

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Thomas Ruzicka

**Experimentelle Untersuchung von kutanen  
Pseudolymphomen hinsichtlich eines kausalen  
Zusammenhangs mit Infektionen durch atypische  
Mykobakterien, Borrelien, Leishmanien, Merkelzell-  
Polyomaviren und Rickettsien**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Eva Felber

aus Ansbach

2016

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Michael Flaig

Mitberichterstatter:  
Prof. Dr. Karl Sotlar  
Prof. Dr. Martin Dreyling  
Prof. Dr. Frank Ebel  
Prof. Dr. Christian Sander

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Christian Andres

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2016

*meinen Eltern gewidmet*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einführung .....</b>	<b>7</b>
1.1 Klinik .....	7
1.2 Histologie und Immunphänotyp.....	8
1.3 Pseudolymphome .....	9
1.3.1 B-Zell-Pseudolymphome.....	9
1.3.2 T-Zell-Pseudolymphome .....	10
1.3.3 Kombinierte B- und T-Zell-Pseudolymphome.....	12
1.4 Differentialdiagnose malignes Lymphom .....	13
1.5 Therapie.....	16
1.6 Ursachen des Pseudolymphoms und Zielsetzung der Arbeit.....	16
1.6.1 Borrelien.....	17
1.6.2 Rickettsien.....	18
1.6.3 Leishmanien.....	19
1.6.4 Atypische Mykobakterien .....	19
1.6.5 Merkelzell-Polyomavirus .....	20
<b>2 Materialien und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1 Patientenkollektiv .....	21
2.2 Material.....	21
2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	22
2.3.1 Verwendete Materialien und Geräte.....	23
2.3.2 Reagenzien .....	23
2.3.2.1 Primer .....	24
2.3.2.2 Polymerase .....	25
2.3.2.3 Positive und negative Kontrolle .....	25
2.4 Auswertung des PCR-Ergebnisses .....	25
2.4.1 Bioanalyzer .....	25
2.4.2 Materialien und Software (Bioanalyzer) .....	26
2.4.3 Agarosegelelektrophorese .....	27
2.4.4 Materialien (Agarosegel) .....	28
2.5 Verifizierung durch Sequenzanalyse .....	29

<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
3.1 Daten des gesamten Patientenkollektivs .....	30
3.1.1 Alter.....	30
3.1.2 Geschlecht .....	30
3.1.3 Lokalisation .....	31
3.1.4 Infiltrattyp .....	32
3.2 Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion.....	32
3.2.1 Ergebnisse der PCR des gesamten Patientenkollektivs ....	32
3.2.2 Ergebnisse der PCR (Merkelzell-Polyomavirus) .....	34
3.2.2.1 Verteilung der positiven Fälle nach Geschlecht und Alter	34
3.2.2.2 Verteilung der positiven Fälle nach Lokalisation und Infiltrattyp.....	35
3.2.2.3 Verteilung der positiven Fälle nach Ergebnissen der immunhistologischen und molekularbiologischen Untersuchung.....	36
3.2.3 Ergebnisse der PCR (atypische Mykobakterien).....	37
3.2.3.1 Verteilung der positiven Fälle nach Alter und Geschlecht	37
3.2.3.2 Verteilung der positiven Fälle nach Lokalisation und Infiltrattyp.....	38
3.2.3.3 Verteilung der <i>Hsp65</i> -positiven Fälle nach Ergebnissen der immunhistologischen und molekularbiologischen Untersuchung .....	39
3.2.4 Ergebnisse der Borrelien-Polymerasekettenreaktion .....	40
3.2.4.1 Verteilung der positiven Fälle nach Alter und Geschlecht	41
3.2.4.2 Verteilung der positiven Fälle nach Lokalisation und Infiltrattyp.....	41
3.2.4.3 Verteilung der positiven Fälle nach Ergebnissen der immunhistologischen und molekularbiologischen Untersuchung .....	42
3.2.5 Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion (Leishmanien) ..	43
3.2.6 Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion (Rickettsien) .....	45
3.3 Positiv- und Negativ-Kontrollreaktionen der Polymerasekettenreaktion.....	45
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>46</b>
4.1 Diskussion der Methoden.....	46

4.1.1 Sensitivität und Spezifität der PCR .....	46
4.1.2 PCR in der Pseudolymphomdiagnostik.....	48
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	50
4.2.1 Häufigkeit eines Erregernachweises .....	50
4.2.2 Vergleich mit anderen Studien .....	53
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>56</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>59</b>
<b>7 Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>62</b>
<b>8 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>64</b>
<b>9 Danksagung.....</b>	<b>67</b>

# 1 Einführung

Kutane Pseudolymphome stellen eine heterogene Gruppe von lymphoproliferativen Erkrankungen dar, deren Ursache meist unerkannt bleibt, die ätiopathogenetisch jedoch als entzündliche Reaktion des Körpers auf einen bekannten oder unbekannten Reiz verstanden werden können. Der Begriff Pseudolymphom geht auf *Hirsch und Lukes* zurück und umfasst eine heterogene Gruppe von Entitäten, die histologisch und/oder klinisch ein malignes Lymphom imitieren, sich jedoch in ihrem klinischen Erscheinungsbild sowie in der Zusammenschau von Histologie, Immunphänotyp und molekularen Markern von diesen unterscheiden lassen (26).

## 1.1 Klinik

Das klinische Erscheinungsbild der kutanen Pseudolymphome ist sehr vielfältig, und oft stellt die Abgrenzung zum malignen kutanen Lymphom eine große Herausforderung dar. Eine anerkannte Klassifikation, vergleichbar der WHO/EORTC-Klassifikation der malignen kutanen Lymphome, liegt nicht vor (27). Dennoch kann eine Unterteilung der Pseudolymphome in B- bzw. T-Zell-dominierte oder gemischte Pseudolymphome vorgenommen werden, denn auch ihr klinisches Erscheinungsbild spiegelt die verschiedenen Immunphänotypen häufig wider. Die Untersuchung von Patienten mit B-Zell-Pseudolymphomen zeigt meist einen einzelnen oder wenige, meist aggregiert stehende Knoten von einem bis mehreren Zentimetern Durchmesser. Die Tumoren sind meist in der Dermis tastbar. Farblich sind rote bis livide, selten auch farblose Knoten zu erkennen. Patienten aller Altersgruppen sind betroffen. Prädilektionsstellen sind Ohrläppchen, Nacken, Mamille und Areole mammae, Achsel, Skrotum und Fußrücken. Patienten mit T-Zell-Pseudolymphomen zeigen meist weiter ausgedehnte, erythematöse Flecken und/oder Plaques (26).

## 1.2 Histologie und Immunphänotyp

Das Pseudolymphom muss primär vom malignen Lymphom abgegrenzt werden. Histologisch sind kutane Pseudolymphome meist lokalisierte lymphohistiozytäre Infiltrate. Es wird zwischen reaktiven lymphozytären Infiltraten und atypischen lympho(histio)zytären Infiltraten unterschieden (27), wobei das atypische Infiltrat zytologisch wesentlich auffälliger ist, die morphologischen, immunhistochemischen und molekularbiologischen Kriterien eines malignen Lymphoms jedoch nicht erfüllt (27). Liegt immunphänotypisch ein B-Zell-Muster vor, sieht man häufig ein noduläres, lymphozytär dominiertes Infiltrat der Dermis (10). Die gleichzeitige Anwesenheit vieler Histiozyten, Eosinophilen und Plasmazellen ist ein entscheidender Hinweis, der das Vorliegen eines Pseudolymphomes wahrscheinlicher macht gegenüber dem malignen Lymphom. Weiterhin findet man bei B-Zell-Pseudolymphomen eine keilförmige Abnahme des Infiltrats in die Tiefe. In Abgrenzung zu den Lymphomen mit einem „bottom heavy“-Aufbau hat sich hier der Begriff „top heavy“ geprägt (18). Bei den T-Zell-Pseudolymphomen werden histologisch bandartige Lymphozyteninfiltrate von knotigen Zellansammlungen unterschieden. Das bandförmige subepidermale Infiltrat besteht hauptsächlich aus Lymphozyten, mäßig vielen Histiozyten, mittelgroßen Blasten, aber kaum Plasmazellen oder Eosinophilen, häufig auch mit Nachweis einer Exozytose in die Epidermis (27). Auch *Lee MW et al.* beschreiben in ihrer klinisch-pathologischen Studie zum Pseudolymphom der Haut diverse histologische Muster, von Mykosis-fungoides-ähnlich über perivaskulär, nodös, diffus bis zur pseudolymphomatösen Follikulitis. Am häufigsten beobachteten sie ein multinodöses Muster mit Ausdehnung in die tiefe Dermis und in das Unterhautfettgewebe (20).

## 1.3 Pseudolymphome

Der Begriff Pseudolymphom ist ein Überbegriff für lymphozytäre Infiltrate verschiedenster klinischer Ausprägungen und Ursachen. Die bekannteste klinische Ausprägung des Pseudolymphoms ist die Borrelien-assoziierte Lymphadenosis cutis benigna. Diese gehört immunphänotypisch in die Gruppe der B-Zell-Pseudolymphome. Es sind allerdings noch einige weitere klinische Erkrankungsbilder bekannt, u.a. das aktinische Retikuloid, die lymphomatoide Arzneireaktionen. Diese werden im Folgenden nach der jeweiligen immunphänotypischen Zugehörigkeit vorgestellt.

### 1.3.1 B-Zell-Pseudolymphome

Hierunter werden Erkrankungen gefasst, die in Klinik und Histologie tatsächliche B-Zell-Lymphome nachahmen. Zu den B-Zell-Pseudolymphomen zählen die Lymphadenosis cutis benigna und der kutane inflammatorische Pseudotumor. Die häufigste Ursache für die Lymphadenosis cutis benigna ist eine Infektion mit dem Bakterium *Borrelia burgdorferi* (5, 21, 27). Die Lymphadenosis cutis benigna gehört neben dem Erythema migrans und der Acrodermatitis chronica atrophicans zu den drei spezifischen Hautmanifestationen der kutanen Borreliose. Lokalisation ist meist das Ohrläppchen bei Kindern, die Areolae mammae und Genitalien bei Erwachsenen. Meist bestehen einzelne, selten mehrere rote bis lividfarbene Papeln, Knoten oder Plaques (26). Histologisch ist das dichte B-lymphozytäre Infiltrat der Dermis charakteristisch, wobei die B-Zellen teilweise von T-Lymphozyten umgeben sind (26). Weiterhin wird über einen ätiologischen Zusammenhang mit Insektenstichen, Medikamenten, Impfungen oder Tätowierungen berichtet (27). Dagegen ist die Ursache für den inflammatorischen Pseudotumor weitgehend ungeklärt. Dieser wurde erstmals von *Hurt und Santa Cruz* im Jahre 1990 beschrie-

ben, bisher sind nur wenige Fälle dokumentiert. Auch hier besteht klinisch meist ein einzelner, erythematöser Knoten (27). Histologisch ist ein in der Dermis gelegenes knotenförmiges lymphozytäres Infiltrat mit ausgedehnten Ansammlungen von Plasmazellen charakteristisch (26).

### B-Zell-Pseudolymphome

<b>Lymphadenosis cutis benigna</b>	B-lymphozytäres Infiltrat, teilweise von T-Lymphozyten umgeben
<b>Inflammatorischer Pseudotumor</b>	Knotenförmiges lymphozytäres Infiltrat mit Plasmazellen

Tab. 1: B-Zell-Pseudolymphome

### 1.3.2 T-Zell-Pseudolymphome

Zu den klinischen Krankheitsbildern des T-Zell-Pseudolymphoms zählen das aktinische Retikuloid, die lymphomatoide Kontaktdermatitis und die lymphocytic infiltration of the skin. Ursache des aktinischen Retikuloids ist eine fortbestehende photoallergische Reaktion auf UV-Licht, die sich als erythematöse, schuppende Papeln und Plaques in erster Linie auf sonnenexponierten Hautarealen an Gesicht und Händen manifestiert. Histologisch zeigt sich ein bandförmiges lymphohistiozytäres Infiltrat der oberen Dermis mit Exozytose von Lymphozyten in die Epidermis. Die Abgrenzung zur Mykosis fungoides kann schwierig sein (26). Auch bei der lymphomatoiden Kontaktdermatitis spielt die allergische Komponente die entscheidende Rolle. Ursächlich ist ein chronischer Allergenkontakt, beispielsweise mit Nickel. In ihrem klinischen und histologischen Erscheinungsbild ähnelt sie dem aktinischen Retikuloid. Als weitere Form

der T-Zell-Pseudolymphome sei noch die lymphozytäre Infiltration der Haut genannt, nach *Jessner und Kanof* (16). Eine Ursache ist nicht bekannt, möglicherweise handelt es sich um eine Variante des Lupus erythematodes tumidus. Klinisch zeigen sich einzelne oder multiple, oft symmetrisch angeordnete erythematöse Makulae, die aber sowohl plaqueartig als auch polsterartig erhaben erscheinen können. Histologisch findet sich ein in der Dermis gelegenes, periadnexiell und perivaskulär akzentuiertes lymphozytäres Infiltrat. Muzin kann in kleinen Mengen vorkommen (26).

### T-Zell-Pseudolymphome

<b>Aktinisches Retikuloid</b>	bandförmiges lymphohistiozytäres Infiltrat der oberen Dermis mit Exozytose von Lymphozyten in die Epidermis
<b>Lymphomatoide Kontaktdermatitis</b>	Bandförmiges lymphohistiozytäres Infiltrat, Exozytose in die Dermis möglich
<b>Lymphozytäre Infiltration der Haut</b>	periadnexiell und perivaskulär akzentuiertes lymphozytäres Infiltrat; Muzinvorkommen möglich

*Tab. 2: T-Zell-Pseudolymphome*

### **1.3.3 Kombinierte B- und T-Zell-Pseudolymphome**

Neben den klarer zu differenzierenden B-Zell-Pseudolymphomen und den T-Zell-Pseudolymphomen kommen auch Pseudolymphome mit einem gemischten B- und T-Zell-Immunphänotyp vor. Diese können das klinische Korrelat einer lymphozytären Arzneireaktion sein, die nach Einnahme verschiedenster Pharmaka unterschiedlicher Arzneigruppen, wie Antiarrhythmika, Antidepressiva, Beta-Blocker u.a., vorkommen können (26).

<b>Antiarrhythmika</b>	Mexiletin
<b>Antidepressiva</b>	Amitriptylin, Fluoxetin
<b>ACE-Hemmer</b>	Benazepril, Captopril, Enalpril
<b>Antibiotika</b>	Penicillin
<b>Antirheumatika</b>	Penicillamin
<b>Beta-Blocker</b>	Atenolol
<b>Chemotherapeutika</b>	Dapson, Nitrofurantoin
<b>Immunsuppressiva</b>	Ciclosporin
<b>Tranquillizer</b>	Clonazepam, Diazepam, Lorazepam

*Tab. 3: Medikamente, die in Zusammenhang mit dem Auftreten von Pseudolymphomen stehen können*

Klinisch treten meist einzelne Papeln, Knoten oder Plaques auf, seltener auch multiple Läsionen bis hin zu einer Erythrodermie. Histologisch besteht in der Dermis ein diffuses oder knotenförmiges lymphozytäres Infiltrat bzw. ein lichenoides Infiltrat mit Epidermotropismus. Die Abgrenzung zur Mykosis fungoides kann schwierig sein (26).

#### **Kombinierte B/T-Zell-Pseudolymphome**

<b>Lymphozytäre Arzneireaktion</b>	Diffuses oder knotenförmiges lymphozytäres Infiltrat der Dermis / lichenoides Infiltrat mit Epidermotropismus
------------------------------------	---

*Tab. 4: B/T-Zell-Pseudolymphome*

#### **1.4 Differentialdiagnose malignes Lymphom**

Die Diagnosestellung des Pseudolymphoms und vor allem die Abgrenzung zu einem malignen Geschehen können den Behandler vor eine Herausforderung stellen, da durch die Diagnosestellung auch die Behandlung maßgeblich beeinflusst wird. Bereits das klinische Erscheinungsbild kann das Vorliegen eines malignen Geschehens mehr oder weniger wahrscheinlich werden lassen. Einzelne Herde lassen eher an ein Pseudolymphom denken, wohingegen ein diffuser Befall oder begleitende Lymphknotenvergrößerung an ein malignes Lymphom denken lassen (26). Allerdings können auch bei einem Pseudolymphom, beispielsweise bei der lymphozytären Arzneimittelreaktion, multiple Läsionen auftreten. Dies zeigt, dass eine eindeutige Diagnose nicht ausschließlich auf Basis des klinischen Erscheinungsbildes gestellt werden kann. Weiterhin sind eine histologische

und immunhistologische Untersuchung sowie ein Klonalitätsnachweis unerlässlich. Histologisch sind das Vorhandensein eines monomorphen Infiltrats und Zellatypien der Lymphozyten Hinweise auf das Vorliegen eines malignen Geschehens. Bei der immunhistologischen Untersuchung liefert die Zuordnung der atypischen Lymphozyten zu einem vorherrschenden Immunphänotyp ein weiteres wichtiges Kriterium. Bei malignen B-Zell-Lymphomen weisen die atypischen Lymphozyten ausschließlich einen B-Zell-Immunphänotyp auf, bei T-Zell-Lymphomen entsprechend einen T-Zell-Immunphänotyp. Bei einem Pseudolymphom ergibt sich meist ein gemischtes Infiltrat, bei dem keine exakte Zuordnung der atypischen Zellen zu einem Immunphänotyp möglich ist (27). Weitere Hinweise auf Malignität bei B-lymphozytären Infiltraten sind eine Leichtkettenrestriktion, das Nichtvorhandensein von Antigenen, die normalerweise von den Zellen exprimiert werden, oder eine anormale Expression von Antigenen, die normalerweise nicht auf B-Lymphozyten ausgebildet werden (10). Bei malignen T-Zell-Lymphomen tritt ein T-Zell-Phänotyp auf, wohingegen bei Pseudolymphomen keine exakte Zuordnung möglich ist. Ein weiteres Kriterium ist der für maligne T-Zell-Lymphome charakteristische Verlust von Pan-T-Antigenen wie CD2, CD3, CD5 CD7 und betaF1 (27). Weiteren Aufschluss kann eine immunhistochemische Untersuchung der kappa- und lambda-Leichtketten geben; hier spricht eine Leichtkettenrestriktion für ein malignes Lymphom. Zusätzlich kann in einigen Fällen die Durchführung einer Klonalitätsanalyse sinnvoll sein. Durch PCR-basierte Methoden wird im Falle von T-Zell-Infiltraten eine mögliche klonale Expression der gamma-Kette des T-Zell-Rezeptorgens nachgewiesen. Bei B-Zell-Infiltraten werden spezifische Primer für die schweren oder leichten Ketten des Immunglobulingens eingesetzt (14, 28). Allerdings muss hierbei bedacht werden, dass Monoklonalität in lymphozytären Infiltraten nicht allein als Kriterium für ein Vorliegen oder den Ausschluss von Malignität stehen darf, da in Einzelfällen auch ein echtes Lymphom kein nachweisbares mo-

noklonales Rearrangement aufweisen kann, ein Pseudolymphom aber ein ebensolches besitzen kann (10). *Holm et al.* zeigten, dass von 20 untersuchten Pseudolymphomen mit T-Zell-Immunphänotyp keines ein klonales Rearrangement aufwies (14) und weisen auf ähnliche Resultate anderer Studien durch *Bakels et al.* und *Bergmann et al.* hin, wohingegen *Brady et al.* und *Slack et al.* monoklonale Rearrangements bei Pseudolymphomen der Haut beschreiben (14). Es muss beachtet werden, dass Klonalität nicht mit Malignität gleichzusetzen ist. Die Diagnose des Pseudolymphoms kann letztendlich nur unter Betrachtung aller Untersuchungsergebnisse gestellt werden und darf nicht auf einem einzelnen Kriterium beruhen (4, 19, 30).

<i>Maligne Lymphome</i>	<i>Pseudolymphome</i>
Diffus	Einzelne Herde
Monomorphes Infiltrat	Polymorphes Infiltrat
Zellatypien	Keine/geringe Zellatypien
Leichtkettenrestriktion	Keine Leichtkettenrestriktion
Antigenverlust	Kein Antigenverlust
Klonalität des T-Zell-Rezeptor-Gens	Polyklonalität

*Tab. 5: Unterscheidungskriterien zwischen malignen Lymphomen und Pseudolymphomen*

## **1.5 Therapie**

Die Therapie eines diagnostisch gesicherten Pseudolymphoms hängt maßgeblich von dessen Ursache ab. Ist die Ursache bekannt oder sehr wahrscheinlich, erfolgt die Therapie über die Behandlung der Grunderkrankung, wie die Behandlung der Borrelieninfektion bei einer durch Borrelien verursachten Lymphadenosis cutis benigna oder das Ersetzen eines für eine lymphozytäre Arzneireaktion verantwortlichen Medikaments durch ein Medikament einer anderen Stoffgruppe. Bei nicht bekannter oder nicht auszuschaltender Ursache kommen an erster Stelle Glukokortikoide zum Einsatz, seltener auch Antimalariamittel, lokale Strahlentherapie oder Kryotherapie (26). *Nervi SJ et al.* beschreiben allerdings eine häufig vorhandene Therapieresistenz der Pseudolymphome idiopathischer Ursache (25). Grundsätzlich ist anzumerken, dass, soweit es Lokalisation und Ausdehnung der Läsion erlauben, eine Exzision *in toto* als sinnvoll anzusehen ist, da die Abgrenzung zum malignen Lymphom schwierig ist und in der Literatur auch einzelne Übergänge von Pseudolymphomen in maligne Lymphome beschrieben sind (26).

## **1.6 Ursachen des Pseudolymphoms und Zielsetzung der Arbeit**

Wie bereits unter 1.1 erwähnt, kommen für das klinische Bild des Pseudolymphoms viele Ursachen infrage. Bekannt ist der Zusammenhang der Lymphadenosis cutis benigna mit einer Borrelieninfektion (21, 34). Weiterhin wird in der Literatur über Zusammenhänge mit HSV-Infektionen (11), Leishmanien (3, 9, 33), *Helicobacter pylori* (22) und Syphilis (23) berichtet. Außerdem kommen Medikamente, Tätowierungen, Impfungen, Allergene, Traumata und Akupunktur als auslösende Faktoren in Frage (26, 30). Die meisten Fälle werden allerdings nach wie vor als idiopathisch eingeordnet, da eine Ursache nicht erkannt wird.

Ziel dieser Arbeit ist es, bei Pseudolymphomen einen Zusammenhang des Geschehens mit verschiedenen Erregern auf molekularer Ebene durch Polymerase-Kettenreaktion nachzuweisen oder auszuschließen und zu quantifizieren. Die in unserer Untersuchung relevanten Erreger werden im Folgenden kurz vorgestellt.

### **1.6.1 Borrelien**

Ein Zusammenhang der Lymphadenosis cutis benigna mit einer Borrelieninfektion ist in der Literatur bereits vielfach beschrieben worden; der ätiopathogenetische Zusammenhang gilt als gesichert (5, 21). Bei den Borrelien handelt es sich um große schraubenförmige gramnegative Bakterien aus der Gruppe der Spirochäten. Als Hauptvektor in Europa dient die Schildzecke *Ixodes ricinus*, die sich über Larven- und Nymphenstadien zu adulten Zecken entwickelt, wobei Nymphen und erwachsene Zecken als Vektoren die Hauptrolle spielen (13). Das Krankheitsbild der Lyme-Borreliose, die durch die Gattung *Borrelia burgdorferi* ausgelöst wird, zeigt klinisch ein sehr vielseitiges Bild, das in etwa 89% der Fälle mit dem Erythema migrans um die Infektionsstelle herum beginnt (15). Vier Genospezies des *Borrelia burgdorferi*-Komplex sind als echte Pathogene für den Menschen bekannt, *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. spielmanii*, wobei die Pathogenität weiterer Arten noch nicht abschließend geklärt ist (21). Borrelien zeigen eine weltweite Verbreitung. Die Hautmanifestation der Lyme disease umfasst neben dem klassischen Erythema (chronicum) migrans das Lymphocytoma cutis und die Akrodermatitis chronica atrophicans. Bei Vorliegen eines Lymphocytoma cutis wird meist die Subspezies *B. afzelii* nachgewiesen (19). Auch wurde über Borrelieninfektionen in Zusammenhang mit B-Zell-Lymphomen und Sarkoidosen der Haut berichtet (7).

### **1.6.2 Rickettsien**

Bei den Rickettsien handelt es sich um gramnegative Bakterien, die wie Viren als obligat intrazelluläre Organismen in Zecken, Flöhen und Milben gedeihen, die dann als Vektoren dienen. Von Zecken übertragene Rickettsiosen treten weltweit auf. Die verursachenden Bakterien gehören zur Fleckfiebergruppe (SFG) innerhalb der Gattung *Rickettsia*. Rickettsien schädigen die Endothelzelle durch Bildung von Radikalen und Proteasen (13). Das klinische Erscheinungsbild reicht von subklinischen bis hin zu schwerwiegenden Verläufen (32). Zur Inzidenz einzelner Rickettsienarten in Deutschland liegen in der Literatur nur wenige Daten vor. Studien zeigten ein Vorherrschen von *R. helvetica* in Zecken aus Bayern und Baden-Württemberg, andere Arten werden vorwiegend bei Reisenden nachgewiesen (32). Eine umfangreiche Untersuchung von mehr als 3500 Zecken der Art *Ixodes ricinus* in Süddeutschland ergab einen Anteil von 8%, bei denen eine Rickettsienart molekularbiologisch nachgewiesen werden konnte (6). Diese Daten waren der Anlass, nach einer Assoziation von R.R.-Spezies in unserem Patientengut mit kutanen Pseudolymphomen zu suchen: Es gibt in der Bevölkerung einerseits einen sehr hohen Durchseuchungstiter mit Borrelien, der gebietsabhängig bei 5-25% liegt bei einem Durchseuchungstiter der heimischen Zecken mit *B. burgdorferi* von bis zu 35% je nach Region (24), und dieser Erreger zählt nachweislich zu den häufigen Ursachen kutaner Pseudolymphome, kann dies dennoch nur einen kleinen Prozentsatz ätiologisch erklären. Andererseits ist nichts bekannt zur Bedeutung der Rickettsien bei der Entstehung von Pseudolymphomen, obwohl mit 8% ein signifikanter Anteil der heimischen Zecken mit Rickettsien infiziert ist (6).

### **1.6.3 Leishmanien**

Auch Fälle, in denen ein Pseudolymphom in Verbindung mit einer Infektion mit *Leishmania*-Arten auftrat, sind bekannt (3, 9, 33). Die Autoren vermuten, dass der Zusammenhang einer Leishmanieninfektion mit Pseudolymphomen häufiger ist, als berichtet wird (9). Leishmanien sind geißeltragende Protozoen, die sich im Blut in Makrophagen vermehren. Überträger ist die Sandmücke (*Phlebotomus*). Die Vermehrung der Leishmanien läuft in zwei Wirten ab: Von der Sandmücke werden mit dem Speichel beim Stich promastigote Formen abgegeben, die im Wirbeltier von Makrophagen, Monozyten oder Langerhanszellen phagozytiert werden und sich dort in eine amastigote (unbegeißelte), lichtmikroskopisch nicht nachweisbare Form umwandeln (13). In den Makrophagen findet eine Vermehrung durch Teilung statt. Etwa 70 von 800 Sandmückenarten übertragen die Leishmaniose. Wegen des stetig steigenden Tourismusaufkommens nimmt auch die Anzahl der Leishmaniosefälle in Ländern zu, in denen die Sandmücken nicht endemisch ist. In Europa ist die Sandmücke vor allem im Mittelmeerraum weit verbreitet (13). Für die lokalisierte kutane Leishmaniasis ist meist die Unterart *L. infantum* verantwortlich. Wenige Berichte gibt es für *L. donovani*-assoziierte kutane Leishmaniasis (9).

### **1.6.4 Atypische Mykobakterien**

Unter dem Begriff atypische Mykobakterien fasst man alle für den Menschen potentiell krankheitserregenden Mykobakterien außer den Erregern der Tuberkulose und der Lepra zusammen (*MOTT – mycobacteria other than tuberculosis*). Es handelt sich um sporenlöse grampositive Stäbchen, die nur selten krankheitserregend sind. Als typische Krankheitsbilder bei geschwächter Abwehrlage entstehen pulmonale Infektionskrankheiten (*Mykobakterium avium*), Hautinfektionen (*Mykobakterium ulcerans*) und zervikale Lymphadenitis (*Mykobakterium avium*). Epidemiologisch kom-

men atypische Mykobakterien weltweit vor und sind in der Natur weit verbreitet (Wasser, Boden, Staub und Nahrungsmitteln) (29).

### **1.6.5 Merkelzell-Polyomavirus**

Polyomaviren sind Viren mit doppelsträngiger DNA, die normalerweise keinen onkogenen Charakter haben (2). Allerdings scheint das Merkelzell-Polyomavirus eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Merkelzellkarzinoms zu spielen. Merkelzell-Polyomaviren konnten jedoch auch bei Menschen nachgewiesen werden, die nicht am Merkelzellkarzinom erkrankt sind. MCV wurde in 88% aller Merkelzellkarzinome nachgewiesen, hingegen nur in 16% anderer Hauttumoren (31). Auch in gesunder Haut kann zu etwa 16% das Vorhandensein des Merkelzell-Polyomavirus nachgewiesen werden (31).

## **2 Materialien und Methoden**

### **2.1 Patientenkollektiv**

Es wurden 78 Gewebeproben von 74 Patienten untersucht, deren Hautveränderungen das klinische und histologische Erscheinungsbild eines Pseudolymphoms aufwiesen. Die Proben stammen aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München aus den Jahren 2000–2008.

Bei den 74 Patienten, davon bei Diagnosestellung 18 jünger als 40 Jahre, handelt es sich um 35 Frauen und 39 Männer. Unter den 78 Gewebeproben lokalisierter Pseudolymphome handelt es sich bei 27 um Tumore des Kopf-/Halsbereichs, 16 Proben stammen von den Extremitäten und 34 vom Körperstamm. Histologische Untersuchungen zeigten in 35 Fällen ein reaktives lymphozytäres Infiltrat und in 33 Fällen ein atypisches Infiltrat. 10 Proben konnten nicht weiter zugeordnet werden.

### **2.2 Material**

Für die Untersuchung standen formalinfixierte und in Paraffin eingebettet archivierte Proben aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München aus den Jahren 2000–2008 zur Verfügung. Von den Paraffinblöcken wurde jeweils eine Hematoxylin & Eosin (H&E) Färbung und ein ungefärbter 10 µm Schnitt angefertigt, von dem anschließend das lymphohistiozytäre Infiltrat mikrodisseziert und aus dem Mikrodissektat in der Folge die DNA extrahiert wurde. Nach Entparaffinierung wurden alle Gewebeproben bei 55 °C mittels Proteinase K vollständig lysiert und verdaut. Anschließend wurde das DNA-Lysat mittels PCR auf Vorhandensein des beta-Globin-Rezeptors untersucht, um so die

erfolgreiche Extraktion amplifizierbarer DNA zu beweisen. Von den 84 Patientenproben waren 6 Proben in der beta-Globin-PCR negativ und wurden somit nicht in die weitere Studie einbezogen.

### 2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Beim Primerpaar für Leishmanien wurde eine einfache PCR, mit den übrigen Primerpaaren wurden eine erste und eine zweite Re-PCR durchgeführt. Das PCR-Endvolumen betrug 20 µl. Die PCR läuft prinzipiell in 3 Schritten ab. Zuerst wird die DNA denaturiert, danach folgt ein Annealingsschritt, der die Primer an die Zielsequenz der nun einzelsträngigen DNA anlagern lässt. Anschließend kommt es zur Elongation der DNA-Abschnitte mittels Polymerase-vermitteltem Anbau von Nukleotiden an die Primersequenzen.

Die folgende Tabelle zeigt die Programmierung des Thermalcyclers.

Zeit	Temperatur (°C)	Schritt
2 min	95	1. initiale Denaturierung
45 sec	95	2. Denaturierung
30 sec	Tm-5 60	3. Annealing
30 sec	72	4. Elongation
7 min	72	5. finale Elongation

Tab. 6: Programmierung des Thermalcyclers

Die Schritte 2.-4. wurden 45 Mal wiederholt.

### **2.3.1 Verwendete Materialien und Geräte**

Die zur Durchführung der PCR verwendeten Materialien sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

ThermoCycler TGradient	Biometra GmbH, Göttingen
PCR-Tubes (0,2 ml und 0,5 ml)	PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen
Pipetten BioHit (0,5–10 µl, 10–100 µl, 100–100 µl)	Biozym Scientific GmbH
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
Kühlblöcke	Eppendorf, Hamburg
Minizentrifuge	NeoLab, Heidelberg
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus Sepatech
Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Vortexgerät Vortex Genie 2	Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz

*Tab. 7: zur PCR verwendete Materialien*

### **2.3.2 Reagenzien**

Das Mastermixvolumen wurde auf 18 µl/Probe festgesetzt und nach folgendem Protokoll erstellt:

Mg <sup>2+</sup> (3,0 mM)	5,0 µL
Primer (0,15 µM/µL)	1,0 µL
dNTPs (100 mM)	0,8 µL
H <sub>2</sub> O	9,2 µL
Taq-Polymerase(1:3)	2,0 µL

Tab. 8: Menge der für den Mastermix verwendeten Reagenzien

### 2.3.2.1 Primer

Für das Merkelzell-Polyomavirus (MCV) wurde ein Produkt mit 138 Basenpaaren (*MCV138*) verwendet (*MCV138 forward*: 5'-GGTTAGAGATGCTGGAAATGACC-3'; *MCV138 reverse* 5'-CAAATAAGCAGCAGTACCAAGGC-3'). Als Primerprodukt für atypische Mykobakterien wurde *Hsp65* gewählt, ein Produkt mit einer Fragmentgröße von 208 bp (*forward* 5'-CGGCGCCAACCCGCTCGG-3', *reverse* 5'-CTCCTCGACGGTGATGAC-3') sowie der Primer *Borrelia burgdorferi* mit einer Fragmentgröße von 171 bp bei Borrelien (*Bb-1 forward* 5'-TTGCAGAATTGATAAAGTTGG-3', *Bb-2 reverse* 5'-AAAACGAAGATACTAAATCTGTAATTGC-3'). Für die Leishmanienkontrolle wurde der Primer *Leishmania kinetoplast DNA minicircle* mit einer Fragmentgröße von 117 bp (*Leish-13A forward* 5'-GTGGGGAGGGCGTTCT-3', *Leish-13B reverse* 5'-ATTTTACACCAACCCCCAGTT-3') und für Rickettsien der Primer *Rickettsia sp. Citrate synthase gene (gltA) all rickettsiae* mit einer Fragmentgröße von 194 bp (*Rick-1 forward* 5'-CGGGGCTAATGAAGTGGTAAT-3', *Rick-2 reverse* 5'-GCAAAGAAGTATTAAAGGAACTCG-3') gewählt.

### **2.3.2.2 Polymerase**

Als Enzym wurde die *atTaq* Polymerase der Firma *Euroclone* verwendet. Die *atTaq Hot Start* Polymerase enthält die *atTaq* DNA Polymerase und ist an einen Antikörper gebunden, der die Polymerase-Aktivität zunächst blockiert. Während des ersten Denaturierungsschritts bei 94–95 °C wird die Polymerase-Aktivität wiederhergestellt. Diese Eigenschaft erlaubt eine Hot-Start PCR, bei der unterhalb von 70 °C in der Aufwärmphase keine unspezifischen Produkte gebildet werden. Die *atTaq Hot Start* Polymerase weist eine 5'→3' Exonuklease-Aktivität auf.

### **2.3.2.3 Positive und negative Kontrolle**

Um die Verlässlichkeit der PCR zu gewährleisten, wurden bei jeder Amplifikationsserie eine Positiv- und eine Negativkontrolle integriert. Für die Negativkontrollen wurde dem Mastermix Wasser anstelle von DNA beigefügt. Die Positivkontrolle ist ein dem jeweiligen Erreger entsprechendes DNA-Fragment und trägt dazu bei, falsch-negative Ergebnisse auszuschließen.

## **2.4 Auswertung des PCR-Ergebnisses**

### **2.4.1 Bioanalyzer**

Die Auswertung des PCR-Ergebnisses erfolgte mittels Bioanalyzer. Das Gerät ergänzt die konventionelle Gelelektrophorese von DNA-Amplifikaten durch Lab-on-Chip-Technologie und erlaubt eine automatisierte semiquantitative Analyse der Länge der Amplifikate. Das System basiert auf Mikrofluidtechnik (1). Die verwendeten Materialien sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

## 2.4.2 Materialien und Software (Bioanalyzer)

<b>Agilent 2100 Bioanalyzer</b>	Agilent Technologies
Chip Priming Station	Agilent Technologies
Chip Vortexer IKA Modell MS2-S8/MS2-S9	Agilent Technologies
Agilent 2100 Expert Software	Agilent Technologies
DNA Series II Kit (25–1000 bp) LotNo: LJ15BK05  Agilent DNA 1000 Kit (reorder number 5067-1504) DNA Chips DNA 1000 Reagents (reorder number 5067-1505) 25 DNA Chips      □ (yellow) DNA 1000 Ladder 1 Electrode Cleaner □ (green) DNA 1000 Markers 15/1500 bp (2 vials) <b>Syringe Kit</b> □ (blue) DNA Dye Concentrate*(1 vial) 1 Syringe      □ (red) DNA Gel Matrix (3 vials)  3 Spin Filters	Agilent Technologies  (1)
Pipette BioHit (0,5–10 µl)	Biozym Scientific GmbH
Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Gerät VF2	Janke&Kunkel IKA Labor-technik

Tab. 9: Verwendete Materialien zur Auswertung am Bioanalyzer

Ein Bioanalyzer-Chip erlaubt die simultane Auswertung von 10 Proben. Hierfür werden die dafür vorgesehenen Gelkammern eines Chips nach Anleitung mit jeweils 9 µl des Gel-Dye-Mixes gefüllt. Anschließend werden 5 µl des DNA-Marker-Gemisches, 1 µl des DNA-Längenstandards sowie

1 µl des jeweiligen PCR-Amplifikats in die dafür vorgesehenen Kammern pipettiert. Der beladene Chip wurde eine Minute bei 2000 rpm gevortext und dann in den Bioanalyzer gesetzt. Nach Programmdurchlauf können die positiven Proben identifiziert werden. Diese wurden zur Überprüfung des Ergebnisses sequenziert.

#### **2.4.3 Agarosegelektrophorese**

Zur Auswertung der PCR-Produkte der Testreihe Leishmanien wurde eine konventionelle Agarosegelektrophorese eingesetzt. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 1,5 g des Agarosegels (*Serva*) mit 100 ml TBE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben vermischt und so 1,5%iges Agarosegel hergestellt. Das Gel wurde zum Aufkochen gebracht und anschließend für 30 bis 40 Minuten zum Erkalten in die vorbereitete Agarosegelkammer gefüllt. Nach vollständigem Erkalten des nun festen Gels wurde die Agarosegelkammer mit TBE-Puffer aufgefüllt. Von den bereits anzentrifugierten PCR-Produkten wurden 10 µl abgemessen und mit jeweils 1 µl Blue Juice in einem 0,5 µl Tube vermischt und zentrifugiert. Die 11 µl der Produkt/Blue Juice-Mischung wurden in die dafür vorgesehenen Kammern pipettiert; zu jeder 10er-Serie wurde zur späteren Auswertung ein Längenstandard in die entsprechende Reihe pipettiert. Nach vollständigem Befüllen der Gelkammern wurden Anode und Kathode angeschlossen, somit das elektrische Feld angelegt und das Gel bei 110 V für eine Stunde gestartet. Anschließend wurde das Gel für 20 Minuten in ein Ethidiumbromidbad gelegt und danach in der Dunkelkammer im UV-Licht analysiert und das Ergebnis fotografisch dokumentiert.

## **2.4.4 Materialien (Agarosegel)**

Die zur Herstellung des Agarosegels benötigten Materialien sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

<b>Erlenmeyerkolben 300 ml</b>	Schott, über Wagner&Munz GmbH, München
<b>Agarosegel</b> (BestNr. 11404)	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
<b>TBE-Puffer</b>	
<b>Tris ultrapur</b> (BestNr. A1086.1000)	AppliChem GmbH, Darmstadt
<b>Borsäure</b> (BestNr. 15660)	Fluka, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<b>Titriplex III</b> (BestNr. 1.08418.1000)	MERCK, Darmstadt
<b>Mikrowelle</b>	
<b>Agarosegelkammer</b>	Life Technologies  (Gibco BRL Horizontal Elektrophoresis Apparatus)
<b>Zentrifuge 5415C</b>	
<b>Pipette 0,5–10 µl</b>	Biozym Scientific GmbH
<b>Pipette 20–200 µl</b>	
<b>Pipettenspitzen</b>	Pipetman/Gilson  Abimend, Langenfeld
Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe	

**Längenstandard** 40 µg 1:20 verdünnt Invitrogen

(φX174RF DNA HAEM III Fragments)

### Blue Juice

**Bromphenolblau 0,20%** Sigma Chemical CO

**Xylenzyanol 0,05%** Sigma Chemical CO

**EDTA (pH 8,0) 0,1 M** Gibco BRL, Life Technologies

**Sucrose 40%** Sigma Chemical CO

**Sodium Dodecyl Sulfate 0,5%** Gibco BRL, Life Technologies

**0,5 ml Tubes** PEQLAB Biotechnologies GmbH,  
Erlangen

**Ethidiumbromid** Sigma-Aldrich Chemie GmbH  
Steinheim, Deutschland

*Tab. 10: Verwendete Materialien zur Auswertung des PCR-Ergebnisses mittels Gelelektrophorese*

### 2.5 Verifizierung durch Sequenzanalyse

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Auswertung am Bioanalyzer wurden die als positiv gewerteten Proben zusätzlich sequenziert. Die Durchführung der DNA-Sanger-Sequenzierung war nicht Gegenstand des praktischen Anteils dieser Arbeit. Die Ergebnisse werden jedoch weiter unten dargestellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Daten des gesamten Patientenkollektivs

Es wurden 78 Proben von 74 Patienten untersucht. Die Patientendaten wurden nach Besonderheiten bezüglich der Lokalisation der Pseudolymphome, Geschlecht der Patienten, Erkrankungsalter und Infiltratotyp charakterisiert.

#### 3.1.1 Alter

Von den 74 Patienten waren 18 jünger als 40 Jahre, dies entspricht einem Anteil von 24 % (18/74) am gesamten Kollektiv. Unter den 18 Patienten unter 40 Jahren befanden sich ein Schulkind (8 Jahre) und ein Baby (9 Monate).

<40 Jahre	24% (18/74)
>40 Jahre	76% (56/74)

Tab. 11: Alter des Patientenkollektivs

#### 3.1.2 Geschlecht

Die Geschlechterverteilung beträgt 47% (Frauen): 53% (Männer). Dies entspricht einer Anzahl von 35 Patientinnen (hier lagen einmal 2 Proben von einer Patientin vor) und 39 Patienten (dreimal 2 Proben von einem Patienten).

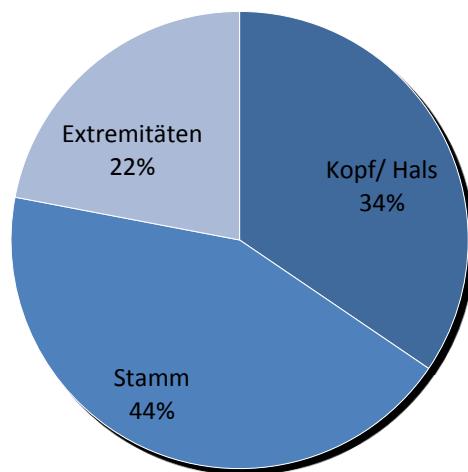
W	47% (35/74)
M	53% (39/74)

Tab. 12: Geschlechtsverteilung Patientenkollektiv

### 3.1.3 Lokalisation

Das Auftreten der Pseudolymphome an bestimmten Körperstellen wurde unterteilt nach Vorliegen der Veränderung im Kopf-/Halsbereich, am Körperstamm oder an den Extremitäten. 27 Gewebeproben stammten vom Kopf oder Hals der Patienten, 34 vom Körperstamm und 17 von den Extremitäten. Dies entspricht einer prozentualen Verteilung von 34,5% (27/78) (Kopf/Hals), 43,5% (34/78) (Stamm) und 22% (17/78) (Extremitäten).

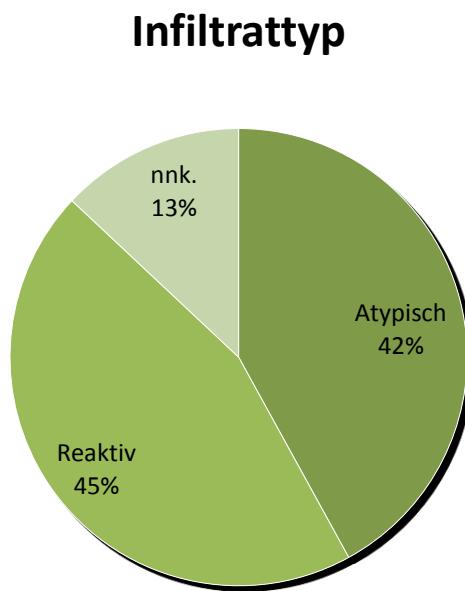
### Lokalisation



Tab. 13: Lokalisation der Pseudolymphome im Patientenkollektiv

### **3.1.4 Infiltrattyp**

Bei den 78 histologisch untersuchten Gewebeproben lag 35 Mal ein reaktives Infiltrat vor (35/78; 45%), 33 Mal ein atypisches Infiltrat (33/78; 42%) und 10 Mal ein nicht näher klassifiziertes Infiltrat (10/78; 13%).



*Tab. 14: Infiltrattyp der untersuchten Pseudolymphome*

## **3.2 Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion**

### **3.2.1 Ergebnisse der PCR des gesamten Patientenkollektivs**

78 von 84 Patientenproben konnten in die Analyse zum Nachweis von Erregern mittels Polymerasekettenreaktion eingeschlossen werden. Bei 6 Proben fiel der beta-Globin-Test negativ aus, die Proben wurden aus dem Kollektiv gestrichen.

beta-Globin positiv	93 % (78/84)
beta-Globin negativ	7 % (6/84)

Tab. 15: Ergebnisse des beta-Globin-Tests

Im Folgenden werden nur positive PCR-Ergebnisse besprochen. Positive Resultate wurden durch Sanger-Sequenzanalyse überprüft. Der Anteil der in der PCR, jedoch nicht in der Sequenzanalyse positiven Ergebnisse beträgt bei den Merkelzell-Polyomaviren 10/20 (50%), bei den atypischen Mykobakterien 5/9 (64%), bei den Borrelien 0/2 (0%) und bei den Leishmanien 2/3 (66%). Letztendlich von der Sequenzanalyse bestätigt wurden von den von 74 Patienten stammenden Proben 10 positive Ergebnisse für das Merkelzell-Polyomavirus, 4 positive Fälle für *Hsp65*, 2 Proben brachten ein positives Ergebnis für Borrelien und 1 Patient war positiv für Leishmanien. Rickettsien konnten nicht nachgewiesen werden. Es ergab sich eine prozentuale Verteilung von 10/74 (MCV138) (13%), 4/74 (*Hsp65*) (5%), 2/74 (Borrelien) (3%) und 1/74 (Leishmanien) (1,3%).

MCV	13%, 10/74
<i>Hsp65</i>	5%, 4/74
Borrelien	3%, 2/74
Leishmanien	1,3%, 1/74
Rickettsien	0%

Tab. 16: Prozentuale Verteilung der positiven Ergebnisse hinsichtlich der unterschiedlichen Erreger

Dabei wurde bei einem Patienten sowohl ein positives Ergebnis für Leishmanien als auch für Borrelien nachgewiesen. Demnach waren von den 74 Patienten 59 auf keinen der gesuchten Erreger positiv. Dies entspricht 78 % (59/78).

### **3.2.2 Ergebnisse der PCR (Merkelzell-Polyomavirus)**

Von den 78 untersuchten Patientenproben ließ sich bei 20 Patientenproben (20/78) ein Amplifikat von 138 bp Länge mittels Bioanalyzer nachweisen. In 58 Fällen konnte kein entsprechendes Amplifikat dargestellt werden. Die Sequenzanalyse bestätigte dieses Ergebnis bei 10 der 20 Proben.

#### **3.2.2.1 Verteilung der positiven Fälle nach Geschlecht und Alter**

Bei den 10 Patienten handelt es sich um 8 Männer und 2 Frauen (80%: 20%). Das Geschlechterverhältnis im gesamten Patientenkollektiv setzt sich aus 39 Männern und 35 Frauen (53%: 47%) zusammen. Von den 10 Patienten, die eine positive Bande für das MCV aufwiesen, waren alle älter als 40 Jahre (100%; 10/10), während beim gesamten Patientenkollektiv 18 Personen (24%; 18/74) jünger als 40 Jahre waren. Das Durchschnittsalter lag bei 61 Jahren.

Geschlecht	M	80%	(8/10)
	W	20%	(2/10)
Alter	<40 J	0%	(0/10)
	>40 J	100%	(10/10)

*Tab. 17: Verteilung der MCV-positiven Fälle nach Geschlecht und Alter*

### **3.2.2.2 Verteilung der positiven Fälle nach Lokalisation und Infiltrattyp**

Drei der auf MCV positiv getesteten Pseudolymphome befanden sich bei den Patienten im Kopf-/Halsbereich (30%; 3/10) (Nasenwurzel, Augenbraue, Stirn), drei am Körperstamm (30%; 3/10) (Rücken, Leiste und am Rücken paravertebral) und 4 an den Extremitäten (40%; 4/10) (Oberarm, Oberschenkel und zweimal am Unterschenkel). Im Hinblick auf den Infiltrattyp ergab sich eine Verteilung von 7:2:1 entsprechend 70% (7/10) reaktive Infiltrate, 20 % (2/10) atypische Infiltrate sowie 10% (1/10), die nicht näher klassifiziert werden konnten (nnk) und somit histologisch keiner der etablierten Gruppen zugeordnet werden können, die klinisch mit der Ausbildung von Pseudolymphomen einhergehen. Als Differentialdiagnose konnte bei diesem Patienten eine Luesinfektion in Betracht gezogen werden.

Lokalisation	Kopf/Hals	30% (3/10)
	Stamm	30% (3/10)
	Extremitäten	40% (4/10)
Infiltrattyp	Reaktiv	70% (7/10)
	Atypisch	20% (2/10)
	Nnk	10% (1/10)

*Tab. 18: Verteilung der MCV-positiven Fälle nach Lokalisation und Infiltrattyp*

In den histopathologischen Gutachten ist zweimal (2/10) ein dichtes, lymphozytäres Infiltrat ohne auffällige Atypien der Lymphozyten beschrieben. Bei vier Gewebeproben (4/10) liegt ein perivaskulär akzentuiertes Infiltrat mit Lymphozyten, Histiozyten und Eosinophilen vor. Zudem fallen Muzin-

ablagerungen auf. Einmal wird eine stellenweise spongiotisch aufgelockerte Epidermis beschrieben, zudem kleine Erosionen im Zentrum des Präparates und ein lymphohistiozytäres Infiltrat, im Randbereich zunehmend Plasmazellen (1/10). Bei einem weiteren Biopsat wird ein dermal gelagertes lymphohistiozytäres Infiltrat beschrieben, das sich bis in die Subkutis nachweisen lässt (1/10). Die beiden übrigen Biopsate zeigten ein fleckförmiges lymphozytäres Infiltrat mit Sternhimmelmakrophagen (2/10).

### **3.2.2.3 Verteilung der positiven Fälle nach Ergebnissen der immunhistologischen und molekularbiologischen Untersuchung**

Die immunhistologische Untersuchung zeigte bei einem für MCV positiven Pseudolymphom einen B-Zell-Typ (10%; 1/10); die Lymphozyten sind positiv für CD20 und CD79a; um die CD20-positiven Zellen herum zeigt sich ein CD3-positives Infiltrat, ferner auch Darstellung von BCL6- und BCL2-positiven Zellen. In einem der 10 MCV-positiven Fälle lag ein Pseudolymphom vom T-Zell-Typ vor (10%; 1/10) mit Lymphozyten positiv für die T-Zell-Marker CD8, CD4, CD5, CD2, CD3; CD 7 war negativ. In acht Fällen (80%; 8/10) waren in der immunhistologischen Untersuchung sowohl B- als auch T-Zell-Marker positiv; somit lagen hier Pseudolymphome mit gemischemtem Immunphänotyp vor. Die molekularbiologische Analyse hinsichtlich eines Rearrangements der Gene der Gamma-Kette des T-Zell-Rezeptors wurde bei 4 der 10 Patienten durchgeführt und war in allen Fällen negativ.

Immunhistologie	B-Zell-dominiert T-Zell-dominiert B-/T-Zell-gem.	10% (1/10) 10% (1/10) 80% (8/10)
Molekularbiologie	TZR-Gamma	negativ (4/4)

*Tab. 19: Verteilung der MCV-positiven Fälle nach Immunhistologie und Molekularbiologie*

### **3.2.3 Ergebnisse der PCR (atypische Mykobakterien)**

Von den 78 untersuchten Patientenproben ließ sich bei 4 Patienten (5%; 4/78) ein Amplifikat von 208 bp Länge mittels Bioanalyzer nachweisen. Die Sequenzanalyse bestätigte dieses Ergebnis. Bei 74 Proben konnte kein entsprechendes Amplifikat dargestellt werden.

#### **3.2.3.1 Verteilung der positiven Fälle nach Alter und Geschlecht**

Alle vier Patienten, bei denen atypische Mykobakterien nachgewiesen werden konnten, waren älter als 40 Jahre (100%; 4/4). Das Durchschnittsalter betrug 56 Jahre.

Die Geschlechtsverteilung der für atypische Mykobakterien positiv getesteten Patienten beträgt 1:1. 2 Proben wurden Männern zugeordnet, 2 Proben stammten von Frauen.

Geschlecht	M	50% (2/4)
	W	50% (2/4)
Alter	<40 Jahre	0% (0/4)
	>40 Jahre	100% (4/4)

Tab. 20: Verteilung der Hsp65-positiven Fälle nach Geschlecht und Alter

### 3.2.3.2 Verteilung der positiven Fälle nach Lokalisation und Infiltrattyp

Bezüglich der Lokalisation der Pseudolymphome befanden sich drei Veränderungen im Kopf-/Halsbereich der Patienten (75%; 3/4), im Bereich der Ohrhelix, der Oberlippe und hochparietal, sowie ein Tumor an einer Extremität (25%, 1/4) (Kniekehle). Der Körperstamm war in keinem der Fälle betroffen. Die histopathologische Untersuchung ergab in drei Fällen ein atypisches Infiltrat (75%; 3/4), und in einem der 4 Fälle, in denen DNA von atypischen Mykobakterien nachgewiesen werden konnte, lag ein nicht näher klassifizierbares Infiltrat vor (25%; 1/4).

Lokalisation	Kopf/Hals	75% (3/4)
	Stamm	0% (0/4)
	Extremitäten	25% (1/4)
Infiltrattyp	Reaktiv	0% (0/4)
	Atypisch	75% (3/4)
	Nnk	25% (1/4)

Tab. 21: Verteilung der Hsp65-positiven Fälle nach Lokalisation und Infiltrattyp

Das dermatohistopathologische Gutachten berichtet in einem Fall über ein leicht verbreitertes Epidermisband, ein lymphohistiozytäres Infiltrat der

Dermis, das fokal mit einer Nekrobiose von kollagenem Bindegewebe einhergeht. Bei starker Vergrößerung zeigten sich mitunter auch Kernatypien. Bei dem hochparietal lokalisierten Pseudolymphom zeigte sich wiederum ein dichtes lymphohistiozytäres Infiltrat im Bereich des Koriums mit Ausbildung von Keimzentren; Lymphozyten zeigten zum Teil gekerbte Kernformen. Auch das Pseudolymphom der Oberlippe zeigte histologisch ein dichtes lymphohistiozytäres Infiltrat und Lymphozyten mit zum Teil gekerbten Kernformen. Bei der vierten *Hsp65*-positiven Probe zeigte das histologische Gutachten ein Infiltrat aus Lymphozyten, histiozytären Zellen und Plasmazellen ohne wesentliche zelluläre Atypien.

### **3.2.3.3 Verteilung der *Hsp65*-positiven Fälle nach Ergebnissen der immunhistologischen und molekularbiologischen Untersuchung**

Von den vier untersuchten Pseudolymphomen wies eines (1/4) einen vorherrschenden T-Immunphänotyp und zwei (2/4) einen gemischten B-/T-Immunphänotyp auf. Vom vierten *Hsp65*-positiven Pseudolymphom lag keine immunhistologische Untersuchung des Gewebes vor, somit ist hier keine Typisierung bekannt. In der immunhistologischen Untersuchung des Pseudolymphoms vom T-Zell-Typ waren die Lymphozyten meist positiv für CD3, CD7 und CD4 und mit partiellem Antigenverlust für CD5; ein kleinerer Anteil war positiv für CD8 und vereinzelt CD30. Bei den zwei kombinierten B-/T-Zell-Pseudolymphomen waren die Infiltrate sowohl mit den B-Zell-Markern CD79a, CD20 färbbar als auch mit CD2, CD3, CD4; etwas geringer waren sie auch für CD5, CD7 und CD8 darzustellen. In beiden Fällen war CD30 negativ sowie keine kappa/lambda-Leichtkettenrestriktion nachweisbar. Eine molekularbiologische Untersuchung wurde in zwei der vier positiven Fälle durch das Pathologische Institut durchgeführt. In einem Fall war das Ergebnis für die TZR-gamma-Gene negativ, im zweiten Fall die Untersuchung auf eine kappa/lambda-Leichtkettenrestriktion ebenfalls

negativ. In zwei der vier Fälle lagen keine molekularbiologischen Untersuchungsergebnisse vor. Die im Anschluss an die PCR durchgeführte Sequenzanalyse wies vier der bekannten Unterarten atypischer Mykobakterien (MOTT = mycobacteria other than tuberculosis) nach, *Mykobakterium monocensae*, *Mykobakterium neglectum*, *Mykobakterium sp.* und *Mykobakterium insubricum*.

Immunhistologie	B-Zell-Reihe	0%	(0/4)
	T-Zell-Reihe	25%	(1/4)
	B-/T-Zell-R.	50%	(2/4)
Molekularbiologie	TZR-gamma negativ	(1/4)	
	kappa/lambda-neg.	(1/4)	
	Keine Ergebnisse	(2/4)	

Tab. 22: Verteilung der 4 Hsp65-positiven Fälle nach Immunhistologie und Molekularbiologie

### 3.2.4 Ergebnisse der Borrelien-Polymerasekettenreaktion

Entsprechend der positiven Kontrollreaktion konnte von den 78 untersuchten Proben 2 Mal (3%; 2/78) ein Amplifikat von 171 bp Länge nachgewiesen und durch die Sequenzanalyse bestätigt werden. In beiden Fällen wurde in der DNA-Sequenzierung die Borrelienart *Borrelia afzelii* nachgewiesen.

### **3.2.4.1 Verteilung der positiven Fälle nach Alter und Geschlecht**

Bei den beiden Patienten, bei denen sich eine Borrelieninfektion durch PCR bestätigen ließ, war ein Patient älter als 40 Jahre (50%; 1/2). Beim zweiten positiven Fall handelt es sich um Schulkind im Alter von 8 Jahren. Es handelt sich bei den zwei positiven Fällen um einen weiblichen und einen männlichen Patienten.

Geschlecht	M	1
	W	1
Alter	<40 Jahre	1
	>40 Jahre	1

*Tab. 23: Verteilung der *Borrelia burgdorferi*-positiven Fälle nach Geschlecht und Alter*

### **3.2.4.2 Verteilung der positiven Fälle nach Lokalisation und Infiltratyp**

Bei den Pseudolymphomen, in deren Zusammenhang eine Borrelieninfektion nachgewiesen werden konnte, befand sich in einem Fall die Läsion an der Oberlippe des Patienten (Kopf-/Halsbereich 50%; 1/2), im zweiten Fall am Skrotum (50%; 1/2). Das skrotal lokalisierte Pseudolymphom wies histologisch ein reaktives Infiltrat auf (50%; 1/2), das an der Oberlippe lokalisierte ein atypisches Infiltrat (50%; 1/2).

Lokalisation	Kopf/Hals (Oberlippe)	1
	Stamm (Skrotum)	1
	Extremitäten	0
Infiltrattyp	Reaktiv	1
	Atypisch	1
	Nnk	0

*Tab. 24: Verteilung der *Borrelia burgdorferi*-positiven Fälle nach Lokalisation und Infiltrattyp*

Die Histologie berichtet im Fall des an der Oberlippe lokalisierten Pseudolymphoms über ein dichtes lymphozytäres, die quergestreifte Muskulatur durchdringendes Infiltrat der Dermis; Lymphozyten zeigen zum Teil gekerbte Kernformen, fokal Nachweis von Plasmazellen. Der Befund ist vereinbar mit einem atypischen Infiltrat. Die zweite positive Probe zeigt histologisch ein noduläres, lymphohistiozytäres Infiltrat mit angedeuteten Keimzentren, mäßiggradige Pleomorphien der Lymphozyten, vereinzelte eosinophile Granulozyten, Plasmazellen und Sternhimmelmakrophagen. Der Befund ist vereinbar mit einem reaktiven Infiltrat.

### **3.2.4.3 Verteilung der positiven Fälle nach Ergebnissen der immunhistologischen und molekularbiologischen Untersuchung**

Bei den beiden Pseudolymphomen, bei denen in der PCR eine Borrelieninfektion nachgewiesen wurde, konnten in der immunhistologischen Untersuchung in einem Fall sowohl Zellen der B-Zell-Reihe als auch der T-Zell-Reihe nachgewiesen werden; im zweiten Fall liegt ein Pseudolymphom der B-Zell-Reihe vor. Im atypischen Infiltrat zeigten sich die Lymphozyten positiv zum Teil für CD79a und CD 20, zum Teil für CD2, CD3, CD4, CD5, CD7. Andere Lymphozytome waren positiv für CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 und CD8. Immunhistochemisch war keine Leichtketten-

restriktion nachweisbar. Im Fall des reaktiven Infiltrats färbte sich der überwiegende Anteil der Lymphozyten für CD20 positiv, für CD3 ein deutlich geringerer Anteil. BCL2 färbte die Keimzentren und BCL6 die umgebenden Lymphozyten, die Histopathologie ließ somit auf ein Pseudolymphom der B-Zell-Reihe schließen. Eine molekularbiologische Untersuchung wurde bei keiner der Gewebeproben durchgeführt, es liegen keine entsprechenden Ergebnisse vor.

Immunhistologie	B-Zell-Reihe T-Zell-Reihe B-/T-Zell-R.	1 0 1
Molekularbiologie	—	

*Tab. 25: Verteilung der *Borrelia burgdorferi*-positiven Fälle nach der Immunhistologie*

### **3.2.5 Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion (Leishmanien)**

Von den 78 Proben konnte in einem Fall (1,3%; 1/78) ein der positiven Kontrollreaktion entsprechendes Amplifikat von 117 bp Länge in der Gel-elektrophorese nachgewiesen und in der Sequenzanalyse durch Nachweis von *Leishmania infantum* bestätigt werden. Bei dem positiven Ergebnis handelt es sich um den bereits 2007 von Flraig *et al.* (9) publizierten Fall eines in Zusammenhang mit Leishmanien aufgetretenen Pseudolymphoms der Haut.

Bei der positiven Patientenprobe handelt es sich um eine 66-jährige Patientin. In der Histologie konnten morphologisch keine Pathogene, insbesondere auch keine Amastigoten nachgewiesen werden (9). Das Pseu-

dolymphom, bei dem ein Zusammenhang mit der auch in der PCR nachgewiesenen Leishmanieninfektion besteht, war im Kopf-/Hals-Bereich der Patientin lokalisiert, betroffen ist das linke Ohrläppchen. Die Patientin hatte eine spontan auftretende Schwellung wahrgenommen, die stetig an Größe zunahm. Klinisch zeigte sich ein livid-roter Knoten. Es liegt ein nicht näher klassifiziertes Infiltrat vor. Das Ergebnis der immunhistologischen Untersuchung ergab das Vorliegen eines kombinierten B-/T-Zell-Pseudolymphoms. Sowohl B-Zell-Marker als auch T-Zell-Marker färbten in der entsprechenden Untersuchung Zellen positiv. Das lymphozytäre Infiltrat war zum Teil positiv für CD20 und CD79a, CD4-positive Lymphozyten waren häufiger als CD8-positive. Immunhistochemisch war keine Leichtkettenrestriktion nachweisbar, BCL-6 war negativ. Molekularbiologische Ergebnisse brachten keinen Nachweis eines klonalen Rearrangements der T- oder B-Zell-Rezeptorgene. Die Sequenzanalyse wies *Leishmania infantum* nach.

Geschlecht	W
Alter	>40 Jahre
Lokalisation	Kopf/Hals (Ohrläppchen)
Infiltrattyp	Nnk
Immunhistologie	B-/T-Zell-Reihe

Tab. 26: Charakteristika des *Leishmania*-positiven Pseudolymphoms

### **3.2.6 Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion (Rickettsien)**

Bei keiner der 78 untersuchten Patientenproben konnte ein einer Rickettsieninfektion entsprechendes Amplifikat von 194 bp Länge dargestellt werden (0/78). Alle untersuchten Proben waren negativ.

### **3.3 Positiv- und Negativ-Kontrollreaktionen der Polymerasekettenreaktion**

Ausgewertet wurden nur Versuchsreihen, bei denen folgende Bedingungen erfüllt wurden:

- bei der Negativkontrolle, bei der Wasser ( $H_2O$ ) anstelle von DNA in den PCR-Ansatz zugesetzt wurde, kam es zu keiner Amplifikation, ein Amplifikat konnte mittels Bioanalyzer bzw. Gelelektrophorese nicht dargestellt werden.
- Bei der positiven Probe, bei der dem PCR-Ansatz eine Referenz-DNA zugesetzt wurde, konnte ein Amplifikat von 138 bp Länge (*MCV138*), 208 bp Länge (*Hsp65*), 171 bp Länge (*Borrelien*), 194 bp Länge (*Rickettsien*) mit den entsprechenden Primern in der Auswertung mittels Bioanalyzer und das Amplifikat von 117 bp Länge (*Leishmanien*) im Agarosegel visualisiert werden.

Wurden diese Bedingungen nicht erfüllt, waren die Ergebnisse nicht auswertbar. Der Versuch wurde wiederholt.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Diskussion der Methoden**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 78 Biopsate von 74 Patienten, die an einem Pseudolymphom erkrankt waren, mittels Polymerasekettenreaktion auf das Vorhandensein von Borrelien-, Leishmanien-, atypische Mykobakterien-, Merkelzell-Polyomaviren- und Rickettsien-DNA untersucht. Im Folgenden wird zunächst auf die Untersuchungsmethode, die Polymerasekettenreaktion, deren Sensitivität und Spezifität sowie auf die Bedeutung eingegangen, die dieses Verfahren im Rahmen der Pseudolymphomdiagnostik einnimmt.

#### **4.1.1 Sensitivität und Spezifität der PCR**

Die Polymerasekettenreaktion ist eine direkte Nachweismethode für spezifische DNA-Sequenzen, die nicht nur in der Dermatohistologie ein etabliertes Verfahren zum Nachweis von Erregern darstellt (8). Geeignete Indikationen für den Einsatz dieses Untersuchungsverfahrens sind beispielsweise der Verdacht auf eine Leishmaniase, eine Borreliose, eine Mykobakteriose oder eine Herpes-simplex- bzw. Varizella-zoster-Virus-Infektion (8). Generell handelt es sich bei der PCR um ein Verfahren mit sehr hoher Sensitivität. Insofern ist von einer gewissen Zahl falsch-positiver Ergebnisse auszugehen, gleichzeitig ist die Spezifität eher gering. Die Spezifität der PCR ist wesentlich beeinflussbar über das Design der verwendeten Primer. Wegen der hohen Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Ergebnisse bei einem Assay, der primär als Screening-Test verwendet wird, sollte die PCR immer durch ein Verfahren mit hoher Spezifität ergänzt werden. Für die hier vorliegende Arbeit wurde dies mit Hilfe der direkten DNA-Sequenzanalyse realisiert. In der Sequenzanalyse wurden

36% (4/9) der im PCR-Verfahren positiv für atypische Mykobakterien (*Hsp65*) gewerteten Proben als spezifisch-positiv bestätigt. Bei dem falsch-positiven Anteil von 64% (5/9) wurde in der Sequenzanalyse *Rhodococcus erythropodus* sowie *Aspergillus flavus* und *Pseudomonas fluorescens* nachgewiesen. Rhodococcen gehören zu den Actinomyceten, die mit den Mykobakterien phylogenetisch verwandt sind. Durch die verwandtschaftliche Beziehung der Mykobakterien und Actinomyceten ähneln sich ihre DNA-Sequenzen und können von den Screening-Primern erkannt und amplifiziert werden. Die Spezifität des eingesetzten Primerpaars ist gering, weshalb erst die Sequenzanalyse ein verlässliches Ergebnis liefern kann. Ähnliches war bei der PCR mit den Primern für das Merkelzell-Polyomavirus *MCV138* und den Primern für die Leishmanien-PCR zu beobachten. Für das Merkelzell-Polyomavirus wurden in der Sequenzanalyse 50% (10/20) der positiven PCR-Ergebnisse bestätigt, bei den Leishmanien 33% (1/3). Im Gegensatz dazu wurden bei den Borrelien-Primern (*Borrelia burgdorferi*) 100% (2/2) der in der Polymerasekettenreaktion positiven Ergebnisse auch in der Sequenzanalyse bestätigt. Die Primer wiesen im Vergleich zu den anderen eine deutlich höhere Spezifität auf und brachten in der primären Diagnostik bereits ein verlässlicheres Ergebnis. Grundsätzlich gilt die Polymerasekettenreaktion in der Dermatohistologie als ein kostengünstiges und schnelles Verfahren zum Nachweis verschiedener Erreger, die Kombination mit einem zweiten Nachweisverfahren hoher Spezifität ist jedoch notwendig. Colli et al., welche die Polymerasekettenreaktion in ihrer Untersuchung zum Erregernachweis von *Borrelia burgdorferi* heranzogen, erhielten ein Ergebnis mit einer Sensitivität vom 67,5% für die Polymerasekettenreaktion. Sie konnten eine Infektion in 54 von 80 Fällen nachweisen und betonten, dass auch in serologisch positiven Fällen einer Borrelieninfektion das Ergebnis der Polymerasekettenreaktion negativ sein kann, beispielsweise aufgrund der geringen Sensitivität (5). Allgemein ist die Sensitivität einer PCR von vielen Faktoren abhängig,

wie der Zusammensetzung des Fixiermediums, dem zu amplifizierenden Genabschnitt, den eingesetzten Primern, der verwendeten Polymerase und der Zusammensetzung des PCR-Ansatzes.

#### **4.1.2 PCR in der Pseudolymphomdiagnostik**

Die PCR ist in der Pseudolymphomdiagnostik von besonderer Bedeutung: einerseits, wie in unserer Untersuchung eingesetzt, zum Nachweis eines Erregers, der ursächlich für das reaktive lymphozytäre Infiltrat sein kann, woraus sich ein kausaler Therapieansatz ergibt. Andererseits dient die PCR der Abgrenzung eines malignen Lymphoms, da dieses meist mit einer nachweisbaren klonalen T- oder auch B-Zell-Population einhergeht und insofern als diagnostisches Kriterium – unter anderen – herangezogen werden kann. In aller Regel werden hierfür Genabschnitte verwendet, die die beta- oder gamma-Kette des T-Zell-Rezeptors bzw. Abschnitte der leichten oder schweren Ketten der Immunglobuline kodieren. Zu Bedenken ist hierbei jedoch, dass auch in Pseudolymphomen ein klonales Rearrangement gefunden werden kann (10, 14). Bedeutsamer in der Pseudolymphomdiagnostik ist sicherlich der Erreger nachweis. Umfangreiche Untersuchungen liegen dazu in erster Linie für den Nachweis einer Borrelieninfektion vor, da dieser Zusammenhang schon länger bekannt ist und mehrfach beschrieben wurde (5, 7, 21). In der hier durchgeföhrten Untersuchungsreihe wurden 100% (2/2) der von der PCR detektierten Borrelien-Gensequenzen auch in der Sanger-Sequenzanalyse bestätigt. Bei einem der beiden Borrelien-positiven Patienten lag bereits klinisch der Verdacht auf eine Borrelieninfektion nahe, die durchgeföhrte Serologie war ebenfalls positiv. Serologische Untersuchungen zur Borreliendiagnostik wie der Nachweis von Antikörpern und spezifischer Banden im *Western-Blot* wiesen auf eine floride Infektion hin. Nach dreiwöchiger Antibiotikatherapie zeigten sich die serologischen Marker IgM und IgG rückläufig. Beim zwei-

ten Borrelien-positiven Patienten wies das histopathologische Gutachten darauf hin, die Differentialdiagnose einer Borrelieninfektion einzubeziehen. Damit wird verdeutlicht, dass die PCR in diesem Szenario ein ergänzendes Verfahren ist, das einen Hinweis auf eine Borrelieninfektion untermauern, diese jedoch nicht gänzlich ausschließen kann. Andererseits berichten Flraig et al., dass bei dem Leishmanien-assoziierten Pseudolymphom, das auch in dieser Versuchsreihe noch einmal bestätigt wurde, die Leishmanien-Infektion nur in der Polymerasekettenreaktion detektiert werden konnte, da in der histologischen Untersuchung kein direkter Erregernachweis, insbesondere keine Amastigoten, gefunden werden konnten (9). Ähnlich berichteten Lenormand et al., dass in ihren Studien zum Borrelien-assoziierten Lymphocytoma cutis ein Patient auch sechs Monate nach einem Zeckenbiss serologisch Borrelien-negativ war, wohingegen die PCR den eindeutigen Nachweis einer Borrelieninfektion lieferte (21). Die mangelnde Sensitivität der Serologie steht hier somit einer hohen Sensitivität der PCR gegenüber, so dass die beiden Verfahren sich bei unklaren Fällen diagnostisch ergänzen. Colli et al. untersuchten in ihrer Studie zum *Borrelia burgdorferi*-assoziierten Lymphocytoma cutis 106 Patienten, davon waren 67,5% PCR-positiv (5). Sie erwähnten dabei eine eingeschränkte Sensitivität der PCR-Technik bei formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Geweben. Einige Patienten mit positivem IgM waren PCR-negativ, andererseits ein serologisch negativer Patient in der PCR-Analyse positiv für *Borrelia burgdorferi*. Dies unterstreicht die Bedeutung des Konzepts sich ergänzender diagnostischer Verfahren. Zum gleichen Ergebnis kommen auch Colli et al. und resümieren, dass in endemischen Gebieten die Integration von Serologie und PCR-Analyse wichtig ist zur Identifikation des ursächlichen Faktors eines Lymphocytoma cutis (5). So kommt der PCR-Diagnostik eine zentrale Rolle in der Pseudolymphomdiagnostik zu, einerseits im Zusammenhang mit dem Nachweis von Polyklonalität, andererseits beim Nachweis verursachender Erreger wie Bor-

relien (3, 5, 21), Leishmanien (3, 9), Herpes simplex-Viren (3) und, wie im Rahmen dieser Arbeit, zum Nachweis atypischer Mykobakterien, Merkelzell-Polyomaviren und Rickettsien. Sie sollte jedoch immer durch geeignete Methoden der Mikrobiologie, der Serologie (5) und Histologie (30) ergänzt werden.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

Analog zur kritischen Betrachtung der verwendeten Methoden erfolgt in diesem Kapitel eine Wertung der Ergebnisse bezüglich der Häufigkeit der positiven Ergebnisse und ihrer Bedeutung im Vergleich zu den Resultaten anderer Studien.

### 4.2.1 Häufigkeit eines Erregernachweises

Bei allen 78 Gewebeproben wurde jeweils eine Polymerasekettenreaktion zum Erregernachweis von Borrelien, Leishmanien, atypischen Mykobakterien, Merkelzell-Polyomaviren und Rickettsien durchgeführt ( $n = 390$ ). Insgesamt ergab sich bei 17 der 390 Untersuchungen der Nachweis eines der genannten Erreger. Für das Merkelzell-Polyomavirus waren 10 Proben positiv, für atypische Mykobakterien 4 Proben, für Borrelien 2 Proben und bei einem Patienten ließ sich eine Leishmanieninfektion nachweisen. Rickettsien konnten in keiner der Proben nachgewiesen werden. 10 Patienten, bei denen das Merkelzell-Polyomavirus nachgewiesen werden konnte, entsprechen 13% (10/78) des gesamten Patientenkollektivs. In der Literatur wird von einem Nachweis von Merkelzell-Polyomaviren bei nicht am Merkelzellkarzinom (MCC) erkrankten Personen berichtet, und zwar in bis zu 16% der Fälle bei Proben von nicht MCC-assoziierten Hauttumoren (10/61) und bis zu 24% bei klinisch und histologisch unauffälligen Hautbiopsien (8/34) – wobei der Erreger speziell an der Stirn- und Augenbrauen-

region besonders häufig nachweisbar ist (62%) (31). Von den zehn Patienten war bei einem das Pseudolymphom in der Augenbrauenregion lokalisiert, bei einem an der Stirn (20%, 2/10). Alle zehn Patienten waren älter als 40 Jahre; das gehäufte Auftreten von Pseudolymphomen in der zweiten Lebenshälfte spiegelt sich allerdings auch im gesamten Patientenkollektiv wider, in dem 76% der Patienten älter als 40 Jahre waren (56/74). Daher kann hier nicht auf einen ätiologischen Zusammenhang mit dem Merkelzell-Polyomavirus geschlossen werden, vielmehr ist dies als Ausdruck einer altersabhängigen Durchseuchung der Bevölkerung und damit auch unseres Patientenkollektivs zu werten. 80% (8/10) der MCV-positiven Pseudolymphome waren kombinierte B-/T-Zell-Pseudolymphome, und bei 40% (4/10) zeigten sich histologisch perivaskulär akzentuierte Infiltrate mit Muzinablagerung. Bei 5% (4/74) konnten atypische Mykobakterien nachgewiesen werden, bei 3% (2/74) Borrelien und bei 1,6% (1/74) Leishmanien. Insgesamt ergibt dies bei 23% (17/74) des gesamten Patientenkollektivs, bei denen einer der gesuchten Erreger nachgewiesen werden konnte, den Verdacht, dass als mögliche Ursache des Pseudolymphoms eine Infektion angesehen werden könnte. Das Auftreten eines Pseudolymphoms wird in der Literatur mehrfach in Zusammenhang mit einer Infektion gebracht. Bekannt sind Zusammenhänge mit dem Erreger der Syphilis, *Treponema pallidum* (23), dem Herpes simplex- bzw. Varizella-zoster-Virus (3, 11), Borrelien (5, 21) und Leishmanien (3, 9, 33). Der von Flaj et al. beschriebene Zusammenhang mit einer Leishmanieninfektion konnte in dieser Untersuchungsreihe bestätigt werden. Weitere Zusammenhänge im Auftreten von Pseudolymphomen in Verbindung mit einer Leishmanieninfektion konnten Yavuzer et al. (33) nachweisen. Weitere Zusammenhänge mit Leishmanieninfektionen konnten in diesem Patientenkollektiv nicht nachgewiesen werden. Das Hauptvorkommen der als Überträger der Leishmaniose bekannten Sandmücke liegt nicht in Mitteleuropa; ihr Verbreitungsgebiet in Europa erstreckt sich über den gesamten

Mittelmeerraum und reicht bis an die Alpen (13) heran. Aufgrund zunehmender Reiseaktivität der Bevölkerung und klimatischen Veränderungen muss diesbezüglich zukünftig mit höheren Inzidenzen gerechnet werden. Auch der bereits häufig in der Literatur erwähnte Zusammenhang des Pseudolymphoms mit einer Borrelieninfektion (5, 7, 21, 26) konnte bestätigt werden. Eine Infektion mit *B. afzelii* konnte bei zwei der 74 Patienten eindeutig durch die Polymerasekettenreaktion nachgewiesen werden. Eben dieser Erreger wurde bereits als die *Borrelia burgdorferi*-Subspezies beschrieben, die am häufigsten in Verbindung mit einem „borrelial lymphocytoma cutis“ nachgewiesen wird (19). Zusammenhänge eines Pseudolymphoms mit Rickettsien, atypischen Mykobakterien oder Merkelzell-Polyomaviren sind nicht beschrieben. Auch in dem hier untersuchten Patientenkollektiv konnte bei keinem Patienten eine Infektion mit Rickettsien nachgewiesen werden, so dass davon auszugehen ist, dass das Auftreten eines Pseudolymphoms nicht im Zusammenhang mit einer Rickettsieninfektion steht. Atypische Mykobakterien konnten bei 5% (4/74) der Patienten nachgewiesen werden; es waren keine Assoziationen bezüglich des Alters der Patienten oder der Lokalisation der Veränderung erkennbar. Merkelzell-Polyomaviren konnten bei 13% (10/74) nachgewiesen werden. Diese Zahlen erscheinen im Vergleich zu den 3% (2/74) mit Borrelien-nachweis – die bekanntermaßen in eindeutigem Zusammenhang mit dem Auftreten eines Pseudolymphoms stehen – sehr hoch, so dass grundsätzlich davon ausgegangen werden kann, dass atypische Mykobakterien und Merkelzell-Polyomaviren eine Rolle beim Auftreten eines Pseudolymphoms der Haut spielen könnten. Allerdings belegen Studien, dass auch in 16% gesunder Haut Merkelzell-Polyomaviren nachweisbar sind (31), was sich mit unserem Ergebnis deckt, so dass ein kausaler Zusammenhang kritisch zu hinterfragen ist und ebenso als Zufallsbefund betrachtet werden kann. Auch atypische Mykobakterien können nachgewiesen werden, ohne dass Symptome vorhanden sind, da sie ubiquitär vorkommen und beim

Gesunden meist apathogen sind (12). Andererseits können sie jedoch kutane Hautveränderungen mit Granulombildung und granulozytenreichen, gemischtzelligen Infiltraten verursachen (17), so dass hier ein Zusammenhang mit den klinisch auftretenden Pseudolymphomen, wie in unserem Patientenkollektiv, möglich ist. Insgesamt lässt diese Arbeit auch erkennen, dass häufige humanpathogene Erreger vermutlich nicht die Mehrzahl der kutanen Pseudolymphome erklären können, obwohl Infektionen mit verschiedensten Erregern bei der Entstehung von Pseudolymphomen nachweislich eine entscheidende Rolle spielen. In dieser Untersuchung konnte bei 17 von 74 Patienten ein Erreger nachgewiesen werden, was eine ätiopathogenetische Relevanz nicht beweist, jedoch nahe legt.

#### **4.2.2 Vergleich mit anderen Studien**

Studien, die sich mit einem kausalen Zusammenhang von Erregern mit dem Auftreten von Pseudolymphomen auseinandersetzen, liegen in erster Linie zu Borrelien und der Lymphadenosis cutis benigna vor (5, 7, 21). Diese zählt zu den B-Zell-Pseudolymphomen und das Borrelien-assoziierte Pseudolymphom wird in der Literatur als das klassische Pseudolymphom der B-Zell-Reihe geführt (5, 26). Bei den hier untersuchten Pseudolymphomen, bei denen in der PCR-Analyse eine Borrelieninfektion nachgewiesen und in der Sequenzanalyse bestätigt werden konnte, lag nur in einem Fall ein B-Zell-Pseudolymphom vor. Bei dem zweiten Pseudolymphom handelt es sich um ein kombiniertes B/T-Zell-Pseudolymphom. *Colli et al.* beschreiben die Borrelieninfektion in endemischen Gebieten als die häufigste Ursache eines B-Zell-Pseudolymphoms (5). Im Einzugsgebiet der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie des Klinikums der Universität München, in der die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten vorstellig wurden, ist mit einer Infektionsrate der endemischen Zecken mit Borrelien von ca. 30% auszugehen, und es

stellt insofern ein Risikogebiet für eine Borrelieninfektion dar. Dennoch konnte nur bei 2/74 Pseudolymphomen (3%) eine Borrelieninfektion als Ursache für das Lymphozyteninfiltrat angesehen werden. Als Prädilektionsstelle für Borrelien-assoziierte Pseudolymphome sind Brustwarzen, Genitalbereich und Ohrläppchen beschrieben (5). Bei einem der Borrelien-positiven Pseudolymphome befand sich die Veränderung im Genitalbereich des Patienten, das andere an der Oberlippe. *Lenormand et al.* und *Ko et al.* definieren die Gattung *B. afzelii* mit 30% als die häufigste Unterart der Borrelien, die ein „borrelial lymphocytoma“ verursacht (19, 21). Die zur Verifizierung durchgeführte Sequenzanalyse wies in beiden Fällen die Borrelienunterart *Borrelia afzelii* nach. *Böer et al.* berichten von einer Kohorte mit 30 Pseudolymphomen, bei denen 17 Mal eine Insektenstichreaktion als die Ursache des Pseudolymphoms vermutet wurde, von fünf Borrelieninfektionen, drei Zusammenhängen mit Medikamenteneinnahme, zwei Manifestationen eines Lupus erythematoses tumidus, einer Herpesvirusinfektion, einer Infektion mit Leishmanien und einer Nebenwirkung einer photodynamischen Therapie (3). Auch sie zeigten die Borrelien-, Leishmanien- und Herpesinfektion über die Polymerasekettenreaktion. Sie schlossen auf einen Anteil von etwa 25% der Pseudolymphome, bei denen eine Erregerbeteiligung wahrscheinlich ist. In der hier untersuchten Kohorte lässt sich dies in 23%, also bei 17 von 74 Patienten annehmen. Neben dem von *Flaig et al.* (9) erstmals beschriebenen und im Rahmen dieser Arbeit bestätigten Leishmanien-assoziierten Pseudolymphom einer 66-jährigen Patientin, das sich immunhistochemisch als kombiniertes B-/T-Zell-Pseudolymphom klassifizieren ließ, berichtet auch *Böer et al.* über ein Pseudolymphom, das nach einer Leishmanieninfektion auftrat (3). *Yavuzer R et al.* erwähnen eine B-Zell-Hyperplasie im Rahmen einer Leishmania cutis (33). Diese Arbeiten bestätigen, dass Leishmanien, wie andere Erreger auch, wenn auch sehr selten, als Ursache eines Pseudolymphoms

angenommen werden können, möglicherweise häufiger als in der Literatur berichtet.

## **5 Zusammenfassung**

Kutane Pseudolymphome entstehen als eine entzündliche Antwort des Immunsystems auf einen meist unbekannten Stimulus und imitieren histologisch und klinisch maligne kutane Lymphome. Ihr variables klinisches Erscheinungsbild reicht von einzelnen derben Knoten bis zu einer Vielzahl an erythematösen Papeln oder Plaques (26). Histologisch unterscheidet man B-Zell-Pseudolymphome, wie das Lymphocytoma cutis benigna, und den inflammatorischen Pseudotumor von T-Zell-Pseudolymphomen, wie den aktinischen Retikuloid, die lymphozytäre Infiltration der Haut Jessner-Kanof und die lymphomatoide Kontaktdermatitis, und kombinierte B- und T-Zell-Pseudolymphome, wie die lymphozytäre Arzneireaktion, bei denen die Prädominanz einer Zellgruppe nicht erkennbar ist. Die Ursache vieler Pseudolymphome gilt als idiopathisch; häufiger beobachtete Ursachen sind Assoziationen zu Medikamenten, Impfungen und Infektionen (27). In dieser Arbeit wurde eine Kohorte von 78 Proben von 74 Patienten, bei denen sich klinisch und histologisch ein Pseudolymphom ergab, mittels Polymerasekettenreaktion auf das Vorhandensein von Borrelien-, Leishmanien-, atypische Mykobakterien-, Merkelzell-Polyomaviren- und Rickettsien-DNA in den Biopsaten untersucht. Positive PCR-Befunde wurden mittels Sanger-Sequenzanalyse bestätigt. Insgesamt konnte bei 17 der 74 Patienten die DNA eines der fünf getesteten Erreger nachgewiesen werden: 10 Fälle mit Nachweis von Merkelzell-Polyomavirus-DNA, 4 Fälle mit atypischer Mykobakterien-DNA, 2 Fälle mit Borrelien-DNA und einmal konnte eine Leishmanieninfektion nachgewiesen werden; Rickettsien-DNA wurde in keinem Fall nachgewiesen. Die wesentlichen klinischen, histomorphologischen und molekularen Parameter und Ergebnisse der positiv getesteten Patienten sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

	<b>MCV</b>	<b>Mykobakt.</b>	<b>Borrelien</b>	<b>Leishmanien</b>
<b>Gesamt +</b>	10/74 (13%)	4/74 (5%)	2/74 (3%)	1/74 (1,3%)
<b>Lokalisation</b>				
Kopf/Hals	3 (4%)	3 (4%)	1 (1,3%)	1 (1,3%)
Stamm	3 (4%)	0	1 (1,3%)	0
Extremitäten	4 (5%)	1 (1,3%)	0	0
<b>Geschlecht</b>				
W	2 (2,7%)	2 (2,7%)	1 (1,3%)	1 (1,3%)
M	8 (11%)	2 (2,7%)	1 (1,3%)	0
<b>Alter</b>				
<40 J	0	0	1 (1,3%) (8 J. !)	0
>40 J	10 (13%)	4 (100%)	1 (1,3%)	1 (1,3%)
<b>Infiltratyp</b>				
Reak.	7 (9,5%)	0	1 (1,3%)	0
Atyp.	2 (2,7%)	3 (4%)	1 (1,3%)	0
Nnk.	1 (1,3%)	1 (1,3%)	0	1 (1,3%)
<b>Immunphänotyp</b>				
B-Zell-	1 (1,3%)	0	0	0
T-Zell-	1 (1,3%)	1 (1,3%)	0	0
B/T-Zell-	8 (11%)	2 (2,7%)	2 (2,7%)	1 (1,3%)

*Tab. 27: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse*

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich in dieser Arbeit die PCR als wichtige Untersuchungsmethode in der differentialdiagnostischen Abklärung von kutanen Pseudolymphomen bestätigte, einerseits als Hilfsmittel in der Abgrenzung zu „echten“ malignen Lymphomen der Haut, andererseits als sensitive Methode zum Nachweis verschiedener potentiell das Pseudolymphom verursachender Erreger. Die in der Literatur beschriebenen Assoziationen von Borrelien (5, 7, 21) und Leishmanien (3, 9,

33) mit der Entstehung eines Pseudolymphoms konnten bestätigt und an einer hohen Fallzahl quantifiziert werden.

Hinweise für eine ätiopathologische Bedeutung von Rickettsien bei der Entstehung kutaner Pseudolymphome konnten im untersuchten Kollektiv nicht gefunden werden.

Viermal (5%, 4/74) konnte DNA atypischer Mykobakterien und zehnmal (13%, 10/74) Merkelzell-Polyomavirus-DNA nachgewiesen werden. Die pathogenetische Relevanz dieser Ergebnisse ist unklar.

Die Ergebnisse bestätigen, dass verschiedenste Erreger eine Rolle bei der Entstehung eines Pseudolymphoms spielen können. In der Literatur wird von einem Anteil von etwa 25% (3) berichtet, und die gleiche Größenordnung ergab sich auch in der vorliegenden Arbeit, bei der bei 23% der Fälle ein Nachweis von Erreger-DNA gelang.

## **6 Literaturverzeichnis**

- (1)** Agilent DNA1000 KitGuide, Agilent Technologies Deutschland GmbH 2000, 2000-2006
- (2)** Andres C, Belloni B, Puchta U, Sander CA, Flaig MJ (2009) Prevalence of MCPyV in Merkel cell carcinoma and non-MCC tumors. *J Cutan Pathol* 2009
- (3)** Böer A, Tirumalae R, Bresch M, Falk TM (2008) Pseudoclonality in cutaneous pseudolymphomas: a pitfall in interpretation of rearrangement studies. *British Journal of Dermatology* 2008; 159: 394-402
- (4)** Cerroni L, Kerl H (1999) Diagnostic Immunohistology: Cutaneous Lymphomas and Pseudolymphomas. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, Vol 18, No 1 (March) 1999: 64-70
- (5)** Colli C, Leinweber B, Müllegger R, Chott A, Kerl H, Cerroni L (2003) Borrelia burgdorferi-associated lymphocytoma cutis: clinicopathologic, immunophenotypic, and molecular study of 106 cases. *J Cutan Pathol* 2004; 31: 232-240
- (6)** Dobler G, Wölfe R (2009) Typhus and Other Rickettsioses – Emerging Infections in Germany. *Dt. Ärztebl. Int* 2009; 106(20): 348-354
- (7)** Eisendle K, Zelger B (2009) The expanding spectrum of cutaneous borreliosis. *G Ital Dermatol Venerol.* 2009 Apr; 144(2): 157-71
- (8)** Flaig MJ, Puchta U, Sander CA (2007) Immunhistochemische und molekularpathologische Untersuchungen in der Dermatohistologie. *Der Hautarzt* 2007; 9: 753-759
- (9)** Flaig MJ, Rupec RA (2007) Cutaneous pseudolymphoma in association with *Leishmania donovani*. *British Journal of Dermatology* 2007; 157: 1040-1085
- (10)** Flaig MJ, Schuhmann K, Sander CA (2000) Impact of Molecular Analysis in the Diagnosis of Cutaneous Lymphoid Infiltrates. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, Vol 19, No 2 (June), 2000: 87-90
- (11)** Fukamachi S, Kimura T, Kobayashi M, Hino R, Nakamura M, Tokura Y. (2010) Palmar pseudolymphoma associated with herpes simplex infection, *J Cutan Pathol.* 2010 Jul; 37(7): 808-11 (Epub 2009 Jul 14)
- (12)** Gerok, Huber, Meinertz, Zeidler (2007), Die Innere Medizin. Referenzwerk für den Facharzt. 2002: 11. Auflage: 428

- (13)** Hahn, Kaufmann, Schulz, Suerbaum (2008), Med. Mikrobiologie und Infektiologie. 2008: 6. Auflage : 384/650
- (14)** Holm N, Flaig MJ, Yazdi AS, Sander CA (2002) The value of molecular analysis by PCR in the diagnosis of cutaneous lymphocytic infiltrates. J Cutan. Pathol. 2002: 29: 447-452
- (15)** Huppertz HI, Böhme M, Standaert SM, Karch H, Plotkin SA (1999) Incidence of Lyme borreliosis in the Würzburg region of Germany. Eur J Clin Microbiol Infect Diss 1999: 18: 697-703
- (16)** JessnerM, Kanof B. (1953) Lymphocytic infiltration of the skin. Arch Dermatol. 1953: 68: 447-449
- (17)** Kempf, Handschke, Kutzner (2007), Dermatopathologie, 2007: Kapitel 2.6.5
- (18)** Kirschner F (2008) Die Behandlung kutaner T-Zell-Lymphome unter besonderer Berücksichtigung der PUVA-Therapie – retrospektive Analyse der Lymphomsprechstunde der Universitäts-Hautklinik Münster. Dissertation. Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- (19)** Ko CJ, Meyerle JH, Glusac EJ (2008) Pseudolymphoma, Cutaneous. eMedicine Dermatology: <http://emedicine.medscape.com/article/1099188-print>
- (20)** Lee MW, Lee DK, Choi JH, Moon KC, Koh JK (2005) Clinicopathologic study of cutaneous pseudolymphomas. J Dermatol. 2005 Jul: 32 (7): 594-601
- (21)** Lenormand C, Jaulhac B, De Martino S, Barthel C , Lipsker D (2008) Species of *Borrelia burgdorferi* complex that cause borrelial lymphocytoma in France. British Journal of Dermatology 2009: 161: 174-176
- (22)** Mitani N, Nagatani T, Ikezawa Z, Kakemizu N, Yamakawa Y, Aihara M, Nozawa A, Tomita N, Tanaka K (2006) A Case of Cutaneous T Cell Pseudolymphoma in a Patient with *Helicobacter pylori* Infection. Dermatology 2006: 213: 156-158
- (23)** Moon HS, Park K, Lee JH, Son SJ (2009) A Nodular Syphilid Presenting as a Pseudolymphoma: Mimicking a Cutaneous Marginal Zone B-Cell Lymphoma. Am J Dermatopathol. 2009: Sep 24
- (24)** Nau R, Christen HJ, Eiffert H (2009) Lyme Disease – Current State of Knowledge. Dt. Ärztebl. Int 2009: 106(5): 72-82

- (25)** Nervi SJ, Schwartz RA (2008) Plasma-cell-predominant B-cell pseudolymphoma. Dermatol Online J. 2008: Okt 14
- (26)** Sander CA Pseudolymphome; aus Braun-Falco,Plewig, Wolff, Burgdorf, Landthaler (2005) Dermatologie Venerologie. 5. Auflage. Berlin: Springer Verlag : 1361-1365
- (27)** Sander CA, Flaig MJ Pseudolymphome; aus Kerl, Garbe, Cerroni, Wolff (2003) Histopathologie der Haut. 1. Auflage. Berlin: Springer Verlag: 855-868
- (28)** Signoretti S, Murphy M, Cangi MG et al. Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements in paraffin-embedded tissue by polymerase chain reaction and non radioactive single-stand conformational polymorphism analysis. Am J Pathol 1999: 154: 67
- (29)** Thomas, Carlos, Atlas der Infektionskrankheiten, Schattauer Verlag, 2010: 97ff
- (30)** Werner B, Massone C, Kerl H, Cerroni L (2008) Large CD30-positive cells in benign atypical lymphoid infiltrates of the skin. J Cutan Pathol 2008: 35: 1100-1107
- (31)** Wieland U, Mauch C, Kreuter A, Krieg T, Pfister H (2009) Merkel Cell Polyomavirus DNA in Persons without Merkel Cell Carcinoma. Emerging Infectious Diseases 2009: Vol 15, No. 9
- (32)** Wölfel R, Essbauer S, Dobler G (2007) Diagnostics of tick-borne rickettsioses in Germany: A modern concept for a neglected disease. International Journal of Medical Microbiology 298 (2008): S1: 368-374
- (33)** Yavuzer R, Akyürek N, Ozmen S, Demirtas Y, Ataoglu O (2001) Leishmania cutis with B-cell cutaneous hyperplasia. Plast Reconstr Surg. 2001 Dec: 108 (7): 2177-8
- (34)** Ziemer M, Eisendle K, Müller H, Zelger B (2009) Lymphocytic infiltration of the skin (Jessner-Kanof) but not reticular erythematous mucinosis occasionally represents clinical manifestations of Borrelia-associated pseudolymphoma. British Journal of Dermatology 2009: 161: 583-590

## **7 Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: B-Zell-Pseudolymphome.....	10
Tab. 2: T-Zell-Pseudolymphome .....	11
Tab. 3: Medikamente, die in Zusammenhang mit dem Auftreten von Pseudolymphomen stehen können .....	12
Tab. 4: B-/T-Zell-Pseudolymphome .....	13
Tab. 5: Unterscheidungskriterien zwischen malignen Lymphomen und Pseudolymphomen.....	15
Tab. 6: Programmierung des Thermalcyclers .....	22
Tab. 7: zur PCR verwendete Materialien .....	23
Tab. 8: Menge der für den Mastermix verwendeten Reagenzien.....	24
Tab. 9: Verwendete Materialien zur Auswertung am Bioanalyzer .....	26
Tab. 10: Verwendete Materialien zur Auswertung des PCR-Ergebnisses mittels Gelelektrophorese .....	29
Tab. 11: Alter des Patientenkollektivs.....	30
Tab. 12: Geschlechtsverteilung Patientenkollektiv.....	31
Tab. 13: Lokalisation der Pseudolymphome im Patientenkollektiv.....	31
Tab. 14: Infiltratyp der untersuchten Pseudolymphome .....	32
Tab. 15: Ergebnisse des beta-Globin-Tests .....	33
Tab. 16: Prozentuale Verteilung der positiven Ergebnisse hinsichtlich der unterschiedlichen Erreger.....	33
Tab. 17: Verteilung der MCV-positiven Fälle nach Geschlecht und Alter ..	34
Tab. 18: Verteilung der MCV-positiven Fälle nach Lokalisation und Infiltratyp .....	35

Tab. 19: Verteilung der MCV-positiven Fälle nach Immunhistologie und Molekularbiologie.....	37
Tab. 20: Verteilung der Hsp65-positiven Fälle nach Geschlecht und Alter	38
Tab. 21: Verteilung der Hsp65-positiven Fälle nach Lokalisation und Infiltratyp .....	38
Tab. 22: Verteilung der 4 Hsp65-positiven Fälle nach Immunhistologie und Molekularbiologie.....	40
Tab. 23: Verteilung der Borrelia burgdorferi-positiven Fälle nach Geschlecht und Alter .....	41
Tab. 24: Verteilung der Borrelia burgdorferi-positiven Fälle nach Lokalisation und Infiltratyp .....	42
Tab. 25: Verteilung der Borrelia burgdorferi-positiven Fälle nach der Immunhistologie .....	43
Tab. 26: Charakteristika des Leishmania-positiven Pseudolymphoms .....	44
Tab. 27: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse.....	57

## **8 Abkürzungsverzeichnis**

atyp.	atypisch
B.	Borrelia
BCL 2/6	B-Cell Lymphoma 2/6 protein
BestNr.	Bestellnummer
Borr	Borrelien
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
et al.	et alii
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H <sub>2</sub> O	Wasser
Hsp	heat shock protein
HSV	Herpes-simplex-Virus
Ig	Immunglobulin
J	Jahre
Leish	Leishmanien

LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Lokal.	Lokalisation
M	männlich
MB	mature human B-cell antigen
MCV	Merkelzell-Polyomavirus
min	Minute(n)
Mg	Magnesium
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimol
µM	Mikromol
MOTT	mycobacteria other than tuberculosis
nnk	nicht näher klassifiziert
PCR	polymerase chain reaction
R.	Rickettsia
reakt.	reakтив
Rick	Rickettsien
rpm	rounds per minute
sec	Sekunde(n)
SFG	spotted fever group
TBE	Trishydroxymethylaminomethan-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure
TZR	T-Zell-Rezeptor

U/ml	Units per milliliter
UV	ultraviolett
V	Volt
W	weiblich
WHO	World Health Organisation

### Zeichenerklärung

> größer als

< kleiner als

## **9 Danksagung**

Diese Dissertation wurde an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Hiermit möchte ich allen danken, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Michael Flajig, insbesondere für die Bereitstellung des Themas und für die bereitwillige Hilfestellung bei der Abfassung der Schrift.

Ein weiterer Dank geht an meinen Betreuer Herrn PD Dr. Christian Andres und an Frau Ursula Puchta denen kein Weg zu weit und keine Erläuterung meiner Fragen zu viel gewesen ist und die mir insbesondere während des praktischen Teils dieser Arbeit jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Insbesondere gilt mein Dank auch meinen Eltern, die mir dieses Studium überhaupt ermöglicht haben und mein Vater der mich nicht zuletzt fortlaufend ermunterte, diese Doktorarbeit fertigzustellen.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*Experimentelle Untersuchung von kutanen Pseudolymphomen hinsichtlich eines kausalen Zusammenhangs mit Infektionen durch atypische Mykobakterien, Borrelien, Leishmanien, Merkelzell-Polyomaviren und Rickettsien*

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ansbach,

Eva Felber