

Aus dem Institut für Pathologie  
Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister  
(Leiter: Herr Prof. Dr. med. W. Klapper)  
im Universitätsklinikum Schleswig – Holstein, Campus Kiel  
an der Christian – Albrechts – Universität zu Kiel

**EPSTEIN – BARR VIRUS – POSITIVE DIFFUS GROßZELLIGE B – ZELL  
LYMPHOME „DES ÄLTEREN PATIENTEN“:  
EINE ANALYSE DER INZIDENZ UND KLINISCHEN RELEVANZ  
IN ZENTRALEUROPA**

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

**ALISA BORCHERT**  
aus **EINBECK**

Kiel 2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfram Klapper  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Monika Brüggemann  
Tag der mündlichen Prüfung: 24. November 2016

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 24. November 2016

gez.: Prof. Dr. Johann Roider  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Thematische Einführung .....	1
1.2 Fragestellungen .....	2
1.3 WHO – Klassifikation der Malignen Lymphome .....	2
1.3.1 DLBCL .....	4
1.3.2 EBV – positives DLBCL „des älteren Patienten“ .....	6
1.4 Epstein – Barr Virus .....	8
<b>2 Materialien und Methoden</b> .....	<b>11</b>
2.1 Verwendete Materialien und Chemikalien .....	11
2.2 Auswahl des Patientenkollektivs .....	13
2.3 Paraffinschnitt .....	14
2.4 EBER <i>in situ</i> – Hybridisierung .....	15
2.5 Immunhistochemie .....	16
2.6 Statistische Analysen .....	17
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>19</b>
3.1 EBER <i>in situ</i> – Hybridisierung .....	19
3.2 Immunhistochemie .....	20
3.2.1 EBV – Latenztypen .....	20
3.2.2 Histomorphologie .....	20
3.3 Charakterisierung des Patientenkollektivs .....	24
3.4 Intra- und peritumorale EBV-Reaktivierung .....	27
3.5 Statistische Analysen .....	32
3.5.1 Inzidenz und Altersverteilung .....	32
3.5.2 Überlebenszeitanalyse .....	34
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>36</b>

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>Publikation der Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>Danksagungen .....</b>	<b>50</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>51</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>52</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ALK	anaplastische Lymphom Kinase
bp	Basenpaare
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Bezeichnung für Oberflächenantigene)
CHEP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Etoposid, Prednisolon
CHOEP	Cyclophosphamid, Hydroxyrubicin, Oncovin® (Vincristin), Etoposid, Prednisolon
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxyrubicin, Oncovin® (Vincristin), Prednisolon
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochloridlösung
DLBCL	<i>diffuse large B-cell lymphoma</i> (= diffus großzelliges B-Zell Lymphom)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (= Desoxyribonukleinsäure)
EBER	<i>EBV-encoded RNA</i> (= EBV-kodierte RNA)
EBNA	EBV-spezifisches nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
GCB	<i>germinal center B-cell like</i> (= Keimzentrums-ähnlich)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (= Meerrettichperoxidase)
IPI	Internationaler Prognose Index
ISH	<i>in situ</i> - Hybridisierung
LMP	<i>latent membrane protein</i> (= latentes Membranprotein)
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
PTLD	<i>Post transplantation lymphoproliferative disorder</i> (= Posttransplantationsassoziierte lymphoproliferative Erkrankung)
R-CHOP	Rituximab, Cyclophosphamid, Hydroxyrubicin, Oncovin® (Vincristin), Prednisolon
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (= Ribonukleinsäure)
VNCOP	Cyclophosphamid, Mitoxantron, Oncovin® (Vincristin), Etoposid, Prednisolon
WHO	<i>world health organization</i> (= Welt Gesundheitsorganisation)

# 1 Einleitung

## 1.1 Thematische Einführung

Das Epstein-Barr Virus (EBV)-positive diffus großzellige B-Zell Lymphom (DLBCL) „des älteren Patienten“ ist erst seit 2008 als eigenständige Gruppe in der WHO (World Health Organization)-Klassifikation der malignen Lymphome aufgeführt. Definitionsgemäß handelt es sich um DLBCL mit Nachweis des Epstein-Barr Virus in den Lymphomzellen bei Patienten über 50 Jahre, die keine klinisch nachweisbare Immunsuppression aufweisen (Swerdlow et al. 2008). Basierend auf dieser Definition müssen alle möglichen Gründe für eine Immunkompromittierung ausgeschlossen werden, um die Diagnose eines EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ stellen zu können.

Im Jahr 2003 publizierten *Oyama et al.* erstmals 22 Fälle EBV-positiver lymphoproliferativer Erkrankungen, bei denen keine Immunsuppression als Ursache zugrunde lag. Interessanterweise waren alle Patienten dieser Serie über 60 Jahre alt (*Oyama et al. 2003*). Die Mehrheit der EBV-positiven Lymphome sind in Deutschland nicht mit einer Immunkompromittierung des Patienten assoziiert (z.B. Burkitt Lymphome und Hodgkin Lymphome sowie T-/NK-Zell Lymphome).

Da mit dem Epstein-Barr Virus assoziierte DLBCL überwiegend bei immunkompromittierten Patienten diagnostiziert werden (z.B. nach einer Organtransplantation, bei HIV-Infektion oder iatrogen nach Einnahme immunsuppressiver Medikamente) und diese Konstellation bei den DLBCL „des älteren Patienten“ fehlt, wird angenommen, dass eine Abnahme der Funktion des Immunsystems im Alter die Ursache für die Entstehung der EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ ist (*Oyama et al. 2003*).

In den letzten Jahren haben sich vor allem japanische Arbeitsgruppen mit dieser neuen Entität von B-Zell Lymphomen beschäftigt. Die Inzidenz wird dort mit 8-10% beschrieben (*Oyama et al. 2007*), wobei die dort beobachtete Zunahme mit steigendem Alter (20-30% bei über 90 Jährigen) zu dem Namen dieser Entität geführt hat (*Shimoyama et al. 2008*). Des Weiteren stellen die Japanischen Studien das EBV-positive DLBCL „des älteren Patienten“ als eine klinisch sehr aggressive Variante der DLBCL mit schlechter Prognose dar (*Oyama et al. 2007*).

Über die Altersverteilung und das klinische Verhalten EBV-positiver im Vergleich zu EBV-negativen DLBCL ist in Zentraleuropa bisher wenig bekannt. Lediglich aus Basel und Tübingen wurden bereits Fälle publiziert, die interessanterweise eine andere Inzidenz und Altersverteilung aufweisen als die in Japan publizierten Fälle (Hoeller et al. 2010; Hofscheier et al. 2011).

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, Erkenntnisse über die Inzidenz, die Altersverteilung und die klinische Relevanz EBV-positiver DLBCL in Zentraleuropa zu gewinnen.

## 1.2 Fragestellungen

- 1) Wie ist die Inzidenz und Altersverteilung der EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ in Zentraleuropa?
- 2) Welche Auswirkung hat die EBNA2-Expression auf das Gesamtüberleben der EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“?

## 1.3 WHO – Klassifikation der Malignen Lymphome

Maligne Lymphome sind Tumorerkrankungen, die mit einer klonalen Proliferation von B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen oder deren Vorläuferzellen einhergehen.

Die Einteilung der Malignen Lymphome erfolgt nach der WHO-Klassifikation von Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes (Stand: 2008). Diese unterscheidet B-Zell Lymphome, T-Zell und NK-Zell Lymphome, Hodgkin Lymphome sowie Posttransplantationsassoziierte lymphoproliferative Erkrankungen (PTLD) (Swerdlow et al. 2008). Vereinfacht hat man viele Jahre von Non-Hodgkin Lymphomen (NHL) und Hodgkin Lymphomen gesprochen.

Die Vorläufer B- und T-Zell Neoplasien treten vorwiegend im Kindesalter auf. Bei den Erwachsenen stellen die reifen B-Zell Lymphome mit über 90% der lymphatischen Neoplasien weltweit die größte Gruppe dar, wobei die Häufigkeit der einzelnen Subtypen von der geographischen Lage sowie ethnischer Gruppen abhängt (Anonymus 1997; Armitage et al. 1998). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die B-

Zell Non-Hodgkin Lymphome, zu denen auch die diffus großzelligen B-Zell Lymphome und im Speziellen das in der vorliegenden Arbeit untersuchte EBV-positive DLBCL „des älteren Patienten“ gehören.

<b>B-Zell Non-Hodgkin Lymphome</b>
Vorläufer B-Zell Neoplasien
- B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom
reife B-Zell Neoplasien
- Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)/lymphozytisches Lymphom
- Prolymphozytenleukämie vom B-Zell Typ
- Lymphoplasmozytisches Lymphom
- Splenisches B-Zell Marginalzonen Lymphom
- Haarzelleukämie
- Lymphoplasmozytisches Lymphom
- Waldenström Makroglobulinämie
- Schwerekettenkrankheit
- Plasmazellmyelom
- Solitäres Plasmozytom des Knochens
- Extraossäres Plasmozytom
- Extranodales Marginalzonen Lymphom des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT Lymphom)
- Nodales Marginalzonen Lymphom
- Follikuläres Lymphom
- Primäres kutanes Follikelzentrumslymphom
- Mantelzell Lymphom
- Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom (DLBCL) <ul style="list-style-type: none"> <li>o T-Zell/histiozytenreiches großzelliges B-Zell Lymphom</li> <li>o Primäres DLBCL des Zentralnervensystems (ZNS)</li> <li>o Primär kutanes DLBCL, Beintyp</li> <li>o <b>EBV-positives DLBCL „des älteren Patienten“</b></li> </ul>
- DLBCL bei chronischer Entzündung
- Lymphomatoide Granulomatose
- Primär mediastinales (thymisches) großzelliges B-Zell Lymphom
- Intravaskuläres großzelliges B-Zell Lymphom
- ALK-positives großzelliges B-Zell Lymphom
- Plasmoblastisches Lymphom
- Großzelliges B-Zell Lymphom auf dem Boden einer HHV8-assoziierten multizentrischen <i>Castleman</i> -Krankheit
- Primäres Effusions Lymphom
- Burkitt Lymphom
- B-Zell Lymphom, nicht klassifizierbar, mit intermediären Merkmalen zwischen einem DLBCL und einem Burkitt Lymphom
- B-Zell-Lymphom, nicht klassifizierbar, mit intermediären Merkmalen zwischen einem DLBCL und einem klassischen Hodgkin Lymphom

Tabelle 1: WHO-Klassifikation von NHL der B-Zell-Reihe



### 1.3.1 Diffus großzellige B-Zell Lymphome

Diffus großzellige B-Zell Lymphome (DLBCL) sind Neoplasien blastärer B-Lymphozyten. Ihre Kerngröße ist mit der von Makrophagen vergleichbar bzw. entspricht in etwa der Größe zweier Lymphozyten (Swerdlow et al. 2008). DLBCL zeichnen sich durch ein diffuses Wachstumsmuster aus und stellen mit 25-30% aller Non-Hodgkin Lymphome der Erwachsenen die häufigste Subgruppe in der westlichen Bevölkerung dar. Das mittlere Erkrankungsalter liegt in der 7. Lebensdekade, das Lymphom kann sich jedoch ebenfalls bei Kindern und jüngeren Erwachsenen manifestieren (Armitage et al. 1998; Anonymus 1997).

Die Ätiologie der DLBCL ist bis heute ungeklärt. In den meisten Fällen handelt es sich um ein primäres Lymphom, es kann jedoch auch sekundär aus weniger aggressiven Lymphomen transformieren, zum Beispiel aus chronisch lymphatischen Leukämien (CLL), folliculären Lymphomen, Marginalzonenlymphomen oder dem nodulären, Lymphozyten prädominanten Hodgkin Lymphom. Ein signifikanter Risikofaktor für die Entstehung eines DLBCL ist eine zugrundeliegende Immunsuppression. Bei diesen Patienten ist eine EBV-Assoziation häufiger nachzuweisen als bei Immunkompetenten (Hummel et al. 1995; Park et al. 2007).

Das DLBCL kann sich sowohl nodal als auch extranodal manifestieren, z.B. im Gastrointestinaltrakt, aber auch in Knochen, Milz, Leber, Nieren, Speicheldrüsen u. a. Ein Befall des Knochenmarks ist in 11-27% der Fälle beschrieben (Campbell et al. 2006; Chung et al. 2007).

Morphologisch unterscheidet man im Wesentlichen 3 verschiedene Subtypen: centroblastischer, immunoblastischer und anaplastischer. Daneben existieren noch weitere, seltene Varianten (Swerdlow et al. 2008).

Immunphänotypische Untersuchungen haben gezeigt, dass die malignen Zellen des DLBCL typische B-Zell-Oberflächenantigene exprimieren wie zum Beispiel CD19, CD20, CD22 und/oder CD79a. Oberflächliche oder zytoplasmatische Immunglobuline sind in 50-75% der Fälle zu finden (Loddenkemper et al. 2004). Anhand der Immunphänotypisierung können DLBCL außerdem in eine Keimzentrums-ähnliche (GCB) und eine nicht-Keimzentrums-ähnliche (non-GCB) Subgruppe gegliedert werden (Colomo et al. 2004). Bei einer CD10-Expression in mindestens 30% der Zellen oder bei CD10-Negativität, BCL6-Positivität und MUM1-

Negativität handelt es sich um den Keimzentrums-ähnlichen Subtyp, alle anderen Fälle werden den non-GCB zugeordnet (Hans et al. 2004).

Der Proliferationsmarker Ki67 ist in der Regel sehr hoch, zumeist über 40%, und kann in einigen Fällen sogar über 90% betragen (Miller et al. 1994). Er liefert einen Hinweis darauf, dass es sich bei einem DLBCL um einen Tumor mit sehr hoher Wachstumsgeschwindigkeit handelt.

Die Klinik der Patienten ist sehr variabel und abhängig von der Lokalisation des Tumors, jedoch sind viele Patienten zunächst asymptomatisch. Etwa die Hälfte aller Fälle wird im Stadium I oder II diagnostiziert und weist initial eine rapide wachsende Tumormasse auf (Anonymus 1997; Armitage et al. 1998).

<b>Primär nodaler Befall</b>	<b>Stadium</b>	<b>Primär extranodaler Befall</b>
Befall einer Lk.-Region (I) oder eines extralymphatischen Organs oder Gewebes (IE)	<b>I</b>	Lokalisierter Befall des extralymphatischen Organs oder Gewebes
Befall von zwei benachbarten Lk.-Regionen ober- oder unterhalb des Zwerchfells (II <sub>1</sub> ) oder einer Lk.-Region mit lokalisiertem Übergang auf ein benachbartes Organ oder Gewebe (II <sub>1</sub> E)	<b>II<sub>1</sub></b>	Lokalisierter Befall eines extralymphatischen Organs einschließlich der regionalen Lk. oder eines weiteren benachbarten extralymphatischen Organs ober- oder unterhalb des Zwerchfells (II <sub>2</sub> E)
Befall von zwei nicht benachbarten oder mehr als zwei benachbarten Lk.-Regionen ober- oder unterhalb des Zwerchfells (II <sub>2</sub> ) einschließlich eines lokalisierten Befalls eines extralymphatischen Organs oder Gewebes (II <sub>2</sub> E)	<b>II<sub>2</sub></b>	Lokalisierter Befall eines extralymphatischen Organs und Lk.-Befall, der über die regionalen Lk. hinausgeht und auch einen weiteren lokalisierten Organbefall einschließen kann (II <sub>2</sub> E)
Befall von Lk.-Regionen ober- und unterhalb des Zwerchfells (III) einschließlich eines lokalisierten Befalls eines extralymphatischen Organs oder Gewebes (III <sub>E</sub> ) oder eines Befalls der Milz (III <sub>S</sub> ) oder von beidem (III <sub>SE</sub> )	<b>III</b>	Lokalisierter Befall des extralymphatischen Organs und Lk.-Befall ober- und unterhalb des Zwerchfells einschließlich eines weiteren lokalisierten Befalls eines extralymphatischen Organs oder Gewebes (III <sub>E</sub> ) oder eines Befalls der Milz (III <sub>S</sub> ) oder von beidem (III <sub>SE</sub> )
Lk.-Befall mit diffusem oder disseminiertem Befall extralymphatischer Organe und Gewebe	<b>IV</b>	Diffuser oder disseminierter Organbefall mit oder ohne Lk.-Befall

Tabelle 2: Stadieneinteilung der DLBCL

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Stadieneinteilung der DLBCL. Ein B-Stadium besteht, wenn eines der drei folgenden Symptome vorliegt: Verlust von >10% des Körpergewichts in den letzten sechs Monaten, Fieber > 38°C, Nachtschweiß ohne anderen Grund. Anderenfalls bekommt das Stadium den Zusatz „A“ (Preiß et al. 2010).

Die Prognose der Erkrankung ist abhängig von verschiedenen Faktoren, die in Tabelle 3 dargestellt sind (Preiß et al. 2010). Langezeit lag die Remissionsrate der DLBCL zwischen 50-60% (Armitage et al. 1998). Seit der Einführung von Rituximab in das Therapieregime konnten die Überlebensraten jedoch deutlich verbessert werden (Coiffier 2007).

<b>Faktoren (jeweils 1 Punkt):</b>
a) Alter > 60 Jahre
b) Karnofsky-Index < 80% bzw. WHO-AZ >2
c) Stadium > II
d) LDH über Normwert erhöht
e) > 1 extranodale Manifestation
<b>Risikogruppe = Summe aller Punkte</b>
0/1 niedrig
2 niedrig-intermediär
3 hoch-intermediär
4/5 hoch

Tabelle 3: Internationaler Prognose Index (IPI) für aggressive B- und T-Zell Lymphome

### 1.3.2 EBV-positives DLBCL „des älteren Patienten“

Das EBV-positive DLBCL „des älteren Patienten“ ist definiert als eine EBV-positive lymphoproliferative Erkrankung, die auftritt bei Patienten, die über 50 Jahre alt sind und bei denen weder eine Immunsuppression noch ein vorausgegangenes Lymphom bekannt ist (Swerdlow et al. 2008).

Während diese Entität in Asien mit einer Häufigkeit von 8-10% der DLBCL beschrieben wird (Oyama et al. 2007; Park et al. 2007), liegen in westlichen Ländern bislang nur wenige Daten bezüglich der Inzidenz vor. Derzeit wird angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit, an diesem Lymphom zu erkranken, mit zunehmendem

Alter ansteigt, da bei Patienten über 90 Jahre eine Häufigkeit von 20-30% beobachtet wurde (Shimoyama et al. 2008). Des Weiteren geht man davon aus, dass eine Verschlechterung der Funktion des Immunsystems als Teil des Alterungsprozesses des Menschen als Ursache der Erkrankung zugrunde liegt (Oyama et al. 2003).

Das mittlere Erkrankungsalter ist mit 71 Jahren beschrieben (Altersspanne 45-92 Jahre) und die Verteilung auf die Geschlechter mit einem Verhältnis von 1,4:1 (männlich:weiblich) (Swerdlow et al. 2008). Bei 70% der Patienten findet sich ein extranodaler Befall mit oder ohne gleichzeitiger Beteiligung der Lymphknoten, wohingegen bei 30% eine rein nodale Erkrankung vorliegt (Kuze et al. 2000; Oyama et al. 2007).

Im Gegensatz zu der benignen Variante der EBV-Manifestation, der infektiösen Mononukleose, ist die physiologische Morphologie des befallenen Gewebes beim malignen EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ vollkommen verstrichen. Man unterscheidet den polymorphen von einem monomorphen und einem Hodgkin-ähnlichen Subtyp (Oyama et al. 2003). Die Tumorzellen der polymorphen Lymphome sind von einem variablen Anteil reaktiver Zellen begleitet wie zum Beispiel kleine Lymphozyten, Plasmazellen, Histiocyten und Epitheloidzellen. Weitere histomorphologische Charakteristika stellen die tumorbegleitende Nekrose sowie das angiotrope Wachstumsmuster der Lymphomzellen dar (Oyama et al. 2003).

Immunphänotypische Untersuchungen haben gezeigt, dass die neoplastischen Zellen überwiegend CD20 und/oder CD79 positiv, MUM1 positiv sowie CD10 und BCL6 negativ sind. Die Lymphomzellen exprimieren in 94% der Fälle LMP1 und sind in 28% positiv für EBNA2 (Oyama et al. 2007).

Die klinischen Charakteristika der EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ sind sehr variabel. Da über die Hälfte aller Fälle jedoch einen hohen bzw. hoch-intermediären IPI aufweisen, ist der Verlauf der Erkrankung meist sehr aggressiv mit einem medianen Überleben von etwa 2 Jahren. Als ungünstige prognostische Parameter konnten hierbei das Vorhandensein einer B-Symptomatik (Fieber  $>38^{\circ}\text{C}$ , Verlust von  $>10\%$  des Körpergewichts in den letzten 6 Monaten, Nachtschweiß ohne anderen Grund) sowie ein Alter von über 70 Jahren identifiziert werden. Patienten, die keine, 1 oder 2 dieser Risikofaktoren aufweisen, überleben im Median 56, 25 bzw. 9 Monate (Oyama et al. 2007).

## 1.4 Epstein – Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus (= Humanes Herpesvirus 4, HHV 4 bzw. EBV) ist ein behülltes, doppelsträngiges DNA-Virus aus der Familie der Herpesviridae (Hof et al. 2014). Es wurde 1964 von den englischen Virologen Micheal Anthony Epstein und Yvonne M. Barr bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von kultivierten B-Zellen entdeckt, die zuvor aus Burkitt Lymphomen afrikanischer Kinder isoliert worden waren (Epstein et al. 1965).

Als Mitglied der Subfamilie der Gammaherpesvirinae, Gattung Lymphokryptovirus, ist das Virus in der Lage, lebenslang in B-Lymphozyten zu persistieren (lymphotropes Herpesvirus) und erhält dadurch onkogenes Potential (Thorley-Lawson et al. 2004; Hof et al. 2014). Es ist das erste Virus, das in direkten Zusammenhang mit der Karzinogenese gebracht wurde. Malignome, die mit EBV assoziiert werden, sind u.a. das Burkitt Lymphom, Hodgkin und Non-Hodgkin Lymphome und das Nasopharynxkarzinom (Thompson et al. 2004)

Der Mensch ist der einzige Wirt des Epstein-Barr Virus (Thompson et al. 2004). Es ist weltweit sehr stark verbreitet und in der Erwachsenenbevölkerung sind über 90 % mit EBV infiziert (Cohen 2000). Die Primärinfektion verläuft im Kindesalter meist asymptomatisch. Vor allem bei Jugendlichen und Erwachsenen manifestiert sich die Infektion mit EBV jedoch als infektiöse Mononukleose, die auch als „Kissing Disease“ (Kusskrankheit) oder nach dem erst beschreibenden Kinderarzt, Emil Pfeiffer, als Pfeiffer'sches Drüsenfieber bezeichnet wird (Niederman et al. 1968). Die Erkrankung wird über den Speichel von Mensch zu Mensch übertragen (Thompson et al. 2004).

Man unterscheidet die akute Infektion von der Latenzphase, die lebenslang andauert. Es wird angenommen, dass das Virus in der akuten Phase das mehrschichtige Plattenepithel des Oropharynx infiziert und dort repliziert (Murray et al. 2002). Vom Plattenepithel ausgehend werden umliegende B-Lymphozyten mit EBV infiziert (lymphotropes Herpesvirus). Nach der akuten Infektion persistiert das Virus lebenslang latent in zirkulierenden B-Gedächtniszellen (Küppers 2003).

In der infizierten Zelle kommt es zur Produktion und Expression der EBV-nukleären Antigene (EBNA) und latenten Membranproteine (LMP) (Allday et al. 1989). Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die viralen Proteine, die bei der Latenz des Virus eine wichtige Rolle spielen. Dazu gehört neben den LMPs und EBNAs auch die EBV-kodierte RNA (EBER). Sie interagieren mit einer Vielzahl

verschiedener antiapoptotischer Moleküle und Zytokine und fördern dadurch die Ausbreitung der EBV-Infektion sowie die Immortalisierung und Transformierung von B-Lymphozyten (Thompson et al. 2004).

EBV Protein	Funktion
EBNA 1	Immortalisierung von B-Lymphozyten; Replikation des EBV-Genoms; Trennung der viralen Episome bei der Mitose
EBNA 2	Immortalisierung von B-Lymphozyten; transkriptioneller Koaktivator, der die Expression viraler und zellulärer Gene (v.a. c-myc) hochreguliert; wird bei der EBV-Infektion als eines der ersten viralen Proteine produziert
EBNA 3A EBNA 3B EBNA 3C	Immortalisierung von B-Lymphozyten weitgehend unbekannt Immortalisierung von B-Lymphozyten; erhöht die Produktion von LMP1
EBNA-LP	Immortalisierung von B-Lymphozyten; interagiert mit EBNA2, um p53 und Rb zu inaktivieren; wird bei der EBV-Infektion als eines der ersten viralen Proteine produziert
LMP 1	Immortalisierung von B-Lymphozyten; imitiert den CD40-Rezeptor; erhöht das BCL2-Level
LMP 2A und 2B	führt EBV in die Latenz
EBER 1 und 2	nicht kodierende RNAs, die in nahezu allen EBV-infizierten Zellen und in allen Latenztypen exprimiert werden

Tabelle 4: EBV Proteine und ihre Funktionen

In immunkompetenten Virusträgern wird diese latente Infektion durch zytotoxische CD8-positive T-Lymphozyten kontrolliert, die jedoch nicht in der Lage sind, das Virus komplett zu eliminieren (Thorley-Lawson et al. 2004).

Es werden 4 verschiedene Typen der latenten Genexpression unterschieden, wobei sich der Latenztyp 0 auf die gesunden, immunkompetenten Menschen bezieht, in denen das Virus als zirkuläres Episom in den B-Gedächtniszellen vorliegt. Tabelle 5 zeigt die Latenztypen 1-3 mit ihren dazugehörigen exprimierten viralen Proteinen und den assoziierten Malignomen (Klein et al. 2007).

<b>Latenztyp</b>	<b>exprimierte virale Proteine</b>	<b>assoziierte Malignome</b>
I	EBERs EBNA 1	Burkitt Lymphom
II	EBERs EBNA 1 LMP 1, 2	Hodgkin Lymphom Nasopharynxkarzinom T-Zell/NK-Zell Lymphome
III	EBERs EBNA 1, 2, 3A-C LMP 1, 2	PTLD AIDS- assoziierte Lymphome

Tabelle 5: Latenztypen des EBV und assoziierte Malignome

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien und Chemikalien

#### - Antikörper

- CD20 (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Deutschland)
- CD10 (Novocastra, Leica Biosystems, Newcastle, Großbritannien, Katalognummer: NCL-CD10-27)
- BCL2 (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, USA, Katalognummer: Mob130)
- Ki67 (Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA, Katalognummer: 9106)
- BCL6 (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, Deutschland, Katalognummer: BI713C01)
- MUM1 (Dako, Glostrup, Dänemark, Katalognummer: M7259)
- LMP1 (Dako, Glostrup, Dänemark, Katalognummer: M0897)
- EBNA2 (Fitzgerald Industries International, Acton, USA, Katalognummer: 10R-E127A)

#### - Hämatoxylin-Eosin-Färbung

- Hämatoxylin = Mayers Hämalaunlösung  
(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Katalognummer: 109249)
- Eosin  
(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Katalognummer: 115935)

#### - EBER *in situ* – Hybridisierung

- Bond™ Epitopdemaskierungslösung 1  
(Leica Biosystems, Newcastle, Großbritannien, Katalognummer: AR9961)
- Bond™ Epitopdemaskierungslösung 2  
(Leica Biosystems, Newcastle, Großbritannien, Katalognummer: AR9640)
- Nachweis-Kit Bond™ Polymer Refine Detection  
(Leica Biosystems, Newcastle, Großbritannien, Katalognummer: DS9800)
- Bond™ Enzyme Pretreatment Kit, Enzym 1  
(Leica Biosystems, Newcastle, Großbritannien, Katalognummer: AR9551)



- EBER Sonde (Bond™ Ready-to-Use ISH EBER Probe)  
(Novocastra, Leica Biosystems, Newcastle, Großbritannien,  
Katalognummer: PB0589)
- 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochloridlösung (Bond™ DAB Enhancer)  
(Leica Biosystems, Newcastle, Großbritannien, Katalognummer:  
AR9432)
- Geräte und Materialien
  - Schlittenmikrotom  
(Leica Biosystems, Newcastle, Großbritannien)
  - BOND-MAX-System  
(Leica Biosystems, Newcastle, Großbritannien)
  - Eindeckautomat  
(Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland)
  - Wärmeschrank  
(Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA)
  - Mikroskop: Axioskop  
(Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland)
  - ProgRes® Mikroskopkamera  
(Jenoptik, Jena, Deutschland)
  - Objektträger  
(Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshafen, Deutschland)
  - Deckgläser  
(Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland)
- Software
  - ProgRes® CapturePro Version 2.7  
(Jenoptik, Jena, Deutschland)
  - Adobe Photoshop Version 11.0.1  
(Adobe Systems GmbH, München, Deutschland)
  - Graph Pad Prism® Version 5  
(Graph Pad Software Inc., La Jolla, USA)
  - R  
(The R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich)

## 2.2 Auswahl des Patientenkollektivs

Im Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, befanden sich 436 Gewebeproben, bei denen in den Jahren 1995 bis März 2011 ein diffus großzelliges B-Zell Lymphom (DLBCL) diagnostiziert wurde. In die Kohorte wurden entsprechend der Definition von EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ aus der WHO-Klassifikation von Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes (Stand: 2008) nur diejenigen Patienten mit DLBCL eingeschlossen, die bei Diagnosestellung älter als 50 Jahre alt waren (Swerdlow et al. 2008). Aufgrund fehlender Paraffinblöcke (n=125) und zu schlechter Materialbeschaffenheit (n=16) mussten 141 Fälle ausgeschlossen werden, so dass letztlich 295 Fälle mittels *in situ* – Hybridisierung auf die EBV-kodierte RNA (EBER) untersucht wurden. Diese Fälle entstammten dem Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, der 2. Medizinischen Klinik des Städtischen Krankenhauses Kiel, dem Friedrich-Ebert-Krankenhaus Neumünster, dem St. Franziskus-Hospital Flensburg sowie dem Diakonissenkrankenhaus Flensburg.

Da nur bei Ausschluss einer Immunkompromittierung ein EBV-positives DLBCL „des älteren Patienten“ diagnostiziert werden darf, wurden alle EBER-positiven Fälle durch Studium der Krankengeschichten auf eine zugrundeliegende Immunkompromittierung untersucht. Hierzu wurden zum einen die Angaben der einsendenden Kliniken hinsichtlich Vorerkrankungen, wie z. B. vorausgegangene Tumoren und Chemotherapien, Vorliegen einer HIV-Infektion, Zustand nach Transplantation und Einnahme immunsuppressiver Medikamente, überprüft. Zum anderen wurden die behandelnden Ärzte kontaktiert und ein Fragebogen zur Erfassung weiterer klinischer Daten verschickt (siehe Anhang).

Zur Vergrößerung des Patientenkollektivs und um ein repräsentatives Ergebnis für Zentraleuropa zu erzielen, wurde die Kohorte aus Kiel um zwei im Vorfeld publizierte Fallserien aus Tübingen, Deutschland, (Hofscheier et al. 2011) und Basel, Schweiz, (Hoeller et al. 2010) ergänzt.

Die Gesamtkohorte zur Ermittlung der Inzidenz und Altersverteilung in Zentraleuropa umfasste letztlich 639 Patienten, zu denen Daten für die Auswertung zur Verfügung standen.

Zur Beurteilung der Auswirkung des EBV-Latenztypes auf das Gesamtüberleben der Patienten wurden die EBER-positiven Fälle aus der Gesamtkohorte aus Kiel,

Tübingen und Basel um 15 EBV-positive Fälle erweitert, die im Lymphknotenregister des Instituts für Pathologie am UKSH Kiel zwischen 2008 und 2011 identifiziert wurden. Diese Fälle wurden von außerhalb Schleswig-Holsteins zur Konsultation zugesandt und erfüllten ebenfalls alle Kriterien eines EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“. Da sie jedoch nicht die Verteilung dieser neuen Entität innerhalb Deutschlands repräsentieren, wurden sie lediglich für die Überlebenszeitanalyse, nicht jedoch für die Ermittlung der Inzidenz, hinzugezogen.

Zur Berechnung des Gesamtüberlebens wurde das Todesdatum bzw. das Datum der letzten Verlaufskontrolle ermittelt. Diese Informationen entstammten zum einen dem oben genannten Fragebogen, der an die behandelnden Ärzte verschickt wurde. Zum anderen wurden die entsprechenden Einwohnermeldeämter kontaktiert, um einen aktuellen Status über den jeweiligen Patienten zu erhalten (siehe Anhang).

Letzteres erfolgte nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (siehe Anhang), ebenso wie alle weiteren Untersuchungen in Übereinstimmung mit den Empfehlungen der Ethikkommission zur Verwendung von Gewebeproben aus dem Archiv des Lymphknotenregisters (Az D447/10) durchgeführt wurden. Alle patientenbezogenen Daten wurden in pseudonymisierter Form nur innerhalb des gesicherten Datennetzes der Universität Kiel gespeichert. Die Publikation der Ergebnisse erfolgte in vollständig anonymisierter Form.

### 2.3 Paraffinschnitt

Aus den in Formalin fixierten und in Paraffinblöcke eingebetteten Gewebeproben wurden mit dem Schlittenmikrotom (Leica Biosystems, Newcastle, Großbritannien) einzelne Schnitte mit einer Schichtdicke von jeweils 3-5  $\mu\text{m}$  angefertigt. Anschließend wurden die Paraffinschnitte auf beschichtete Objektträger (Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshafen, Deutschland) aufgezogen und für eine Nacht bei 37-42 °C im Wärmeschrank (Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA) getrocknet.

## 2.4 EBER *in situ* – Hybridisierung

Die *in situ* – Hybridisierung ist eine Methode zum direkten und spezifischen Nachweis von DNA und RNA in Gewebe, Zellen und Chromosomen. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren dazu verwendet, die durch das Epstein-Barr Virus kodierte RNA (EBER) zu detektieren und dadurch herauszufinden, ob die Tumorzellen der DLBCL latent mit dem Virus infiziert waren.

Die Untersuchung erfolgte an den zuvor gefertigten Paraffinschnitten. Als erstes mussten die Schnitte entparaffiniert werden. Dafür wurden diese für 10 Minuten in Xylol inkubiert. Durch eine absteigende Alkoholreihe (3-mal 100% Alkohol, 2-mal 96% Alkohol, 1-mal 70% Alkohol) wurde das Xylol wieder entfernt und die Präparate rehydriert. Die nachfolgenden Schritte wurden mit dem Nachweis-Kit Bond™ Polymer Refine Detection im automatisierten BOND-MAX-System (Leica Biosystems, Newcastle, Großbritannien) durchgeführt. Hier wurden die Präparate zunächst für 10 Minuten mit Wasserstoffperoxid inkubiert, um die endogene Peroxidaseaktivität in den Gewebeproben zu unterdrücken. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Enzymvorbehandlung unter Anwendung von Bond™ Enzyme Pretreatment Kit, Enzym 1 (Leica Biosystems, Newcastle, Großbritannien). Nach Zugabe der Bond™ Ready-to-Use ISH EBER Probe (Leica Biosystems, Newcastle, Großbritannien), einer Fluorescein-konjugierten Oligonukleotidsonde, erfolgte die zweistündige Hybridisierung. Mit Meerrettichperoxidase (HRP) markierte Anti-Fluorescein Antikörper wurden hinzugefügt, um die Hybridisierung zwischen der EBV-kodierten RNA und der Sonde zu lokalisieren. Die Zugabe des Substrats 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochloridlösung (DAB) (Bond™ DAB Enhancer, Leica Biosystems, Newcastle, Großbritannien) machte den Komplex und somit diejenigen Zellkerne, die EBER-Transkripte enthielten, als braunes Präzipitat sichtbar. Abschließend folgte eine Kontrastfärbung mit Hämatoxylin (blau), die der Sichtbarmachung der Zellkerne diente.

Danach wurden die Präparate aus dem Leica Bond Vollautomaten (Leica Biosystems, Newcastle, Großbritannien) entnommen und manuell mittels aufsteigender Alkoholreihe (1-mal 70% Alkohol, 2-mal 96% Alkohol, 3-mal 100% Alkohol, 2-mal 100% Alkohol-Xylol 1:1) entwässert. Das Entfetten erfolgte durch 3- bis 4-malige Inkubation in Xylol. Als letzter Schritt wurde zum Schutz des gefärbten

Schnittes im Eindeckautomat (Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland) ein Deckglas auf den Objektträger aufgebracht.

Es folgte die mikroskopische Beurteilung und Auswertung der Präparate. Die Diagnose eines EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ wurde gemäß *Oyama et al.* gestellt, wenn mindestens 50% der Lymphomzellen positiv für die EBV-kodierte RNA waren (*Oyama et al.* 2007).

## 2.5 Immunhistochemie

Mit immunhistochemischen Färbungen können bestimmte Zellproteine spezifisch sichtbar gemacht werden. Das Prinzip beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. In der vorliegenden Arbeit wurden die bei der *in situ* – Hybridisierung EBV positiv getesteten Fälle mittels Immunhistochemie weitergehenden Färbungen für Hämatoxylin und Eosin, CD10, CD20, Ki67, BCL2, BCL6, MUM1, LMP1 sowie EBNA2 unterzogen. Diese wurden nach den in der Pathologie üblichen Standards für paraffineingebettetes Gewebe durchgeführt.

Vor der immunhistochemischen Färbung mussten die formalinfixierten Paraffin-Gewebeschnitte entparaffiniert werden. Hierfür erfolgte eine 10-minütige Inkubation in Xylol und eine absteigende Alkoholreihe (3-mal 100% Alkohol, 2-mal 96% Alkohol, 1-mal 70% Alkohol) zur Rehydrierung der Präparate. Die anschließende Färbung wurde ebenfalls mit dem vollautomatischen BOND-MAX-System (Leica Biosystems, Newcastle, Großbritannien) durchgeführt. Es erfolgte zunächst eine Vorbehandlung mit der Bond™ Epitopdemaskierungslösung 1 (Citrat-Puffer, pH-Wert 5,9-6,1) bzw. 2 (EDTA-Puffer, pH-Wert 8,9-9,1) (Leica Biosystems, Newcastle, Großbritannien) zur hitzeinduzierten Freilegung der Antigene, die zuvor durch die Formalinfixierung verändert worden waren. Dieses ermöglicht die Erkennung des Epitops durch den Primärantikörper. Anschließend wurde der jeweilige gegen das gesuchte Zielantigen gerichtete Antikörper in verdünnter Form hinzugefügt. Die Bindung des Antikörpers an das Zielantigen im Gewebeschnitt wurde mithilfe eines polymeren Detektionssystems (Bond™ Polymer Refine Detection, Leica Biosystems, Newcastle, Großbritannien) sichtbar gemacht.

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper, ihre Herkunftsspezies, den Klon sowie über den Ablauf der

Antigenfreilegung. Alle Materialien und Chemikalien wurden entsprechend der Anweisungen ihres Herstellers verwendet.

Abschließend erfolgte die mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen. Mithilfe einer Mikroskopkamera (Jenoptik, Jena, Deutschland) und der Bildaufnahmesoftware ProgRes® CapturePro Version 2.7 (Jenoptik, Jena, Deutschland) wurden Fotos für die vorliegende Arbeit angefertigt. Diese wurden mit dem Programm Adobe Photoshop Version 11.0.1 (Adobe Systems GmbH, München, Deutschland) bearbeitet.

Zielantigen	Klon	Herkunftsspezies	Verdünnung	Antigen Demaskierung	Verstärker
CD20	JH1	Maus (monoklonal)	1:50	Bond™ Epitopdemaskierungslösung 1, 20 min. 100° C	Bond™ Polymere Refine Detection
Ki67	SP6	Kaninchen (monoklonal)	1:300	Bond™ Epitopdemaskierungslösung 2, 20 min. 100° C	Bond™ Polymere Refine Detection
LMP1	CS.1-4	Maus (monoklonal)	1:50	keine Antigen Demaskierung	Bond™ Polymere Refine Detection
EBNA2	PE2	Maus (monoklonal)	1:50	Bond™ Epitopdemaskierungslösung 2, 30 min. 100° C	Bond™ Polymere Refine Detection
BCL2	100/D5	Maus (monoklonal)	1:25	Bond™ Epitopdemaskierungslösung 1, 20 min. 100° C	Bond™ Polymere Refine Detection
BCL6	BL6.02	Maus (monoklonal)	1:50	Bond™ Epitopdemaskierungslösung 2, 30 min. 100° C	Bond™ Polymere Refine Detection
MUM1	Mum1P	Maus (monoklonal)	1:50	Bond™ Epitopdemaskierungslösung 1, 20 min. 100° C	Bond™ Polymere Refine Detection
CD10	56C6	Maus (monoklonal)	1:10	Bond™ Epitopdemaskierungslösung 1, 30 min. 100° C	Bond™ Polymere Refine Detection

Tabelle 6: Antikörper der Immunhistochemie. Auflistung ihrer Herkunftsspezies, des Klons, der Verdünnung, des Verstärkers sowie des Ablaufs der Antigenfreilegung.

## 2.6 Statistische Analysen

Zur Bestimmung der Häufigkeit EBV-positiver DLBCL „des älteren Patienten“ in Deutschland bzw. Zentraleuropa wurde in der vorliegenden Kohorte die Inzidenz berechnet.

Das Gesamtüberleben der Patienten mit EBV-positivem DLBCL „des älteren Patienten“ in Abhängigkeit von der EBNA2-Expression wurde gemäß Kaplan und Meier geschätzt (Kaplan et al. 1958). Es wurde definiert als die Zeit vom Tag der Diagnosestellung bis zum Todestag bzw. bis zum Tag der letzten Verlaufskontrolle. Für die Darstellung der Kaplan-Meier-Überlebenskurve wurde das Programm Graph Pad Prism® Version 5 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, USA) verwendet.

Die logistische Regression wurde dazu verwendet, die Wahrscheinlichkeit darzustellen, in einem bestimmten Alter an einem EBV-positiven DLBCL zu erkranken, und damit einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Alter und dem EBV-Status in DLBCL aufzuweisen (Klapper et al. 2012). Sie wurde mit dem Statistikprogramm R (The R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) berechnet.

Die p-Werte wurden auf 4 Stellen hinter dem Komma gerundet. Es wurde definiert, dass ab einem p-Wert kleiner als 0,05 das Ergebnis als statistisch signifikant zu werten ist.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 EBER *in situ* – Hybridisierung

295 DLBCL, die zwischen 1995 und 2011 in Schleswig-Holstein diagnostiziert wurden und von denen im Archiv des Instituts für Pathologie des UKSH, Campus Kiel, Gewebeblöcke vorhanden waren, wurden mittels *in situ* – Hybridisierung auf die EBV-kodierte RNA untersucht. Von diesen Fällen entsprachen 5 nach heutigen Diagnosekriterien nicht mehr einem diffus, großzelligen B-Zell Lymphom, 42 Präparate konnten nicht ausgewertet werden. In einem Lymphom wurde eine peritumorale Reaktivierung des Epstein-Barr Virus entdeckt, die in Kapitel 3.4 näher beschrieben wird. Letztlich konnten somit 247 Lymphome hinsichtlich ihres EBV-Status beurteilt werden.

EBER-Positivität konnte in 9 der 247 DLBCL (3,64 %) detektiert werden, jedoch mussten 6 Patienten nach sorgfältigem Studium ihrer Krankengeschichten aufgrund einer zugrundeliegenden Immunsuppression ausgeschlossen werden. In einem Fall handelte es sich um ein Posttransplantationsassoziiertes Lymphom (Zustand nach Herztransplantation), ein anderer Patient war in der Vorgeschichte bereits an einer chronisch lymphatischen Leukämie erkrankt, so dass es sich bei dem DLBCL um ein Zweitmalignom handelte. Drei weitere Fälle hatten bei entsprechender Grunderkrankung (Autoimmunhämolytische Anämie [n=1], Bullöses Pemphigoid [n=1], seropositive chronische Polyarthritits [n=1]) zuvor eine medikamentöse Immunsuppression erhalten. Bei einem DLBCL handelte es sich um ein sekundär bzw. simultan hochmalignes Lymphom. Die Diagnose eines EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ konnte in der Kieler Kohorte somit bei 3 von 247 Patienten (1,21 %) gestellt werden.

Hinzu kamen 160 EBV-negative und 4 EBV-positive DLBCL aus Tübingen (Hofscheier et al. 2011) sowie 226 EBV-negative und 8 EBV-positive Fälle aus Basel (Hoeller et al. 2010).

Die Gesamtkohorte für Zentraleuropa umfasste 639 Patienten, von denen 15 Fälle EBV-Positivität in der EBER *in situ* – Hybridisierung zeigten (2,35 %). Entsprechend der Definition der WHO-Klassifikation (Swerdlow et al. 2008) mussten 40 Patienten, die jünger als 50 Jahre alt waren, aus der Kohorte ausgeschlossen werden, von einem Patienten war das Alter nicht bekannt. Letztlich konnte in 15 von 598



Lymphomen ein EBV-positives DLBCL „des älteren Patienten“ diagnostiziert werden, was einer Inzidenz von 2,51 % in Zentraleuropa entsprach.

## 3.2 Immunhistochemie

Die in der Gesamtkohorte identifizierten 15 EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ sowie die 15 positiven Konsultationsfälle aus dem Kieler Lymphknotenregister wurden in einem zweiten Schritt weiterführenden immunhistochemischen Färbungen unterzogen.

### 3.2.1 EBV – Latenztypen

Der Latenztyp des Epstein-Barr Virus wurde, wie von *Klein et al.* beschrieben, durch immunhistochemische Färbungen auf die viralen Proteine LMP1 und EBNA2 ermittelt (Klein et al. 2007). Er konnte in 28 der 30 Fälle bestimmt werden. 5 von 28 Biopsaten (17,86 %) präsentierten einen Latenztyp I, bei dem weder LMP1 noch EBNA2 exprimiert wird. In 15 der 28 Lymphome (53,57 %) konnte eine alleinige LMP1-Expression und somit ein Latenztyp II nachgewiesen werden. Sowohl LMP1 als auch EBNA2 wurden in 8 von 28 Fällen detektiert, so dass sich ein Latenztyp III in 28,57 % darstellte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in 71,43 % keine EBNA2-Expression nachgewiesen werden konnte (Abbildung 1) und 28,57 % Positivität für EBER, LMP1 und EBNA2 zeigten (Abbildung 2).

### 3.2.2 Histomorphologie

Die Lymphome wurden gemäß der Charakterisierung von *Oyama et al.* in Abhängigkeit ihrer histomorphologischen Eigenschaften als polymorph, monomorph oder Hodgkin-ähnlich klassifiziert (Oyama et al. 2003). Von 18 Fällen waren Informationen für die Beurteilung verfügbar. 5 der 18 Biopsate (27,78 %) stellten sich als polymorpher und 13 von 18 Fällen (72,22 %) als monomorpher Subtyp dar.

Von 16 dieser 18 histomorphologisch charakterisierten Lymphome konnte der Subtyp noch einmal unter Berücksichtigung der EBNA2-Expression bestimmt werden. Vier

monomorphe Lymphome waren EBNA2 positiv (4/16 = 25,0 %), in sieben Fällen (7/16 = 43,75 %) zeigte sich ein monomorpher Subtyp ohne EBNA2-Expression. Bei den polymorphen DLBCL wurde in einem Lymphom (1/16 = 6,25 %) EBNA2-Positivität nachgewiesen, die vier weiteren Fälle vom polymorphen Subtyp (4/16 = 25,0 %) zeigten keine EBNA2-Expression. Es wurde kein Lymphom mit Hodgkin-ähnlichem Subtyp identifiziert.

17 Fälle konnten hinsichtlich spezifischer histomorphologischer Eigenschaften, die zuvor in EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ identifiziert worden waren, wie zum Beispiel Nekrose und Angiotropismus (Oyama et al. 2003), charakterisiert werden. Von diesen wurde in 16 Lymphomen (94,1 %) eine Nekrose und/oder eine Ulzeration des Epithels detektiert. In 8 von 16 Präparaten (50,0 %) zeigte sich ein angiotropes Wachstumsmuster der neoplastischen Zellen.

Nach Färbung auf CD10, BCL6 und MUM1 waren 17 Lymphome für die Klassifikation in Keimzentrums-ähnliche (*germinal center like* = GCB) und nicht Keimzentrums-ähnliche (*non-germinal center like* = non-GCB) DLBCL auswertbar (Hans et al. 2004). 3 der 17 Fälle (17,65 %) präsentierten einen GCB-Subtyp und 14/17 (82,35 %) wurden als non-GCB DLBCL klassifiziert.

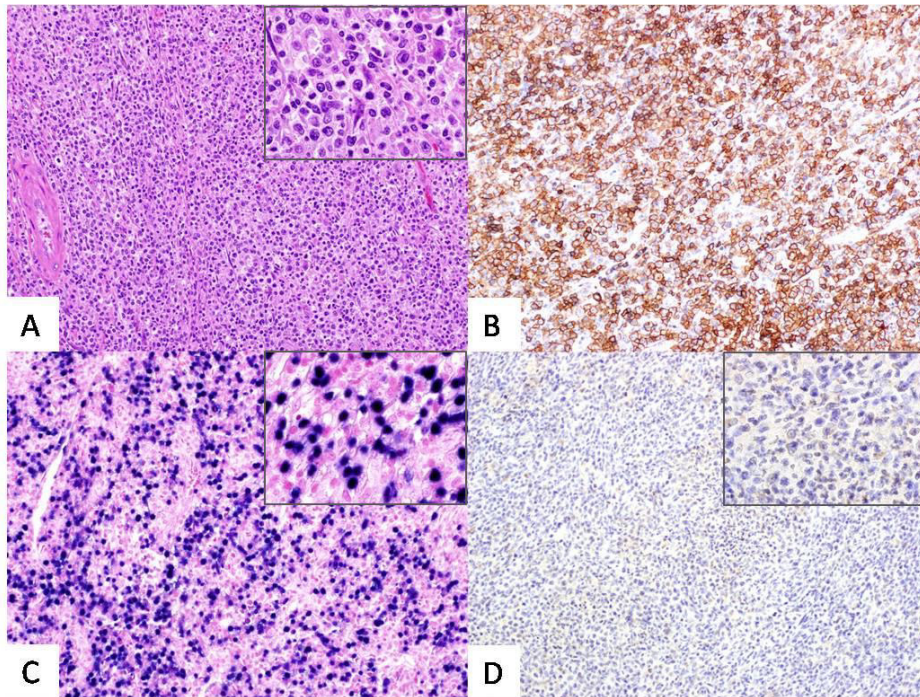


Abbildung 1: EBV-positives DLBCL „des älteren Patienten“ ohne EBNA2-Expression.

A: Diffuse Infiltration eines Lymphknotens durch mittelgroße lymphoide Blasten vermischt mit kleineren Lymphozyten (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 200-fache Vergrößerung, Ausschnitt 1000-fache Vergrößerung). B: Die Blasten zeigen starke CD20-Positivität (CD20-Färbung, 200-fache Vergrößerung). C: Die Lymphomzellen sind in mehr als 50 % aller Tumorzellen positiv für die EBV-assoziierte RNA (EBER *in situ* – Hybridisierung, 200-fache Vergrößerung, Ausschnitt 1000-fache Vergrößerung). D: Eine Expression des EBV-spezifischen nukleären Antigen 2 (EBNA2) ist nicht in den Lymphomzellen nachzuweisen (EBNA2-Färbung, 200-fache Vergrößerung, Ausschnitt 1000-fache Vergrößerung).

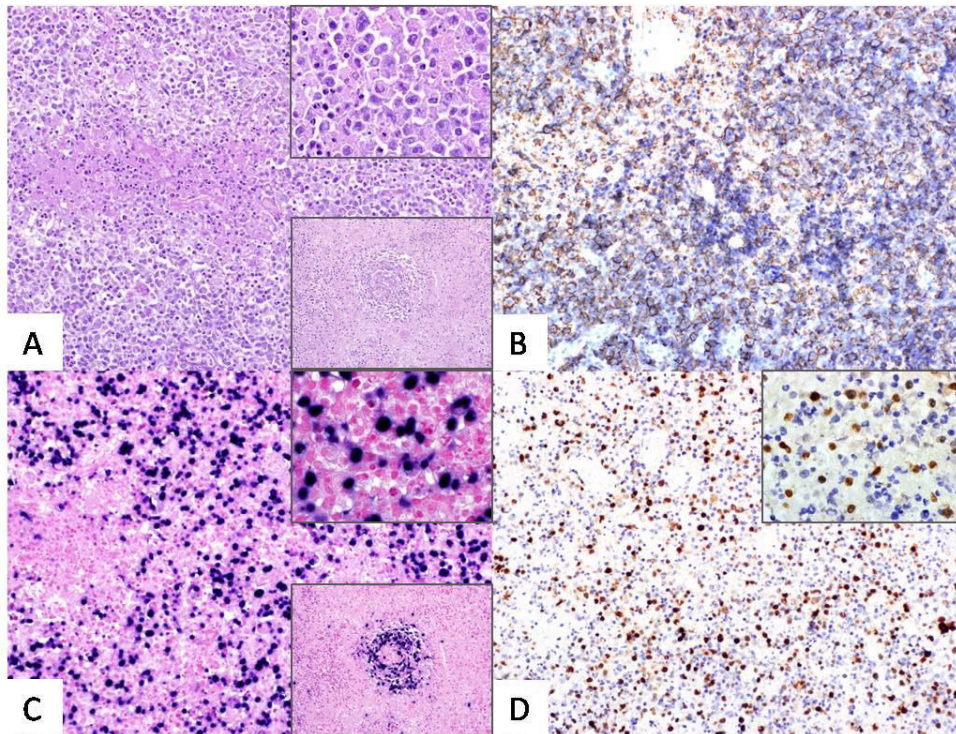


Abbildung 2: EBV-positives DLBCL „des älteren Patienten“ mit EBNA2-Expression.

A: Diffuse Infiltration eines Lymphknotens durch pleomorphe, lymphoide Blasten begleitet von Nekrose (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 200-fache Vergrößerung, Ausschnitt oben rechts 1000-fache Vergrößerung), Ausschnitt unten rechts: Die Blasten zeigen ein angiotropes Wachstumsmuster (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 1000-fache Vergrößerung). B: Die Blasten zeigen eine inhomogene Positivität für CD20, einige sind stärker positiv, andere nur schwach (CD20-Färbung, 200-fache Vergrößerung). C: Die Lymphomzellen sind in mehr als 50 % aller Tumorzellen positiv für die EBV-assoziierte RNA, sowohl im Bereich des diffusen Lymphoms, als auch im angiotropen Kompartiment (EBER *in situ* – Hybridisierung, 200-fache Vergrößerung, Ausschnitte oben und unten rechts 1000-fache Vergrößerung). D: Die Lymphomzellen sind positiv für EBNA2 (EBNA2-Färbung, 200-fache Vergrößerung, Ausschnitt 1000-fache Vergrößerung).

### 3.3 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Die Diagnose eines EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ wurde in der Kieler Kohorte bei 3 von 247 Patienten (1,21 %) gestellt. Das Alter der EBER-positiven Patienten bei der Erstdiagnose der Erkrankung betrug im Median 72 Jahre (Altersspanne 59-73 Jahre). Unter diesen drei Fällen waren zwei Männer (66,7 %) und eine Frau (33,3 %).

Die Gesamtkohorte für Zentraleuropa umfasste 639 Patienten, die in Schleswig-Holstein, Tübingen (Hofscheier et al. 2011) und Basel (Hoeller et al. 2010) identifiziert wurden und zu denen Daten für die Auswertung zur Verfügung standen. In dieser kombinierten Kohorte waren 598 Patienten bei der Diagnosestellung über 50 Jahre alt mit einem medianen Alter von 71 Jahren (Altersspanne 50-98 Jahre). Unter diesen zeigten insgesamt 15 Fälle (2,51 %) eine positive Färbung in der EBER *in situ* – Hybridisierung und erfüllten somit alle in der WHO-Klassifikation definierten Kriterien für ein EBV-positives DLBCL „des älteren Patienten“ (Swerdlow et al. 2008). Das mediane Alter in der EBV-positiven Gruppe betrug 72 Jahre (Altersspanne 57-88 Jahre). Im Vergleich dazu lag das Alter der EBER-negativen Patienten im Median bei 71 Jahren (Altersspanne 50-98 Jahre).

Unter den insgesamt 30 EBV-positiven Patienten (inklusive Konsultationsfälle) waren 18 Männer (60 %) und 12 Frauen (40 %). Zu 18 dieser 30 EBV-positiven DLBCL lagen Informationen bezüglich des Stadiums bei Erstmanifestation der Erkrankung vor. In 3 Fällen (16,67 %) zeigte sich ein Stadium I, Stadium II lag bei 6 Patienten (33,33 %) vor, 8 Fälle (44,44 %) präsentierten ein Stadium III und bei einem Patienten (5,56 %) wurde das DLBCL erst im Stadium IV diagnostiziert.

In 18 der 30 EBV-positiven DLBCL (60 %) lag initial eine nodale Manifestation des Tumors vor, 12 Patienten (40 %) zeigten einen primär extranodalen Befall.

Tabelle 7 gibt einen Überblick über die klinischen Charakteristika der 30 EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“.

Fall	Geschlecht	Alter	Lokalisation	EBNA2	Stadium	Therapie	Status nach Therapie	Überleben	Überlebenszeit [Tage]
1	männlich	57	LK	negativ	na	na	na	tot	4383,36
2	männlich	59	"bulky disease" Thoraxwand	positiv	na	6x CHOP, Radiatio	PR	tot	831
3	männlich	62	Weichteilgewebe	negativ	IIIA	CHOP	na	lebt	1034,96
4	männlich	63	LK (submandibulär)	negativ	IIA	R-CHOP	CR	lebt	1065,4
5	männlich	64	LK	negativ	na	na	na	lebt	5753,16
6	männlich	65	gastrointestinal	positiv	II	na	na	tot	60,88
7	weiblich	70	LK	negativ	III	CHOP	na	lebt	2252,56
8	männlich	72	Tonsille	negativ	na	na	na	na	na
9	weiblich	73	Cervix uteri	negativ	na	na	na	tot	18
10	männlich	77	LK (axillär)	positiv	IIIA	2x R-Bendamustin	na	tot	91,32
11	weiblich	77	LK	negativ	IIA	4x CHOP- Bendamustin	PR	tot	334,84
12	männlich	79	LK	positiv	na	na	na	tot	273,96
13	weiblich	81	LK	negativ	na	na	na	na	na
14	männlich	86	LK	negativ	na	na	na	na	na
15	weiblich	88	LK, Darm	negativ	IIEB	keine	na	tot	na
16	weiblich	62	LK	negativ	IA	abwarten und beobachten	na	tot	630
17	weiblich	83	LK (cervical)	negativ	IA	na	na	tot	135
18	weiblich	69	LK (paraaortal), retropilonidal	negativ	IIB	R-CHOP	na	lebt	1434
19	weiblich	66	LK (cervical)	negativ	IIIB	R-CHOP	PR	lebt	1162
20	männlich	62	retroperitoneale Tumormasse	partiell positiv	IIIEB	Vorphase Chemo- Immuntherapie	na	tot	260
21	weiblich	75	LK (supraclaviculär)	positiv	IIIB	R-Bendamustin	na	tot	76

22	männlich	58	Jejunum	negativ	na	CHOP	na	tot	28
23	weiblich	84	Magen	na	na	na	na	tot	100
24	männlich	59	LK (cervical)	schwach positiv	IVB	R-CHOP	CR	tot	721
25	männlich	59	LK (inguinal)	negativ	na	na	na	lebt	1707
26	männlich	80	LK (submandibulär)	negativ	IIIA	R-CHOP	CR	tot	1092
27	männlich	67	Weichteilgewebe	positiv	IEB	R-CHOP	CR	lebt	988
28	männlich	81	Tonsille	negativ	na	Tonsillektomie	CR	lebt	258
29	weiblich	76	intraabdominale Tumormasse	na	IIIB	R-CHOP	PR	lebt	968
30	männlich	73	paraaortal	negativ	IIA	R-CHOP	CR	lebt	952

Tabelle 7: Klinische Charakteristika der EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“.

LK= Lymphknoten. R= Rituximab. CHOP= Cyclophosphamid, Hydroxyrubicin, Oncovin® (Vincristin), Prednisolon. PR= partielle Remission. CR= komplette Remission. na= Daten nicht verfügbar.

### 3.4 Intra- und peritumorale EBV-Reaktivierung

Unter den 247 DLBCL der Kieler Kohorte, die mittels EBER *in situ* – Hybridisierung auf das Vorhandensein des Epstein-Barr Virus analysiert wurden, wurde ein Lymphom detektiert, bei dem EBV peritumoral reaktiviert war, die Lymphomzellen selbst jedoch EBER negativ waren. Die Diagnose eines EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ konnte in diesem Fall nicht gestellt werden und die weiteren Analysen der vorliegenden Arbeit erfolgten unter Ausschluss dieses DLBCL.

Im gleichen Beobachtungszeitraum wurden im Kieler Institut für Pathologie, Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister, jedoch drei weitere Fälle identifiziert, bei denen die Lymphomzellen selbst keine Reaktivität in der EBER *in situ* – Hybridisierung zeigten, aber ein intra- oder peritumoral gelegenes Areal mit EBER-positiven Zellen nachgewiesen werden konnte. Diese befanden sich vor allem perivaskulär und bildeten ein inhomogenes Infiltrat aus Blasten, kleinen Lymphozyten sowie Histiocyten. Die EBV-positiven Zellen machten etwa 10 % aller B-Zellen des Präparats aus. Mittels Laser-unterstützter Mikrodisektion wurden die EBV-positiven Zellen aus dem Gewebe heraus getrennt. Eine Analyse des Immunglobulin Rearrangements der mikrodisektierten Zellen zeigte, dass die intra- und peritumoral gelegenen EBV-positiven B-Zellen und die EBV-negativen Lymphomzellen keine identischen klonalen Produkte aufwiesen. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 3 dargestellt.



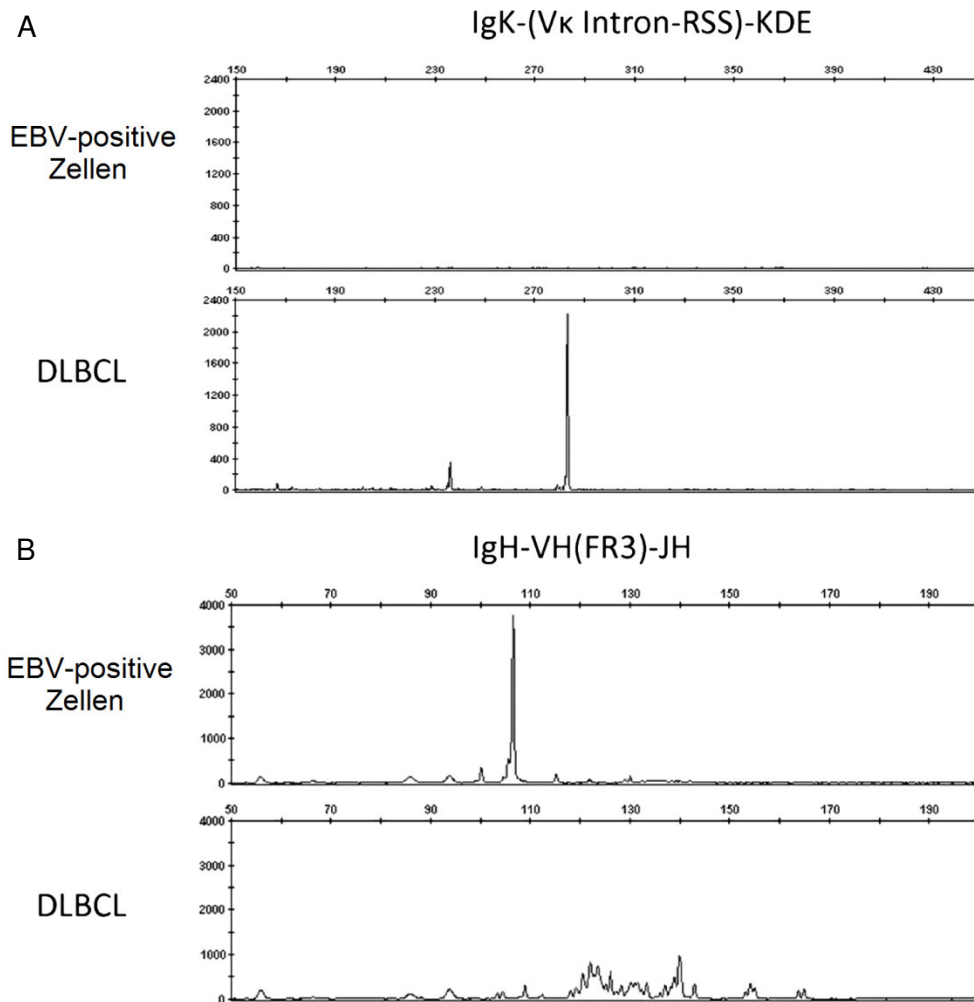


Abbildung 3: Vergleich des Immunglobulin Rearrangements zwischen EBV-negativen DLBCL und den mikrodisektierten EBV-positiven B-Zellen (Fall 1, Tabelle 8).

Die verwendeten Primer sind oberhalb des Elektropherogramms angegeben, auf der linken Seite sind die jeweils analysierten Proben aufgeführt. A: PCR mit dem BIOMED2 Primer IgK (Vκ Intron-RSS)-KDE. In den mikrodisektierten EBV-positiven Zellen sind keine klonalen Amplifikationsprodukte nachweisbar. Das EBV-negative DLBCL zeigt eine klonale Amplifizierung bei 283 Basenpaaren (bp). B: PCR mit dem BIOMED2 Primer IgH VH (FR3)-JH. Detektion eines klonalen Amplicons mit 106 bp in den mikrodisektierten EBV-positiven B-Zellen. Keine klonale Amplifizierung im EBV-negativen DLBCL.

3 der 4 Fälle (75 %) waren vom Latenztyp III mit Positivität sowohl für EBNA2 als auch für LMP1, ein Fall (25 %) zeigte einen Latenztyp II ohne EBNA2-Expression.

Alle Patienten (100 %) waren männlich. Das mediane Alter bei der Diagnosestellung betrug 56,5 Jahre (Altersspanne 46-69 Jahre). Zwei Lymphome zeigten eine primäre nodale Manifestation mit Befall der axillären und inguinalen Lymphknoten, ein DLBCL war in der Mucosa des Magens lokalisiert (siehe Abbildung 4) und der vierte Fall stellte sich als intraabdominale Tumormasse dar. Alle Patienten erhielten eine Polychemotherapie in Kombination mit dem CD20-Antikörper Rituximab mit oder ohne anschließende Radiatio. Zwei Patienten erreichten eine komplette Remission, ein Patient eine partielle Remission und ein Patient starb aufgrund multipler kardiovaskulärer Erkrankungen. Die klinischen Charakteristika der Patienten sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Die genannten Fälle ähnelten den bereits beschriebenen EBV-positiven mukokutanen Ulzerationen (EBVMCU) (Dojcinov et al. 2010), traten jedoch alle in unmittelbarer Nähe eines EBV-negativen DLBCL auf und stellen somit eine neue Entität der lokalen EBV-Reaktivierung dar.

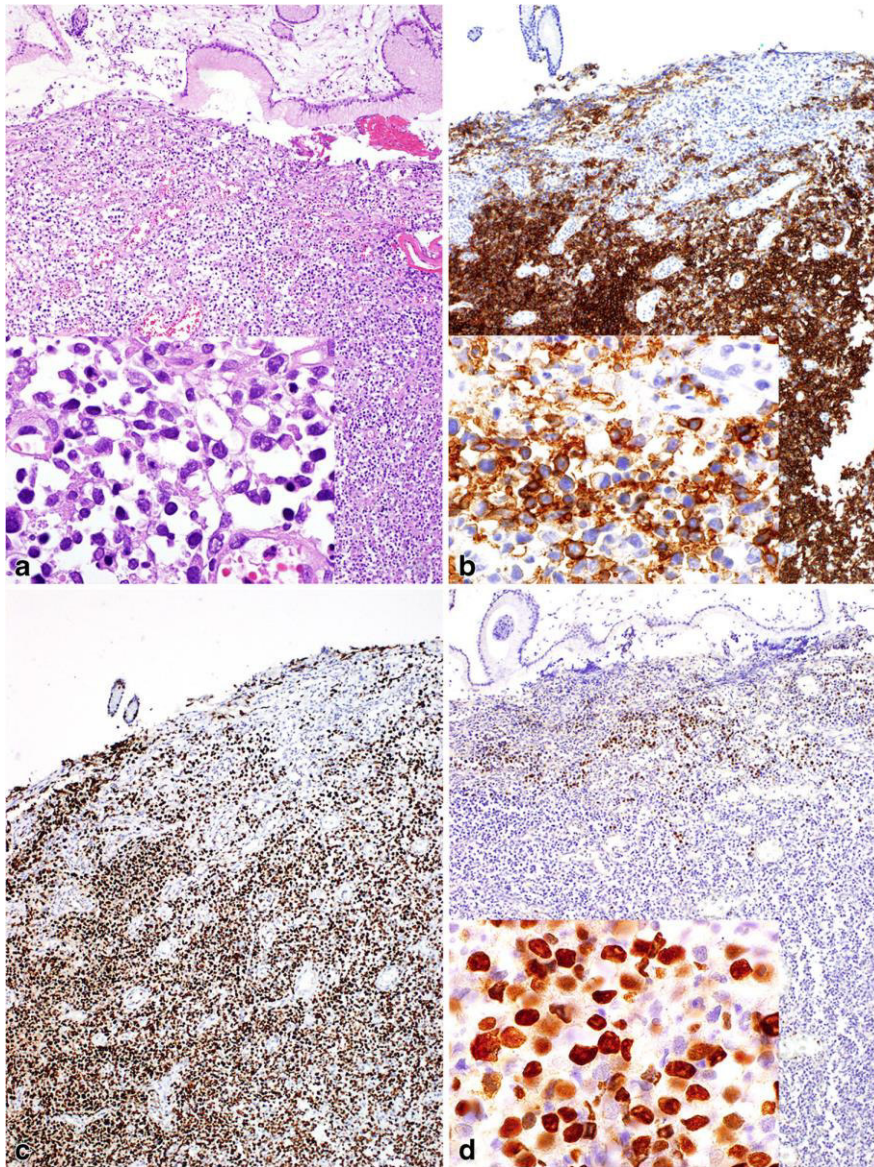


Abbildung 4: EBV-negatives DLBCL im Magen mit peritumorale EBV Aktivität.

a: Diffuse Infiltration der Submucosa durch blastische, lymphoide Zellen (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 100-fache Vergrößerung, Ausschnitt 1000-fache Vergrößerung). b: Die Blasten zeigen CD20-Positivität. Unterhalb des Epithels befindet sich ein Areal mit CD20-negativen, lymphoiden Zellen, das von CD20-positiven Blasten durchsetzt ist (CD20-Färbung, 100-fache Vergrößerung, Ausschnitt 1000-fache Vergrößerung). c: Die Blasten zeigen eine hohe Proliferationsaktivität (Ki67, 100-fache Vergrößerung). d: Das Lymphom ist negativ für die EBV-assoziierte RNA (EBER *in situ* – Hybridisierung, 100-fache Vergrößerung). d Ausschnitt: direkt unterhalb des Epithels befinden sich einige wenige EBV-positive Blasten (EBER *in situ* – Hybridisierung, 1000-fache Vergrößerung).

Fall	Lokalisation	Alter	Geschlecht	Stadium	Therapie	Status nach Therapie	Immunsuppression	„Follow-Up“ [Monate]	Status nach „Follow-Up“
1	LK (axillär, inguinal)	49	männlich	III B	3x R-CHOP, 2x R-Bendamustin	PR	nein	4	lebt
2	LK (axillär)	64	männlich	III B	1x CHOEP, 1x VNCOP, 4x CHEP	CR	nein	11	lebt
3	Magen	46	männlich	II <sub>1</sub> B	6x R-CHOP, Radiatio	CR	nein	6	lebt
4	abdominale Tumormasse	69	männlich	na	R-CHOP	na	nein	na	tot

Tabelle 8: Klinische Charakteristika der EBV-negativen DLBCL mit intra- und peritumorale EBV-Aktivierung.

LK= Lymphknoten. R= Rituximab. CHOP= Cyclophosphamid, Hydroxyrubicin, Oncovin® (Vincristin), Prednisolon. CHOEP= Cyclophosphamid, Hydroxyrubicin, Oncovin® (Vincristin), Etoposid, Prednisolon. VNCOP= Cyclophosphamid, Mitoxantron, Oncovin® (Vincristin), Etoposid, Prednisolon. CHEP= Cyclophosphamid, Doxorubicin, Etoposid, Prednisolon. PR= partielle Remission. CR= komplette Remission. na= Daten nicht verfügbar.

## 3.5 Statistische Analysen

### 3.5.1 Inzidenz und Altersverteilung

In 247 der in Schleswig-Holstein diagnostizierten DLBCL konnte eine Auswertung der EBER *in situ* – Hybridisierung erfolgen. Unter diesen zeigten 9 Fälle ein positives Signal für die EBV-kodierte RNA. Nach sorgfältigem Studium der Krankengeschichten der Patienten hinsichtlich einer Immunkompromittierung erfüllten drei Fälle alle Kriterien für die Diagnose eines EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“. Für Schleswig-Holstein ergab sich daraus eine Inzidenz von 1,21% (3/247).

Für die Ermittlung der Inzidenz in Zentraleuropa und die Analyse eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem Alter der Patienten und dem EBV-Status in den Lymphomen wurde die Kieler Kohorte mit zwei im Vorfeld publizierten Fallserien aus Tübingen, Deutschland, (Hofscheier et al. 2011) und Basel, Schweiz, (Hoeller et al. 2010) kombiniert. Hierfür konnte die Kohorte mit 160 EBV-negativen und 4 EBV-positiven DLBCL aus Tübingen ergänzt werden, aus Basel wurden 226 EBV-negative und 8 EBV-positive Fälle hinzugefügt, für die Informationen zum Alter vorhanden waren. Die Gesamtkohorte umfasste schließlich 639 DLBCL, von denen 598 Patienten bei der Erstdiagnose über 50 Jahre alt waren. Insgesamt zeigten 15 Fälle in der *in situ* – Hybridisierung einen positiven Status für das Epstein-Barr Virus, was in Zentraleuropa einer Inzidenz von 2,51 % (15/598) entsprach.

Abbildung 5 zeigt die Häufigkeit und die altersabhängige Verteilung EBV-negativer DLBCL (dunkelgraue Balken) und EBV-positiver DLBCL „des älteren Patienten“ (hellgraue Balken). Positivität für das Epstein-Barr Virus wurde in der Altersspanne zwischen 50 und 89 Jahren nachgewiesen. Die höchste altersabhängige Inzidenz, 6/202 (2,97 %), wurde bei den Patienten im Alter zwischen 70 und 79 Jahren gesehen. In diesem Altersbereich war auch die Häufigkeit EBV-negativer DLBCL (196/639 = 30,67 %) und somit die Gesamtzahl der DLBCL am größten. Bei den über 90-jährigen Patienten gab es kein EBV-positives Lymphom.

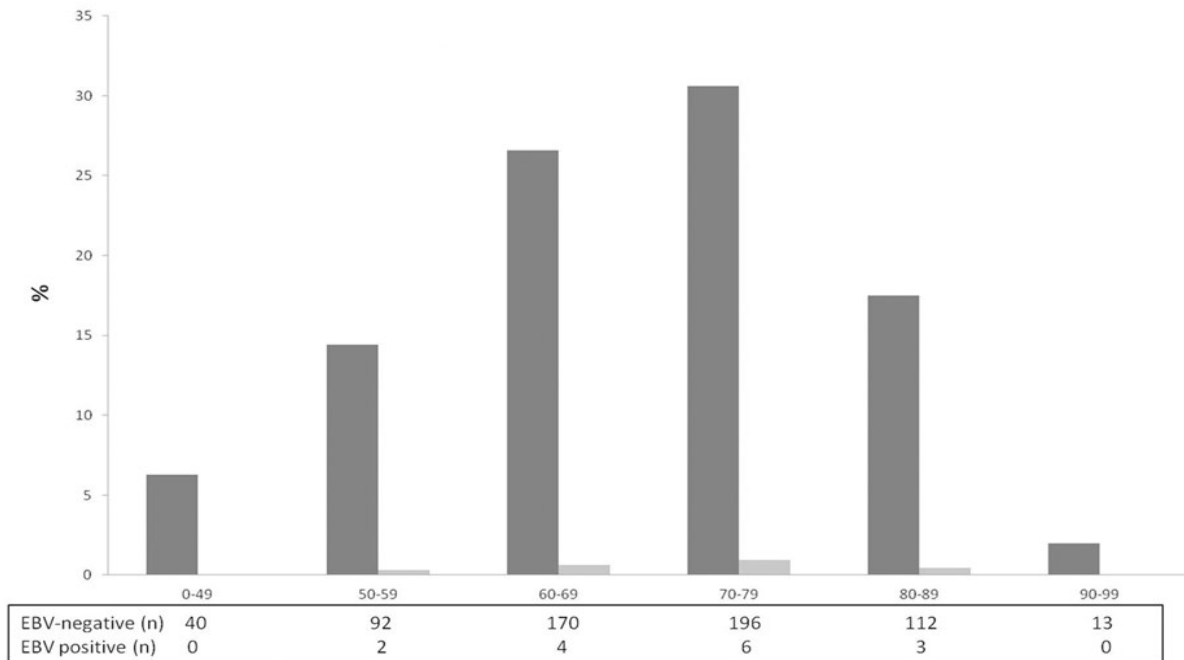


Abbildung 5: Altersabhängige Inzidenz und Verteilung EBV-negativer DLBCL (dunkelgrau) und EBV-positiver DLBCL „des älteren Patienten“ (hellgrau). x-Achse: Altersspanne in Jahren. y-Achse: Prozentanteil an der Gesamtzahl aller DLBCL. Die unten stehende Tabelle gibt die Anzahl der untersuchten Patienten jeder Altersgruppe wider.

Mithilfe der logistischen Regression (Abbildung 6) wurde analysiert, ob ein Zusammenhang zwischen der EBV-Positivität in den Lymphomen und dem Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung besteht. Das Verfahren ermittelt die Wahrscheinlichkeit, in einem beliebigen Alter an einem EBV-positiven DLBCL zu erkranken, unabhängig von der Anzahl der untersuchten Fälle in einer entsprechenden Altersgruppe. Auf der x-Achse ist das Alter aufgetragen, auf der y-Achse der Zusammenhang zwischen einem positiven EBV-Status und dem Alter, wobei 1 definiert ist als EBV-Assoziation und 0 keinen Zusammenhang zum Epstein-Barr Virus darstellt. Die blaue, leicht ansteigende Linie veranschaulicht die Wahrscheinlichkeit, an einem EBV-positiven DLBCL zu erkranken in Abhängigkeit vom zunehmenden Alter. Die Abbildung verdeutlicht, dass die Anzahl EBV-positiver DLBCL im Verhältnis zu allen analysierten Fällen sehr gering ist. Gleichzeitig zeigt der Graph, dass die Wahrscheinlichkeit, mit zunehmendem Alter an einem EBV-positiven DLBCL zu erkranken, nur gering ansteigt. Das Ergebnis der Regressionsanalyse war nicht statistisch signifikant ( $p = 0,8522$ ).

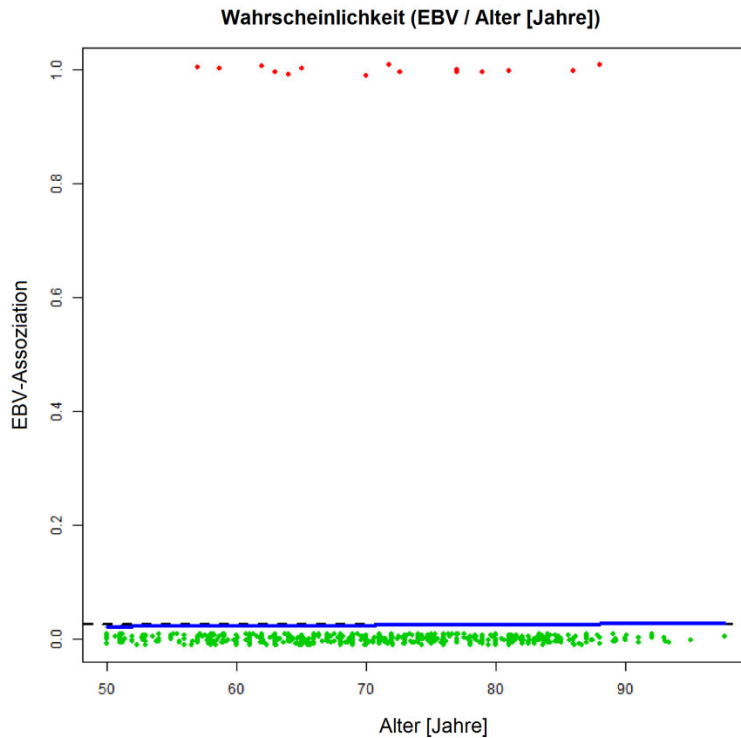


Abbildung 6: Logistische Regressionsanalyse EBV-negativer DLBCL (grüne Punkte) und EBV-positiver DLBCL „des älteren Patienten“ (rote Punkte). Gestrichelte Linie: Durchschnittswert EBV-positiver DLBCL „des älteren Patienten“ im Verhältnis zu allen analysierten Fällen. Blaue Linie: Wahrscheinlichkeit, an einem EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ zu erkranken. x-Achse: Alter in Jahre. y-Achse: EBV-Assoziation, 0=kein Zusammenhang, 1=Assoziation zu EBV.

### 3.5.2 Überlebenszeitanalyse

Aufgrund der für Zentraleuropa ermittelten geringen Inzidenz des EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ wurde in der betrachteten Kohorte nur eine kleine Anzahl positiver Fälle (n=15) identifiziert. Um bei der Analyse des Gesamtüberlebens dennoch ein vertrauenswürdiges Ergebnis zu erhalten, wurde die Gruppe der EBV-positiven DLBCL um 15 weitere positive Fälle ergänzt, die unter den Konsultationsfällen des Kieler Lymphknotenregisters identifiziert wurden. Für die Überlebenszeitanalyse nach Kaplan und Meier (Kaplan et al. 1958) stand somit eine Kohorte von 30 EBV-positiven Fällen zur Verfügung. Das Gesamtüberleben wurde in Abhängigkeit von der EBNA2-Expression analysiert, die in 28 der 30 Fälle bekannt war. In 8 von 28 (28,57 %) Lymphomen zeigte sich ein Latenztyp III mit einer EBNA2-Expression, in 20 der 28 Fälle (71,43 %) konnte keine Expression von EBNA2 nachgewiesen werden. Informationen zum Überlebenszeitraum waren von

24 Patienten vorhanden. Von den 8 EBNA2-positiven Fällen starben 7 Patienten (87,5 %) innerhalb des Beobachtungszeitraumes, nur ein Patient (12,5 %) war zu diesem Zeitpunkt noch am Leben. Abbildung 7 veranschaulicht, dass Patienten, die an einem EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ mit einem Latenztyp III (positiver EBNA2-Status) erkrankt sind, ein deutlich schlechteres Gesamtüberleben aufzeigen als Patienten, bei denen ein Latenztyp I oder II (ohne EBNA2-Expression) nachgewiesen wurde. Das mediane Überleben EBNA2-positiver Fälle in der analysierten Kohorte lag bei 267 Tagen, Patienten ohne EBNA2-Expression überlebten im Median für 4383 Tage nach der Diagnosestellung. Das Ergebnis war statistisch signifikant ( $p = 0,0156$ ).

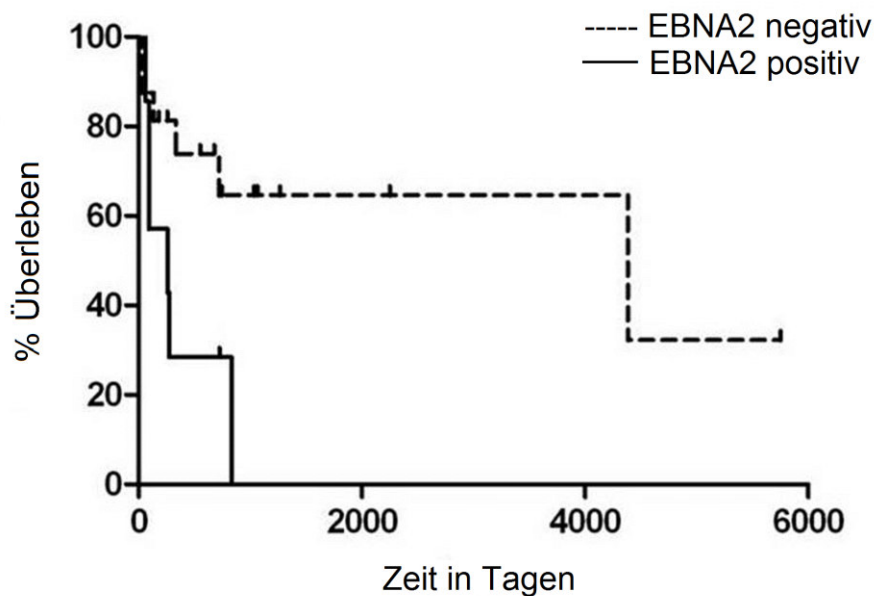


Abbildung 7: Darstellung des Gesamtüberlebens in einer Kaplan-Meier Kurve. Durchgezogene Linie: EBNA2-positiv Fälle (n=8). Gestrichelte Linie: EBNA2-negativ Fälle (n=20).



## 4 Diskussion

Diffus großzellige B-Zell Lymphome sind die häufigsten aggressiven B-Zell Lymphome in der westlichen Bevölkerung. Hinsichtlich ihrer molekularen Eigenschaften, des Immunphänotyps, der Morphologie und der Klinik handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe von Lymphomen (Armitage et al. 1998; Swerdlow et al. 2008).

Das Epstein-Barr Virus spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von diversen B- und T-Zell Lymphomen. EBV-positive B-Zell Lymphome können unterteilt werden in immunsuppressionsassoziierte B-Zell Lymphome sowie in EBV-positive B-Zell Lymphome, die bei immunkompetenten Patienten auftreten. Letztere kommen zum einen im Zusammenhang mit chronischen Entzündungen vor, wie zum Beispiel das pyothoraxassoziierte DLBCL, zum anderen als EBV-positives DLBCL „des älteren Patienten“, welches in der aktuellen WHO-Klassifikation von Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes (Stand: 2008) als neue Entität aufgeführt ist. Es ist definiert als EBV-positives DLBCL, das bei immunkompetenten Patienten, die bei der Diagnosestellung über 50 Jahre alt sind, auftritt (Swerdlow et al. 2008). Zunehmendes Alter und die damit verbundene Abschwächung des Immunsystems wurden bisher in der Literatur als mögliche Ursachen für den onkogenen Effekt der EBV-Reaktivierung in B-Zellen diskutiert (Adam et al. 2011; Oyama et al. 2007; Franceschi et al. 2007; Roschewski et al. 2012).

Das EBV-positive DLBCL „des älteren Patienten“ wurde erstmals in asiatischen Patientenkohorten beschrieben, bei denen eine relativ hohe Inzidenz von bis zu 14 % aller DLBCL detektiert und ein Anstieg der Inzidenz mit zunehmendem Alter beobachtet wurde (Oyama et al. 2007; Park et al. 2007; Kuze et al. 2000). Die Inzidenz in den westlichen Ländern scheint wesentlich geringer zu sein als die berichteten Daten aus Asien, die zwischen 1 % und 14 % variieren (Oyama et al. 2007; Park et al. 2007; Chang et al. 2014; Oyama et al. 2003; Wada et al. 2011). So konnte die Schweizer Arbeitsgemeinschaft um *Hoeller et al.* 8 EBV-positive DLBCL „des älteren Patienten“ in einer Kohorte von 258 Patienten identifizieren, was einer Inzidenz von 3,1 % entsprach (Hoeller et al. 2010). Die Studie von *Hofscheier et al.* zeigte ebenfalls ein selteneres Vorkommen der Erkrankung in der westlichen Bevölkerung: 2 % der deutschen Fälle und 7 % der mexikanischen Patienten

(Hofscheier et al. 2011). Die Inzidenz in Mexiko lag damit jedoch nur geringfügig unter den asiatischen Werten von 8-14 %. Vergleichbar hohe Inzidenzen wie in Asien wurden von *Beltran et al.* in Peru (14,07 %) und *Montes-Moreno et al.* in Spanien (16,38 %) beobachtet. Allerdings ist hervorzuheben, dass die Diagnose eines EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ hier bereits gestellt wurde, wenn mehr als 20 % der Tumorzellen EBER-positiv waren (Beltran et al. 2011) bzw. bei jeglicher Positivität in der EBER *in situ* – Hybridisierung (Montes-Moreno et al. 2012). Dieses könnte eine Erklärung für die deutlich höheren Inzidenzen sein.

Die bisher publizierten Studien aus der westlichen Bevölkerung, in denen die Inzidenz des EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ erforscht wurde, basierten jedoch auf kleineren Patientenkohorten als in Asien.

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, eine Aussage über die Inzidenz und Altersverteilung des EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ in Zentraleuropa treffen zu können. Dafür wurde eine Kohorte DLBCL (n=247) aus dem Kieler Institut für Pathologie, Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister, mit zwei zuvor publizierten Fallserien aus Tübingen, Deutschland, (n=169) (Hofscheier et al. 2011) und Basel, Schweiz, (n=258) (Hoeller et al. 2010) zusammengefügt. Das Ergebnis war eine große, kombinierte Kohorte von 639 DLBCL, zu denen Daten für die Auswertung zur Verfügung standen. Da diese hämatopathologischen Zentren jedoch nicht alle DLBCL einer bestimmten Region diagnostizieren und erfassen, kann ein Bias der analysierten Gewebeproben nicht ausgeschlossen werden. Dennoch wird die kombinierte Kohorte aufgrund der beträchtlichen Größe, der Verteilung über drei verschiedene europäische Institute und der unselektionierten Auswahl aus den Archiven als repräsentativ für Zentraleuropa betrachtet.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Inzidenz (2,5 %) des EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ in Zentraleuropa ist deutlich niedriger als die im Vorfeld beschriebene Inzidenz von bis zu 14 % in Asien (Oyama et al. 2007). Sie deckt sich aber mit den oben beschriebenen größtenteils niedrigeren Inzidenzen, die in vorherigen Studien der westlichen Bevölkerung ermittelt wurden. Interessanterweise wurde in der zentraleuropäischen Kohorte die höchste altersabhängige Inzidenz (2,97 %) zwischen 70 und 79 Jahren detektiert, die Altersspanne, in der auch die Häufigkeit EBV-negativer DLBCL (30,67 %) und somit die Gesamtzahl aller DLBCL am größten war. Weiterhin ist besonders hervorzuheben, dass die

Wahrscheinlichkeit an einem EBV-positiven DLBCL zu erkranken, nicht mit zunehmendem Alter anstieg und somit im Gegensatz zu den Ergebnissen der asiatischen Studien steht (Oyama et al. 2007). Vielmehr wurde in Zentraleuropa bei Patienten über 90 Jahre in keinem einzigen DLBCL EBV-Positivität nachgewiesen. Die vorliegenden Daten suggerieren daher, dass eine Assoziation zwischen dem Epstein-Barr Virus und den diffus großzelligen B-Zell Lymphomen bei immunkompetenten Patienten in Zentraleuropa nicht durch eine altersabhängige Abnahme der Funktion des Immunsystems verursacht ist. Es lässt sich daraus spekulieren, dass EBV-assoziierte Lymphome und lymphoproliferative Erkrankungen in immunkompetenten Patienten aufgrund von Unterschieden in der genetischen Disposition in asiatischen Ländern häufiger sind als in Europa. Die hier beobachteten Differenzen in der Inzidenz des EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ (2,5 % in Zentraleuropa vs. 8-14 % in Asien) sowie im Zusammenhang zwischen EBV-Assoziation und Patientenalter bei Diagnosestellung (kein Anstieg der Inzidenz mit zunehmendem Alter in Zentraleuropa) wurden durch die Analyse in der vorliegenden Arbeit erstmals demonstriert.

Das mediane Alter der Patienten mit EBV-positivem DLBCL betrug in der zentraleuropäischen Kohorte 72 Jahre (Altersspanne 57-88 Jahre). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Werten in der Literatur, in der das Alter bei Diagnosestellung im Median mit 69 Jahren (Montes-Moreno et al. 2012), 71 Jahren (Oyama et al. 2007) bzw. 75 Jahren (Beltran et al. 2011) beschrieben wurde.

Sowohl in der asiatischen als auch in der westlichen Bevölkerung zeigte sich das hier beobachtete Vorherrschen der Erkrankung bei männlichen Patienten (60 %). In den Studien von *Beltran et al.* und *Montes-Moreno et al.* betrug das Verhältnis von Männern zu Frauen jeweils 1,5:1, bei *Oyama et al.* 1,2:1 (Beltran et al. 2011; Montes-Moreno et al. 2012; Oyama et al. 2003).

In der vorliegenden Studie waren 60 % der Fälle primär in den Lymphknoten lokalisiert. Dieses steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von *Oyama et al.*, der eine nodale Manifestation in nur 31 % und einen extranodalen Befall in 69 % der Fälle beobachtet hat (Oyama et al. 2007).

Die Gewebeproben aus der Kohorte der hier vorgelegten Arbeit wurden weiterhin gemäß der Beschreibungen von *Oyama et al.* hinsichtlich ihrer histomorphologischen Eigenschaften untersucht (Oyama et al. 2003). 27,8 % der DLBCL präsentierten einen polymorphen und 72,2 % einen monomorphen Subtyp. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den bisherigen Daten, in denen der polymorphe Subtyp einen Anteil von 59,1 % (Oyama et al. 2003) bzw. 64,58 % (Oyama et al. 2007) ausmachte und der monomorphe Subtyp in 40,9 % (Oyama et al. 2003) bzw. 35,42 % (Oyama et al. 2007) detektiert wurde.

Eine begleitende Nekrose und/oder Ulzeration des Epithels wurde in der vorliegenden Arbeit in 94 % der DLBCL nachgewiesen und fand sich somit noch häufiger als in der Publikation von *Oyama et al.*, in der 77,27 % der Lymphome Nekroseareale enthielten (Oyama et al. 2003). Die hier detektierten 50 % der Fälle mit einem angiotropen Wachstum der neoplastischen Zellen sind vergleichbar mit den 59 % der zuvor publizierten Studie (Oyama et al. 2003).

Die hier präsentierten Daten könnten einen Einfluss auf die Kriterien für das EBV-Screening in DLBCL in Zentraleuropa haben. Sie suggerieren, dass vielmehr die histologischen Befunde, wie vor allem eine Lymphom begleitende Nekrose, aber auch ein angiotropes Wachstumsmuster der neoplastischen Zellen, auf eine EBV-Assoziation hindeuten und den Pathologen dazu veranlassen sollten, nach dem Epstein-Barr Virus zu fahnden. Sowohl die Nekrose als auch der Angiotropismus sind als morphologische Eigenschaften des EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ bereits in der aktuellen WHO Klassifikation aufgeführt (Swerdlow et al. 2008).

EBV-positive lymphoproliferative Erkrankungen sind durch verschiedene vorherrschende Latenztypen des Virus charakterisiert. So ist zum Beispiel das plasmablastische Lymphom mit dem Latenztyp I (Liu et al. 2012) und das Hodgkin Lymphom mit dem Latenztyp II (Massini et al. 2009) assoziiert, wohingegen der Latenztyp III vorwiegend in Posttransplantationsassoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen (PTLD) und der lymphomatoiden Granulomatose zu finden ist (Rezk et al. 2007; Loren et al. 2003; Morscio et al. 2013). Die unterschiedlichen Latenztypen sind definiert als spezifische Expressionsmuster der EBV-assoziierten Antigene, die jeweils mit einer bestimmten Phase des viralen Lebenszyklus in Zusammenhang stehen (Klein et al. 2007; Thorley-Lawson et al. 2004). Der Latenztyp III des Epstein-

Barr Virus, der sowohl EBER und LMP1 als auch EBNA2 exprimiert, repräsentiert eine aktive Phase mit Produktion von Virus-assoziierten Proteinen (Klein et al. 2007) und tritt vor allem in Lymphoproliferationen mit reduzierter Immunität gegen EBV auf, bedingt durch eine verminderte Antikörperantwort gegen EBV-spezifische Antigene (Cen et al. 1993). Er wird daher vorwiegend im Rahmen von Immunsuppressionen nachgewiesen (Adam et al. 2011). Die aktuelle Literatur berichtet, dass sowohl der Latenztyp II als auch der Latenztyp III im EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ vorkommen (Adam et al. 2011; Oyama et al. 2007; Hoeller et al. 2010; Liu et al. 2012). *Hoeller et al.* analysierten die Auswirkung einer EBNA2-Expression auf das Gesamtüberleben in acht Fällen von EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ (Hoeller et al. 2010). 2/8 (25 %) waren EBNA2-positiv und wiesen ein schlechteres Überleben im Vergleich zu den EBNA2-negativen Fällen auf. Die untersuchten Gruppen waren jedoch zu klein für eine statistische Analyse. In der hier vorgelegten Arbeit wurden deshalb drei verschiedene Studien zu einer großen Kohorte zusammengefügt. In dieser zeigte sich, dass etwa ein Drittel (28,6 %) aller EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ in Zentraleuropa einen Latenztyp III (mit EBNA2-Expression) aufwiesen, inklusive der 2 Patienten aus der Studie von *Hoeller et al.*, während in 71,4 % der Fälle keine Expression von EBNA2 nachgewiesen werden konnte. Der Prozentsatz EBV-positiver DLBCL „des älteren Patienten“ mit EBNA2-Expression ist mit den Daten aus den asiatischen Studien vergleichbar (Oyama et al. 2007; Shimoyama et al. 2008). In der zentraleuropäischen Kohorte zeigten die EBNA2-positiven Fälle ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben als die EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ ohne EBNA2-Expression. Erst vor kurzem untersuchten *Ok et al.* die EBV-Assoziation in einer großen Kohorte mit DLBCL Patienten aller Altersgruppen, die R-CHOP Chemotherapie erhalten haben (Ok et al. 2014). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit wiesen die EBNA2-positiven Fälle aus der Kohorte von *Ok et al.* kein kürzeres Überleben auf. Der Unterschied in der prognostischen Rolle der EBNA2-Expression könnte durch unterschiedliche Auswahlkriterien in der Patientenselektion erklärt sein, denn in der publizierten Studie von *Ok et al.* waren 7 von 28 EBV-positiven DLBCL Patienten jünger als 50 Jahre alt. Daher sollte der prognostische Einfluss des Latenztypes in zukünftigen Studien mit unselektionierten, großen Kohorten von EBV-positiven DLBCL weiter erforscht und bestätigt werden.

Zusammenfassend kann man aufgrund der hier präsentierten Daten die Vermutung anstellen, dass sich die EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ in zwei Subgruppen einteilen lassen. Zum einen in Lymphome mit Latenztyp III und EBNA2-Expression sowie einer altersabhängigen Abnahme der Immunkompetenz und dem damit verbundenen schlechteren Gesamtüberleben. Zum anderen in Lymphome mit Latenztyp I oder II, bei denen die Immunschwäche eine weniger wichtige Rolle in der Pathogenese des Lymphoms spielen könnte. Die zweite Gruppe könnte damit ähnlich zu den klassischen Hodgkin Lymphomen sein, welche ebenfalls häufig EBV-positiv sind, oftmals mit einem Latenztyp II assoziiert sind und meist bei immunkompetenten Patienten auftreten.

EBV-positive DLBCL „des älteren Patienten“ stellen eine morphologisch vielfältige Entität dar, bestehend aus unterschiedlichen histopathologischen Subgruppen, die von *Oyama et al.* beschrieben und in den polymorphen, monomorphen sowie Hodgkin-ähnlichen Subtyp eingeteilt wurden (Oyama et al. 2003). Die Ergebnisse der in dieser Arbeit analysierten Studie deuten jedoch auf weitere biologische und klinische Subgruppen hin und suggerieren, dass die Untersuchung des EBV-Latenztypes ein wertvolles Instrument sein kann, um eine klinisch aggressivere Subgruppe von Lymphomen zu identifizieren.

## 5 Zusammenfassung

Diffus großzellige B-Zell Lymphome stellen mit 25-30 % der Non-Hodgkin Lymphome der Erwachsenen die häufigste aggressive Subgruppe in der westlichen Bevölkerung dar.

Erst im Jahr 2008 wurde das EBV-positive DLBCL „des älteren Patienten“ als neue Entität in die WHO-Klassifikation von Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes aufgenommen. Per definitionem tritt dieses Lymphom bei Patienten auf, die bei der Erstdiagnose über 50 Jahre alt sind und bei denen keine zugrundeliegende Immunsuppression als Ursache für die Erkrankung nachgewiesen werden kann (Swerdlow et al. 2008). Es wurde erstmals in asiatischen Patientenkohorten beschrieben, in denen eine relativ hohe Inzidenz von bis zu 14 % sowie ein Anstieg der Inzidenz mit zunehmendem Alter beobachtet wurden (Oyama et al. 2007; Park et al. 2007; Kuze et al. 2000).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Inzidenz und klinische Relevanz dieser neuen Entität in Zentraleuropa zu analysieren.

Die erste Fragestellung zielte auf die Inzidenz und Altersverteilung in Zentraleuropa ab. Insgesamt konnten in der Gesamtkohorte der vorliegenden Arbeit 15 EBV-positive DLBCL „des älteren Patienten“ identifiziert werden, was einer Inzidenz von 2,5 % entsprach. Die höchste Inzidenz zeigte sich zwischen 70 und 79 Jahren und somit genau in der Altersspanne, in der auch die Gesamtzahl aller DLBCL am größten war. Interessanterweise konnte kein einziges EBV-positives Lymphom bei den über 90-jährigen Patienten detektiert werden. Die Ergebnisse zeigten, dass das EBV-positive DLBCL „des älteren Patienten“ in Zentraleuropa wesentlich seltener vorkommt als in Asien und der dort beobachtete Anstieg der Inzidenz mit zunehmendem Alter in der vorliegenden Kohorte nicht nachgewiesen werden konnte. Auch in der logistischen Regressionsanalyse zeigte sich keine statistisch signifikante Assoziation zwischen der EBV-Positivität und dem Alter der Patienten. Die Daten suggerieren daher, dass das EBV-positive DLBCL „des älteren Patienten“ nicht durch eine altersabhängige Abnahme des Immunsystems verursacht ist. Vielmehr können Unterschiede in der genetischen Prädisposition sowie Umweltfaktoren das häufigere Vorkommen in Asien erklären.

Weiterhin haben die vorliegenden Daten gezeigt, dass nicht das Alter des Patienten sondern die typischen histomorphologischen Charakteristika, wie Nekrose und Angiotropismus, den Pathologen dazu veranlassen sollten, ein Lymphom auf eine Reaktivierung des Epstein-Barr Virus zu prüfen.

Die zweite Fragestellung zielte auf die klinische Relevanz der neuen Entität in Zentraleuropa ab. Die Daten zeigten in etwa einem Drittel (28,57 %) der EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ einen Latenztyp III mit EBNA2-Expression. Diese Lymphome zeigten ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben im Vergleich zu den EBNA2-negativen Fällen.

Anhand der Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit kann man postulieren, dass es zwei Subgruppen des EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ gibt: zum einen Lymphome mit EBNA2-Expression und schlechterer Überlebenszeit, die vermutlich auf eine tatsächliche Abnahme der Immunkompetenz zurückzuführen ist, und zum anderen die Lymphome ohne EBNA2-Expression, die in immunkompetenten Patienten auftreten.

Zukünftige Studien an großen Kohorten sind notwendig, um den Einfluss des Latenztypes auf die Prognose des EBV-positiven DLBCL „des älteren Patienten“ sowie mögliche therapeutische Konsequenzen zu überprüfen.



## 6 Literaturverzeichnis

Adam, P., Bonzheim, I., Fend, F., Quintanilla-Martinez, L. (2011): Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphomas of the elderly. *Advances in anatomic pathology*, 18, 349-355

Allday, M. J., Crawford, D. H., Griffin, B. E. (1989): Epstein-Barr virus latent gene expression during the initiation of B cell immortalization. *The Journal of general virology*, 70 ( Pt 7), 1755-1764

Anonymus. (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, 3909-3918

Armitage, J. O., Weisenburger, D. D. (1998): New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 16, 2780-2795

Beltran, B. E., Castillo, J. J., Morales, D., de Mendoza, F. H., Quinones, P., Miranda, R. N., Gallo, A., Lopez-Illasaca, M., Butera, J. N., Sotomayor, E. M. (2011): EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: a case series from Peru. *American journal of hematology*, 86, 663-667

Campbell, J., Seymour, J. F., Matthews, J., Wolf, M., Stone, J., Juneja, S. (2006): The prognostic impact of bone marrow involvement in patients with diffuse large cell lymphoma varies according to the degree of infiltration and presence of discordant marrow involvement. *European journal of haematology*, 76, 473-480

Cen, H., Williams, P. A., McWilliams, H. P., Breinig, M. C., Ho, M., McKnight, J. L. (1993): Evidence for restricted Epstein-Barr virus latent gene expression and anti-EBNA antibody response in solid organ transplant recipients with posttransplant lymphoproliferative disorders. *Blood*, 81, 1393-1403

Chang, S. T., Lu, Y. H., Lu, C. L., Weng, S. F., Lin, S. H., Kuo, S. Y., Chuang, Y. T., Takeuchi, K., Ohshima, K., Chuang, S. S. (2014): Epstein-Barr virus is rarely associated with diffuse large B cell lymphoma in Taiwan and carries a trend for a shorter median survival time. *Journal of clinical pathology*, 67, 326-332

Chung, R., Lai, R., Wei, P., Lee, J., Hanson, J., Belch, A. R., Turner, A. R., Reiman, T. (2007): Concordant but not discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma predicts a poor clinical outcome independent of the International Prognostic Index. *Blood*, 110, 1278-1282

Cohen, J. I. (2000): Epstein-Barr virus infection. *The New England journal of medicine*, 343, 481-492

Coiffier, B. (2007): Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene*, 26, 3603-3613

Colomo, L., Loong, F., Rives, S., Pittaluga, S., Martinez, A., Lopez-Guillermo, A., Ojanguren, J., Romagosa, V., Jaffe, E. S., Campo, E. (2004): Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic differentiation represent a heterogeneous group of disease entities. *The American journal of surgical pathology*, 28, 736-747

Dojcinov, S. D., Venkataraman, G., Raffeld, M., Pittaluga, S., Jaffe, E. S. (2010): EBV positive mucocutaneous ulcer--a study of 26 cases associated with various sources of immunosuppression. *The American journal of surgical pathology*, 34, 405-417

Epstein, M. A., Henle, G., Achong, B. G., Barr, Y. M. (1965): Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *The Journal of experimental medicine*, 121, 761-770

Franceschi, C., Capri, M., Monti, D., Giunta, S., Olivieri, F., Sevini, F., Panourgia, M. P., Invidia, L., Celani, L., Scurti, M., Cevenini, E., Castellani, G. C., Salvioli, S. (2007): Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanisms of ageing and development*, 128, 92-105

Hans, C. P., Weisenburger, D. D., Greiner, T. C., Gascoyne, R. D., Delabie, J., Ott, G., Muller-Hermelink, H. K., Campo, E., Braziel, R. M., Jaffe, E. S., Pan, Z., Farinha, P., Smith, L. M., Falini, B., Banham, A. H., Rosenwald, A., Staudt, L. M., Connors, J. M., Armitage, J. O., Chan, W. C. (2004): Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 103, 275-282

Hoeller, S., Tzankov, A., Pileri, S. A., Went, P., Dirnhofer, S. (2010): Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma in elderly patients is rare in Western populations. *Human pathology*, 41, 352-357

Hof, H., Dörries, R. (2014): *Medizinische Mikrobiologie*. 5. Auflage, Thieme, Stuttgart

Hofscheier, A., Ponciano, A., Bonzheim, I., Adam, P., Lome-Maldonado, C., Vela, T., Cortes, E., Ortiz-Hidalgo, C., Fend, F., Quintanilla-Martinez, L. (2011): Geographic variation in the prevalence of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: a comparative analysis of a Mexican and a German population. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 24, 1046-1054

Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Korbjuhn, P., Stein, H. (1995): Epstein-Barr virus in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: unexpected infection patterns and different infection incidence in low- and high-grade types. *The Journal of pathology*, 175, 263-271

Kaplan, E. L., Meier, P. (1958): Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53, 457-481

Klapper, W., Kreuz, M., Kohler, C. W., Burkhardt, B., Szczepanowski, M., Salaverria, I., Hummel, M., Loeffler, M., Pellissery, S., Woessmann, W., Schwanen, C., Trumper, L., Wessendorf, S., Spang, R., Hasenclever, D., Siebert, R. (2012): Patient age at

diagnosis is associated with the molecular characteristics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 119, 1882-1887

Klein, E., Kis, L. L., Klein, G. (2007): Epstein-Barr virus infection in humans: from harmless to life endangering virus-lymphocyte interactions. *Oncogene*, 26, 1297-1305

Küppers, R. (2003): B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nature reviews. Immunology*, 3, 801-812

Kuze, T., Nakamura, N., Hashimoto, Y., Sasaki, Y., Abe, M. (2000): The characteristics of Epstein-Barr virus (EBV)-positive diffuse large B-cell lymphoma: comparison between EBV(+) and EBV(-) cases in Japanese population. *Japanese journal of cancer research : Gann*, 91, 1233-1240

Liu, F., Asano, N., Tatematsu, A., Oyama, T., Kitamura, K., Suzuki, K., Yamamoto, K., Sakamoto, N., Taniwaki, M., Kinoshita, T., Nakamura, S. (2012): Plasmablastic lymphoma of the elderly: a clinicopathological comparison with age-related Epstein-Barr virus-associated B cell lymphoproliferative disorder. *Histopathology*, 61, 1183-1197

Loddenkemper, C., Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Johrens-Leder, K., Foss, H. D., Jundt, F., Wirth, T., Dorken, B., Stein, H. (2004): Differential Emu enhancer activity and expression of BOB.1/OBF.1, Oct2, PU.1, and immunoglobulin in reactive B-cell populations, B-cell non-Hodgkin lymphomas, and Hodgkin lymphomas. *The Journal of pathology*, 202, 60-69

Loren, A. W., Porter, D. L., Stadtmauer, E. A., Tsai, D. E. (2003): Post-transplant lymphoproliferative disorder: a review. *Bone marrow transplantation*, 31, 145-155

Massini, G., Siemer, D., Hohaus, S. (2009): EBV in Hodgkin Lymphoma. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 1, e2009013

Miller, T. P., Grogan, T. M., Dahlberg, S., Spier, C. M., Brazier, R. M., Banks, P. M., Foucar, K., Kjeldsberg, C. R., Levy, N., Nathwani, B. N., et al. (1994): Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood*, 83, 1460-1466

Montes-Moreno, S., Odqvist, L., Diaz-Perez, J. A., Lopez, A. B., de Villambrosia, S. G., Mazorra, F., Castillo, M. E., Lopez, M., Pajares, R., Garcia, J. F., Mollejo, M., Camacho, F. I., Ruiz-Marcellan, C., Adrados, M., Ortiz, N., Franco, R., Ortiz-Hidalgo, C., Suarez-Gauthier, A., Young, K. H., Piris, M. A. (2012): EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly is an aggressive post-germinal center B-cell neoplasm characterized by prominent nuclear factor-kB activation. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 25, 968-982

Morscio, J., Dierickx, D., Tousseyn, T. (2013): Molecular pathogenesis of B-cell posttransplant lymphoproliferative disorder: what do we know so far? *Clinical & developmental immunology*, 2013, 150835

Murray, P. G., Young, L. S. (2002): The Role of the Epstein-Barr virus in human disease. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 7, 519-540

Niederman, J. C., McCollum, R. W., Henle, G., Henle, W. (1968): Infectious mononucleosis. Clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *Jama*, 203, 205-209

Ok, C. Y., Li, L., Xu-Monette, Z. Y., Visco, C., Tzankov, A., Manyam, G. C., Montes-Moreno, S., Dybaer, K., Chiu, A., Orazi, A., Zu, Y., Bhagat, G., Chen, J., Richards, K. L., Hsi, E. D., Choi, W. W., van Krieken, J. H., Huh, J., Ai, W., Ponzoni, M., Ferreri, A. J., Farnen, J. P., Moller, M. B., Bueso-Ramos, C. E., Miranda, R. N., Winter, J. N., Piris, M. A., Medeiros, L. J., Young, K. H. (2014): Prevalence and clinical implications of Epstein-Barr virus infection in de novo diffuse large B-cell lymphoma in Western countries. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 20, 2338-2349

Oyama, T., Ichimura, K., Suzuki, R., Suzumiya, J., Ohshima, K., Yatabe, Y., Yokoi, T., Kojima, M., Kamiya, Y., Taji, H., Kagami, Y., Ogura, M., Saito, H., Morishima, Y., Nakamura, S. (2003): Senile EBV+ B-cell lymphoproliferative disorders: a clinicopathologic study of 22 patients. *The American journal of surgical pathology*, 27, 16-26

Oyama, T., Yamamoto, K., Asano, N., Oshiro, A., Suzuki, R., Kagami, Y., Morishima, Y., Takeuchi, K., Izumo, T., Mori, S., Ohshima, K., Suzumiya, J., Nakamura, N., Abe, M., Ichimura, K., Sato, Y., Yoshino, T., Naoe, T., Shimoyama, Y., Kamiya, Y., Kinoshita, T., Nakamura, S. (2007): Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13, 5124-5132

Park, S., Lee, J., Ko, Y. H., Han, A., Jun, H. J., Lee, S. C., Hwang, I. G., Park, Y. H., Ahn, J. S., Jung, C. W., Kim, K., Ahn, Y. C., Kang, W. K., Park, K., Kim, W. S. (2007): The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 110, 972-978

Preiß, J., Dornoff, W., Hagmann, F. G., Schmieder, A. (2010): *Taschenbuch Onkologie : interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2010/2011*. 15. Auflage, Zuckschwerdt, München

Rezk, S. A., Weiss, L. M. (2007): Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Human pathology*, 38, 1293-1304

Rooney, C. M., Rickinson, A. B., Moss, D. J., Lenoir, G. M., Epstein, M. A. (1985): Cell-mediated immunosurveillance mechanisms and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *IARC scientific publications*, 249-264

Roschewski, M., Wilson, W. H. (2012): EBV-associated lymphomas in adults. *Best practice & research. Clinical haematology*, 25, 75-89

Shimoyama, Y., Yamamoto, K., Asano, N., Oyama, T., Kinoshita, T., Nakamura, S. (2008): Age-related Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative

disorders: special references to lymphomas surrounding this newly recognized clinicopathologic disease. *Cancer science*, 99, 1085-1091

Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J. W. (2008): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization classification of tumours ; 2 (der 4. ed.), Lyon, Internat. Agency for Research on Cancer.

Thompson, M. P., Kurzrock, R. (2004): Epstein-Barr virus and cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10, 803-821

Thorley-Lawson, D. A., Gross, A. (2004): Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *The New England journal of medicine*, 350, 1328-1337

Wada, N., Ikeda, J., Hori, Y., Fujita, S., Ogawa, H., Soma, T., Sugiyama, H., Fukuhara, S., Kanamaru, A., Hino, M., Kanakura, Y., Morii, E., Aozasa, K. (2011): Epstein-barr virus in diffuse large B-Cell lymphoma in immunocompetent patients in Japan is as low as in Western Countries. *Journal of medical virology*, 83, 317-321

## 7 Publikation der Ergebnisse

### Publizierte Abstracts:

**Borchert, A.**, Stuhlmann-Laiesz, C., Quintanilla-Martinez, L., Hoeller, S., Tzankov, A., Oshlies, I., Kreuz, M., Trappe, R.U., Klapper, W. (2014): Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly is rare in Central Europe and associated with poor outcome if positive for EBNA2. **Der Pathologe**, Supplement 1

Stuhlmann-Laiesz, C., Szczepanowski, M., **Borchert, A.**, Brüggemann, M., Klapper, W. (2014): Intra- and peritumoral Epstein-Barr virus activation in Epstein-Barr virus-negative diffuse large B-cell lymphoma. **Der Pathologe**, Supplement 1

### Originalarbeiten:

Stuhlmann-Laiesz, C., **Borchert, A.**, Quintanilla-Martinez, L., Hoeller, S., Tzankov, A., Oshlies, I., Kreuz, M., Trappe, R.U., Klapper, W. (2015): In Central Europe expression of EBNA2 is associated with poor survival in EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Leukemia & Lymphoma* [Epub ahead of print] DOI: 10.3109/10428194.2015.1040014

Stuhlmann-Laiesz, C., Szczepanowski, M., **Borchert, A.**, Brüggemann, M., Klapper, W. (2015): Epstein-Barr virus-negative diffuse large B-cell lymphoma hosts intra- and peritumoral B-cells with activated Epstein-Barr virus. *Virchows Archiv*, 466, 85-92

## **8 Danksagungen**

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. W. Klapper für die Überlassung des Themas, die umfangreiche Betreuung bei der gesamten Dissertation sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Allen Mitarbeitern der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister danke ich für die Unterstützung und die herzliche Aufnahme in das Team. Ein besonderer Dank gilt Dr. Christiane Stuhlmann-Laeisz für die Hilfe bei der Auswertung und der Veröffentlichung der Ergebnisse und dafür, dass sie sich immer wieder so viel Zeit für mich genommen hat. Charlotte Botz-von Drathen danke ich für die tolle Einarbeitung in die Datenbank und für die hervorragende technische Arbeit.

Für die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich bei PD Dr. Oschlies, Prof. Dr. Trappe, PD Dr. Quintanilla-Martinez, Prof. Tzankov, PD Dr. Höller und Dr. M. Kreuz.

Vielen Dank an Christiane, Thomas und Anne für das Korrekturlesen.

Mein letzter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die nicht nur während der Promotion sondern während des gesamten Studiums immer für mich da waren, mich stets motiviert und in allen Situationen unterstützt haben.

## 9 Lebenslauf

19.01.1989	geboren in Einbeck
08/1995 - 07/1999	Pestalozzi-Grundschule, Einbeck
08/1999 - 07/2001	Orientierungsstufe, Einbeck
08/2001 - 07/2008	Gymnasium Goetheschule, Einbeck
27.06.2008	Abitur
10/2008 - 11/2014	Studium der Humanmedizin, Christian – Albrechts – Universität zu Kiel
09/2010	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
seit 02/2013	Doktorandin bei Herrn Prof. Dr. med. W. Klapper, Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister, Institut für Pathologie, UK-SH, Campus Kiel
08/2013	Zulassung zum Praktischen Jahr
11/2014	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2014	Approbation
seit 01/2015	Ärztin im Kinder- und Jugendkrankenhaus Auf der Bult, Hannover



## **Anhang**

- Brief an Hausärzte
- Brief an Einwohnermeldeämter
- Votum der Ethikkommission



## Campus Kiel

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Christoph Röcken

**Sektion Hämatopathologie  
und Lymphknotenregister**

Leitung: Prof. Dr. Wolfram Klapper

Tel.: 0431 / 597-3399

E-Mail: [wklapper@path.uni-kiel.de](mailto:wklapper@path.uni-kiel.de)

Postanschrift: Postfach 7154, 24171 Kiel

Tel. Befundauskunft: 0431 / 597-3425

Fax Befundauskunft: 0431 / 597-4129

Internet: [www.uni-kiel.de/haematopath-lkr](http://www.uni-kiel.de/haematopath-lkr)

Datum:

### Betreff:

Sehr geehrter ... ,

im Rahmen unserer diagnostischen Qualitätskontrolle bezüglich der relativ neu definierten Erkrankung des EBV-positiven **diffusen großzelligen B-Zell Lymphoms des älteren Patienten** wollen wir eine diagnostische Qualitätskontrolle durchführen. Ziel ist es die diagnostischen Kriterien, die wir verwenden, zu überprüfen und zu prüfen, ob der klinische Verlauf der Erkrankung in Deutschland dem der bisher publizierten Fälle aus Japan entspricht. Dahinter verbirgt sich die Frage, ob es überhaupt Sinn macht, die EBV-positiven Varianten des diffusen großzelligen B-Zell Lymphome in der histopathologischen Diagnostik als solche zu identifizieren. Eine solche Überprüfung diagnostischer Maßnahmen wird in rein anonymisierter Form ausgewertet und durch eine Stellungnahme der Ethikkommission der Universität Kiel gedeckt.

Wir wären Ihnen sehr dankbar, wenn Sie die Fragen auf dem beigefügten Blatt beantworten könnten.

Zusätzlich bitten wir um Übersendung eines aktuellen Arztbriefes soweit vorhanden.

Für Ihre Unterstützung möchten wir uns herzlich bedanken.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. W. Klapper

Dr. Christiane Stuhlmann-Laeisz

Alisa Borchert



## Fragebogen zu EBV-positiven diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen des älteren Patienten

**Bestehen Grunderkrankungen insbesondere Erkrankungen, die mit einer Immunsuppression (HIV) oder einer immunsuppressiven Behandlung (Kortison, MTX, Chemotherapie anderer Art) einhergehen?**

Kortison     MTX     HIV     andere Immunsuppression: \_\_\_\_\_

Wenn ja, Ursache für medikamentöse Immunsuppression (Grunderkrankung):

\_\_\_\_\_

**Liegt ein Zustand nach Organtransplantation vor?**

Nein     Ja, speziell \_\_\_\_\_ Datum: \_\_\_\_\_

**Gab es eine Symptomatik zum Zeitpunkt der Diagnose?**

Fieber     Nachtschweiß     Gewichtsverlust

Lymphadenopathie, wo? \_\_\_\_\_

Splenomegalie     Anämie     Thrombopenie     Granulopenie

andere: \_\_\_\_\_

**Wie war die Lymphomausbreitung zum Zeitpunkt der Diagnose (Ann Arbor Stadium)?**

I     II     III     IV

A – ohne B-Symptome

B – mit B-Symptomen

E – extranodaler Befall (außerhalb von Lymphknoten)

S – Milzbefall (Spleen)

X – größere Tumor-Masse (Bulk: Tumor > 10 cm maximaler )

Bei extranodaler Beteiligung wo? . \_\_\_\_\_

Lag eine Knochenmarksbeteiligung vor?  ja     nein     nicht untersucht

**Welche Behandlung erfolgte?**

R-CHOP 14       R-CHOP 21       andere: \_\_\_\_\_

**Was war der Behandlungserfolg der ersten Therapie?**

Progress     Stable disease     Partielle Remission     Komplette Remission

Ende der ersten Therapie (Datum): \_\_\_\_\_

**Wie war der Verlauf nach Therapie?**

Tag des letzten Follow-up: \_\_\_\_\_

Zustand des Patienten bei letztem Follow-up:

Progress     Stable disease     Rezidiv

Patient verstorben?

Nein       Ja, Datum: \_\_\_\_\_

**Kommentar:**

Für Ihre Unterstützung möchten wir uns herzlich bedanken!

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. W. Klapper

Dr. Christiane Stuhlmann-Laeisz

Alisa Borchert



**Prof. Dr. med. Ralf Ulrich Trappe**  
Arnold-Heller-Straße 3, Haus 50  
24105 Kiel

**Kontakt Sekretariat:**  
Tel.: 0431 597-3493  
Fax: 0431 597-4739  
**Regina Barg**  
[Regina.Barg@uksh.de](mailto:Regina.Barg@uksh.de)

November 2013

### Bitte um Amtshilfe Patient:

Sehr geehrte Damen und Herren,

bei o. g. Patienten war im Jahre XX eine Erkrankung diagnostiziert worden, die erst 2008 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in ihrer Charakteristik als eigenständiges Krankheitsbild definiert wurde. Entscheidender Aspekt der Abgrenzung gegenüber anderen Erkrankungen mit identischer Histologie ist neben einer bestimmten, in der Bevölkerung sehr weit verbreiteten Virusinfektion, die sehr ungünstige Prognose. Patientenspezifische Komorbiditäten, insbesondere eine Immunsuppression, müssen für die Diagnosestellung ausgeschlossen sein. Die klinische Information ist damit integraler Bestandteil der Diagnosefindung. Bis sich die schlechte Prognose im Alltag bestätigt, wird die Erkrankungsentität von der WHO als provisorisch angesehen.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie konnten wir eine Kohorte von Patienten identifizieren, bei denen die o. g. Erkrankung in den letzten 10 Jahren differentialdiagnostisch angenommen werden muss.

Da der Ausschluss einer Immunsuppression wesentlicher diagnostischer Bestandteil ist, würden wir gern die jeweiligen Patienten kontaktieren und hier um Ihre Mitarbeit/Kooperation bitten.

Die Erkrankung ist letztlich sehr selten und der Umstand, dass uns die Proben zur referenzpathologischen Mitbeurteilung von anderen pathologischen Instituten zur



Zweitbegutachtung zugesandt wurden, macht es uns bei einem Teil der Patienten unmöglich, diese direkt zu kontaktieren und um ihre Mitarbeit zu bitten.

Wir möchten Sie daher bitten, uns zu helfen, den Kontakt zu den jeweiligen Patienten aufzunehmen und bitten daher um Übermittlung einer aktuellen Meldeadresse. Sollte der Patient bereits verstorben sein, möchten wir bitten, uns auch dies mitzuteilen, damit wir weitere Bemühungen in dieser Richtung einstellen können.

Ich danke Ihnen schon jetzt ganz herzlich für Ihre Hilfe. Gerade bei neuen Erkrankungsentitäten ist es wichtig, Klarheit über den natürlichen Verlauf einer Erkrankung zu gewinnen. Nur so können in einem nächsten Schritt adäquate Therapien entwickelt werden. Bei sehr seltenen Erkrankungen, wie der hier vorliegenden, ist es leider manchmal unvermeidlich, den hier eingeschlagenen Weg zu gehen.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. Ralf Ulrich Trappe

Leiter der Deutschen PTLD Studiengruppe

Anlagen

Antwortformular

Unbedenklichkeitsbescheinigung der Ethikkommission



**Antwortformular** bitte per Telefax an 04 31 / 597 - 41 29

Patient:

Die Adresse des o. g. Patienten lautet:

---

---

---

---

---

Der Patient ist bei uns nicht bekannt.

Der Patient ist verstorben am: \_\_\_\_\_

sonstige Mitteilungen:

---

---

---

---

\_\_\_\_\_  
Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift/Stempel



Universitäts-Kinderklinik · Schwänenweg 20 · 24105 Kiel

PD Dr. med. Ralf Ulrich Trappe  
Medizinische Klinik II  
Hämatologie und Onkologie  
UKSH, Campus Kiel  
Arnold-Heller-Str. 3, Haus 11  
24105 Kiel

Postadresse:  
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9  
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09  
Telefax 04 31 / 597-53 33  
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum:  
5.3.2013

**AZ.: D 435/13** (bitte stets angeben)  
**Studienplan:** **Nichtinterventionelle Registerstudie zur Behandlungspraxis der EBV-assoziierten Lymphoproliferationen des Alters**  
Anschreiben an Ethik-Kommission,  
Anschreiben an Einwohnermeldeämter/Krankenkassen, Antwortformular  
Beobachtungsplan, Version 3.0 vom September 2012  
Patienteninformation und Einwilligungserklärung, Version 3.0 vom  
13.9.2012  
Patient Registration

**Antragsteller und  
Projektleiter:** **PD Dr. med. Ralf Ulrich Trappe, Medizinische Klinik II, UKSH,  
Campus Kiel**

**Datum des  
Antrages:** **28.02.2013**

Sehr geehrter Herr Kollege Trappe,

vielen Dank für Ihren obengenannten Antrag zur Beratung gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein. Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als stellvertretenden Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Registerstudie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

**Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen werden:**

1. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen des Antrages der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
2. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt beim Projektleiter und den teilnehmenden Ärzten.
3. Die Ethik-Kommission weist darauf hin, dass für eventuell in Zukunft weitere teilnehmende Zentren eine berufsrechtliche Beratung bei der jeweils für sie zuständigen Ethik-Kommission erforderlich ist.

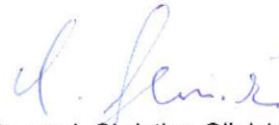


4. Nach Abschluss der Studie erbittet die Kommission einen kurzen Bericht mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen



Prof. Dr. med. Dr. jur. H.-J. Kaatsch  
Stellv. Vorsitzender der Ethik-Kommission



Dr. med. Christine Glinicke  
Geschäftsführung der Ethik-Kommission