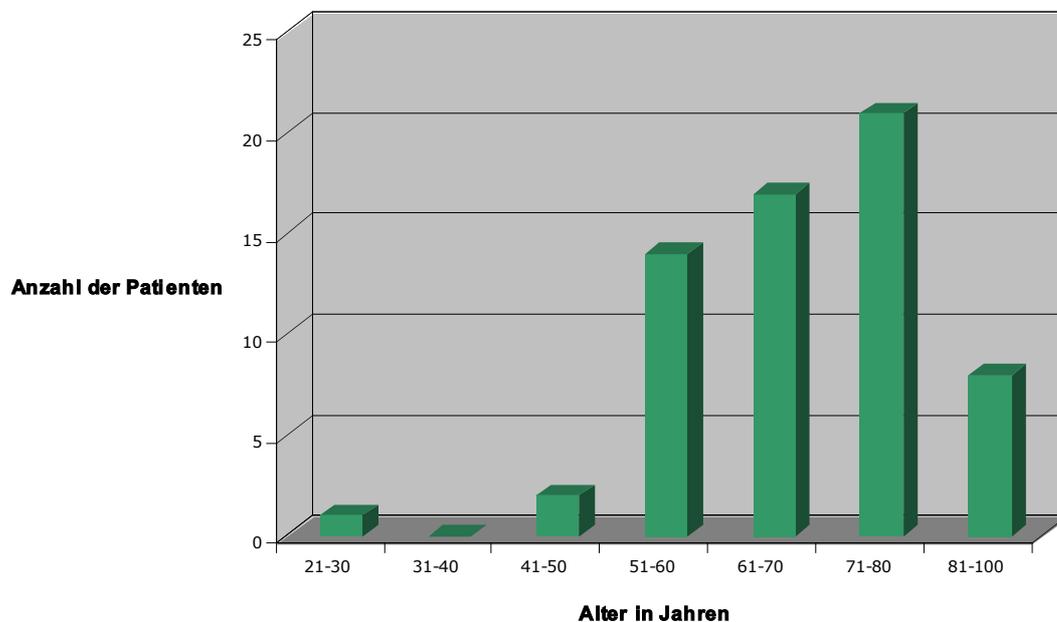
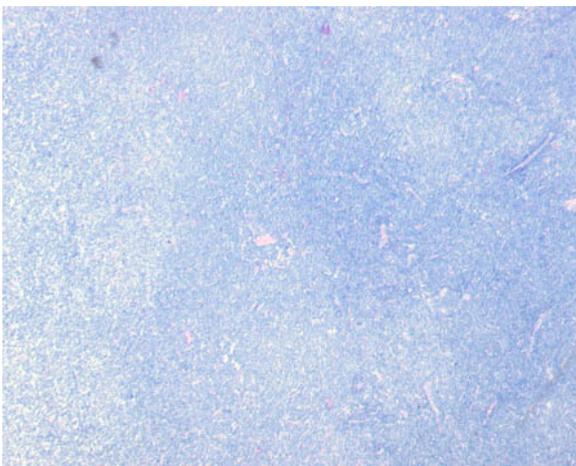


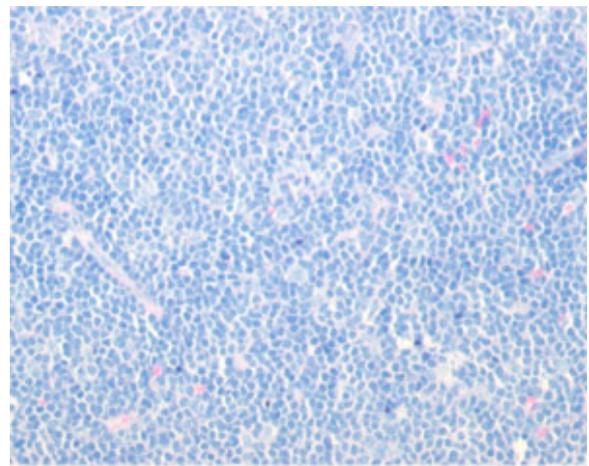
Abb. 7: Altersverteilung der Patienten zum Zeitpunkt der Charakterisierung

## 5.2. Morphologie

Das typische morphologische Bild einer B-CLL zeigt ein pseudofollikuläres Wachstumsmuster in der Übersicht (Abb. 8a). In der Vergrößerung lässt sich eine monomorphe Population von kleinen, atypischen lymphatischen Zellen mit runden bis ovalen Kernen, mäßig dichtem Kernchromatin und unauffälligen Nukleolen erkennen (Abb. 8b). Beigemischt sind wenige größere Prolymphozyten und Paraimmunoblasten.

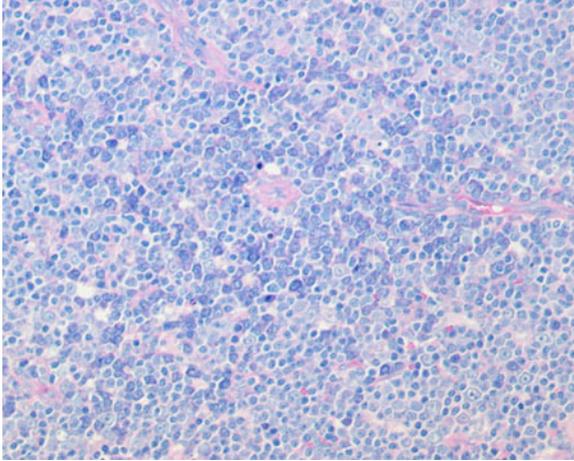


**Abb. 8a: Lymphknoten mit B-CLL/B-SLL und pseudofollikulärem Wachstumsmuster**  
(Giemsa, Vergrößerung x40)

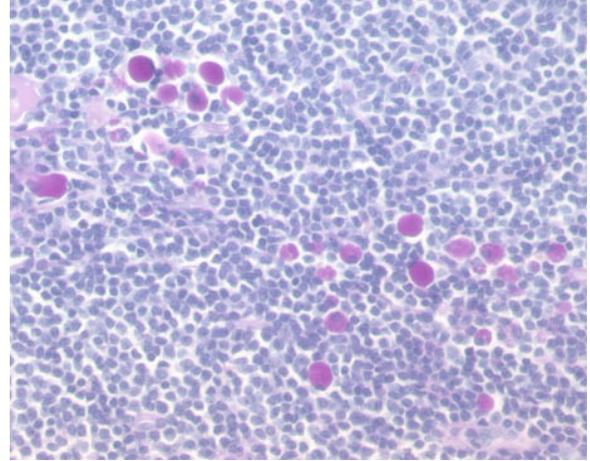


**Abb. 8b: Stärkere Vergrößerung einer B-CLL/B-SLL**  
aus kleinen lymphozyten-artigen Tumorzellen mit  
Beimischung von größeren Prolymphozyten und  
Paraimmunoblasten (Giemsa, x100)

Als B-CLL/B-SLL mit plasmazellulärer Differenzierung wurden alle Fälle eingestuft, bei denen über zehn Prozent der Tumorzellen morphologische Zeichen einer plasmazellulären Differenzierung und eine monotypische Expression der Immunglobulin-Leichtketten aufwiesen. Zu den typischen morphologischen Zeichen einer plasmazellulären Differenzierung zählen: exzentrisch gelegene Kerne, basophiles Zytoplasma und Dutcher/Russel-Körperchen (Abb. 9a und b).



**Abb. 9a: CLL/SLL mit plasmazellulärer Differenzierung**  
und einer Tumorzellpopulation mit basophilem Zytoplasma (Giemsa, x100)



**Abb. 9b: CLL/SLL mit plasmazellulärer Differenzierung**  
und zahlreichen Russel-Körperchen (PAS-Reaktion, x200)

Morphologisch zeigten 56 von 63 CLL-Fällen ein pseudofollikuläres Wachstumsmuster, wohingegen sich in 7 von 63 Fällen ein diffuses Wachstumsmuster fand (zusammengefasst in Tab. 2). Die Morphologie der Kerne war in 34 von 63 Fällen rund, in 29 von 63 irregulär. In 21 von 63 Fällen konnten wenig, in 29 von 63 Fällen mäßig viele und in 13 von 63 Fällen viele Paraimmunoblasten nachgewiesen werden. Residuelle Keimzentren fanden sich in 47 von 63 Fällen nicht, in 9 von 63 Fällen wenige und in 7 von 63 Fällen mäßig viele. Die Zeichen der plasmazellulären Differenzierung konnten in über zehn Prozent der Tumorzellen bei 20 von 63 Fällen nachgewiesen werden, davon in 7 von 50 Fällen (14 %) des 1. Patientenkollektives.

**Tabelle 2 Morphologische Charakterisierung der CLL-Fälle**  
Morphologisches Merkmal

Wachstumsmuster	pseudofollikulär 56/63 (89%)	diffus 7/63 (11%)	
Kerne	rund 34/63 (54%)	irregulär 29/63 (46%)	
Paraimmunoblasten	(+) 21/63 (33%)	+ 29/63 (46%)	++ 13/63 (21%)
residuelle Keimzentren	0 47/63 (75%)	+ 9/63 (14%)	++ 7/63 (11%)
plasmazelluläre Differenzierung	plasmaz. Diff. 20/63 (32%)	keine plasmaz. Diff. 43/63 (68%)	

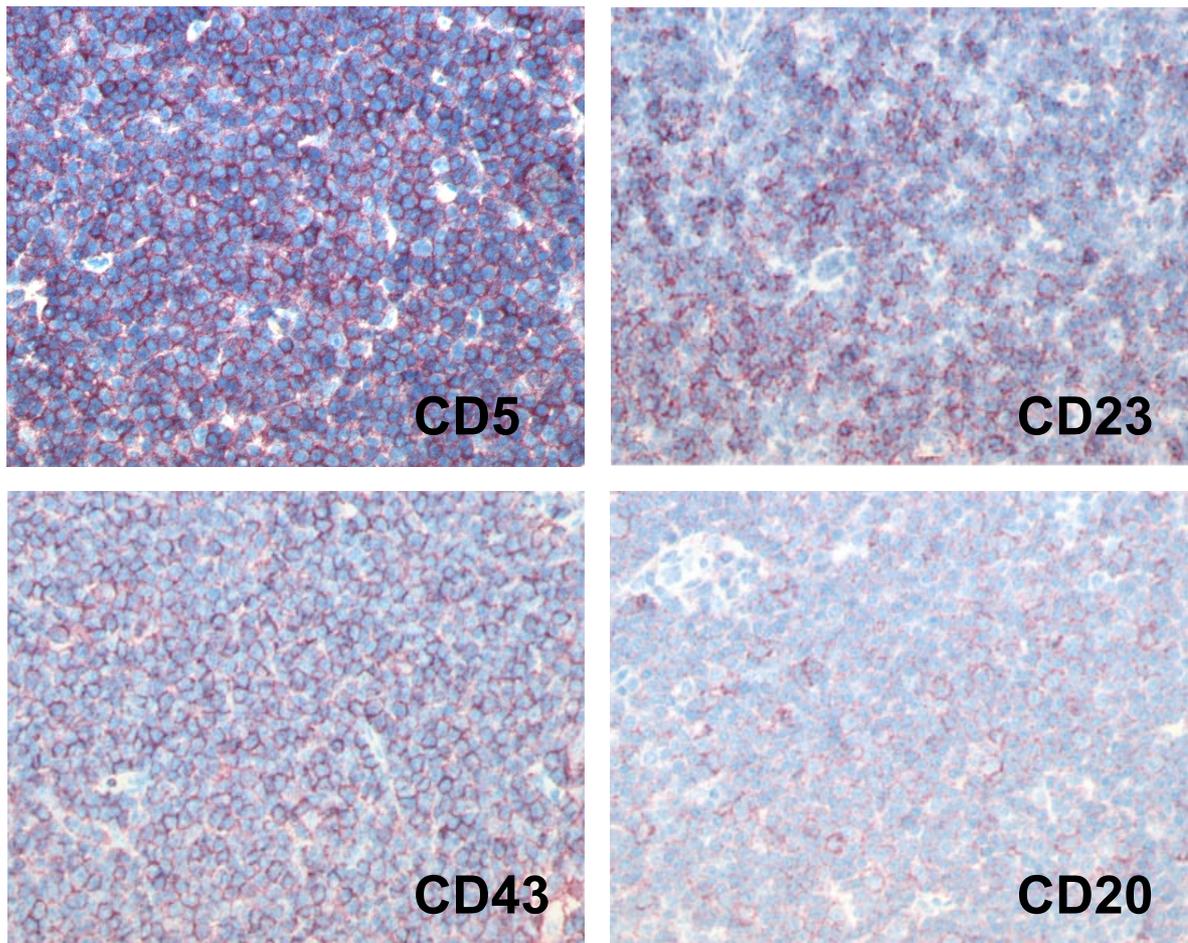
### 5.3. Immunphänotyp

#### 5.3.1. Expression von B-CLL typischen Markern

Tabelle 3 zeigt die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der B-Zell-assoziierten Membranantigene CD5, CD23, CD43 und CD20. Nahezu alle Fälle zeigten einen B-CLL/B-SLL-typischen Immunphänotyp mit Expression von CD5, CD23 und CD43 sowie eine unterschiedlich kräftige Expression des Pan-B-Zellmarkers CD20 (Abb. 10).

**Tabelle 3 Oberflächenmarker B-CLL**

	<b>0</b>	<b>&lt;50%</b>	<b>&gt;50%</b>
<b>CD5</b>	3/63 (5%)	13/63 (20%)	47/63 (75%)
<b>CD23</b>	-	21/63 (33%)	42/63 (67%)
<b>CD43</b>	2/63 (3%)	7/63 (11%)	54/63 (86%)
	<b>weak</b>	<b>strong</b>	<b>weak/strong</b>
<b>CD20</b>	15/63 (24%)	9/63 (14%)	39/63 (62%)



**Abb. 10: Typischer Immunphänotyp der B-CLL/B-SLL**  
mit kräftiger Expression von CD5, CD23 und CD43 sowie unterschiedlich kräftiger Expression von CD20 (APAAP-Methode, x100)

### **5.3.2. Expression der Immunglobulin-Leichtketten kappa und lambda**

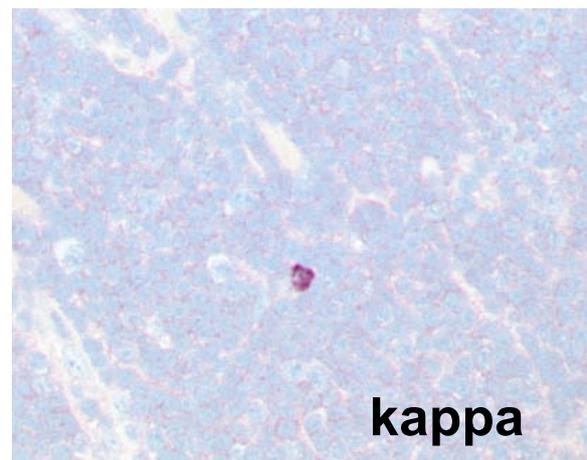
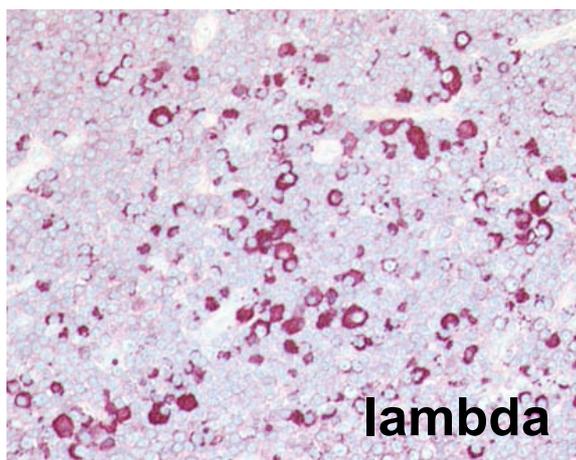
Nach der morphologischen Einteilung der B-CLL/B-SLL-Fälle in die Gruppen „mit plasmazelluläre Differenzierung“ (20/63) und „konventionelle Morphologie/keine plasmazelluläre Differenzierung“ (43/63) wurden die Fälle nach dem Kriterium der monotypischen Expression einer Immunglobulin-Leichtkette (kappa/lambda) erneut in die zwei Gruppen geteilt. Hierbei zeigten 29 von 63 Fällen eine monotypische Leichtkettenexpression. Alle Fälle, die sowohl die morphologischen Kriterien erfüllten als auch eine monotypische Leichtkettenexpression zeigten, wurden letztendlich als plasmazellulär differenziert gewertet (18/63).

#### Tabelle 4 Plasmazelluläre Differenzierung

Kriterien der plasmazellulären Differenzierung

---

monotypische Leichtkettenexpression	29/63 (46%)
kappa	16/63 (25%)
lambda	13/63 (21%)
<hr/>	
morphologischer Nachweis der plasmaz. Diff.	20/63 (32%)
<hr/>	
<b>monotyp. Leichtkettenexpr. und morph. Nachweis</b>	<b>18/63 (28%)</b>



**Abb. 11: B-CLL/B-SLL mit monotypische Leichtkettenexpression** lambda (links) und Negativität für kappa (rechts) mit einer reaktiven Plasmazelle als positive intrinsische Kontrolle (APPAP-Methode, x200).

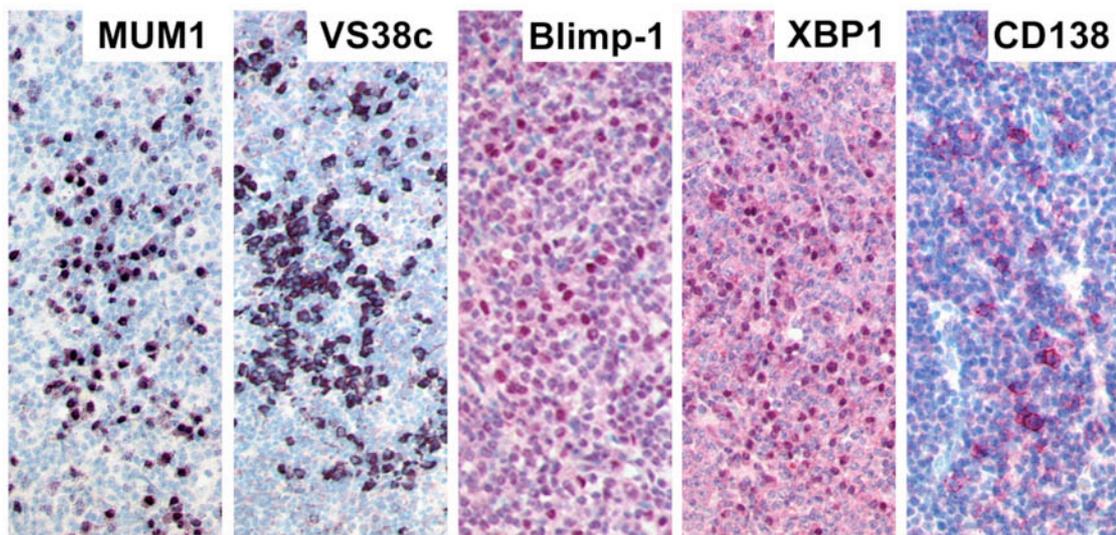
#### 5.3.3. Expression von Markern plasmazellulärer Differenzierung

Nachdem die Fälle morphologisch und anhand der immunhistochemischen Färbung der Immunglobulin-Leichtketten in die zwei Gruppen „plasmazellulär differenziert“ und „keine plasmazelluläre Differenzierung“ eingeteilt wurden, wurden die Ergebnisse zusätzlich mit der Expression von fünf Plasmazellmarkern korreliert: IRF4/MUM1, VS38c, Blimp-1, XBP1 und CD138.

**Tabelle 5 Expression von Markern plasmazellulärer Differenzierung**

	B-CLL konventionell	B-CLL plasmazellulär
MUM1 (>50%)	12/45 (27%)	8/18 (44%)
VS38c (>50%)	20/45 (44%)	11/18 (61%)
Blimp-1 (++/+++)	4/45 (9%)	8/18 (44%)
XBP1 (++/+++)	8/45 (18%)	7/18 (39%)
CD138 (>10%)	4/45 (9%)	3/18 (17%)
<b>&gt;2 Plasmazellmarker</b>	<b>6/45 (13%)</b>	<b>12/18 (67%)</b>

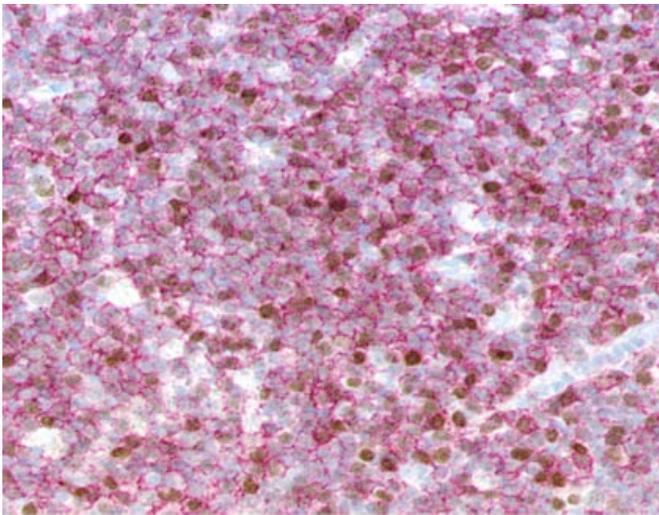
Tabelle 5 zeigt die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der plasmazell-assoziierten Membranantigene Mum1, VS38c, Blimp, XBP1 und CD138. Eine Expression von mehr als zwei Plasmazellmarkern konnte in 67% der Fälle nachgewiesen werden, die zuvor morphologisch als plasmazellulär differenziert identifiziert worden waren. Lediglich 13% der Fälle, bei denen morphologisch keine plasmazelluläre Differenzierung nachgewiesen werden konnte, zeigten eine Expression von mehr als zwei Plasmazellmarkern.



**Abb. 12: Immunhistologische Expression der fünf untersuchten Plasmazell-Marker (MUM1, VS38c, Blimp-1, XBP1 und CD138) in einer B-CLL mit plasmazellulärer Differenzierung**

### 3.3.4. Mehrfachmarkierungen zur Charakterisierung der plasmazellulär differenzierten Zellpopulation

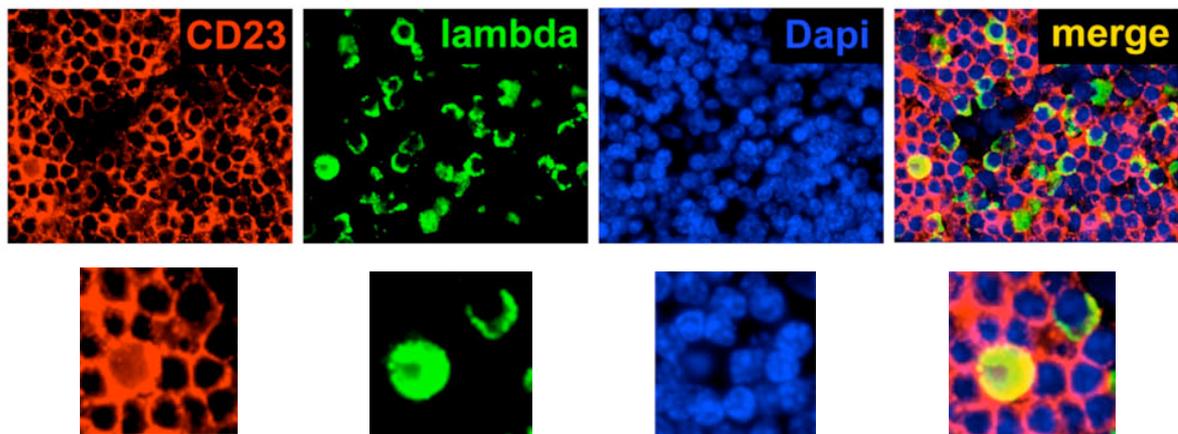
Die B-CLL/B-SLL-Fälle mit plasmazellulärer Differenzierung wurden zusätzlich noch mit Hilfe von Mehrfachmarkierungen zur näheren Charakterisierung der plasmazellulär differenzierten Zellpopulation untersucht. Dabei wurde immunhistologisch eine Doppelmarkierung CD23 und IRF4/MUM1 durchgeführt (Abb. 13).



**Abb. 13: Immunhistologische Doppelmarkierung**

IRF4/MUM1 (braun, nukleär)/CD23 (rot, membranös) zum Nachweis einer Ko-Expression von CD23 der IRF4/MUM1 positiven plasmazellulär differenzierten Zellpopulation (APPAP/ABC-Methode, x100).

Weiterhin wurden immunfluoreszenzoptische Mehrfachmarkierungen angefertigt unter Verwendung von Primärantikörpern gegen die Immunglobulinleichtketten kappa bzw. lambda und CD23 sowie fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper (Abb. 14).



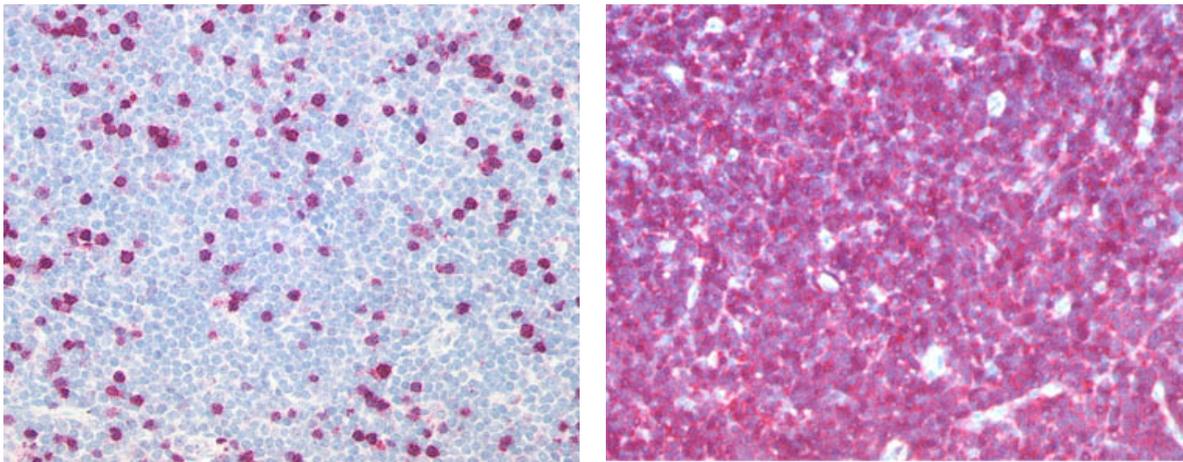
**Abb. 14: Immunfluoreszenzoptische Mehrfachmarkierung einer B-CLL/B-SLL mit Expression von CD23**

(rot, Alexa A555), monotypischer Expression der Immunglobulinleichtkette lambda (grün, Alexa A488) und DAPI-Kernfärbung (blau). Die Überlagerung zeigt eine Ko-Expression von lambda/CD23 (gelb) (obere Reihe x200; untere Reihe, Ausschnitt x600)

Mit Hilfe der Mehrfachmarkierungen konnte somit gezeigt werden, dass die plasmazellulär differenzierte Zellpopulation eine Ko-Expression von CD23 aufweist und somit erwartungsgemäß der Tumorzellpopulation zugehörig ist.

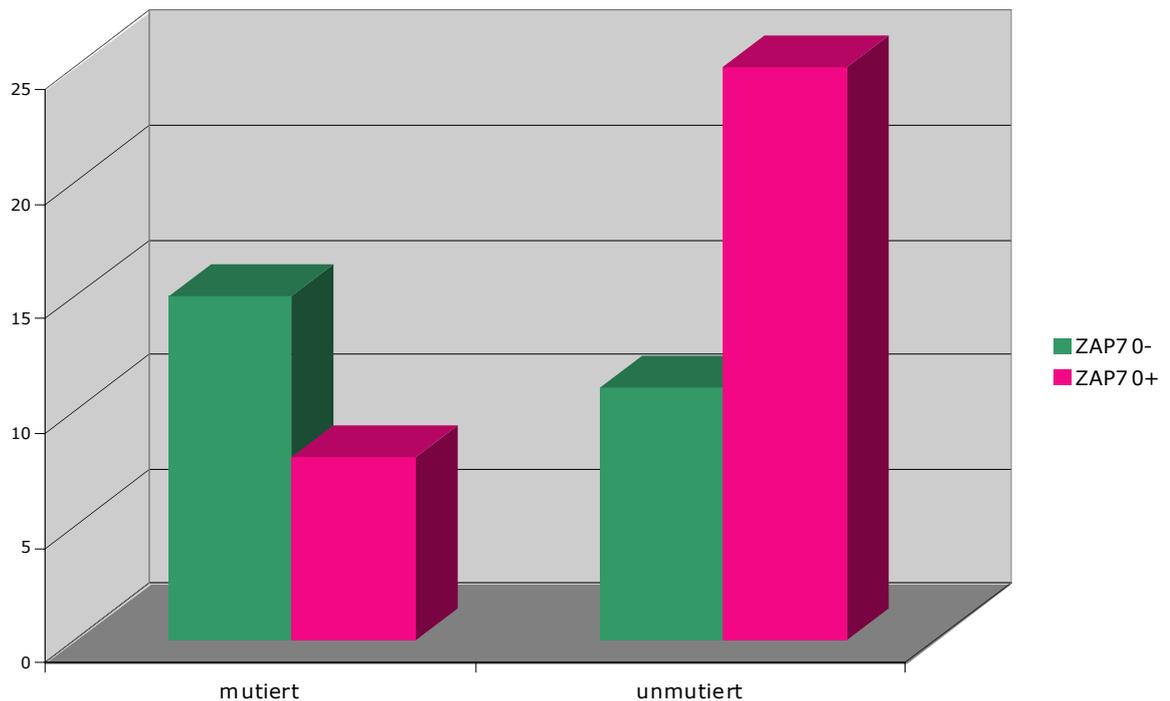
#### 5.3.4. Expression von ZAP70

Die immunhistologische Expression von ZAP70 ist als Surrogatmarker für den Mutationsstatus der B-CLL/B-SLL beschrieben. Eine fehlende Expression von ZAP70 der Tumorzellen spricht für eine Abstammung von mutierten (memory) B-Zellen mit besserer Prognose, wohingegen eine Expression von ZAP70 für eine Abstammung von unmutierten (naiven) B-Zellen spricht (Abb. 15).



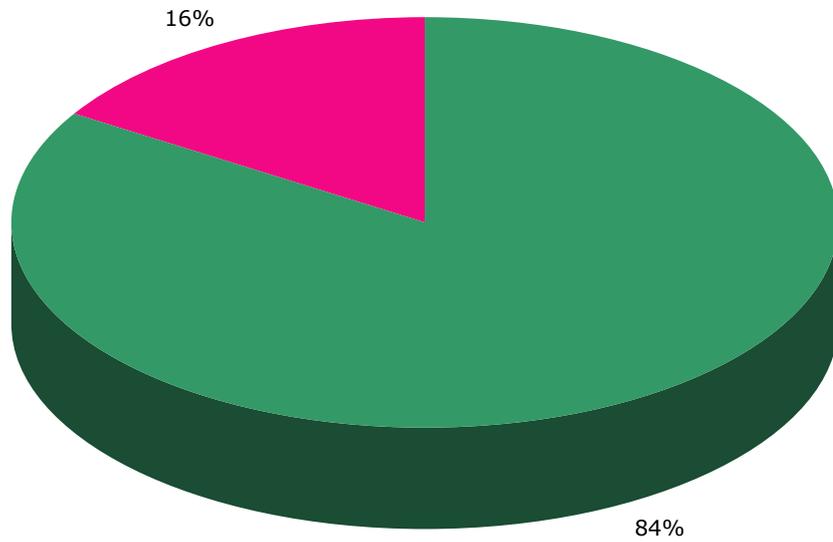
**Abb. 15: Immunhistochemische Expressionsanalyse von ZAP 70**

mit Negativität der Tumorzellen in einer B-CLL mit mutiertem IgH-Status (links) bei positiver intrinsischer Kontrolle anhand der reaktiven T-Zellen sowie Positivität der Tumorzellen bei unmutiertem IgH-Status (rechts) (ABC-Methode, x100).



**Abb. 16: Expression von ZAP70 in Korrelation mit dem Mutationsstatus**

Auf Abbildung 16 ist die Expression von ZAP70 in Korrelation mit dem Mutationsstatus (siehe 3.4 Molekularpathologie) dargestellt. Von 23 Fällen, bei denen somatische Mutationen nachgewiesen werden konnten, fiel der immunhistochemische Nachweis von ZAP70 in 18 Fällen (78%) negativ und in 4 Fällen (17%) positiv aus, ein Fall konnte nicht ausgewertet werden. Die Gruppe, bei der keine somatischen Keimbahnmutationen nachgewiesen werden konnte, zeigte in 29 von 36 Fällen (81%) eine Expression von ZAP 70 und in 5 von 36 (14%) Fällen keine; zwei Fälle konnten nicht ausgewertet werden. Es konnte also in 47 von 56 Fällen (84%) eine Übereinstimmung der Expression von ZAP70 mit dem Mutationsstatus nachgewiesen werden.



**Abb. 17: Übereinstimmung ZAP70 Expression mit dem IgH-Mutationsstatus**

In 47 von 56 Fällen (84%) konnte eine Übereinstimmung der Expression von ZAP70 mit dem Mutationsstatus nachgewiesen werden (siehe 3.4 Molekularpathologie)

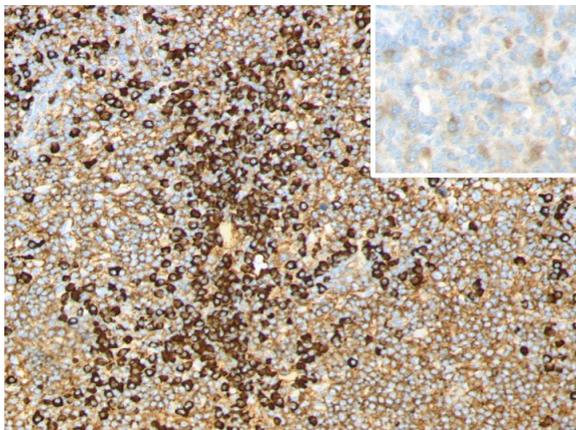
### 5.3.5. Expression von IgM und IgD

Die Expression von IgM und IgD der neoplastischen B-Zellen kann einen Hinweis auf die Entwicklungsstufe der B-Zelle bzw. einen bereits erfolgten Antigenkontakt geben (s. Abb. 2). Daher wurde ermittelt, welche Fälle eine Ko-Expression von IgM und IgD und welche Fälle nur eine Expression von IgM aufweisen bei Negativität für IgD. Beide Gruppen wurden mit dem Vorhandensein von somatischen Mutationen sowie einer plasmazellulären Differenzierung in Korrelation gebracht.

Während die Fälle ohne somatische Mutation und ohne plasmazelluläre Differenzierung hauptsächlich IgM und IgD exprimieren (87,5%), sind die Fälle ohne Mutationen aber mit plasmazellulärer Differenzierung tendenziell nur IgM-positiv (64%). Die Fälle mit somatischen Mutationen zeigten unabhängig von der plasmazellulären Differenzierung überwiegend eine Expression von IgM bei Negativität für IgD (69% IgH unmutiert konventionell, 75% IgH unmutiert plasmazellulär).

**Tabelle 6 Expression von IgM und IgD in Korrelation mit dem Mutationsstatus und dem Vorhandensein einer plasmazellulären Differenzierung**

	IgH unmutiert, konventionell	<b>IgH unmutiert, plasmazellulär</b>	IgH mutiert, konventionell	IgH mutiert, plasmazellulär
IgM+/IgD+	21/24 ( 87,5%)	<b>4/11 (36%)</b>	4/13 (31%)	1/4 (25%)
IgM+/IgD-	3/24 (12,5%)	<b>7/11 (64%)</b>	9/13 (69%)	3/4 (75%)



**Abb. 18: Immunhistochemischer Nachweis einer Expression der Immunglobulinschwerkette IgM in einer unmutierten B-CLL/B-SLL mit plasmazellulärer Differenzierung**

## 5.4. Molekularpathologie

Zur Bestimmung des Mutationsstatus wurden die DNA-Sequenzen der PCR-Produkte mit den korrespondierenden Keimbahnsequenzen verglichen. Abbildung 19 zeigt beispielhaft einen solchen Vergleich. Die Abweichungen von den Keimbahnsequenzen stellen Mutationen dar. Der hier abgebildete Fall (H203-00) wurde als mutiert gewertet, da in mehr als 2% der Sequenz eine Abweichung von der Keimbahnsequenz gezeigt werden konnte.

```

<----- FR1-IMGT -----
L33851 IGHV3-74*01      gaggtgcagctggtggagtcggggga...ggcttagttcagcctggggggtccctgaga
H203-00                .....

----->_____ CDR1-IMGT _____<-----
L33851 IGHV3-74*01      ctctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtagctactgg.....atgcac
H203-00                .....

----- FR2-IMGT ----->_____ CDR
L33851 IGHV3-74*01      tgggtcgcgccaagctccagggaggggctggtgtgggtctcacgtattaatagtgatggg
H203-00                -----g-----gg-----c-----

2-IMGT _____<-----
L33851 IGHV3-74*01      agtagcaca.....agctacgcggactccgtgaag...ggccgattcacatctccaga
H203-00                -cc-t-----t-----g-----

----- FR3-IMGT -----
L33851 IGHV3-74*01      gacaacgccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagctctgagagccgaggacaggct
H203-00                -----t-----gg-----a-----

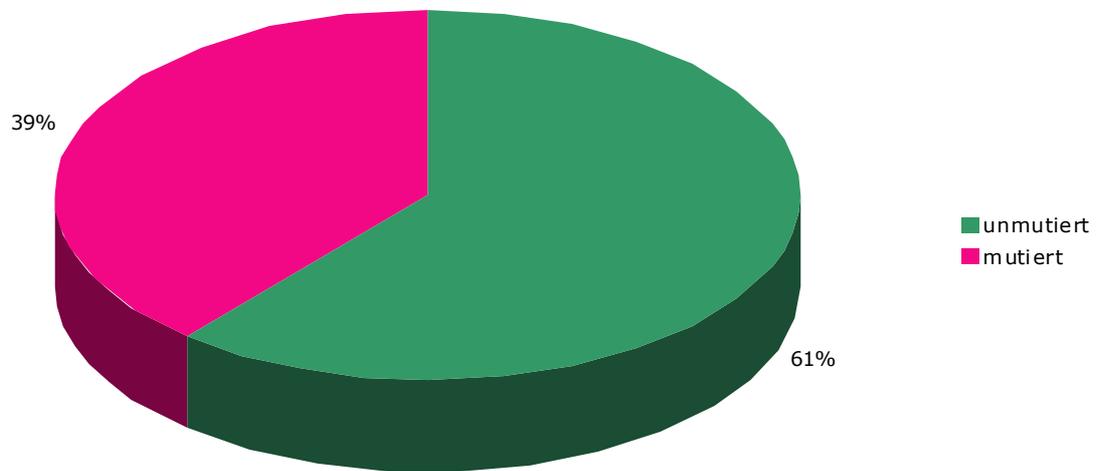
-----> CDR3-IMGT
L33851 IGHV3-74*01      gtgtattactgtgcaagaga
H203-00                --a----t---c-----cgtctgaggggtcgactacggtgactattgggactacttctat

L33851 IGHV3-74*01
H203-00                tacggtatggacgtctggggccaaggnaccctggtcaca  IGHJ6*02

```

### Abb. 19: Mutationsstatus von Fall H203-00

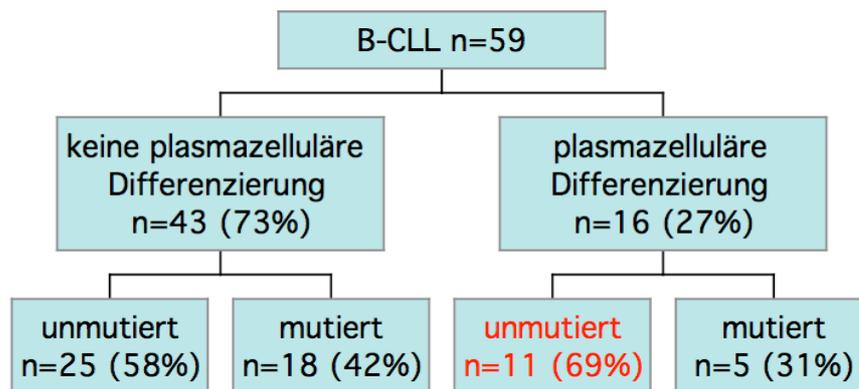
Vergleich der DNA-Sequenz des PCR-Produktes von Fall H203-00 (untere Reihe) mit der korrespondierenden Keimbahn-Sequenz (obere Reihe) zur Bestimmung des Mutationsstatus: Die Abweichung von der Keimbahnsequenz stellen Mutationen dar



**Abb. 20: Verteilung Mutationsstatus**

39% der Fälle wurden in die Gruppe „mutiert“, 61% in die Gruppe „unmutiert“ eingeteilt

Aufgrund der molekularpathologischen Untersuchungen konnten in 39% der Fälle somatische Mutationen nachgewiesen werden, 61% der Fälle wurden in die Gruppe „unmutiert“ eingeordnet. Bei einer Abweichung der DNA-Sequenzen von den korrespondierenden Keimbahnsequenzen von zwei Prozent oder mehr wurde der Fall als mutiert gewertet (Chiorazzi, Rai et al. 2005). In 4/63 Fällen war eine direkte Sequenzierung nicht möglich, da eine bi-allelische Umlagerung vorlag und beide Amplifikate aufgrund einer ähnlichen Amplifikatgröße nicht getrennt sequenziert werden konnten.



**Abb. 21: Plasmazelluläre Differenzierung in Korrelation mit dem Mutationsstatus**

Die Fälle, die keine plasmazelluläre Differenzierung aufwiesen, wurden in 58% (25 von 43) als unmutiert und in 42% (18 von 43) als mutiert charakterisiert. In der Gruppe der plasmazellulär differenzierten Fälle – in der aufgrund der B-Zell-Entwicklung eine Abstammung von mutierten (memory) B-Zellen zu erwarten wäre – zeigte ein Großteil der Fälle jedoch einen unmutierten IgH-Status: 69% (11 von 16) zeigten keine somatischen Mutationen, 31% (5 von 16) der Fälle zeigten somatische Mutationen.

## 5.5. Überlebenswahrscheinlichkeit

Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Tod bzw. bis zu dem Zeitpunkt, ab dem es nicht mehr möglich war, Daten zu dem jeweiligen Patienten zu ermitteln. Er betrug mindestens 1 Monat und maximal 216 Monate, mit einem Median von 79 Monaten. 6 Patienten, die im Beobachtungszeitraum an einem Zweitmalignom verstorben sind, wurden bei der Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeiten nicht berücksichtigt. Bei den übrigen Patienten, die im Beobachtungszeitraum verstorben sind, konnte aufgrund der klinischen Angaben von einer B-CLL-bedingten Todesursache ausgegangen werden. In 11 von 63 Fällen (17%) war es trotz erheblicher Mühen aufgrund des langen Zeitintervalls von z.T. über 10 Jahren vom Datum der Lymphknotenbiopsie zum Zeitpunkt der Datenerhebung nicht möglich, die entsprechenden Überlebensdaten zu ermitteln.

Während 18 von 46 Patienten (39%) bis zum Ende der Datenerhebung noch am Leben waren, waren 28 von 46 (61%) Patienten bereits verstorben. Die mittlere Überlebenszeit der Patienten, die bei Abschluss der Datenerhebung bereits verstorben waren, betrug 58 Monate vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Zeitpunkt des Todes.

Der Vergleich der Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit vom Mutationsstatus zeigte, dass Patienten, deren Tumorzellen somatische Mutationen aufweisen, eine signifikant längere Überlebenszeit aufweisen als Patienten, deren Tumorzellen keine somatischen Mutationen aufweisen (Abb. 22,  $p=0,003$ ).

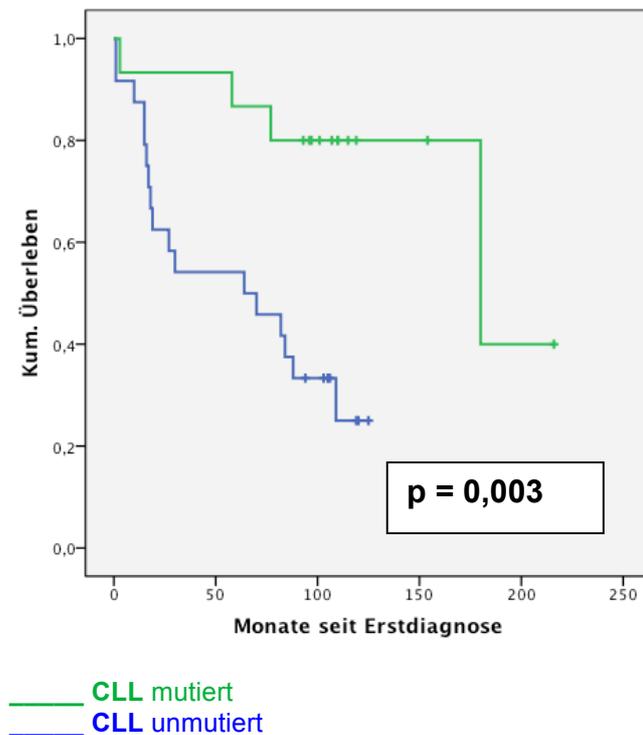
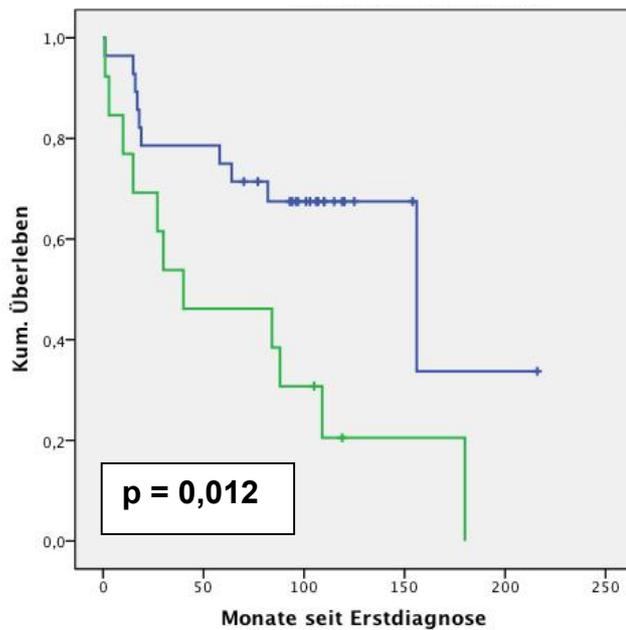


Abb. 22: Kaplan-Meier-Kurve der Patienten mit B-CLL (n=46) in Abhängigkeit vom Mutationsstatus

Wird die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Vorhandensein einer plasmazellulären Differenzierung dargestellt (Abb. 23), so zeigt sich eine signifikant kürzere Überlebenszeit für die Fälle mit plasmazellulärer Differenzierung ( $p = 0,012$ ).



— CLL (plasmazellulär)  
— CLL (konventionell)

**Abb. 23: Kaplan-Meier-Kurve der Patienten mit B-CLL (n=46) in Abhängigkeit vom Vorhandensein einer plasmazellulären Differenzierung**

## **6. Diskussion**

### **6.1. Morphologie und Immunhistochemie**

Alle CLL-Fälle, in denen über zehn Prozent der Tumorzellen die morphologischen Zeichen einer plasmazellulären Differenzierung (exzentrische Kerne, basophiles Zytoplasma, Dutcher/Russel-Körperchen) und eine monotypische Expression der Immunglobulin-Leichtketten aufwiesen, wurden in dieser Studie als plasmazellulär differenziert gewertet (18/63) (Coupland, Dallenbach et al. 2000; Swerdlow, Campo et al. 2008). Dabei konnte eine gute Korrelation der Morphologie von Fällen der B-CLL mit plasmazellulärer Differenzierung mit der Expression von Plasmazellmarkern nachgewiesen werden: 67% der Fälle, die morphologisch als plasmazellulär differenziert identifiziert wurden, zeigten eine Expression von mehr als zwei Plasmazellmarkern. Dies bestätigt die Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen, die sich mit dem Nachweis von Plasmazellmarkern in B-NHL beschäftigt haben. Während die Bedeutung von VS38c, CD138 und IRF4/MUM1 als Plasmazellmarker bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte (Sanderson, Lalor et al. 1989; Jago, Robillard et al. 1999; Falini, Fizzotti et al. 2000; Tsuboi, Iida et al. 2000), sind Blimp-1 und XBP1, die uns freundlicherweise von Prof. Dr. M. A. Piris (Madrid, Spanien) zur Verfügung gestellt wurden, noch wenig als Plasmazellmarker an B-NHL untersucht. Arbeitsgruppen wie die von Garcia et al. konnten allerdings bereits das Potential von Blimp-1 als Plasmazell-Marker zeigen (Cattoretti, Angelin-Duclos et al. 2005; Garcia, Roncador et al. 2006). Blimp-1 und XBP-1 sind wichtige Bestandteile des Regulationsmechanismus der Plasmazelldifferenzierung (Calame, Lin et al. 2003; Lin, Tunyaplin et al. 2003) und somit als Plasmazellmarker interessant. In unserer Studie zeigten 44% der plasmazellulär differenzierten Fälle eine mäßige bis starke Expression von Blimp1 bzw. 39% von XBP1, wohingegen die Fälle ohne plasmazelluläre Differenzierung nur in 9% bzw. 18% eine entsprechende Expression aufwiesen.

Die verschiedenen Plasmazell-Marker können in unterschiedlichen Stadien der plasmazellulären Differenzierung nachgewiesen werden (Abb. 1). Das in unserer Arbeit dargestellte Muster der Plasmazellmarkerexpression mit einer schwachen

Expression von CD138 spricht für ein eher frühes Stadium der plasmazellulären Differenzierung der neoplastischen B-Zellen der CLL. Dies passt gut zu der Tatsache, dass es sich bei der B-CLL um ein B-NHL mit plasmazellulärer Differenzierung handelt und nicht um eine Neoplasie mit Ausgang von terminal differenzierten Plasmazellen wie beim Multiplen Myelom/Plasmozytom.

Die in Abbildung 13 und 14 dargestellten Mehrfachmarkierungen (MUM1/CD23 bzw. IgL/CD23) belegen, dass die plasmazellulär differenzierten B-Zellen zur Tumorzellpopulation gehören und es sich dabei nicht um reaktive „Bystander“-Plasmazellen handelt.

Die Transformation der B-CLL in ein aggressives Lymphom im Sinne eines Richter-Syndroms ereignet sich selten (ca. 3,5% aller Fälle). In unserer Arbeit ist der Anteil an Fällen mit einer Transformation in ein Richter-Syndrom höher (6,3%), was sich erklären lässt durch die Tatsache, dass es sich bei den von uns untersuchten Fällen überwiegend um Konsilfälle handelt.

## **6.2. Mutationsstatus und ZAP70**

Verschiedene Studien haben eine Korrelation zwischen der Expression des zeta-assoziierten Protein 70 (ZAP70) und der Mutation der variablen Region der Schwereketten des Immunglobulins nachgewiesen und somit die Bedeutung von ZAP70 als prognostischem Marker aufgezeigt (Rosenwald, Alizadeh et al. 2001; Crespo, Bosch et al. 2003; Wiestner, Rosenwald et al. 2003; Orchard, Ibbotson et al. 2004; Rassenti, Huynh et al. 2004).

Unsere Ergebnisse bestätigen die bereits publizierten Daten an einer großen Zahl von B-CLL/B-SLL-Fällen mit Lymphknotenmanifestation: es konnte in 47 von 56 Fällen (84%) eine Übereinstimmung der Expression von ZAP70 mit dem Mutationsstatus nachgewiesen werden. Der Nachweis von ZAP70 ist demnach mit dem Fehlen somatischer Mutationen und einer ungünstigen Prognose assoziiert, wohingegen eine ZAP70-Negativität für das Vorliegen von somatischen Mutationen und eine günstige Prognose spricht.

Auch wenn die Technik zur IgV<sub>H</sub>-Sequenzanalyse zur Verfügung steht, sprechen der hohe Kosten- und Zeitaufwand gegen eine routinemäßige Einführung dieser Methode. Aus diesem Grund ist ZAP70 als Surrogatmarker des Mutationsstatus von großem Interesse für die Routinediagnostik und weitere Therapieplanung (Crespo, Bosch et al. 2003; Durig, Nuckel et al. 2003; Schroers, Griesinger et al. 2005).

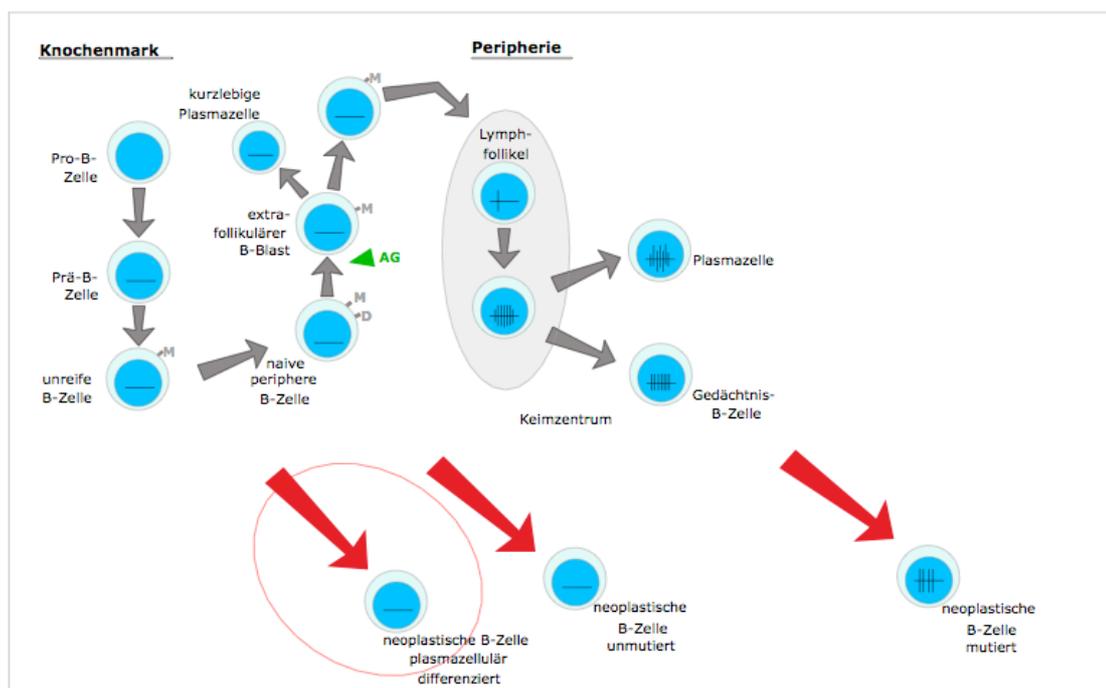
## **6.3. Mutationsstatus und plasmazelluläre Differenzierung**

In einem Teil der B-CLL-Manifestationen lässt sich eine plasmazelluläre Differenzierung nachweisen, entsprechend dem sog. lymphoplasmozytoiden Lymphom nach der alten Kiel-Klassifikation. In der neuen WHO-Klassifikation und in der REAL-Klassifikation werden Lymphome mit plasmazellulärer Differenzierung und gleichzeitig B-CLL-typischer Morphologie und Immunphänotyp als Variante der B-CLL eingeordnet (Swerdlow, Campo et al. 2008).

Andere kleinzellige B-NHL mit plasmazellulärer Differenzierung (z.B. Marginalzonenlymphome oder Immunozytome/lymphoplasmozytische Lymphome) stammen von mutierten Post-Keimzentren (memory) B-Zellen ab. Bisher wurde

noch nicht untersucht, ob auch die plasmazellulär differenzierten B-CLL Fälle somatische Mutationen aufweisen und somit dem Schema der regulären B-Zell-Differenzierung entsprechen oder womöglich keine somatischen Mutationen aufweisen und folglich nicht den Entwicklungsschritt durch das Keimzentrum genommen haben. Eigentlich wäre zu erwarten, dass plasmazellulär differenzierte B-Zellen als Post-Keimzentrumszellen und (prä)-terminal differenzierte Form der B-Zelle Träger somatischer Mutationen sind.

Unsere Studie zeigt überraschenderweise, dass 69% (11 von 16) der Fälle, bei denen eine plasmazelluläre Differenzierung nachgewiesen werden konnte, entgegen der Erwartung keine Träger somatischer Mutationen sind und somit nicht den klassischen Weg der B-Zell-Differenzierung gegangen sind.



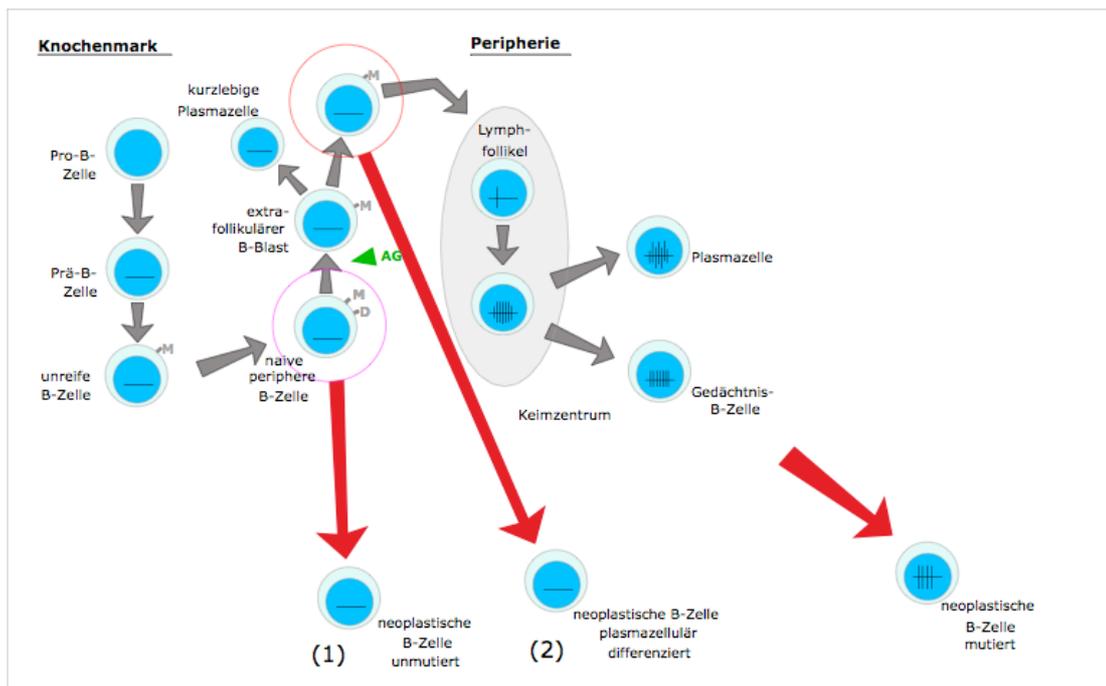
**Abb. 24 Schematische Darstellung der zellulären Herkunft der Fälle mit plasmazellulärer Differenzierung**

Ein Großteil der B-CLL/B-SLL Fälle mit plasmazellulärer Differenzierung ist offenbar nicht den klassischen Weg der B-Zell-Differenzierung gegangen und weist keine somatischen Mutationen auf (roter Kreis)

Das große Repertoire an spezifischen Antikörpern ist auf die somatische Rekombination der V- (variable) D- (diversity) und J- (joining) Immunglobulin-Gene zurückzuführen. Die im Keimzentrum stattfindende somatische Mutation der variablen Region der Immunglobulin-Gene ist nach der somatischen Rekombination als zweite Runde der Vergrößerung der Antikörperspezifität und -diversität zu verstehen (Murray, Darzentas et al. 2008). Ein Teil der von uns untersuchten Fälle weist so genannte stereotype VDJ-Umlagerungen (4/7 V<sub>H</sub> 1-69) auf, die möglicherweise als Folge einer Antigenselektion bzw. -stimulation in der Pathogenese der B-CLL zu interpretieren sind (Messmer, Albesiano et al. 2004; Murray, Darzentas et al. 2008; Buhler, Zenz et al. 2010). Es wird zum Teil sogar von einer Selektion durch so genannte „Superantigene“ (z.B. bakterielle Antigene) gesprochen, da es sich hierbei um Antigene handelt, die an alle B-Lymphozyten mit bestimmten IGV-Genen (variable Region der Immunglobulin-Gene) binden können und sie folglich zur Expansion bringen. Außerdem wird diskutiert, ob die Antigenstimulation auch nach der Transformation in eine maligne Erkrankung weiter eine Rolle spielt (Forconi, Potter et al.; Ghia, Granziero et al. 2002; Stamatopoulos, Belessi et al. 2007). Verschiedene Arbeitsgruppen nehmen an, dass anhand jener stereotypen VDJ-Umlagerungen die B-CLL in molekularbiologische, klinische und prognostische Untergruppen eingeteilt werden kann (Ghiotto, Fais et al. 2004; Stamatopoulos, Belessi et al. 2007; Murray, Darzentas et al. 2008).

Interessante Zusammenhänge konnten außerdem beim immunhistochemischen Nachweis der Immunglobuline IgM und IgD festgestellt werden. Während die Fälle ohne somatische Mutation und ohne plasmazelluläre Differenzierung hauptsächlich IgM und IgD exprimieren (87,5%), sind die Fälle ohne Mutationen aber mit plasmazellulärer Differenzierung tendenziell nur IgM-positiv (64%). Diese Ergebnisse legen nahe, dass jene IgM+IgD+ bzw. IgM+IgD- Fälle womöglich von Präkeimzentrums-B-Lymphozyten in unterschiedlichen Entwicklungsstadien abstammen (Abbildung 25). Die IgM+IgD+ unmutierten Fälle ohne plasmazelluläre Differenzierung stammen möglicherweise von der reifen naiven B-Zelle ab, die gerade das Knochenmark verlassen hat und auf dem Blutweg ins periphere lymphatische Gewebe gewandert ist, aber noch keinen Antigenkontakt in der

Peripherie hatte. Demgegenüber stammen die IgM+IgD- unmutierten Fälle mit plasmazellulärer Differenzierung möglicherweise von einem Prä-Keimzentrums-B-Lymphozyten ab, der bereits unspezifisch stimuliert wurde, das Keimzentrum umgangen hat und so genannte „*natural antibodies*“ als Teil eines angeborenen Antikörper-Repertoires produziert und somit Teil der unspezifischen Immunantwort ist (Forconi, Potter et al.; Capolunghi, Cascioli et al. 2008).



**Abb. 25: Schematische Darstellung der Abstammung der unmutierten Fälle mit und ohne plasmazelluläre Differenzierung**

Die unmutierten Fälle ohne plasmazelluläre Differenzierung (1) und die unmutierten plasmazellulär differenzierten Fälle (2) stammen womöglich von unterschiedlichen Prä-Keimzentrumszellen ab.

## 6.4. Prognostische Relevanz

Die B-CLL ist bezüglich Prognose und klinischem Verlauf eine sehr heterogene Erkrankung. Langsam verlaufende Formen mit nahezu normaler Lebenserwartung bis hin zu rasch progredienten Verlaufsformen mit schlechter Prognose können beobachtet werden (Rozman and Montserrat 1995). Um das Ausmaß der Erkrankung jedes individuellen Patienten besser einschätzen zu können, wurden diverse Systeme entwickelt. Zwei Klassifikationssysteme haben sich im Laufe der Zeit durchgesetzt: die Binet- und die Rai-Klassifikationen (Rai, Sawitsky et al. 1975; Binet, Auquier et al. 1981; Chiorazzi, Rai et al. 2005). Sie wurden in den letzten Jahren durch zusätzliche Parameter ergänzt, um die individuelle Prognose bezüglich Therapienotwendigkeit und Progression der Erkrankung besser einschätzen zu können und eine möglichst individuelle Therapieplanung zu ermöglichen.

Der Mutationsstatus der variablen Region der Immunglobulin-Schwerkette wird derzeit als einer der aussagekräftigsten prognostischen Faktoren der B-CLL betrachtet. Unsere Studie bestätigt, dass Patienten mit somatischen Mutationen der neoplastischen B-Zellen eine signifikant längere Überlebenszeit aufweisen ( $p=0,003$ ) als Patienten, deren Tumorzellen keine somatischen Mutationen zeigen und von naiven Prä-Keimzentrums-Lymphozyten abstammen. Diese Aussage bestätigt die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zu diesem Thema (Damle, Wasil et al. 1999; Hamblin, Orchard et al. 2002; Shanafelt, Geyer et al. 2004; Chiorazzi, Rai et al. 2005; Schroers, Griesinger et al. 2005; Huttmann, Klein-Hitpass et al. 2006).

Die prognostische Relevanz des Nachweises einer plasmazellulären Differenzierung bei Fällen der B-CLL wurde bislang nicht untersucht. Unsere Studie zeigt eine signifikant kürzere Überlebenszeit für die Fälle mit plasmazellulärer Differenzierung ( $p=0,012$ ) im Vergleich zu den Fällen, bei denen keine plasmazelluläre Differenzierung nachgewiesen werden konnte (Abb. 23). Diese Erkenntnis ist bemerkenswert, da man eher erwarten würde, dass Fälle der B-CLL, bei denen eine plasmazelluläre Differenzierung nachgewiesen werden konnte, mit mildereren klinischen Verläufen assoziiert sind, da Plasmazellen als weit differenzierte Form

des B-Lymphozyten das Vorhandensein von somatischen Mutationen und somit einen weniger aggressiven klinischen Verlauf nahe legen.

Diese plasmazellulär differenzierten B-Zellen scheinen allerdings nicht den herkömmlichen Weg der B-Zell-Differenzierung gegangen zu sein, tragen keine somatischen Mutationen und sind mit aggressiveren klinischen Verläufen assoziiert. Unsere Ergebnisse stellen in erster Linie Tendenzen dar und müssen in zukünftigen Studien anhand von größeren Fallzahlen bestätigt werden.

Trotzdem scheint der Nachweis einer plasmazellulären Differenzierung bei Fällen der B-CLL von prognostischer und womöglich auch therapeutischer Relevanz zu sein und sollte als zusätzlicher Parameter in Betracht gezogen werden, um die individuelle Prognose bezüglich Therapienotwendigkeit und Progression der Erkrankung besser einschätzen zu können und eine möglichst individuelle Therapieplanung zu ermöglichen.

## 7. Appendix

### Erhebungsbogen für klinische Daten zu Patienten mit B-CLL

Name: \_\_\_\_\_ Vorname: \_\_\_\_\_ Geb.-Dat.: \_\_\_\_\_

**Binet-Stadium:** A B C

**Rai-Stadium:** 0 I II III IV

**Lokalisation vergrößerter Lymphknoten:**

**Verlauf:** lebt \_\_\_\_\_ verstorben (Datum: \_\_\_\_\_), Todesursache: \_\_\_\_\_

Hepatomegalie ja nein

Splenomegalie ja nein

B-Symptome

Sonstiges

**Therapie:**

**Therapieerfolg:**

Komplette Remission

Teilremission

Rezidiv

Kein Ansprechen auf die Therapie

Transformation (Richter-Syndrom)

Progressionsfreies Überleben

Progression der Erkrankung

Laborwerte z.Zt. der Diagnosestellung:

Leukozyten:

Lymphozyten:

Lymphozytenverdopplungszeit:

Hb:

Thrombozyten:

LDH:  
Serum-Immunglobuline:  
(IgA, IgM, IgG)  
Serum- $\beta$ 2-Mikroglobulin:  
Serum-Thymidinkinase:  
Serum-Albumin:

**Knochenmarks-Histologie/-Zytologie:**

KM-Infiltration:      nicht-diffus  
                             diffus  
                             Infiltrationsgrad in %:

**Immunphäotypisierung peripheres Blut/KM (z.B. CD38-Expression):**

## 8. Abkürzungen

CLL	Chronische lymphatische Leukämie
SLL	„small lymphocytic lymphoma“
REAL-Klassifikation	„Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms“
WHO	„World Health Organisation“
Blimp-1	„B lymphocyte induced maturation protein-1“
XBP-1	„X box binding protein-1“
IgV <sub>H</sub>	variable Region der Immunglobulinschwerkette
ZAP70	zeta-assoziiertes Protein 70
Pro-B-Zelle	Progenitor-B-Zelle
V <sub>H</sub> D <sub>H</sub> J <sub>H</sub>	Immunglobulinschwerkette V= „variable“ D= „diversity“ J= „joining“
V <sub>L</sub> J <sub>L</sub>	Immunglobulinleichtkette
DNA	Desoxyribonucleinsäure
FISH	„Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung“
APAAP-Methode	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase-Methode
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex-Methode
TBS	„Tris Buffered Saline“
PCR	„Polymerase Chain Reaction“
B-NHL	B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom

## 9. Literaturverzeichnis

- (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): 3909-18.
- Apelgren, P., S. Hasselblom, et al. (2006). "Evaluation of clinical staging in chronic lymphocytic leukemia-population-based study." *Leuk Lymphoma* **47**(12): 2505-16.
- Binet, J. L., A. Auquier, et al. (1981). "A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis." *Cancer* **48**(1): 198-206.
- Bonato, M., S. Pittaluga, et al. (1998). "Lymph node histology in typical and atypical chronic lymphocytic leukemia." *Am J Surg Pathol* **22**(1): 49-56.
- Buhler, A., T. Zenz, et al. (2010). "Immunoglobulin heavy chain variable gene usage and (super)-antigen drive in chronic lymphocytic leukemia." *Clin Cancer Res* **16**(2): 373-5.
- Calame, K. L., K. I. Lin, et al. (2003). "Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells." *Annu Rev Immunol* **21**: 205-30.
- Calin, G. A., C. D. Dumitru, et al. (2002). "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15524-9.
- Capolunghi, F., S. Cascioli, et al. (2008). "CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies." *J Immunol* **180**(2): 800-8.
- Cattoretti, G., C. Angelin-Duclos, et al. (2005). "PRDM1/Blimp-1 is expressed in human B-lymphocytes committed to the plasma cell lineage." *J Pathol* **206**(1): 76-86.
- Chen, L., J. Apgar, et al. (2005). "ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **105**(5): 2036-41.
- Chen, L., G. Widhopf, et al. (2002). "Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **100**(13): 4609-14.
- Chiorazzi, N. and M. Ferrarini (2003). "B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor." *Annu Rev Immunol* **21**: 841-94.
- Chiorazzi, N., K. R. Rai, et al. (2005). "Chronic lymphocytic leukemia." *N Engl J Med* **352**(8): 804-15.
- Coupland, S. E., F. E. Dallenbach, et al. (2000). "[Small cell B-cell lymphomas: guidelines for differential diagnosis]." *Pathologe* **21**(2): 147-61.
- Coupland, S. E., M. Hummel, et al. (2000). "[Lymphatic system and differentiation of B and T lymphocytes]." *Pathologe* **21**(2): 106-12.
- Crespo, M., F. Bosch, et al. (2003). "ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia." *N Engl J Med* **348**(18): 1764-75.
- Damle, R. N., T. Wasil, et al. (1999). "Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **94**(6): 1840-7.
- de Lima, M., S. O'Brien, et al. (1998). "Chronic lymphocytic leukemia in the young patient." *Semin Oncol* **25**(1): 107-16.
- Dohner, H., S. Stilgenbauer, et al. (2000). "Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia." *N Engl J Med* **343**(26): 1910-6.

- Dunphy, C. H., S. E. Wheaton, et al. (1997). "CD23 expression in transformed small lymphocytic lymphomas/chronic lymphocytic leukemias and blastic transformations of mantle cell lymphoma." Mod Pathol **10**(8): 818-22.
- Durig, J., H. Nuckel, et al. (2003). "ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia." Leukemia **17**(12): 2426-34.
- Elias, J. M., M. Margiotta, et al. (1989). "Sensitivity and detection efficiency of the peroxidase antiperoxidase (PAP), avidin-biotin peroxidase complex (ABC), and peroxidase-labeled avidin-biotin (LAB) methods." Am J Clin Pathol **92**(1): 62-7.
- Faguet, G. B. (1994). "Chronic lymphocytic leukemia: an updated review." J Clin Oncol **12**(9): 1974-90.
- Fais, F., F. Ghiotto, et al. (1998). "Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors." J Clin Invest **102**(8): 1515-25.
- Falini, B., M. Fizzotti, et al. (2000). "A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells." Blood **95**(6): 2084-92.
- Finch, S. C. and M. S. Linet (1992). "Chronic leukaemias." Baillieres Clin Haematol **5**(1): 27-56.
- Forconi, F., K. N. Potter, et al. "The normal IGHV1-69-derived B-cell repertoire contains stereotypic patterns characteristic of unmutated CLL." Blood **115**(1): 71-7.
- Garcia, J. F., G. Roncador, et al. (2006). "PRDM1/BLIMP-1 expression in multiple B and T-cell lymphoma." Haematologica **91**(4): 467-74.
- Ghia, P., L. Granziero, et al. (2002). "Chronic B cell malignancies and bone marrow microenvironment." Semin Cancer Biol **12**(2): 149-55.
- Ghia, P., K. Stamatopoulos, et al. (2007). "ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia." Leukemia **21**(1): 1-3.
- Ghiotto, F., F. Fais, et al. (2004). "Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia." J Clin Invest **113**(7): 1008-16.
- Giorno, R. (1984). "A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction." Diagn Immunol **2**(3): 161-6.
- Guesdon, J. L., T. Ternynck, et al. (1979). "The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques." J Histochem Cytochem **27**(8): 1131-9.
- Hallek, M., M. Bergmann, et al. (2002). "[Chronic lymphatic leukemia. Current therapy concepts]." Internist (Berl) **43**(10): 1245-54.
- Hallek, M., B. Schmitt, et al. (2001). "[Chronic lymphocytic leukemia. 1. Diagnosis]." Dtsch Med Wochenschr **126**(23): 687-9.
- Hallek, M., B. Schmitt, et al. (2001). "[Chronic lymphocytic leukemia. 2. Therapy]." Dtsch Med Wochenschr **126**(23): 690-5.
- Hamblin, T. J., Z. Davis, et al. (1999). "Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia." Blood **94**(6): 1848-54.
- Hamblin, T. J., J. A. Orchard, et al. (2002). "CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease." Blood **99**(3): 1023-9.

- Han, T., M. Barcos, et al. (1984). "Bone marrow infiltration patterns and their prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia: correlations with clinical, immunologic, phenotypic, and cytogenetic data." J Clin Oncol **2**(6): 562-70.
- Harris, N. L., E. S. Jaffe, et al. (1994). "A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group." Blood **84**(5): 1361-92.
- Hsu, S. M., L. Raine, et al. (1981). "A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies." Am J Clin Pathol **75**(5): 734-8.
- Hsu, S. M., L. Raine, et al. (1981). "The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics." Am J Clin Pathol **75**(6): 816-21.
- Huttmann, A., L. Klein-Hitpass, et al. (2006). "Gene expression signatures separate B-cell chronic lymphocytic leukaemia prognostic subgroups defined by ZAP-70 and CD38 expression status." Leukemia **20**(10): 1774-82.
- Jego, G., N. Robillard, et al. (1999). "Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells." Blood **94**(2): 701-12.
- Kelsoe, G. (1994). "B cell diversification and differentiation in the periphery." J Exp Med **180**(1): 5-6.
- Lennert, K. (1990). "Histopathologie der Non-Hodgkin Lymphome (nach der aktualisierten Kiel-Klassifikation)." Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- Lennert, K. (1992). "[Non-Hodgkin's lymphomas: principles and application of the Kiel classification]." Verh Dtsch Ges Pathol **76**: 1-13.
- Lennert, K. (1995). "The proposal for a Revised European American Lymphoma classification--a new start of a transatlantic discussion." Histopathology **26**(5): 481-3.
- Lennert, K., H. Stein, et al. (1975). "Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata." Br J Cancer Suppl **2**: 29-43.
- Lin, K. I., C. Tunyaplin, et al. (2003). "Transcriptional regulatory cascades controlling plasma cell differentiation." Immunol Rev **194**: 19-28.
- Lipshutz, M. D., R. Mir, et al. (1980). "Bone marrow biopsy and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia." Cancer **46**(6): 1422-7.
- Mauro, F. R., G. De Rossi, et al. (1994). "Prognostic value of bone marrow histology in chronic lymphocytic leukemia. A study of 335 untreated cases from a single institution." Haematologica **79**(4): 334-41.
- Mauro, F. R., R. Foa, et al. (1999). "Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases." Blood **94**(2): 448-54.
- Messmer, B. T., E. Albesiano, et al. (2004). "Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia." J Exp Med **200**(4): 519-25.
- Migliazza, A., F. Bosch, et al. (2001). "Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia." Blood **97**(7): 2098-104.
- Molica, S. and A. Alberti (1987). "Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia." Cancer **60**(11): 2712-6.
- Molica, S., J. C. Reverter, et al. (1990). "Timing of diagnosis and lymphocyte accumulation patterns in chronic lymphocytic leukemia: analysis of their clinical significance." Eur J Haematol **44**(5): 277-81.

- Montserrat, E., F. Gomis, et al. (1991). "Presenting features and prognosis of chronic lymphocytic leukemia in younger adults." *Blood* **78**(6): 1545-51.
- Montserrat, E. and C. Rozman (1987). "Bone marrow biopsy in chronic lymphocytic leukemia: a review of its prognostic importance." *Blood Cells* **12**(2): 315-26.
- Montserrat, E. and C. Rozman (1995). "Chronic lymphocytic leukemia: present status." *Ann Oncol* **6**(3): 219-35.
- Montserrat, E., J. Sanchez-Bisono, et al. (1986). "Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance." *Br J Haematol* **62**(3): 567-75.
- Murray, F., N. Darzentas, et al. (2008). "Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis." *Blood* **111**(3): 1524-33.
- Noll (2000). "Praxis der Immunhistochemie." *Urban und Fischer Veralg.*
- Orchard, J. A., R. E. Ibbotson, et al. (2004). "ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia." *Lancet* **363**(9403): 105-11.
- Rai, K. R., A. Sawitsky, et al. (1975). "Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **46**(2): 219-34.
- Rassenti, L. Z., L. Huynh, et al. (2004). "ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia." *N Engl J Med* **351**(9): 893-901.
- Robertson, L. E., W. Pugh, et al. (1993). "Richter's syndrome: a report on 39 patients." *J Clin Oncol* **11**(10): 1985-9.
- Robinson, J., J. A. Halliwell, et al. "The IMGT/HLA database." *Nucleic Acids Res.*
- Rosenwald, A., A. A. Alizadeh, et al. (2001). "Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia." *J Exp Med* **194**(11): 1639-47.
- Rozman, C., L. Hernandez-Nieto, et al. (1981). "Prognostic significance of bone-marrow patterns in chronic lymphocytic leukaemia." *Br J Haematol* **47**(4): 529-37.
- Rozman, C. and E. Montserrat (1995). "Chronic lymphocytic leukemia." *N Engl J Med* **333**(16): 1052-7.
- Sanderson, R. D., P. Lalor, et al. (1989). "B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation." *Cell Regul* **1**(1): 27-35.
- Schroeder, H. W., Jr. and G. Dighiero (1994). "The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire." *Immunol Today* **15**(6): 288-94.
- Schroers, R., F. Griesinger, et al. (2005). "Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia." *Leukemia* **19**(5): 750-8.
- Shanafelt, T. D., S. M. Geyer, et al. (2004). "Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL." *Blood* **103**(4): 1202-10.
- Stamatopoulos, K., C. Belessi, et al. (2007). "Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations." *Blood* **109**(1): 259-70.
- Stevenson, F. K. and F. Caligaris-Cappio (2004). "Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor." *Blood* **103**(12): 4389-95.
- Stilgenbauer, S., L. Bullinger, et al. (2002). "Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course." *Leukemia* **16**(6): 993-1007.
- Swerdlow, S. H., E. Campo, et al. (2008). "World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues." *IARC Press Lyon Fourth Edition*

- Tonegawa, S. (1983). "Somatic generation of antibody diversity." *Nature* **302**(5909): 575-81.
- Tsuboi, K., S. Iida, et al. (2000). "MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies." *Leukemia* **14**(3): 449-56.
- Turley, H., M. Jones, et al. (1994). "VS38: a new monoclonal antibody for detecting plasma cell differentiation in routine sections." *J Clin Pathol* **47**(5): 418-22.
- van Dongen, J. J., A. W. Langerak, et al. (2003). "Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936." *Leukemia* **17**(12): 2257-317.
- Wiestner, A., A. Rosenwald, et al. (2003). "ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile." *Blood* **101**(12): 4944-51.
- Working Formulation (1982). "National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project." *Cancer* **49**(10): 2112-35.
- Zenz, T., D. Mertens, et al. (2008). "Molecular diagnostics in chronic lymphocytic leukemia - pathogenetic and clinical implications." *Leuk Lymphoma* **49**(5): 864-73.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nora Bolz, geb. Keller, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Immunphänotyp und Mutationsstatus der chronischen lymphatischen Leukämie mit plasmazellulärer Differenzierung selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **10. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. M. Hummel danke ich für seine herzliche Betreuung, seine große Geduld sowie für seine kompetente Einführung in die Hämatopathologie.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H. Stein danke ich für die freundliche Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit.

Aus dem Institut für Pathologie Charité Campus Benjamin Franklin/ Charité Campus Mitte danke ich Prof. Dr. Ch. Loddenkemper, Prof. Dr. H.-D. Foss, und Prof. Dr. I. Anagnostopoulos.

Mein Dank gilt auch allen an der Arbeit beteiligten medizinisch-technischen Assistentinnen aus dem Institut für Pathologie Charité Campus Benjamin Franklin insbesondere Frau Simone Spieckermann für die kompetente Einführung in die Methoden der Immunhistochemischen Färbungen sowie Herrn Henning Müller für die kompetente Einführung in die Methoden der Molekularpathologie.

Ausserdem danke ich Bettina Brandt, Axumawit Berhe, und meiner Schwägerin Alexandra Frohne für die wertvolle Hilfe bei allen Computerfragen.

Meinem Ehemann Simon Bolz und meinen Eltern Margarethe und Hansjürgen Keller danke ich für die moralische und fachliche Unterstützung.