Article 25fa pilot End User Agreement

This publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act (Auteurswet) with explicit consent by the author. Dutch law entitles the maker of a short scientific work funded either wholly or partially by Dutch public funds to make that work publicly available for no consideration following a reasonable period of time after the work was first published, provided that clear reference is made to the source of the first publication of the work.

This publication is distributed under The Association of Universities in the Netherlands (VSNU)'Article 25fa implementation' pilot project. In this pilot research outputs of researchers employed by Dutch Universities that comply with the legal requirements of Article 25fa of the Dutch Copyright Act are distributed online and free of cost or other barriers in institutional repositories. Research outputs are distributed six months after their first online publication in the original published version and with proper attribution to the source of the original publication.

You are permitted to download and use the publication for personal purposes. Please note that you are not allowed to share this article on other platforms, but can link to it. All rights remain with the author(s) and/or copyrights owner(s) of this work. Any use of the publication or parts of it other than authorised under this licence or copyright law is prohibited. Neither Radboud University nor the authors of this publication are liable for any damage resulting from your (re)use of this publication.

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please contact the Library through email: copyright@ubn.ru.nl, or send a letter to:

University Library
Radboud University
Copyright Information Point
PO Box 9100
6500 HA Nijmegen

You will be contacted as soon as possible.

Diagnostische Strategien, Immunhistochemie und molekulare Diagnostik lymphatischer Gewebe

G. Ott, J. Han J. M. van Krieken

Inhalt

Einleitung und diagnostische Strategien	228	Translokationsanalysen	232
Immunhistochemie	229	Literatur	234
Klonalitätstestung	230		

Einleitung und diagnostische Strategien

Die hämatopathologische Diagnostik im Lymphknoten und in extranodalen Lokalisationen erfordert die histologische und zytologische Untersuchung von Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem (FFPE) Gewebe. Eine optimale Schnittqualität, die auch die Beurteilung zytologischer Details am Paraffinmaterial erlaubt, ist Voraussetzung dieser spezialisierten Diagnostik. Dabei werden die konventionellen Färbungen HE und PAS in der Regel durch die Giemsa-Färbung und in vielen Fällen auch durch eine Versilberung nach Gomori ergänzt. So ist es möglich, an optimal aufgearbeitetem Material sowohl Architekturstörungen zu beurteilen, eine zytomorphologische Charakterisierung auffälliger Infiltrate vorzunehmen und auch die zelluläre Zusammensetzung des nichtneoplastischen Gewebes, also des *Microenvironments*, zu beurteilen. Hierfür ist die Kenntnis der normalen Lymphknotenstrukturen und ihrer reaktiv-entzündlichen Veränderungen erforderlich. Mit ihrer Hilfe gelingt es bereits in vielen Fällen, eine Lymphominfiltration histologisch von reaktiven Läsionen abzugrenzen. Insbesondere kann aufgrund des primären, morphologischen Eindrucks bestimmt werden, welche immunhistochemischen und/oder molekulargenetischen Untersuchungen zur weiteren Festlegung der Diagnose, zur Einordnung in eine bestimmte prognostische Gruppe oder aber in prädiktiver Hinsicht erforderlich sind.

Die Wertigkeit der reinen (Zyto-)Morphologie ist für verschiedene Lymphomentitäten durchaus unterschiedlich. So hat sich in retrospektiven Untersuchungen gezeigt, dass erfahrene Hämatopathologen Hodgkin-Lymphome und bestimmte Non-Hodgkin-Lymphome, wie etwa das folliculäre Lymphom (FL), sehr reproduzierbar auch bereits in konventionell-morphologischen Untersuchungen korrekt diagnostizieren können [4]. Gleiches gilt – in typischen Fällen – für andere häufige Lymphome der B-Zell-Reihe wie die chronische lymphatische Leukämie/das kleinzellige lymphozytische Lymphom (CLL/SLL), das Mantelzelllymphom (MCL) oder für Marginalzonenlymphome (MZL). Da diese Entitäten aber zum einen ungewöhnliche Infiltratmuster in den Lymphknoten aufweisen können, zum anderen jedoch histologische Erscheinungsbilder auch überlappen können, ist heute in der Regel die Ermittlung eines zusätzlichen charakteristischen Immunphänotyps Voraussetzung der Diagnostik. So können z. B. Fälle einer vorwiegend perifollikulären Infiltration der CLL/SLL auftreten, die ein Marginalzonenlymphom imitieren, oder ein prominentes pseudofollikuläres Infiltrationsmuster der CLL/SLL, das mit einem folliculären Lymphom verwechselt werden kann. Auch die Abgrenzung eines blastenreichen, folliculären Lymphoms von einer reaktiven lymphfollikulären Hyperplasie ist nicht

immer zweifelsfrei aufgrund der Morphologie allein möglich. Maligne Lymphome der T-Zell-Reihe stellen in dieser Hinsicht häufig das andere Extrem der rein morphologischen Beurteilbarkeit von Lymphknotenveränderungen dar. Abgesehen von großzelligen Varianten der Erkrankung, wie etwa dem großzelligen anaplastischen Lymphom, tritt wohl bei keiner anderen Entität maligner Lymphome eine derartige Vielfalt unterschiedlicher Infiltrationsmuster, pleomorpher zytologischer Veränderungen und ein erheblich variabler Gehalt an untermischten, nichtneoplastischen und die Tumorzellen begleitenden Entzündungszellen zu Tage. Diese Vielgestaltigkeit im morphologischen Erscheinungsbild von peripheren T-Zell-Lymphomen spiegelt sich in der Antigenität der Tumorzellen wider. Wie kaum eine andere Entität maligner Lymphome zeigen T-Zell-Neoplasien wechselnde Reaktivitäten für die eingesetzten (T-Zell- oder NK-Zell-spezifischen) immunologischen Marker. Sie sind nicht nur bezüglich ihrer An- oder Abwesenheit unterschiedlich, sondern können auch, wenn sie exprimiert sind, eine deutliche Heterogenität bezüglich der Zahl der betroffenen (positiven) Zellen und der Reaktionsstärke in der Antikörperfärbung aufweisen.

Die Beurteilung des lymphatischen Parenchyms der Lymphknoten bzw. extranodaler lymphatischer Organe wie der Milz oder des Thymus beginnt in der schwachen Vergrößerung ($\times 20$ – 40) und sollte zunächst klären, ob die Grundstruktur des lymphatischen Parenchyms erhalten, (deutlich) verändert oder schließlich aufgehoben bzw. destruiert ist (Abb. 12.1). Hierzu ist, wie oben erwähnt, die Kenntnis der normalen Topografie und Morphologie des reaktiven Lymphknotens erforderlich. Es kann dann festgelegt werden, ob ein auffälliges Infiltrat das gesamte Parenchym mit einbezieht oder nur herdförmig bzw. umschrieben nachweisbar ist, und in welchem Kompartiment des lymphatischen Parenchyms eine auffällige Morphologie bzw. Infiltration vorliegt (im Kortex, im Parakortex, in den B-Zell-Arealen, in den Follikeln oder in der tiefen Pulpa). Die genaue Lokalisierung der Veränderungen kann bereits einen ersten Hinweis darauf geben, um welches Infiltrat es sich handeln könnte. So ist die Grundstruktur des Parenchyms bei folliculären Lymphomen (s. dort) scheinbar noch erhalten, und die auffälligen Veränderungen betreffen zunächst die Follikel bzw. Keimzentren. Im Gegensatz hierzu infiltrieren Mantelzelllymphome oder Marginalzonenlymphome – zumindest in frühen Stadien – den Follikelmantel bzw. die Follikelaußenzone, und das Keimzentrum ist in der Regel noch erhalten. T-Zell-Lymphome schließlich können in frühen Infiltrationsstadien auf das T-Zell-Kompartiment, also die interfollikuläre Zone, – zumindest im Wesentlichen – beschränkt sein; dasselbe gilt für eine Lymphknoteninfiltration durch myeloische Neoplasien. In jüngerer Zeit wurden frühe Formen oder Vorläuferläsionen maligner Lymphome beschrieben, die sich einer rein histomorphologischen Diagnosestellung entziehen:

Immunhistochemie

Abb. 12.1 Reaktiv veränderter Lymphknoten. Die Übersichtsvergrößerung zeigt eine zarte Kapsel, den Kortex mit reaktiven Lymphfollikeln, erhaltene subkapsuläre, kortikale und medulläre Sinus und zur Tiefe hin die medullären Areale

die *in-situ* folliculäre oder die *in-situ* Mantelzell-Neoplasie. Zu ihrer Diagnose sind ergänzende, spezialisierte Techniken wie die Immunhistochemie erforderlich. Daraus folgt wiederum, dass insbesondere bei der klinischen Fragestellung eines malignen Lymphoms auch bei einem weitgehend regelhaften Befund in der konventionellen Morphologie eine – zumindest orientierende – immunhistochemische Zusatzuntersuchung immer durchgeführt werden sollte.

Weiterhin gibt es Fälle, in denen auch nach Durchführung der Immunhistochemie noch Zweifel verbleiben, ob es sich um eine Neoplasie handelt oder doch noch um eine reaktive Lymphoproliferation. Aufgrund der Tatsache, dass es im Rahmen der Reifung von B- und T-Lymphozyten zu einem Rearrangement von Antigenrezeptoren kommt, ist es theoretisch relativ einfach, eine reaktive, polyklonale, Lymphozytenpopulation von einem klonalen malignen Lymphom durch eine molekulare Klonalitätstestung zu unterscheiden. Letztlich gibt es noch die Möglichkeit, Lymphknotenveränderungen auf Translokationen von Genen mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zur Sicherung der Diagnose zu untersuchen. Der Nachweis einer Translokation $t(14;18)(q32;q21)$, die das BCL2-Gen mit dem Immunglobulin-Schwerkettengen fusioniert, kann zum Beispiel die Diagnose eines folliculären Lymphoms unterstützen. Andererseits kann eine FISH wichtige prognostische Informationen geben: Der Nachweis einer MYC-Translokation in einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom bedingt in der Regel eine schlechtere Prognose für den Patienten.

In den folgenden Abschnitten werden die o. g. Techniken kurz beschrieben; ihre Anwendung auf die einzelnen Lymphomentitäten findet sich in den jeweiligen Kapiteln.

Die Anwendung der Immunhistochemie ist nicht nur an gefrorenem oder formalinfixiertem und paraffineinbettetem (FFPE) Gewebe, sondern auch in Zellsuspensionen oder in der Durchflusszytometrie möglich. Damit spielt sie generell in der modernen Pathologie eine bedeutende Rolle; in der Hämatopathologie ist sie unverzichtbar. Auch unter erfahrenen Hämatopathologen verbessert sie sowohl die Sicherheit als auch die Reproduzierbarkeit der Diagnosen [4]. Zu diesen Fortschritten haben entscheidend die Entwicklung, Charakterisierung und kommerzielle Verfügbarkeit von Antikörpern, die ein breites Spektrum in der Linien-differenzierung und biologischen Charakterisierung von Zellen abdecken, beigetragen. Tab. 12.1 gibt einen Überblick über Antikörper bzw. Zielantigene, die in der täglichen Diagnostik eine große Rolle spielen.

Immunhistochemische Untersuchungen haben – neben ihrer unbestreitbaren Bedeutung für die Diagnose der Lymphomentitäten – auch zum Verständnis der Histogenese und Pathogenese hämatopoetischer Neoplasien entscheidend beigetragen. Sie sind darüber hinaus sehr nützlich, um im Lymphknoten eine erhaltene oder zerstörte Architektur erkennen zu können. Bereits mit der immunhistochemischen Färbung für B- und T-Zell-assoziierte Antigene lassen sich die gelegentlich regressiv veränderten und daher nur verwaschen oder nicht erkennbaren B- und T-Zell-Areale relativ scharf definieren (Abb. 12.2a,b). Durch Differenzierungsantigene, wie z. B. CD5, lässt sich erkennen, ob in einer verbreiterten perifollikulären Mantelzone eine Koexpression für CD5 vorliegt (Abb. 12.3a) und damit eine (perifollikuläre) Infiltration durch ein kleinzelliges B-Zell-Lymphom oder ein Mantelzelllymphom wahrscheinlich wird. Eine ergänzende Färbung mit „entitätsspezifischen“ Antikörpern wie Cyclin D1 (Mantelzelllymphom; Abb. 12.3b), ALK-Kinase (großzelliges, anaplastisches Lymphom) oder TdT (akute lymphoblastische Leukämie/Lymphom) grenzt dann die Natur eines atypischen Infiltrats weiter ein.

Zu einer sicheren Beurteilung einer immunhistochemischen Färbung ist es erforderlich, sowohl das Reaktionsspektrum des Antikörpers zu kennen als auch die Reaktivität dem richtigen Kompartiment im reaktiven und neoplastischen System zuzuordnen. So wird im reaktiven Keimzentrum das BCL2-Protein lediglich in zumeist locker eingestreuten T-Lymphozyten exprimiert, während die Keimzentruums-B-Zellen bei einer reaktiven Hyperplasie stets negativ sind; dies bedeutet, dass der Nachweis einer atypischen BCL2-positiven Lymphoproliferation im Keimzentrum, wie z. B. bei der *in-situ* folliculären Neoplasie, Ausdruck einer atypischen Reaktion ist und auf das Vorliegen eines (Prä-)Lymphoms hinweist. Schließlich zeigen Proliferationsmarker wie Ki67/MIB1

Tab. 12.1 Häufig verwendete Antikörper in der Diagnostik lymphoproliferativer Erkrankungen

Antigen	Spezifität
CD45	Leukocyte common antigen
CD2	T-Zellen, NK-Zellen
CD3	T-Zellen
CD4	Helfer-T-Zellen
CD5	T-Zellen, B-Zellen-Subpopulation
CD7	T-Zellen, myeloische Zellen
CD8	Zytotoxische B-Zellen
CD20	B-Zellen
CD79a	B-Zellen, Plasmazellen
CD138	Plasmazellen
CD10	Keimzentrums-B-Zellen
BCL6	Keimzentrums-B-Zellen
PD1	Keimzentrums-T-Zellen
CD15	Neutrophile Granulozyten, Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen
CD21	B-Zellen-Subpopulation, folliculäre dendritische Zellen
CD23	B-Zellen-Subpopulation, folliculäre dendritische Zellen
CD30	Aktivierte B- und T-Zellen, Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen
CD34	Vorläufer-B- und -T-Zellen, Myeloblasten
CD43	T-Zellen, B-Zellen-Subpopulation, myeloische und monozytäre Zellen
CD56	T/NK-Zellen, NK-Zellen
CD57	T-Zellen-Subpopulation, NK-Zellen
CD68	Monozyten, Makrophagen
Andere	Spezifität
TdT	Vorläufer-B und -T-Zellen
TIA 1, Perforin, Granzyme B	Zytolytische und zytotoxische Zellen
Annexin A1	Haarzellenleukämie
BCL2	Protoonkogenprodukt
TP53	Tumorsuppressorgen
p27	Zellzykluskinaseinhibitor
p21	Zellzykluskinaseinhibitor
Cyclin D1	Zellzykluskinase

Die hier angegebene Spezifität gibt lediglich das Hauptspektrum der Reaktivität an

an, welche Zellen sich im Zyklus befinden: Im reaktiven Lymphknoten färben sich praktisch alle Zellen des Keimzentrums nukleär kräftig positiv an, während die perifollikuläre Mantelzone kaum, die T-Zone je nach Aktivierungszustand positiv ist (Abb. 12.4). Abweichungen von diesem Muster, wie z. B. beim FL, in dem die Keimzentren in der Regel wenig proliferieren, geben daher wiederum einen Hinweis auf die mögliche neoplastische Natur eines Infiltrats. Schließlich kann die Verwendung von Antikörpern gegen Kappa- und Lambda-Leichtketten der Immunglobuline eine klonale plasmazytoide bzw. Plasmazellpopulation nachweisen lassen, die zumindest die klonale Expansion einer B-Zell-Population nahelegt.

Für manche reaktiven und neoplastischen Infiltrate ist eine Kombination von Antikörperreaktivitäten hilfreich. So werden bei der Kikuchi-Lymphadenitis in dem auffälligen, zum Teil auch hochproliferierenden Infiltrat in unterschiedlicher Zusammensetzung CD8-positive aktivierte T-Lymphozyten, CD68-positive Makrophagen bzw. histiozytäre Zellen und auch unreifere histiozytäre Zellen nachgewiesen, die die Myeloperoxidase (MPO) exprimieren können. Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen sind in der Regel positiv für CD30. Diese CD30-Reaktivität ist für das Hodgkin-Lymphom zwar typisch, nicht aber spezifisch, so dass es erforderlich ist, die HRS-Zellen durch weitere Marker eindeutig zu charakterisieren (CD15, EBV-Antigene, schwache Reaktivität für PAX5, Negativität für B-Zell-spezifische Transkriptionsfaktoren wie BOB.1 und OCT-2). Eine atypische Expression von Tumorsuppressorgen wie mutiertes TP53 (Abb. 12.5), eine Überexpression von Onkogenen wie MYC (Abb. 12.6) oder die entweder lediglich zytoplasmatische oder die zytoplasmatisch-nukleäre Expression der ALK-Kinase (Abb. 12.7) können schließlich bestimmte biologische Prozesse wie Genmutationen oder aber die Formation eines tumorassoziierten Fusionsproteins anzeigen.

Klonalitätstestung

B- und T-Lymphozyten zeigen an ihrer Membranoberfläche Rezeptoren, die sehr spezifisch Proteine erkennen können: Immunglobulin auf B-Lymphozyten und T-Zell-Rezeptoren auf T-Zellen. Diese sog. Antigenrezeptoren weisen eine sehr hohe Variabilität auf, wodurch das Immunsystem in der Lage ist, nahezu alle Bakterien-, Viren- und anderen Antigene zu erkennen. Diese Variabilität ist nicht ausschließlich in der DNA kodiert, sondern entsteht auch durch einen komplizierten Prozess von DNA-Rearrangements während der Reifung von B- und T-Lymphozyten. Dieser Prozess resultiert letztlich in einer DNA-Sequenz und damit in einer Oberflächenstruktur, die für eine gegebene reife B- oder T-Zelle einzigartig ist und nur dann zur Expansion ge-

Abb. 12.2 a,b Immunhistochemie für B- und T-Zell-assoziierte Antigene in einem reaktiven Lymphknoten. **a** CD20-Positivität findet sich sowohl in der Mantelzone wie auch im Keimzentrum und in (überwiegend locker eingestreuten) B-Zellen des Parakortex bzw. der Medulla. **b** In der Färbung für das T-Zell-assoziierte CD3-Anti-

gen sind die B-Zell-Areale ausgespart. Dagegen liegt eine Reaktivität in T-Lymphozyten in der parakortikalen und tiefen T-Zone sowie in überwiegend locker eingestreuten Zellen in der Mantelzone und im Keimzentrum vor

Abb. 12.3 a,b Reaktionsspektrum von Differenzierungsantigenen und Lymphom-assoziierten Markern im Lymphknoten. **a** In dieser Färbung für CD5 werden die T-Zellen im Keimzentrum kräftig angefarbt. Die Keimzentrums-B-Zellen sind negativ. Auffällig ist eine CD5-Färbung der B-Zellen der etwas verbreiterten perifollikulären

Mantelzone (die normalerweise CD5-negativ ist). **b** In der Färbung für Cyclin D1 zeigt sich, dass etwa 50 % der Mantelzellenzellen auch nukleär positiv für Cyclin D1 sind. Damit liegt eine partielle Infiltration durch ein Mantelzelllymphom, akzentuiert im Bereich der perifollikulären Mantelzone, vor

langt, wenn das spezifische Antigen erkannt wird. Weil eine physiologische, reaktive Expansion von B- oder T-Zellen aufgrund einer bakteriellen oder viralen Infektion eine große Zahl von Lymphozyten aktiviert hat, entsteht eine verschiedenartige Expansion von Antigenrezeptoren und damit eine polyklonale Lymphoproliferation. Im Falle einer lymphoiden Neoplasie hingegen, die aus einer entarteten Zelle hervorgeht, expandiert nur eine spezifische B- oder T-Zell-Struktur als (mono) klonaler Prozess, der an der nichtvariablen Struktur der Antigenrezeptoren zu erkennen ist (Abb. 12.8). Tech-

nisch gesehen gibt es ganz unterschiedliche Plattformen und Primersequenzen für die erforderlichen PCR-Untersuchungen. Als „Goldstandard“ wird derzeit der Biomed-2-Ansatz akzeptiert [2, 5, 6], obwohl es neuere Ansätze gibt, um die Analysen, z. B. durch Techniken des Next Generation Sequencing, noch zu verbessern [1].

Ganz allgemein setzt eine korrekte Klonalitätsanalyse Erfahrung hinsichtlich molekularer Techniken und in der Hämatopathologie voraus, da es in der Regel erforderlich ist, morphologische, immunhistochemische und molekulare Befunde miteinander in Einklang zu

Abb. 12.4 Ki67-Expression im reaktiven Lymphknoten und in der Mantelzone. Im reaktiven Keimzentrum zeigen nahezu alle Zellen der „dunklen“ Zone des Keimzentrums (*rechts*) eine deutliche Positivität, während in der „hellen“ Zone des Keimzentrums nur ein Teil der Zellen proliferieren. Demgegenüber reagieren in der perifollikulären Mantelzone nur wenige Zellen mit diesem Antigen

Abb. 12.6 Beckenkamltrepanat mit deutlicher nukleärer Überexpression von MYC in ausgedehnten Infiltraten eines aggressiven B-Zell-Lymphoms vom Burkitt-Typ. In diesem Fall ist die Überexpression von MYC eine Folge der Translokation $t(8;14)(q24;q32)$, durch die das MYC-Gen dereguliert und überexprimiert wird. Im Hintergrund nachweisbare Restzellen des reaktiven Knochenmarks bleiben negativ (Megakaryozyten!)

Abb. 12.5 Deutliche nukleäre Überexpression von TP53 in einem folliculären Lymphom, die auf eine Inaktivierung des Proteins durch Mutation hinweist

Abb. 12.7 Zytoplasmatische sowie nukleäre ALK- („anaplastic lymphoma kinase“) Überexpression in einem großzelligen anaplastischen Lymphom. Dieser Befund ist ein deutlicher Hinweis auf das Vorliegen einer $t(2;5)(p23;q25)$ -Translokation, durch die das ALK-Gen überexprimiert wie auch in den Kern transportiert wird

bringen. So treten beispielsweise auch klonale Lymphoproliferationen häufig vor einem polyklonalen Hintergrund auf (Abb. 12.8). Weitere detailliertere Informationen sind auf www.euroclonality.org zu finden, wohin auch Fälle zu einer Zweitmeinung eingesandt werden können.

Translokationsanalysen

Der Nachweis einer Translokation kann mit mehreren Techniken erfolgen. In FFPE-Gewebe hat sich die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) eindeutig bewährt bzw. durchgesetzt. Diese Methode hat den großen Vorteil, dass direkt geklärt werden kann, ob eine neoplastische Zelle eine Translokation aufweist oder nicht. In Lymphomen sind Translokationen, im Gegensatz zu chromosomalen Imbalancen, wichtig und kommen häufig vor, in erster Linie aufgrund von Fehlern des physiologischen Rearrangements von Antigenrezeptorgen. So wird zum Beispiel das *Cyclin D1*-Gen durch eine $t(11;14)(q13;q32)$ -Translokation überexprimiert, weil es

Nachweis einer klonalen Bande in der FR1 und FR2 (Doppeltestung)

Polyklonale Kontrolle

Abb. 12.8 Beispiele einer Klonalitätsanalyse mit Primern für die Framework-1- (FR1), Framework-2- (FR2) und Framework-3- (FR3) Regionen des Immunglobulin-Schwerkettengens. In den Analysen für FR2 und FR1 ist jeweils eine distinkte klonale Bande, entsprechend dem Nachweis eines klonalen Amplifikats, nachweisbar. Die oberen beiden Analysen zeigen die Ergebnisse eines doppelten Ansatzes mit identischem Ergebnis. Unten ist die polyklonale Kontrolle dargestellt

unter den Einfluss des Immunglobulin-Enhancers gerät. Durch die Translokation kommt es dann zu einer hohen Expression des Cyclin D1-Proteins, die wiederum immunhistochemisch nachgewiesen werden kann. Daher muss die Translokation in der Routinediagnostik nur selten durch eine FISH bewiesen werden. Anders ist es hingegen bei der $t(14;18)(q32;q21)$ -Translokation, die zu einer Überexpression von BCL2 in 18q21 führt. Das BCL2-Protein ist aber in der Regel, mit Ausnahme des Keimzentrums, in Lymphozyten auch ohne Translokation exprimiert. Ein folliculäres Lymphom kann somit nur durch eine FISH genetisch bewiesen werden. Für das MYC-Gen wiederum ist der Zusammenhang zwischen der Anwesenheit einer Translokation und der Proteinüberexpression variabel [3].

In Gewebeschnitten ist eine Translokation am besten durch die sog. Split-Signal- („break-apart“) Probe nachzuweisen [7]. Mit einer solchen DNA-Probe sieht man in normalen Zellen häufig ein gelbes Signal (rote und grüne Signale liegen an derselben Stelle). Im Falle eines Bruchereignisses sieht man dann neben dem normalen Allel ein rotes und ein grünes Signal (Abb. 12.9). Genau genommen weist man also nur nach, dass ein Gen eine Translokation erfahren hat, aber nicht, welches andere Gen der Fusionspartner ist. Daher kommen manchmal auch sog. Fusionssonden zum Einsatz, die dann tatsächlich eine bestimmte Translokation anzeigen.

Ähnlich wie in der Bewertung von Klonalitätsanalysen gilt auch für die FISH, dass in der Anwendung Expertise vonnöten ist. Durch Translokationen und Rearrangements werden bisweilen sehr komplizierte Signalmuster erzeugt, deren richtige Interpretation Erfahrung voraussetzt. Neuere Entwicklungen bestehen z. B. in sog. „Bright-field“-Methoden, bei denen die Proben

Abb. 12.9 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit einer DNA-Probe zum Nachweis eines Cyclin D1-Rearrangements, das die Bruchpunktregion im *Cyclin D1*-Gen überspannt (sog. „Break-apart“-Sonde). In mehreren Zellkernen lassen sich ein Fusionsignal, das dem normalen Allel entspricht, und zwei getrennte rote und grüne Signale, entsprechend einem Bruchereignis, erkennen

mit einer zusätzlichen Immunohistochemie verstärkt werden. Die Ergebnisse sind aber manchmal aufgrund der Spot-Größe und der damit verbundenen schwierigeren Erkennung eines Split-Signals nicht einfach zu interpretieren.

Literatur

1. Appenzeller S, Gilissen C, Rijntjes J, Tops BB, Kastner-van RA, Hebeda KM, Nissen L, Dutilh BE, van Krieken JH, Groenen PJ (2015) Immunoglobulin rearrangement analysis from multiple lesions in the same patient using next-generation sequencing. *Histopathology* 67:843–858
2. Groenen PJ, Langerak AW, van Dongen JJ, van Krieken JH (2008) Pitfalls in TCR gene clonality testing: teaching cases. *J Hematop* 1:97–109
3. Kluk MJ, Ho C, Yu H, Chen BJ, Neuberg DS, Dal CP, Woda BA, Pinkus GS, Rodig SJ (2016) MYC immunohistochemistry to identify MYC-driven B-cell lymphomas in clinical practice. *Am J Clin Pathol* 145:166–179
4. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project (1997) A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 89:3909–3918
5. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuur-ing E, Garcia-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, Gonzalez D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, Gonzalez M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA (2003) Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17:2257–2317
6. van Krieken JH, Langerak AW, Macintyre EA, Kneba M, Hodges E, Sanz RG, Morgan GJ, Parreira A, Molina TJ, Cabecadas J, Gaulard P, Jasani B, Garcia JF, Ott M, Hannsmann ML, Berger F, Hummel M, Davi F, Bruggemann M, Lavender FL, Schuur-ing E, Evans PA, White H, Salles G, Groenen PJ, Gameiro P, Pott C, Dongen JJ (2007) Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 21:201–206
7. Van Rijk A, Mason D, Jones M, Cabecadas J, Crespo M, Cigudosa JC, Garcia JF, Leoncini L, Cocco M, Hansmann ML, Mottok A, Copie BC, Baia M, Anagnostou D, Pouliou E, Hamilton DS, Hjollund CM, Svenstrup PT, Hauge MS, van DJ, van Krieken JH (2008) Translocation detection in lymphoma diagnosis by split-signal FISH: a standardised approach. *J Hematop* 1:119–126

Milz

13 Funktionelle Anatomie, allgemeine Pathologie und Mitbeteiligung der Milz bei Erkrankungen anderer Organe 237
<i>J. Diebold, T. Rüdiger, A. Marx, H. K. Müller-Hermelink</i> 14 Reaktive, infektiöse und immunologisch bedingte Läsionen der Milz 299
<i>J. Diebold, T. Rüdiger, A. Marx, H. K. Müller-Hermelink</i> | <ol style="list-style-type: none"> 15 Tumoren und tumorartige Erkrankungen der Milz 337
<i>J. Diebold, T. Rüdiger, A. Marx, H. K. Müller-Hermelink</i> |
|---|---|

Die Autoren danken Dr. Agnès Le Tourneau und Prof. Dr. Josée Audouin, den langjährigen Mitarbeitern und Nachfolgern von Prof. Dr. J. Diebold, herzlich für ihre Beiträge zu zahlreichen Abbildungen in den folgenden Milz-Kapiteln.