

Aus dem  
Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. T. Kirchner

**Kombination von Y-FISH und Immunfluoreszenz  
zum Nachweis eines „lymphoendothelialen“ Chimärismus in  
Sinuswandzellen von Lymphknoten  
nach gegengeschlechtlicher Knochenmarktransplantation**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Olaf Bahlmann  
aus  
Hannover  
2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Huss
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. P. Kufer Prof. Dr. Th. Heinzeller
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. G. Babaryka
Dekan:	Prof. Dr. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	29.11.2007

INHALTSVERZEICHNIS

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... iv**

**1 EINLEITUNG ..... 1**

**2 GRUNDLAGEN..... 2**

**2.1 Sinuswandzellen ..... 2**

Sinuswandzellen der Rand-, Intermediär- und Marksinus..... 4

Struktur der Sinuswand..... 4

Histogenese, Funktion und Regeneration der SWZ..... 5

Darstellung der SWZ ..... 8

**2.2 Lymphknoten nach SZT..... 10**

Lymphatische Depletion nach Konditionierung ..... 10

Lymphknotenregeneration nach SZT ..... 11

GvHR/GvHD und Behandlung ..... 14

**3 ZIEL DER ARBEIT ..... 16**

**4 MATERIAL UND METHODEN ..... 18**

**4.1 Untersuchungsmaterial ..... 18**

Autoptisch gewonnene Lymphknoten ..... 18

Bioptisch gewonnene Lymphknoten..... 20

**4.2 Untersuchungsmethoden..... 24**

Einzelfärbungen ..... 24

Doppelfärbung ..... 27

Laborprotokolle..... 29

Antikörper, Lösungen und Reagenzien und Gerätschaften ..... 34

**4.3 Auswertung..... 37**

Einzelfärbungen ..... 37

Doppelfärbung ..... 37

**5 ERGEBNISSE ..... 38**

**5.1 Histopathologischer Befund..... 38**

Autoptisch gewonnene Lymphknoten ..... 38

Bioptisch gewonnene Lymphknoten..... 39

**5.2 Nachweis von SWZ ..... 39**

Autoptisch gewonnene Lymphknoten ..... 40

Bioptisch gewonnene Lymphknoten..... 41

**5.3 Nachweis eines Chimärismus..... 42**

---

	Autoptisch gewonnene Lymphknoten .....	42
	Bioptisch gewonnene Lymphknoten.....	43
<b>5.4</b>	<b>Die einzelnen Lymphknotenpräparate .....</b>	<b>43</b>
	Autoptisch gewonnene Lymphknoten .....	43
	Bioptisch gewonnene Lymphknoten.....	46
<b>5.5</b>	<b>Konditionierung, Transplantation und Verlauf.....</b>	<b>47</b>
<b>5.6</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>82</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>83</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

FDZ	Follikuläre dendritische Zellen
FISH	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung
FRZ	Fibroblastäre Retikulumzellen
GvHR	Graft-versus-Host-Reaktion (Transplantat-Wirt-Reaktion)
GvHD	Graft-versus-Host-Disease (Transplantat-Wirt-Erkrankung)
IDR	Interdigitierende Retikulumzellen
IF	Immunfluoreszenz
IH	Immunhistologie
KMT	Knochenmarktransplantation
PBSZT	Periphere Blutstammzelltransplantation
SWZ	Sinuswandzellen
SZT	Stammzelltransplantation
Y-FISH	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung des Y-Chromosoms

## 1 Einleitung

Chimärismus bezeichnet in der Medizin u.a. das Vorhandensein von allogenen Spenderzellen im Organismus des Empfängers (1,3). Eine Chimäre ist in der griechischen Mythologie ein Wesen mit drei Köpfen: mit dem Haupt eines Löwen, mit dem Kopf einer Ziege im Nacken, und dem einer Schlange bzw. eines Drachen als Schwanz (34).

Der Nachweis eines Chimärismus nach allogener Stammzelltransplantation (SZT) ist klinischer Standard, z.B. um ein Rezidiv der Grunderkrankung, z.B. Leukämie, vorhersagen zu können (1,3) und ist natürlich auch von wissenschaftlichem Interesse, z.B. um Erkenntnisse über den Einfluss eines Chimärismus in dendritischen Zellen auf das Auftreten einer GvHD zu gewinnen. So hat Boeck in seiner Dissertation aus dem Jahre 2005 einen Chimärismus dendritischer Zellen im peripheren Blut bei Patienten nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation nachgewiesen (9,8) und diskutiert, dass „ein gemischter Chimärismus dendritischer Zellen im peripheren Blut möglicherweise mit einer erhöhten GvHD-Inzidenz vergesellschaftet ist“ (9, S. 67).

Zu den ortsständigen dendritischen Zellen der verschiedenen Gewebe existieren bisher recht wenige Studien, in Langerhans-Zellen konnte Wochen bis Monate nach allogener, humaner Knochenmarktransplantation (KMT) ein unterschiedlich ausgeprägter Chimärismus nachgewiesen werden (39,45). Zu den dendritischen Zellen in Lymphknoten existieren bisher nur wenige Studien und nach unserer Kenntnis sind die Sinuswandzellen (SWZ) der Lymphknoten, die Wacker Mitte der Neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts als dendritische, immunakzessorische Zellen der Lymphknoten charakterisierte (96), auf einen Chimärismus nach allogener SZT hin bislang nicht untersucht worden.

## 2 Grundlagen

### Sinuswandzellen

Die Rinde und das Mark der Lymphknoten werden von den Lymphsinus durchzogen. Die afferenten Lymphgefäße treten durch die Lymphknotenkapsel hindurch und münden in den Randsinus, dieser steht mit den radiär angeordneten Intermediärsinus in Verbindung. Die Intermediärsinus setzen sich wiederum in die zentralen Marksinus fort, die dann in einen kleinen lymphatischen Plexus münden, von dem der Abfluss in das efferente Lymphgefäß entspringt (siehe Abb. 1) (31,57,96).

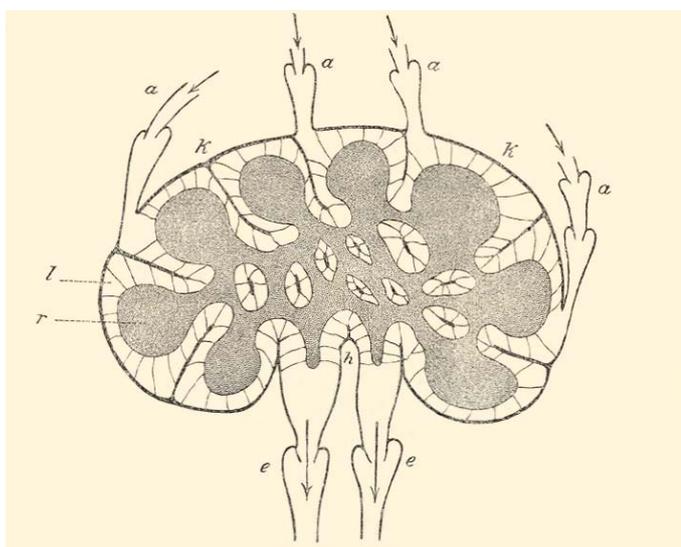


Abbildung 1: Lymphgefäße und Lymphsinus eines Lymphknotens. Afferente Lymphgefäße penetrieren die Kapsel und münden in den Randsinus. Über kortikale Intermediär- und zentrale Marksinus erreicht die Lymphe das efferente Lymphgefäß. Daneben betreten bzw. verlassen arterielle und venöse Gefäße den Hilus des Lymphknotens (Abbildung entnommen aus Lit. 26, S. 693).

Die Ultrastruktur der Lymphsinus ist nur im Elektronenmikroskop zu erkennen (96). Die Sinuswand besteht dabei – von innen nach außen – aus einer einschichtigen Zelllage aus Sinuswandzellen (SWZ), darunter einem Spaltraum aus kollagenen Faserbündeln, dem eine Lage retikulärer Zellen unterliegt (14,63).

Die Lymphsinus sind von einem Maschenwerk aus retikulären Fasern durchzogen und intraluminal gelegene SWZ folgen den retikulären Faserbündeln mit Ausläufern ihrer Zellmembranen, und stehen so mit den wandständigen SWZ in Verbindung

(siehe Abb. 2) (15,96,97,98). Die weniger als 10  $\mu\text{m}$  breiten SWZ sind untereinander mit drei bis vier, bis zu 100  $\mu\text{m}$  langen Zellausläufern über Desmosomen verbunden (96). Sie weisen einen oval-eckigen Zellkern mit hellem Euchromatin auf, dadurch sind sie von den teils dicht anliegenden Makrophagen und Lymphozyten zu unterscheiden (siehe Abb. 3) (96,97).

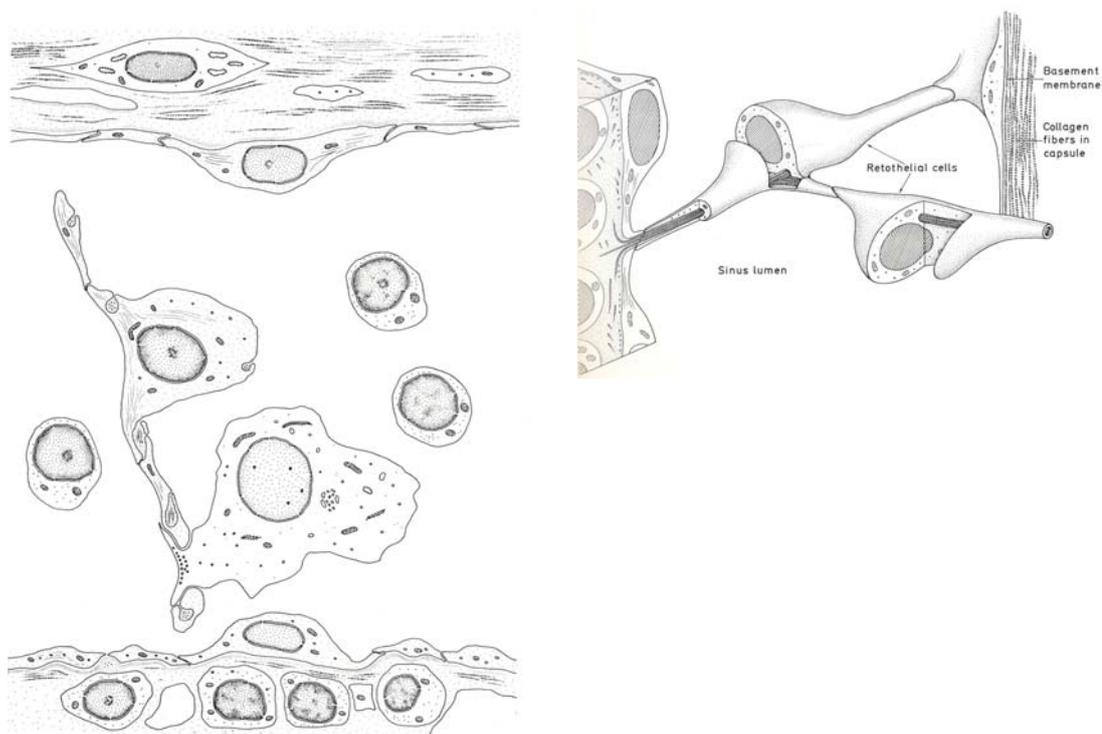


Abbildung 2: Aufbau des Randsinus eines Lymphknotens. Der Randsinus ist durch eine Lage SWZ ausgekleidet, die einer basalmembranähnlichen Schicht aus retikulären Fasern aufliegt. Retikuläre Fasern durchziehen maschenwerkartig das Sinuslumen und werden dabei von SWZ umschieden. Die intraluminale SWZ stehen mit den wandständigen SWZ in Verbindung. Im Sinuslumen werden neben den SWZ mononukleäre Entzündungszellen in der Lymphe angetroffen (entnommen aus Lit. 64, S. 18 u. 19).

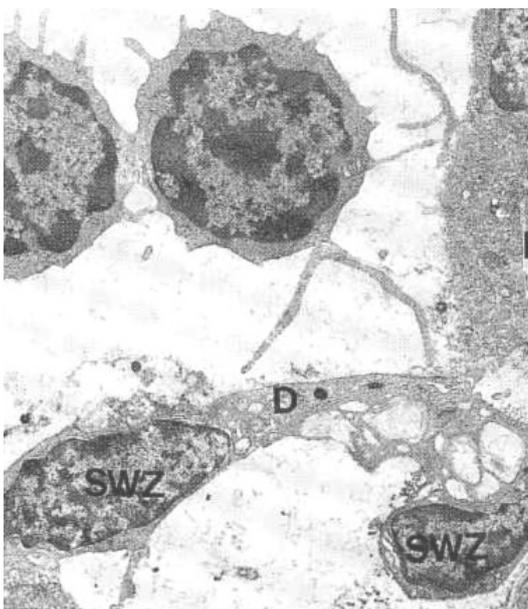


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Darstellung von SWZ. SWZ sind mit ihren ovalären Zellkernen und dem langgezogenen Zelleib von Lymphozyten innerhalb der Lymphsinus zu unterscheiden (entnommen aus Lit. 96, S. 60).

### **Sinuswandzellen der Rand-, Intermediär- und Marksinus**

In ihrer Grundstruktur unterscheiden sich die SWZ der Rand-, Intermediär- und Marksinus nicht, einzelne Merkmale sind in ihnen jedoch unterschiedlich ausgeprägt. So besteht die Zelllage im Randsinus unter der Lymphknotenkapsel aus langgezogenen, flachen SWZ, die restlichen Sinusabschnitte sind dagegen durch organellenreichere SWZ mit breiterem Zytoplasma ausgekleidet (64,96).

### **Struktur der Sinuswand**

Die subkapsuläre Lage von SWZ im Randsinus ist kontinuierlich, d.h. lückenlos. In den restlichen Sinusabschnitten ist die Sinuswand „gefenstert“, analog den „gefensterten“ Kapillaren des Blutkreislaufs, und kernhaltige Blutzellen durchtreten hier die Sinuswand (14,18,31,32,63,69,81), indem sie die SWZ entweder durchwandern (Emperipoese) (29) oder durch Lücken zwischen den SWZ in die Lymphsinus übertreten (Diapedese). Zudem können Makrophagen oder

Makrophagen-Aggregate eingelagert in die Wand der Lymphsinus, auch als ortsständige Zellen, beobachtet werden (15,29).

### **Histogenese, Funktion und Regeneration der SWZ**

Zur Histogenese der SWZ gibt es eine Reihe von Untersuchungen und Konzepten (siehe Abb. 4), ihre Herkunft ist aber bisher nicht abschließend geklärt. Die verschiedenen Bezeichnungen der Sinuswandzellen, u.a. als Retothelzellen (nach Mori und Lennert (64) die die Sinus auskleidenden und durchkreuzenden Zellen) oder Reticuloendothelzellen sind aus den unterschiedlichen histogenetischen und funktionellen Konzepten hervorgegangen und haben heute historischen Charakter.

### **SWZ und Makrophagen**

Verschiedene Arbeiten haben sich mit der Filterfunktion der Lymphknoten, ihrem zellulären Substrat und ihren Mechanismen, befasst. Ein „Klassiker“ dieser Literatur ist die Untersuchung von L. Aschoff (1866-1942) aus dem Jahr 1924, in der er aufgrund der Fähigkeit zur Phagozytose bzw. zur Aufnahme feindisperser Farbstoffe (sogenannte Vitalfärbung) eine Gruppe mesenchymaler Zellen, u.a. die „Reticuloendothelien der Lymphsinus der Lymphknoten“, als „reticuloendotheliales System“ zusammenfasst (2). Sie seien transitionelle Endothelzellen, die sich abrundeten und ablösten und damit freie Makrophagen würden (37,89). Andere Untersucher haben SWZ von Makrophagen abgegrenzt, da SWZ makrophagenspezifische Merkmale (endogene Peroxidase, Phagosomen) vermissen ließen und sich beide Zelltypen phänotypisch unterschieden (81,96).

### **Retikulumzellen/Reticulo-endotheliales System**

Verschiedenen embryologischen, histomorphologischen und funktionellen Untersuchungen zufolge stammen SWZ von Retikulumzellen ab, diese beiden Zelltypen bilden das innere Gerüst der Lymphknoten (18). 1922 hat Downey die sich entwickelnden Lymphsinus als schlitzförmige Räume im lokalen Mesenchym beschrieben, diese seien durch abgeflachte und lang gestreckte Retikulumzellen des umgebenden Mesenchyms ausgekleidet (23). Dementsprechend wären SWZ

gleichfalls mesenchymale Zellen(18). Lichtmikroskopisch sind Retikulumzellen von SWZ nicht unterscheidbar und „es erschien [L. Aschoff] wünschenswert [diese Zelltypen] wegen ihrer gleichartigen Funktion als Reticularbildner und Bekleider sinusoidaler Lymph- und Bluträume unter einem Begriff, nämlich dem reticulo-endothelialen System zusammenzufassen“ (2, S. 38). Ultrastrukturell weisen SWZ tatsächlich Ähnlichkeiten mit den sogenannten fibroblastären Retikulumzellen (FRZ) auf und FRZ scheinen sich in SWZ umwandeln zu können. SWZ stellen demnach in luminaler Position gewechselte FRZ dar (17,18,51).

### **SWZ und Endothelzellen**

Die Zuordnung von SWZ zu lymphatischen Endothelien ist nahe liegend, ähnelt die Wandung der Lymphsinus doch der kapillärer Blutgefäße oder Venulen (97). Aufgrund gemeinsamer funktioneller Merkmale (geringe phagozytotische Aktivität) betrachtet Nopajaroonsri die SWZ als lymphatische Endothelzellen (69,70). Nach embryologischen Studien an humanen und murinen Feten entwickeln sich die Lymphsinus der Lymphknoten an der Stelle primitiver Lymphgefäße, die die Lymphsinus auskleidenden SWZ stammten daher von den lymphatischen Gefäßendothelien der präexistenten Lymphgefäße ab (6,79,81). Dabei gibt es Hinweise auf einen Chimärismus nach SZT im klassischen vaskulären (5,4) als auch im lymphatischen Gefäßendothel (52).

### **SWZ und dendritische Zellen**

Neuere Arbeiten haben die SWZ in Beziehung zu dendritischen Zellen, speziell den folliculären dendritischen Zellen (FDZ) gesetzt. Dieses Konzept basiert auf morphologischen und immunphänotypischen Untersuchungen der Lymphknoten. Immunisierungsversuche sind der die dendritischen Zellen definierenden immunakzessorischen Funktion nachgegangen: In Versuchstiere injiziertes und über die Lymphe anflutendes Antigen ist zunächst im Randsinus angetroffen und im Verlauf von Stunden zusätzlich in den Zentren der Lymphfollikel nachgewiesen worden. Ultrastrukturell hat Szakal dabei nicht-phagozytierende, dendritische Zellen als Antigen-transportierende Zellen (ATZ) beschrieben und angenommen, dass diese

ATZ bei der Migration entweder in FDZ ausreifen oder mit FDZ in engem Kontakt stehen und Antigen an die FDZ weitergeben (90). In Analogie dazu betrachtet Wacker die SWZ im Randsinus als Antigen-bindende Zellen (96). SWZ treten in sich entwickelnden, embryonalen Lymphknoten vor FDZ in Erscheinung, nach Wacker bekräftigt dies die Hypothese einer Transition von SWZ in FDZ (96). Daneben bestehen immunphänotypische Gemeinsamkeiten. Beide Zelltypen exprimieren die hoch restriktiven Oberflächen-Antigene Ki-M4 und Ki-M9 und besitzen charakteristische Merkmale immunakzessorischer Zellen, wie Human Leukocyte Antigen (HLA-)DR des Major Histocompatibility Complex (MHC) II (97,98). IL-6 (Interleukin -6) mRNA ist in SWZ nachzuweisen, und IL-6 ist beispielsweise essentiell für die Plasmazellreifung (75).

Um den postulierten monozytären Ursprung der SWZ zu überprüfen, hat Wacker „die Ableitung von SWZ aus Monozyten durch Parabioseversuch“ beschrieben. Dabei hat er nach Kreislaufshunt zwischen Spendertieren mit markierten peripheren Blutzellen und Empfängertieren in den entnommenen Empfängerlymphknoten vereinzelt Ki-M9-positive SWZ beobachtet, der Prozentsatz markierter SWZ hat dabei weit unter 1‰ gelegen und die Regenerationszeit der SWZ 72 Stunden betragen (in diesem Zeitraum werden 50% der gesamten Population der SWZ erneuert). Vermutlich rekrutierten sich also SWZ „heteroplastisch aus Vorstufen, die nicht als SWZ zu erkennen sind“ (96, S. 191) und stellten „eine eigenständige, terminale Differenzierungsform wahrscheinlich der Monozyten“ (96, S. 192) dar. Zusammenfassend werden SWZ als Antigen-transportierende, immunakzessorische Zellen der humoralen (B-Lymphozyten vermittelten) Immunreaktion klassifiziert und histogenetisch als intermediärer Zelltyp zwischen monozytären Zellen und FDZ eingeordnet (25,90,97,98).

Der Ursprung der den SWZ verwandten FDZ ist ebenfalls noch nicht abschließend geklärt. Verschiedene Untersuchungen haben auf einen Ursprung der FDZ im Knochenmark hingewiesen (36,73,74,91). Szakal hat nach SZT in FDZ-defizienten Mäusen chimäre FDZ gefunden und hat dies als Hinweis für eine hämatopoetische Abstammung der FDZ gewertet (91). Tatsächlich haben sich *in vitro* aus Monozyten

FDZ-ähnliche Zellen züchten lassen (38). Haley hat zudem potentielle Vorläuferzellen der FDZ im Knochenmark beschrieben, die morphologisch Stromazellen ähneln und stellt einen mesenchymalen Ursprung zur Diskussion (91). Im Gegensatz zu diesen Arbeiten hat Humphrey einen negativen Chimärimus in FDZ nach Bestrahlung und SZT als Argument gegen einen Ursprung aus dem Knochenmark angeführt (44). In Analogie zur Histogenese der SWZ haben daher verschiedene Autoren eine ortsständige Retikulumzelle als Vorläuferzelle der FDZ betrachtet (21).

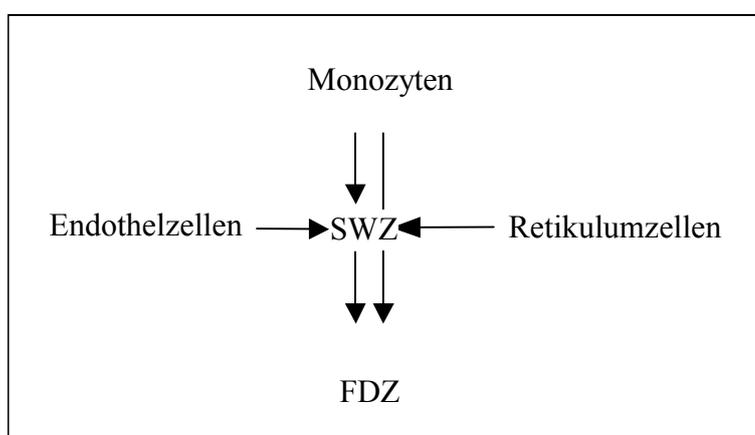


Abbildung 4: Unterschiedliche Konzepte zur Histogenese der SWZ. SWZ sollen von Blutmonozyten, oder Endothelzellen oder mesenchymalen Stromazellen der Lymphknoten abstammen. Sie werden als Zwischenstadium in der Differenzierung von Monozyten in FDZ angesehen.

Die Funktion der SWZ ist dabei wiederum noch nicht abschließend geklärt. Möglicherweise sind die SWZ aktiv an der Zellmigration an der Lymph-Parenchym-Grenze beteiligt. So wird der Chemokin-Rezeptor D6 auf SWZ exprimiert, Chemokine (chemotaktische Zytokine) sollen an den Zellbewegungen von Lymphozyten beteiligt sein (67).

### **Darstellung der SWZ**

SWZ sind lichtmikroskopisch nur unzureichend abgrenzbar. Die Darstellung der Zellen der luminalen Sinuswand erfolgt durch die Aufnahme feindisperser Partikel wie Ferritin (15), enzymhistochemisch durch eine (schwache) positive Reaktion für

die saure Esterase und Phosphatase (19,96) und mit Lectinen (25). Immunhistochemisch werden die SWZ mit gegen das Antigen Ki-M9 generierten Antikörpern markiert, daneben in geringerem Ausmaß die FDZ in den Lymphknotenfollikeln (96). Eine Darstellung der Lymphsinus ist außerdem mit Lymphendothelmarkern zu erreichen. Seit neuerem sind Marker für die selektive Darstellung lymphatischer Endothelien bekannt: der Tyrosinkinase-Rezeptor VEGFR-3 (47), Podoplanin, ein in glomerulären Podozyten vorkommendes Membranprotein (10,11), Hyaluronan-Rezeptor 1 (LYVE-1) (7), Prospero-related homebox 1 (Prox 1) (72) und der Antikörper D2-40 (46,48).

### **Lymphatischer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor**

Der lymphatische endotheliale Wachstumsfaktor Rezeptor (Vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR-3) wird laut embryologischen Studien nach Abschluss der fetalen Organogenese nur noch in lymphatischem Endothel exprimiert. In Lymphknoten markieren VEGFR-3-Antikörper SWZ als auch das Blutgefäßendothel der hochendothelialen Venulen (HEV) (47,72). VEGFR-3 wird auch in der Neoangiogenese von Tumoren und in vaskulären Neoplasien gefunden (60,71,72,99). Einige periphere Blutzellen exprimieren sowohl den hämatopoetischen Stammzellmarker CD34 als auch VEGFR-3 und werden daher als Vorläuferzellen lymphatischer Endothelzellen angesehen (84). Über Schwierigkeiten in der Anwendung kommerziell erhältlicher VEGFR-3-Antikörper an Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebetteten Gewebe mit unbefriedigenden Färberegebnissen ist berichtet worden (87).

### **Podoplanin**

Namensgebend für dieses Membranmukoprotein noch weithin unbekannter biologischer Funktion ist seine Erstbeschreibung in der Zellmembran der Podozyten der Niere (10,62).

Durch die komplementäre immunhistochemische Färbereaktion von VEGFR-3 und etablierten Blutgefäßmarkern (PAL-E u. a.) kann die spezifische Expression von Podoplanin in normalen Lymphendothelien und lymphatischen Neoplasien

nachgewiesen werden. VEGFR-3 und Podoplanin zeigen dabei eine Kollokalisierung in lymphatischen Endothelien (11,27,35,40,56). Lymphatisches Endothel mit einer Lage aus Endothelzellen wird durch den Antikörper erfasst, größere Lymphgefäße mit glatten Muskelzellen in der Gefäßwand sind Podoplanin-negativ. Ultrastrukturell ist die Reaktion auf der luminalen Seite am kräftigsten, in geringerer Intensität färbt sich die abluminale Plasmamembran und intrazytoplasmatisch wird keine Färbung registriert (86).

In Lymphknoten markieren Podoplanin-Antikörper die SWZ der Lymphknotensinus als auch die FDZ und kleine hiläre Lymphgefäße, erfassen aber weder die hochendothelialen Venulen (HEV) noch größere Lymphknotengefäße (10,11). Auch die Sinusendothelien der Leber-, Milz- und der Knochenmarkssinus sind Podoplanin-negativ (11,48,85,86).

## **2.1 Lymphknoten nach SZT**

### **Lymphatische Depletion nach Konditionierung**

Die Konditionierung vor SZT umfasst eine Bestrahlung und Chemotherapie, meist in Kombination und zeigt je nach Gewebetyp und Dosis unterschiedliche Wirkung (20). Im lymphoretikulären Gewebe zerstört die Bestrahlung die relativ radiosensitiven Lymphozyten, das relativ radioresistente Retikulum hingegen bleibt als lymphatisch depletiertes Skelett der Lymphknoten bestehen (20).

Eine Chemotherapie mit Cyclophosphamid (CY) führt zu einer zellulären Depletion des lymphatischen Gewebes und damit zu einer Immunsuppression, die Immunsuppression verhindert so die Abstoßung des transplantierten Knochenmarks (42).

Nach der Konditionierung für eine SZT sind die Lymphknoten somit weithin zellulär depletiert, Lymphfollikel und Keimzentren sind reduziert oder fehlen, an deren Stelle sind nur noch Cluster persistierender lymphatischer Zellen vorhanden, die Lymphknotensinus sind ektatisch und mit Histozyten angefüllt und das Retikulum tritt in den Vordergrund (22,30,43,55,66).

Nach einmaliger Gabe von Cyclophosphamid in einer hohen Dosis verfallen SWZ in eine *Art vita minima*, und erholen sich eine Woche nach Exposition wieder (59). Untersuchungen zu Strahlenfolgen an SWZ liegen bisher nicht vor, allerdings sind die den SWZ vermutlich nahe stehenden FDZ dahin gehend untersucht worden und gelten als weitgehend radioresistent. Zuvor mittels radioaktiven Immunkomplexen markierte FDZ sind nach Bestrahlung mit 18,5 Gray oder nach Cyclophosphamid-Gabe weiter identifizierbar gewesen (44). Ultrastrukturelle Untersuchungen haben eine unveränderte Morphologie und Zeichen metabolischer Aktivität nach Bestrahlung von FDZ ergeben (54).

### **Lymphknotenregeneration nach SZT**

Zur Repopulation der infolge der Konditionierung vor SZT lymphatisch depletierten Lymphknoten liegen eine Reihe von Untersuchungen mit unterschiedlichen Ergebnissen vor (siehe Abb. 5) (22,30,43,55,66). Der Beginn einer zellulären Repopulation ist bereits ca. nach zwei Wochen (43,66) und eine normalisierte Lymphknotenarchitektur frühestens nach 4 ½ bzw. 7 Monaten (30,55), eine anhaltend gestörte Lymphknotenarchitektur aber auch mehrere Jahre nach KMT beobachtet worden (22,43).

Bezüglich der Regeneration von FDZ nach allogener SZT hat Friedrich bereits 100 Tage nach KMT knötchenförmige Lymphozyten-Aggregate mit CD21- und CD35-positiven FDZ in Lymphknoten erkannt (33) und Horny hat zwölf Monate nach KMT bei fehlenden Lymphfollikeln und Keimzentren ganz vereinzelt Ki-M4-positive FDZ und S-100- positive interdigitierende Retikulumzellen (IDR) nachgewiesen (43) (siehe Abb. 5).

Zudem sind im Tierversuch nach Bestrahlung und SZT bei Mäusen FDZ vorgefunden worden, diese FDZ waren allerdings nicht chimär. Da es als unwahrscheinlich betrachtet worden ist, dass Knochenmark-abstammende FDZ persistierten und noch zehn Monate nach SZT keine neuen FDZ aufgetreten seien, ist ein Ursprung aus dem Knochenmark verworfen worden (44). Nach anderer Meinung sollen FDZ hingegen über Monate bis Jahre persistieren und daher möglicherweise

das Auftreten von vom Spender abstammenden FDZ in „bone marrow chimeras“ behindern (92). Folgerichtig ist nach SZT in immundefiziente Mäuse (severe combined immunodeficiency, SCID) ohne eigene FDZ ein Chimärismus in FDZ zu beobachten gewesen und angenommen worden, dass hier Spender-FDZ nicht mit radioresistenten Vorläuferzellen des Empfängers konkurrieren müssten (91).

Diese Beobachtungen beziehen sich sämtlich auf die lymphatische Repopulation der Lymphknoten und auf die Regeneration der FDR und IDR (zusammengefasst in Abb. 5), entsprechende Untersuchungen zu den SWZ gibt es bis heute keine.

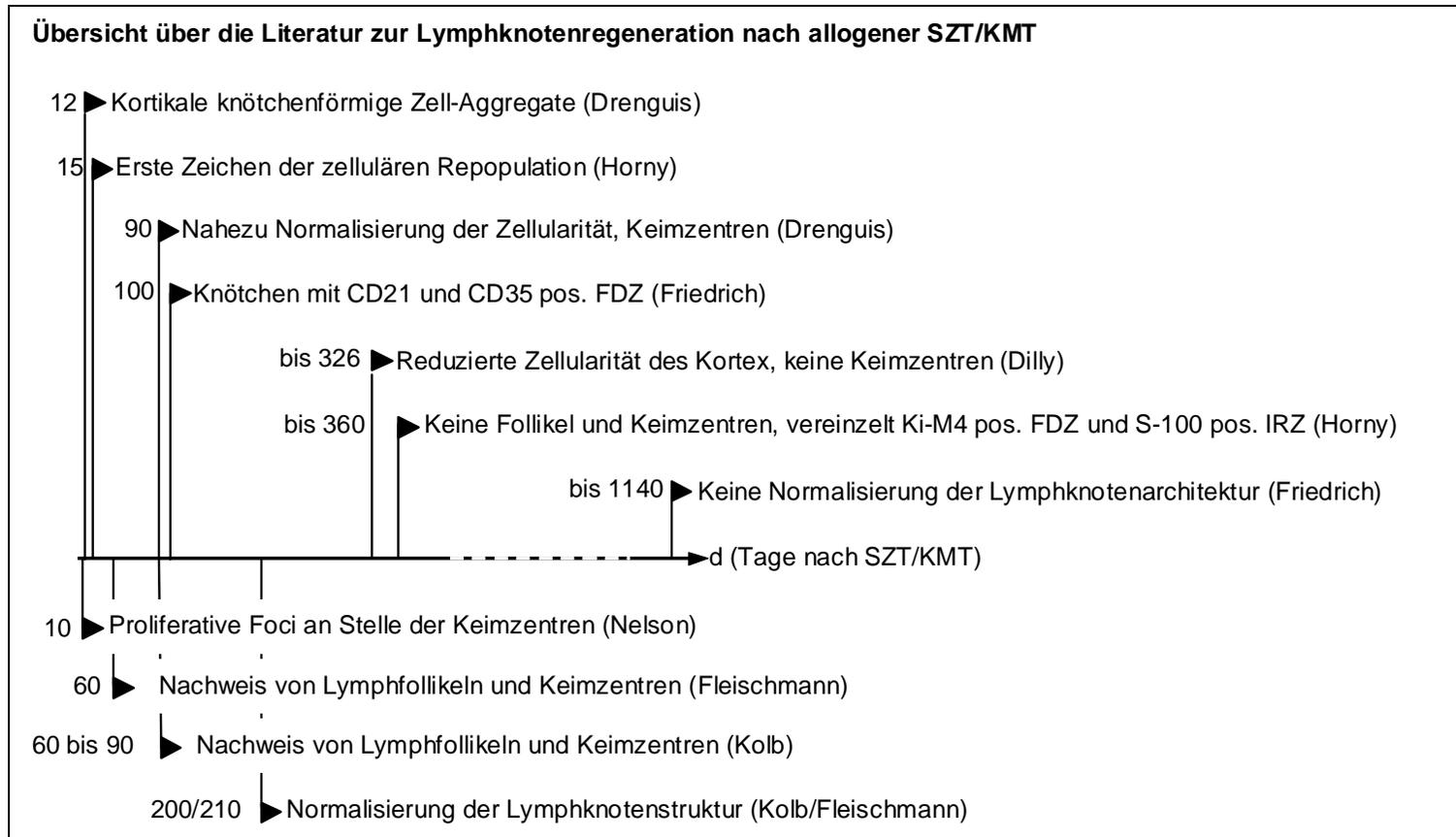


Abbildung 5: Lymphknotenregeneration nach allogener SZT/KMT. Oberhalb der Zeitachse Arbeiten zur Lymphknotenregeneration nach allogener humaner KMT, unterhalb Arbeiten zur Lymphknotenregeneration nach Ganzkörperbestrahlung mit 1200R und Infusion mononukleärer Leukozyten (Nelson) und hämatopoetischer Zellen (Kolb) am Hund. Die Tage nach SZT/KMT sind auf der Ordinate aufgetragen.

## **GvHR/GvHD und Behandlung**

Die Graft-versus-Host-Reaktion (Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion) GvHR geht von alloreaktiven Zellen des Transplantats aus, richtet sich gegen die Gewebe des Empfängers und kann zur klinisch manifesten Graft-versus-Host-Disease (Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung) GvHD führen (83). In Untersuchungen zu den Auswirkungen einer GvHR/GvHD auf die Restitution des lymphatischen Gewebes ist im Tierversuch und am Menschen in einigen Studien eine verzögerte oder ausbleibende Regeneration der Lymphknoten festgestellt worden (33,41), in weiteren Arbeiten haben sich keine wesentlichen Unterschiede in Untergruppen mit oder ohne GvHD erwiesen (24,55). Nach Prophylaxe einer GvHD mit Anti-Lymphozyten-Serum (ALS) oder einem immunsuppressiven Medikament wie z.B. Methotrexat konnte z.T. eine beschleunigte Restitution beobachtet werden (30,65), Kolb hat hingegen bei Hunden mit und ohne Gabe von MTX nach KMT keine wesentlichen Unterschiede in der Lymphknotenregeneration festgestellt (55).

Lymphknoten verstorbener Patienten wurden außerdem daraufhin untersucht, ob eine GvHR/GvHD den Nachweis dendritischer Zellen beeinflusst. Waren die Patienten nicht an einer GvHD erkrankt, konnten häufiger FDZ nachgewiesen werden als im Falle einer Erkrankung (82). Dem Einfluss einer GvHR auf SWZ ist Friedrich im Tierversuch nachgegangen. Er hat dabei die Aktivierung und Migration von SWZ und FDZ und den Einfluss einer immunsuppressiven Behandlung nach semiallogener Dünndarmtransplantation in Spendertieren verfolgt und einen Austausch von SWZ und FDZ zwischen den lymphatischen Geweben des Spenders und Empfängers mit zunächst ansteigender und im Verlauf kontinuierlich abfallender Anzahl an SWZ und FDZ beobachtet; durch eine immunsuppressive Behandlung der Versuchstiere blieb ein entsprechender Abfall der Anzahl an nachweisbaren SWZ und FDZ im Verlauf aus (28).

Das Schicksal lymphatischer Zellen und Hypothesen zum Verbleib von SWZ und FDZ nach allogener SZT sind in Abbildung 6 und 7 zusammengefasst.

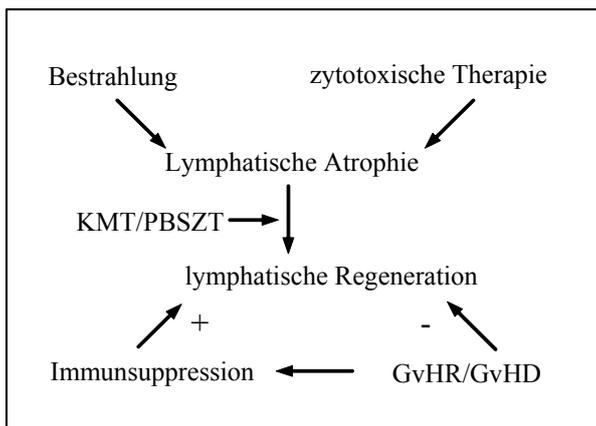


Abbildung 6: Schicksal lymphatischer Zellen nach allogener SZT. Die Bestrahlung und die Immunsuppression im Rahmen der Vorbehandlung vor KMT führen zur lymphatischen Atrophie der Lymphknoten. Nach KMT oder peripherer Blutstammzelltransplantation (PBSZT) werden die Lymphknoten repopularisiert, eine GvHR/GvHD verzögert und eine Immunsuppression beschleunigt die lymphatische Regeneration.

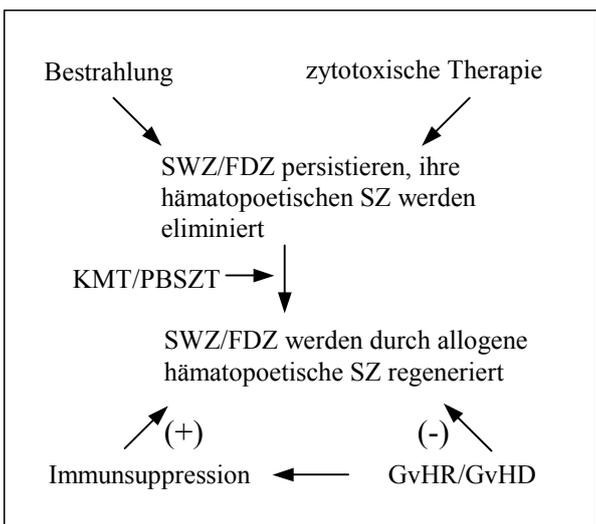


Abbildung 7: Hypothesen zum Schicksal von SWZ/FDZ nach allogener SZT. Bestrahlung und Immunsuppression im Rahmen der Vorbehandlung vor KMT führen nicht zur Elimination der SWZ/FDZ. Nach KMT oder PBSZT werden die SWZ/FDZ durch allogene hämatopoietische Stammzellen regeneriert, ihr Beitrag zu einer GvHR/GvHD ist bisher wenig untersucht worden.

### 3 Ziel der Arbeit

Bislang ist in wenigen Arbeiten der Frage eines Chimärismus in dendritischen Zellen nachgegangen worden. So hat Boeck in zirkulierenden dendritischen Zellen des peripheren Blutes bei Patienten nach allogener SZT einen Chimärismus und zudem eine Tendenz zu einem vermehrten Auftreten einer GvHR bei gemischtem Chimärismus dendritischer Zellen nachweisen können. Die Untersuchungen erfassen jedoch nur die Verhältnisse im Blut, nicht aber den Chimärismus im Gewebe und daher sind Untersuchungen an dendritischen Zellen im Gewebe (in situ) wünschenswert (8). Diesem Desiderat kommt die vorliegende Arbeit durch die Untersuchung der SWZ auf Chimärismus nach allogener SZT nach, und liefert damit auch einen allgemeinen Beitrag zur Pathologie bzw. Pathophysiologie der KMT bzw. PBSZT.

Die SWZ der Lymphknoten haben trotz des weithin bekannten, von L. Aschoff geprägten Begriffs des „Reticulo-endothelialen Systems“, welches die SWZ der Lymphknoten einschließt, in der neueren medizinischen Literatur wenig Beachtung gefunden, u.a. weil es keine geeigneten, spezifischen Nachweismethoden zur phänotypischen Identifikation der SWZ gegeben hat. Wacker hat 1994 in einer Arbeit zum Thema SWZ: „Sinuswandzellen. Immunakzessorische Zellen des Lymphknotensinus“ (96) diesen Zelltyp mit eigens generierten monoklonalen Antikörpern dargestellt und eingehend charakterisiert. Wacker hat die Unklarheit über die Histogenese der SWZ aufgegriffen und ist ihrem Ursprung und ihrer Funktion nachgegangen. Zusammenfassend hat er die SWZ als dendritische, immunakzessorische Zellen betrachtet und ist zu dem Ergebnis gekommen, dass SWZ Abkömmlinge von zirkulierenden Monozyten (96), somit letztlich Abkömmlinge hämatopoetischer Stammzellen sind. Seit der Einführung von spezifischen „Lymphendothelmarkern“ wie Podoplanin Ende der Neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts haben sich die Möglichkeiten zur Darstellung von SWZ erweitert.

Um dendritische Zellen in situ –speziell die SWZ der Lymphknoten– auf einen Chimärismus hin untersuchen zu können, haben wir eine autoptische und bioptische Studie an Material von einem großen Kollektiv allogenen stammzelltransplantierten Patienten durchgeführt. Verschiedene ausgewählte Lymphknotenpräparate wurden nach allogener, „gegengeschlechtlicher“ Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation auf einen Chimärismus der Geschlechts-Chromosomen in SWZ hin untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine simultane Doppelfärbung an ausgewählten Lymphknoten-Präparaten durchgeführt, dabei stellten Antikörper gegen Podoplanin in einer Immunfluoreszenz (IF)-Färbung die SWZ dar, gleichzeitig wurden mit einer Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung des Y-Chromosoms (Y-FISH) alle vom Spender abstammenden Zellen markiert. Eine derartige simultane Doppelfärbung an Lymphknoten ist bisher nicht beschrieben worden und stellte somit eine labortechnische Herausforderung dar, welche erst nach arbeitsintensiven Anpassungen der verschiedenen Laborprotokolle durchgeführt werden konnte. Die gewonnenen Ergebnisse wurden unter Berücksichtigung der teils umfangreichen Literatur gewertet. Nicht zuletzt trägt die vorliegende Arbeit damit zur Klärung der histogenetischen Abstammung der SWZ bei und liefert einen Beitrag zur Frage, ob hämatopoetische Stammzellen nach humaner SZT auch SWZ in Lymphknoten regenerieren können.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Untersuchungsmaterial

#### Autoptisch gewonnene Lymphknoten

In Zeitraum von Anfang 1992 bis Ende 2003 wurden die Leichnahme von 143 Patienten, die u.a. wegen akuter und chronischer Leukämie eine SZT erhalten hatten und im Verlauf von einer Woche bis 54  $\frac{3}{4}$  Monaten nach Transplantation verstorben waren, am Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München obduziert. Im Rahmen der Autopsie wurden dabei axilläre, inguinale, pulmonale, paraaortale, hepatohiläre und parapankreatische Lymphknoten entnommen, feingeweblich untersucht und die Paraffinblöcke und Schnittpräparate archiviert.

Um „gegengeschlechtliche“ („sex-mismatch“) transplantierte Patienten identifizieren zu können, wurden für die vorliegende Arbeit die klinischen Informationen in Zusammenarbeit mit der Abteilung für hämatopoetische Stammzelltransplantation der Medizinischen Klinik III des Klinikums Großhadern (Prof. Kolb) zusammengeführt, wobei für diese Untersuchung nach einem „male mismatch“ gesucht wurde, d. h. nach weiblichen Patientinnen, die eine Knochenmarksspende von männlichen Spendern erhalten hatten. Daraufhin konnte Obduktionsmaterial von insgesamt 60 „gegengeschlechtlich“ transplantierten Frauen identifiziert und ein Kollektiv von 33 Fällen von „male mismatch“ zusammengestellt werden mit insgesamt 180 autoptisch gewonnenen Lymphknoten. Dieses umfangreiche Material bildete die Grundlage der vorliegenden Arbeit. Anhand der Haematoxylin-Eosin-gefärbten Schnittpräparate wurden zehn geeignete Lymphknoten für die Durchführung der Doppelfärbung ausgewählt. Kriterien für die Auswahl waren eine möglichst gut erhaltenen Lymphknotenstruktur, eine geringgradige Autolyse und ein geringes Ausmaß sonstiger Veränderungen, wie z. B. eine ausgeprägte Mischstaubantrakose.

### **Konditionierung, Transplantation und Verlauf**

Bei der Konditionierung wurde vor SZT bei sechs von zehn Patientinnen eine Bestrahlung vorgenommen und in vier Fällen eine Chemotherapie.

Bei acht Patientinnen wurde Knochenmark und in zwei Fällen wurden periphere Blutstammzellen transplantiert, ein Engraftment wurde klinisch dokumentiert. Bei allen Patientinnen war der Spender männlich.

Zudem erfolgte bei neun Patientinnen eine GvHR-Prophylaxe mit Cyclosporin A (CSA) und Methotrexat (MTX) und in einem Fall mit CSA und Mycophenolat-Mofetil (MMF) (zusammengefasst in Tabelle 1).

### **Die einzelnen Lymphknotenpräparate und Knochenmarksbefunde**

**Präparat 1a:** Untersucht wurde ein paraaortaler Lymphknoten (zwölf Jahre altes Material) nach KMT 54  $\frac{3}{4}$  Monate ante mortem wegen AML. Im Knochenmark lag zum Zeitpunkt der Obduktion ein Rezidiv der Grunderkrankung vor, mehrere klinische Rezidive waren vorausgegangen.

**Präparat 2a:** Untersucht wurde ein mesenterialer Lymphknoten (zehn Jahre altes Material) nach KMT zwei Monate ante mortem wegen CML (Ph+). Ein Engraftment wurde klinisch nachgewiesen, das Knochenmark war zum Zeitpunkt der Obduktion hypoplastisch.

**Präparat 3a:** Untersucht wurde ein hepatohilärer Lymphknoten (zehn Jahre altes Material) nach KMT dreieinviertel Monate ante mortem wegen AML. Ein Engraftment wurde klinisch nachgewiesen, im Knochenmark lag zum Zeitpunkt der Obduktion eine normale Blutbildung vor.

**Präparat 4a:** Untersucht wurde ein tracheobifurkaler Lymphknoten (neun Jahre altes Material) nach KMT eineinviertel Monate ante mortem wegen CML. Ein Engraftment wurde klinisch nachgewiesen; im Knochenmark lag zum Zeitpunkt der Obduktion eine normale Blutbildung vor.

**Präparat 5a:** Untersucht wurde ein inguinaler Lymphknoten (acht Jahre altes Material) nach KMT drei Wochen ante mortem wegen ALL. Ein Engraftment wurde

klinisch nachgewiesen, das Knochenmark zeigte zum Zeitpunkt der Obduktion einen toxischen Knochenmarksschaden.

**Präparat 6a:** Untersucht wurde ein inguinaler Lymphknoten (acht Jahre altes Material) nach KMT zweieinviertel Monate ante mortem wegen CML. Ein Engraftment wurde klinisch nachgewiesen, das blutbildende Knochenmark war zum Zeitpunkt der Obduktion hypoplastisch.

**Präparat 7a:** Untersucht wurde ein tracheobifurkaler Lymphknoten (acht Jahre altes Material) nach KMT sechseinviertel Monate ante mortem wegen CML (Ph+). Ein Engraftment wurde klinisch nachgewiesen, das Knochenmark war zum Zeitpunkt der Obduktion hypoplastisch.

**Präparat 8a:** Untersucht wurde ein tracheobifurkaler Lymphknoten (sieben Jahre altes Material) nach KMT drei Monate ante mortem wegen CML (Ph+). Das Knochenmark war zum Zeitpunkt der Obduktion hypoplastisch und zeigte eine toxische Knochenmarksreaktion.

**Präparat 9a:** Untersucht wurde ein inguinaler Lymphknoten (fünf Jahre altes Material) nach PBSZT eine Woche ante mortem wegen AML. Zum Zeitpunkt der Obduktion lag eine Knochenmarksaplasie vor.

**Präparat 10a:** Untersucht wurde ein axillärer Lymphknoten (zwei Jahre altes Material) nach PBSZT dreieinviertel Monate ante mortem wegen ALL. Ein Engraftment wurde klinisch nachgewiesen, zum Zeitpunkt der Obduktion war das Knochenmark durch die bekannte ALL infiltriert.

Die klinischen Angaben und pathologisch-anatomischen Befunde sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

### **Bioptisch gewonnene Lymphknoten**

In Zeitraum von 1992 bis 2003 wurden sechs bioptisch gewonnene Lymphknoten von Patientinnen, die eine Knochenmarksspende von männlichen Spendern erhalten hatten, zur histologischen Untersuchung dem Pathologischen Institut der Universität München übersandt. Drei geeignete Lymphknotenpräparate wurden daraus

ausgewählt und für die vorliegende Studie weiter bearbeitet. Kriterium der Auswahl war die möglichst gute morphologische Identifizierung der Lymphsinus.

### **Konditionierung, Transplantation und Verlauf**

Bei der Konditionierung wurde bei einer Patientin eine Chemotherapie mit Busulfan durchgeführt und bei den restlichen Patientinnen eine meist fraktionierte Bestrahlung.

Bei jeweils zwei Patientinnen erfolgte eine PBZST und in einem Fall eine KMT. In allen Fällen war der Spender ein Mann. Bei allen Patientinnen wurde klinisch ein Engraftment nachgewiesen.

Bei allen Patientinnen erfolgte eine GvH-R-Prophylaxe mit Cyclosporin A (CSA) und Methotrexat (MTX) (zusammengefasst in Tabelle 2).

### **Die einzelnen Lymphknotenpräparate und Knochenmarksbefunde**

**Präparat 1b:** Untersucht wurde ein mesenterialer Lymphknoten (11 Jahre altes Material), entnommen 2 ½ Monate nach KMT wegen CML bei V.a. Lymphknoteninfiltration.

**Präparat 2b:** Untersucht wurde ein pulmohilärer Lymphknoten (fünf Jahre altes Material), entnommen 1 ¾ Monate nach PBSZT wegen ALL. Der Lymphknoten wurde im Rahmen einer Lungenoberlappenresektion bei Aspergillose der Lunge gewonnen.

**Präparat 3b:** Ein zervikaler Lymphknoten wurde untersucht (drei Jahre altes Material), entnommen ca. ¾ Monat nach PBSZT wegen NHL bei V.a. Lymphknoteninfiltration.

Die klinischen Angaben und pathologisch-anatomischen Befunde sind in Tabelle 1 und 2 zusammengefasst.

Tabelle 1: Klinische Angaben (Autopsisch gewonnene Lymphknoten). ALL: akute lymphatische Leukämie, AML: akute myeloische Leukämie, CML: chronisch myeloische Leukämie, ATG: Anti-Thymozyten-Globulin, BC: Buffy coat, BUS: Busulfan, CSA: Cyclosporin A, CY: Cylophosphamid, Flu: Fludarabin, FTBI: fraktionierte Ganzkörperbestrahlung, Gy: Gray, Mel: Melphalan, MMF: Mycophenolat-Mofetil, MTX: Methotrexat, TT: Thiotepa, BPN: Bronchopneumonie, DALD: "Diffuse alveolar lung damage" (Diffuser alveolärer Lungenschaden), MI: Myokardinfarkt, VODL: Veno-occlusive disease of the liver (Veno-occlusive Erkrankung der Leber), \*Zeichen einer GvHD nach Obduktionsbefund, j: ja, n: nein, k.A.: keine Angaben.

Nr.	Diagnose	Konditionierung	SZT	Engraft- ment	GvHR-Prophylaxe	Zeichen einer GvHD*	Alter	Überleben nach SZT [Mo]	Todesursache
1a	AML	BUS-CY	KM	j	CSA-MTX	j	54	54 ¾	AML
2a	CML	FTBI-BC-A-CY	KM	j	CSA-MTX	n	43	2	MI
3a	AML	BUS-ATG-CY	KM	j	CSA-MTX	j	55	3 ¼	DALD,BPN
4a	CML	FTBI-ATG-CY2	KM	j	CSA-MTX	n	55	1 ¼	Aspergillose
5a	ALL	TT-MEL-ATG-CY	KM	j	CSA-MTX	n	23	¾	Sepsis
6a	CML	FTBI-ATG-CY	KM	j	CSA-MTX	j	25	2 ¼	Toxoplasmose
7a	CML	FTBI-ATG-CY	KM	j	CSA-MTX	j	54	6 ¼	DALD, BPN
8a	CML	FTBI-ATG-CY	KM	k.A.	CSA-MTX	j	53	3	DALD, BPN
9a	AML	4Gy-ATG-CY	PBSZ	k.A.	CSA-MTX	n	39	¼	Sepsis
10a	ALL	Flu-2Gy	PBSZ	j	CSA-MMF	j	53	3 ¼	Rhabdomyolyse,BPN

Tabelle 2: Klinische Angaben (Lymphknotenprobeexzision/-biopsie). Legende siehe Tabelle 1.

<b>Nr.</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Konditionierung</b>	<b>SZT</b>	<b>Engraft- ment</b>	<b>GvHR- Prophylaxe</b>	<b>Alter</b>	<b>Gewinnung nach SZT[Mo]</b>	<b>Lymphknoten</b>	<b>Frage/Grund der Entnahme</b>
1b	CML	BUS-CY	KM	j	CSA-MTX	54	2 ½	mesenterial	V.a. Infiltration
2b	ALL	FTBI-ATG-CY	PBSZ	j	CSA-MTX	30	1 ½	pulmohilär	Oberlappen-Resektion wg. Aspergillose
3b	NHL	12Gy-FLU-CY	PBSZ	j	MTX-CSA	37	24 ¾	zervikal	V.a. Infiltration

## 4.2 Untersuchungsmethoden

### Einzelfärbungen

Von allen Lymphknotenpräparaten wurden Schnittpräparate (4 µm) angefertigt und mit Haematoxylin-Eosin (HE) angefärbt.

### Immunhistologie

Die Immunhistologie (IH) identifiziert am Gewebeschnitt spezifische antigene Determinanten, die an der Zelloberfläche oder intrazellulär vorhanden sind. Die verwendeten Antikörper sind monoklonal oder polyklonal und richten sich demnach gegen eine bzw. mehrere Determinanten. Der Primäantikörper ist bei der von uns durchgeführten VEGFR-3 und Podoplanin-IH indirekt über einen weiteren, biotinmarkierten, sekundären „Anti-Antikörper“ mit einem Avidin-Biotin-Enzymkomplex (ABC-Methode) verbunden. Das komplexierte Enzym Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) setzt das zugegebene Chromogen, hier 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) enzymatisch in ein rotbraunes Farbprodukt um, die Färbung ist lichtmikroskopisch auswertbar. Bei der vorgenommenen Podoplanin-Immunfluoreszenz (IF) ist an den Sekundäantikörper ein Fluorochrom, Fluoreszinoisothiocyanat (FITC), gebunden, dieses ist im Fluoreszenzmikroskop sichtbar (68).

Um eine Antikörperbindung zunächst zu ermöglichen, müssen die Antigene, die im Formalin-fixierten Gewebe durch u.a. Wasserstoffbrückenbindungen konformitätsverändert sind, eventuell demaskiert werden. Dazu können verschiedene Reagenzien wie z.B. Proteasen verwendet werden und werden als vorgefertigte Lösung angeboten (Target retrieval solution). Prinzipiell erzielt die IH an autolytisch verändertem Gewebe schlechtere Resultate, daneben wirkt sich auch eine Überfixierung mit Formaldehyd negativ auf das Färbeergebnis aus (68).

An dem vorliegenden Untersuchungsmaterial wurde eine IH mit einem polyklonalen VEGFR-3-Antikörper (Zymed Laboratories, Cat. No. 18-7382) (Verdünnung 1:50)

und einem monoklonalen, Podoplanin-Antikörper (Acris-Antibodies, Deutschland, Katalog Nr. DM3500) (Verdünnung 1:80) vorgenommen. Diese wurden jeweils mit Hilfe des Vectastain Avidin Biotin-Komplex (ABC) Kit Elite Universal detektiert (Vector Laboratories, Kanada, Katalog Nr. PK6200) und mit dem Chromogen AEC (Fa. Zymed, USA, Cat. No. 00-1122) sichtbar gemacht. Die Zellkerne wurden mit Hematoxylin Gill's Formula (Vector Laboratories, Kanada, Katalog Nr. H-3401) gegengefärbt (siehe Abb. 8).

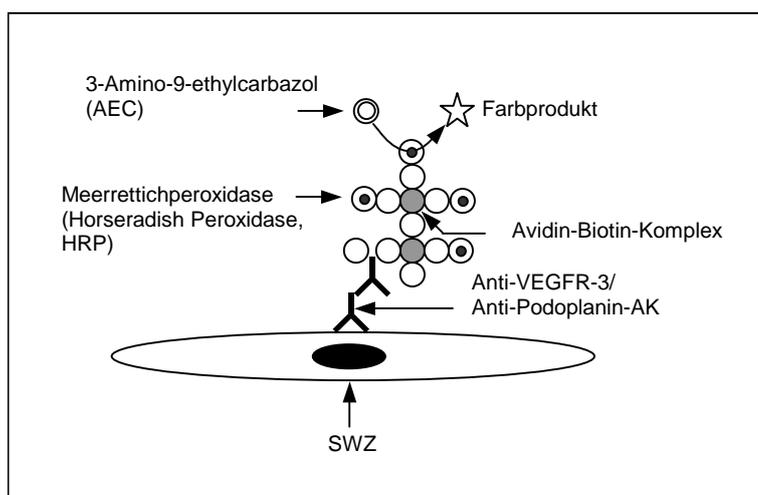


Abbildung 8: Indirekte IH. In der IH wurde ein primärer VEGFR-3/Podoplanin-Antikörper verwendet. Mit dem Avidin-Biotin-Komplex (ABC) wurde detektiert und das Chromogen 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) in ein Farbprodukt umgewandelt.

### Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) identifiziert am Gewebeschnitt spezifische Nukleinsäuresequenzen der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Die dabei eingesetzte FISH-Sonde besteht aus einem oder mehreren markierten Nukleinsäure-Einzelsträngen mit einer Basenabfolge komplementär zur gesuchten Basensequenz und lagert sich spezifisch an den gesuchten Chromosom- oder Genabschnitt an. Um eine Anlagerung der zunächst doppelsträngigen Sonde zu ermöglichen, muss die Doppelhelix der Sonde und Ziel-DNA entwunden und die (kovalenten) Bindungen zwischen den beiden Basensträngen getrennt werden (Denaturierung). Zur Denaturierung erhitzt man die Sonde und Ziel-DNA (bis zu 95 Grad Celcius) mit

z.B. Formamid. Detektiert wird die hybridisierte Sonde mit an diese gebundenen Fluorochromen.

Die Herstellung einer Sonde erfolgt durch Synthese eines der Matrize komplementären Einzelstrangs, mehrere Methoden stehen hierbei zur Verfügung. Bei der in der vorliegenden Arbeit verwandten Nick-Translation werden Einzelstrangbrüche in die DNA eingefügt und mit Fluorochromen markierte Basen mit der DNA-Polymerase aus *E. Coli* wieder eingefügt (58).

Die Autolyse im Obduktionsmaterial betrifft auch die Ziel-DNA. Die Fixierung des Gewebes bewahrt die Nukleinsäuren vor dem vollständigen Zerfall. Fixanzien wie Formaldehyd führen zu einer Quervernetzung von Proteinen des Gewebes und daneben auch zu Doppelstrangbrüchen in der DNA. Die Durchlässigkeit des Gewebes verhält sich umgekehrt zum Grad der Fixierung des Gewebes, dasselbe muss für die FISH daher wieder permeabel gemacht werden. Mit Proteinase E, Proteinase K oder Pepsin/HCl wird eine Permeabilisierung des Gewebes erreicht. Die Nukleinsäuren werden von assoziierten Proteinen befreit und die Quervernetzung des Gewebes durch die Fixierung teilweise gelöst. Nach Hybridisierung stabilisiert eine Refixierung die Chromosomen und verhindert einen Verlust an DNA.

Für die Auswertung der FISH und IF wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss, Deutschland) verwendet, das Licht einer definierten Wellenlänge aussendet und dadurch einen Farbstoff wie FITC oder Rhodamin anregt (495 nm bzw. 596 nm), der dann fluoreszierendes Licht einer farbstoffspezifischen Wellenlänge (520 nm bzw. 615 nm) emittiert. Verschiedene Filtersysteme werden in den Strahlengang geschaltet um kurzwelliges Anregungslicht und langwelliges Emissionslicht zu filtern. Ein dichromatischer Teilungsspiegel trennt die Wellenlängen voneinander, so dass der Betrachter nur das emittierte Signal im Okular sieht (58).

Sind Spender und Empfänger bei einer Transplantation unterschiedlichen Geschlechts, wird durch Darstellung der Geschlechtschromosomen ein Chimärismus erkannt. Chromosome Enumeration Probes (CEP) binden an hochrepetitive DNA-

Sequenzen meist nahe dem Centromer. CEP-Proben sind für das Y als auch X Chromosom mit entsprechender chromogener Markierung erhältlich.

An dem Untersuchungsmaterial erfolgte eine FISH ohne Kombination mit einer IF, anders als in der Doppelfärbung, mit einer kommerziell erhältlichen Sonde (Q-Biogene, Deutschland, PSAT00AY-G) (in 20 % Verdünnung) gegen die Alpha-Satellitenregion des Y Chromosoms (siehe Abb. 9).

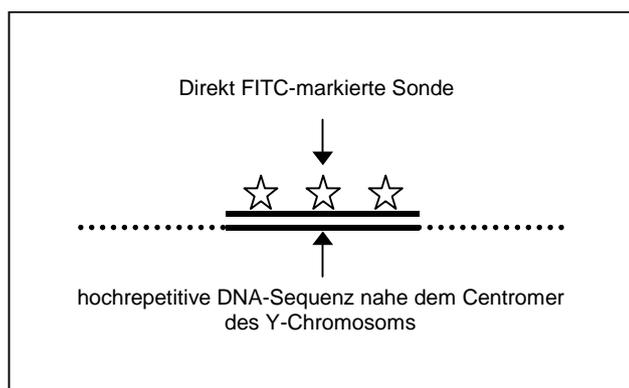


Abbildung 9: Y-FISH (Einzelfärbung). In der Einzelfärbung wurde eine direkt FITC-markierte Sonde verwendet. Die Sonde bindet an hochrepetitive DNA-Sequenzen, die nahe dem Centromer des Y-Chromosoms gelegen sind.

## Doppelfärbung

### Immunfluoreszenz

Das Grundprinzip der Immunfluoreszenz (IF) und der IH ist gleich, wie bereits beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte zunächst eine indirekte Podoplanin-IF unter Verwendung eines monoklonalen Podoplanin-Antikörpers (Acris-Antibodies, Deutschland, Katalog Nr. DM3500) (Verdünnung 1:100) und eines sekundären FITC-markierten Antikörpers (Vector Laboratories, Kanada, Katalog Nr. FI-2000) (siehe Abb. 10) (Verdünnung 1:75).

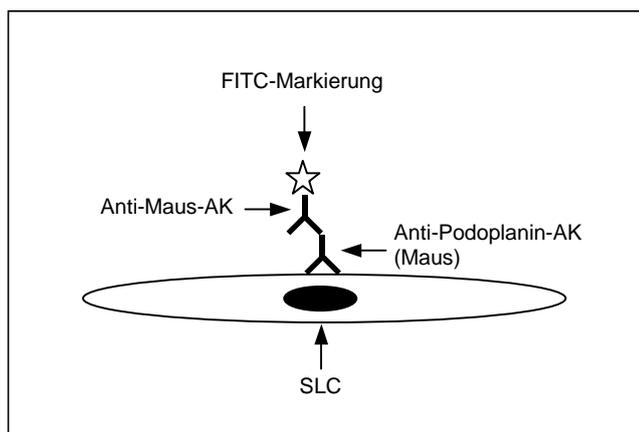


Abbildung 10: Indirekte IF. Podoplanin-Antikörper (AK) binden an SWZ, daran gekoppelt ist ein sekundärer, FITC-konjugierter AK. FITC weist bei Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge (495 nm) eine Grünfluoreszenz auf.

## FISH

Eine FISH mit einer eigens hergestellten Sonde gegen die Alpha-Satellitenregion des Y Chromosoms schloss sich an. Für die Herstellung der Sonde wurde ein E.coli-Plasmid des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung (Klon ID RZPDB737C022027D) verwendet und nach Standardprozedur aufgearbeitet, die Prozedur ist bereits vielfach publiziert und soll an dieser Stelle nicht erneut dargestellt werden (58). Die Sonde (in 8% Verdünnung) wurde mittels Nick-Translation Digoxigenin-markiert und mit einem Rhodamin-markierten Anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche, Deutschland, Katalog Nr. 1207750) (Verdünnung 1:300) detektiert (siehe Abb. 11).

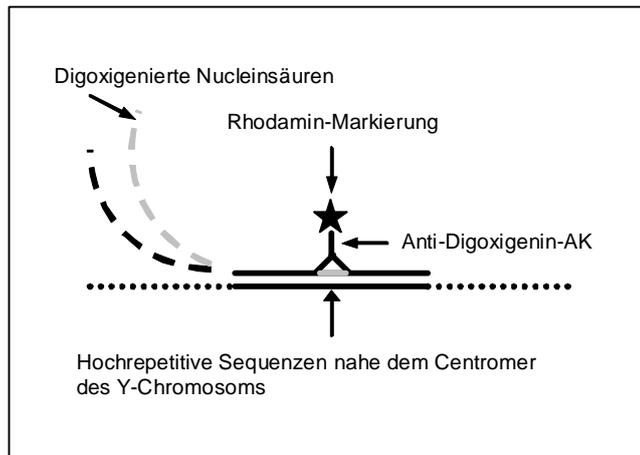


Abbildung 11: Y-FISH (Doppelfärbung). Digoxigenierte Nucleinsäuren werden mit der Nick-Translation in die zu hochrepetitiven Sequenzen nahe dem Centromer des Y-Chromosoms komplementäre DNA-Sonde eingebaut und mit einem Anti-Digoxigenin-Antikörper (AK) detektiert. Der Antikörper ist mit dem Farbstoff Rhodamin markiert. Rhodamin weist bei Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge eine Rotfluoreszenz auf.

## Laborprotokolle

Für die simultane Doppelmarkierung mussten die Laborprotokolle für die IH und FISH kombiniert und zu diesem Zweck angepasst werden. Die dabei verwendete kommerziell erhältliche Y-Sonde war ohne verwertbare Signale. Daher musste eine Y-FISH-Sonde eigens generiert werden.

## Einzelfärbungen

### VEGFR-3-Immunhistologie

1. Entparaffinierung der Präparate.
2. Vorbehandlung der Präparate:
3. Inkubation mit Enhancer (Linaris, Wertheim-Bettingen, Katalog Nr. E7000) in der Mikrowelle (750 W) für 2 x 15 min.
4. Abkühlen der Präparate bei Raumtemperatur für 20 min.
5. Spülen der Präparate in Tris-Puffer für 2 x 5 min.
6. Blockierung der endogenen Peroxidase:
7. Inkubation mit 7,5% wässrigem Wasserstoffperoxid bei Raumtemperatur für 10 min.

8. Fließend wässern der Präparate für 10 min, Spülen der Präparate in Tris-Puffer für 2 x 5 min.
9. Inkubation mit Blocking-Serum (Vectastain ABC Kit Universal, Vector Laboratories, Kanada, Cat. No. PK 6200) für 20 min, den Überstand abkippen.
10. Antikörperauftrag des primären, polyklonalen VEGFR-3-Antikörpers (Zymed Laboratories, Cat. No. 18-7382) in 1:50 Verdünnung für 60 min.
11. Spülen der Präparate in Tris-Puffer für 2 x 5 min.
12. Antikörperauftrag des biotinylierten Sekundärantikörpers (ABC Kit s.o.) für 30 min.
13. Spülen der Präparate in Tris-Puffer für 2 x 5 min.
14. Inkubation mit dem ABC-Komplex (ABC kit s.o.) für 30 min.
15. Spülen der Präparate in Tris-Puffer für 2 x 5 min.
16. Auftrag des Chromogens AEC (Fa. Zymed, USA, Cat. No. 00-1122) für 10 min.
17. Fließend wässern der Präparate für 10 min.
18. Gegenfärbung mit Hematoxylin Gill's Formula (Vector Laboratories, Kanada, Cat. No. H-3401) für 10 sec.
19. Fließend wässern der Präparate für 10 min.
20. Eindecken der Präparate mit Kaisers Glyceringelatine (Merck, Cat. No. 1.09242.0100).

#### *Podoplanin-Immunhistologie*

1. Entparaffinierung der Präparate.
2. Vorbehandlung der Präparate:
3. Inkubation mit Pro Taqs I Antigen-Enhancer (Quartett, Berlin, Katalog Nr. 401602092) in der Mikrowelle (750 W) für 2 x 15 min.
4. Abkühlen der Präparate bei Raumtemperatur für 20 min.
5. Spülen der Präparate in Tris-Puffer für 2 x 5 min.
6. Blockierung der endogenen Peroxidase:
7. Inkubation mit 7,5% wässrigem Wasserstoffperoxid bei Raumtemperatur für 10 min.

8. Fließend wässern der Präparate für 10 min, Spülen der Präparate in Tris-Puffer für 2 x 5 min.
9. Inkubation mit Blocking-Serum (Vectastain ABC Kit Universal, Vector Laboratories, Kanada, Cat. No. PK 6200) für 20 min, den Überstand abkippen.
10. Antikörperauftrag des primären Podoplanin-Antikörpers (Acris Antibodies, Deutschland, Katalog Nr. DM3500) in 1:80 Verdünnung für 60 min.
11. Spülen der Präparate in Tris-Puffer für 2 x 5 min.
12. Antikörperauftrag des biotinylierten Sekundärantikörpers (ABC Kit s.o.) für 30 min.
13. Spülen der Präparate in Tris-Puffer für 2 x 5 min.
14. Inkubation mit dem ABC-Komplex (ABC kit s.o.) für 30 min.
15. Spülen der Präparate in Tris-Puffer für 2 x 5 min.
16. Auftrag des Chromogens AEC (Fa. Zymed, USA, Cat. No. 00-1122) für 10 min.
17. Fließend wässern der Präparate für 10 min.
18. Gegenfärbung mit Hematoxylin Gill's Formula (Vector Laboratories, Kanada, Cat. No. H-3401) für 10 sec.
19. Fließend wässern der Präparate für 10 min.
20. Eindecken der Präparate mit Kaisers Glyceringelatine (Merck, Cat. No. 1.09242.0100).

### *Y-FISH*

#### *Vorbehandlung der Präparate*

1. Inkubation der positiv geladenen Objektträger mit aufgezogenen Präparaten bei 56°C im Brutschrank übernacht.
2. Entparaffinieren der Präparate in 100% Xylol für 25 Minuten.
3. Rehydrieren der Präparate in der Alkoholreihe (Ethanol 100%, 90%, 70%) für je 5 Minuten.
4. Spülen der Präparate in 5' Aqua destillata.
5. Inkubation mit Target Retrieval Solution 6 für 20 min bei 100°C im Wasserbad.
6. Auskühlen der Präparate für 20 min.
7. 5 min Spülen der Präparate mit Tris-Puffer.

8. Verdau des Gewebes mit Pepsin in 0,2 N HCl für 15 min.
9. Erneutes Spülen der Präparate.
10. Refixation der Präparate in 4% Tris-gepuffertem Paraformaldehyd für 10 min.
11. Waschen der Präparate in destilliertem Wasser für 5 min.
12. Dehydrierung der Präparate in der Alkoholreihe (Ethanol 70%, 90%, 100%) für je 2 Minuten.
13. Trocknen der Präparate an der Luft.

#### *Hybridisierung*

13. Sondenauftrag von 8 Mikroliter der direkt FITC markierten Sonde (Q-Biogene, Deutschland, PSAT00AY-G) in 20% Verdünnung auf das 18x18mm große Deckglas.
14. Denaturieren von Präparat und Sonde gleichzeitig in Formamid-haltigem Hybmix (Hybridisierungsmix) (DAKO, Katalog Nr. S3305) für 3 min bei 95°C.
15. Versetzen der Objektträger mit Deckgläsern und Versiegeln mit Rubber Cement (Fixogum, Marabu, Deutschland).
16. Inkubation übernacht bei 37°C.

#### *Post-Hybridisierungs-Waschungen*

16. Entfernen des Rubber cements. Manuelles Lösen der Deckgläser von den Objektträgern.
17. Waschen der Präparate in 0,1xSSC/0,1%Tris für 3x10 min bei 55°C.
18. Spülen der Präparate.
19. Kerngegenfärbung und Eindecken der Präparate mit Vectashield Eindeckmedium mit DAPI (Vector Laboratories, Kanada, Katalog Nr. H-1200) und Bereitstellung zur Auswertung.

### **Doppelfärbung**

#### *Vorbehandlung der Präparate*

1. Entparaffinierung der Präparate in 100% Xylol für 25 min.
2. Rehydrierung in der Alkoholreihe (Ethanol 100%, 90%, 70%) für je fünf min.

3. Inkubation mit Target Retrieval Solution (TRS) 6 (DAKO, Deutschland, Katalog Nr. S1699) für 20 min.
4. Auskühlen der Präparate für 20 min.
5. Spülen der Präparate für 5 min mit Tris-Puffer.
6. Blockierung mit ProtBlock (Protein Block) (DAKO, Katalog Nr. X0909) für 10 min.

#### *Primär- und Sekundärantikörper*

7. Antikörperauftrag des Podoplanin-Antikörpers (Acris Antibodies, Deutschland, Katalog Nr. DM3500), in 1:100 Verdünnung für 60 min.
8. Spülen der Präparate.
9. Antikörperauftrag des FITC gekoppelten Anti-Maus-Antikörpers (Vector Laboratories, Kanada, Katalog Nr. FI-2000), 1:75 verdünnt, für 30 min.
10. Spülen der Präparate.
11. Refixierung der Präparate in Tris gepuffertem, 4% Paraformaldehyd für 10 min.
12. Spülen der Präparate.
13. Trocknen der Präparate an der Luft.

#### *Hybridisierung*

14. Denaturierung der 8% verdünnten Sonde bei 95°C für 3 min (Lagern der Sonde im Eisbad) und der Präparate in 0,05 N NaOH/1xSSC für 4,5 min.
15. Spülen der Präparate.
16. Trocknen der Präparate an der Luft.
17. Sondenauftrag der Digoxigenin-markierten Sonde (Eigenherstellung).
18. Versetzen der Objektträger mit Deckgläsern und Versiegeln mit Rubber Cement (Fixogum, Marabu, Deutschland).
19. Inkubation übernacht bei 37°C.

#### *Post-Hybridisierungs-Waschungen*

20. Waschen der Präparate mit 0,1xSSC/0,1Tween 20 (Sigma, Katalog Nr. P9416) für 3x10 min bei 55°C.
21. Spülen der Präparate.

#### *Detektion der Sonde*

22. Aufbringen des 1:300 verdünnten Rhodamin-markierten Anti-Digoxigenin-Antikörpers (Roche, Deutschland, Katalog Nr. 1207750) bei 37°C.
23. Kerngegenfärbung und Eindecken der Präparate mit Vectashield Eindeckmedium mit DAPI (Vector Laboratories, Kanada, Katalog Nr. H-1200) und Bereitstellung zur Auswertung.

Alle Spülschritte wurden, soweit nicht anders angegeben mit 0,05 M Tris-Puffer in H<sub>2</sub>O pH7,5 durchgeführt und die Antikörper in DAKO-Medium (DAKO, Deutschland, Katalog Nr. S3022) verdünnt.

### **Antikörper, Lösungen und Reagenzien und Gerätschaften**

In Tabelle 3 sind z.T. die Hersteller und Chargen und z.T. die eingesetzten Mengen der verwendeten Lösungen und Reagenzien, soweit sie nicht bereits im Text genannt sind, aufgeführt. Tabelle 4 sind die verwendeten optischen Gerätschaften zu entnehmen.

Tabelle 3: Lösungen und Reagenzien.

<b>Lösungen und Reagenzien</b>		<b>Hersteller, Charge</b>
Xylol		Merck, Deutschland, Katalog Nr. 108681
Ethanol		Merck, Katalog Nr. 100983
Pepsin		Sigma, Deutschland, Katalog Nr. P6887
0,05M Tris:	NaCl 43,9 g;	Fluka (Sigma), Deutschland, Katalog Nr. 71382
	Tris-HCl 34,25 g;	Sigma, Katalog Nr. T3253
	Tris-Base 4,5 g;	Sigma, Katalog Nr. T1503
	Aqua bidestillata ad 5 l.	
Paraformaldehyd 4%:	Paraformaldehyd 20g;	Merck, Katalog Nr. 104005
	aqua bidestillata 250 ml.	
NaOH		ApplieChem, Deutschland, Katalog Nr. A1432
20xSSC:	NaCl 350,6 g;	Fluka
	Na <sub>3</sub> Citratdihydrat 176,4 g;	
	Aqua bidestillata 1,9 l;	
	pH auf 7,0 einstellen;	
	Aqua bidestillata ad 2 l.	

Tabelle 4: Gerätschaften.

<b>Mikroskope, Zubehör</b>	<b>Typ, Hersteller</b>
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop, Zeiss, Deutschland
Lichtquelle (UV-Lampe)	HBO 100W/2, Osram, Deutschland
Objektivlinsen, Ocular	Plan-Apochromat 63x/1,40 Oil, Zeiss, Plan-Neofluar 100x/1,30 Oil, Zeiss, W-PI 10x/23, Zeiss
Filtersätze	FITC, Texasred, DAPI, AF Analysentechnik, Tübingen
Steuereinheit	LEP MAC5000, Ludl Electronic Products, USA
Lichtmikroskop	Axioplan2imaging, Zeiss
Lichtquelle	Halogenlampe HAL 100
Objektivlinsen, Ocular	Plan-Neofluar 2,5x/0,075, Plan-Apochromat 20x/0,75, Plan-Neofluar 63x/0,95, E-PI 10x/25, Zeiss
Camera (Fluoreszenzmikroskop und Lichtmikroskop), Software	Color Camera, AxioCam MRc, Zeiss, AxioVision Version 4.3, Zeiss

## 4.3 Auswertung

### **Einzelfärbungen**

In der Lichtmikroskopie wurde das Lymphsinussystem daraufhin beurteilt, ob ein Randsinus durchgehend zu identifizieren war, daneben ob im Cortex und der Medulla Intermediär- bzw. Marksinus zu erkennen waren. Zudem wurde der Gehalt an lymphatischen Zellen in den Lymphknoten abgeschätzt, dabei wurde der Lymphknoten mit dem geringsten und mit dem höchsten Zellgehalt als Bezugsgröße genommen.

In der Immunhistologie maß sich die Spezifität der Podoplanin-Färbereaktion an der Färbereaktion der gleichzeitig auf dem Schnittpräparat erfassten Blutgefäßendothelzellen. Die Intensität der Färbereaktion wurde in Bezug auf die Intensität der Färbereaktion in hilären Lymphgefäßen oder perinodalen Lymphspalten bzw. bezogen auf die maximale Intensität im Vergleich aller Lymphknoten angegeben.

In der Y-FISH-Einzelfärbung wurden die Lymphknoten auf einen zellulären Chimärismus untersucht und die Intensität der Sondersignale beurteilt.

### **Doppelfärbung**

Im Rhodamin-Filter (Podoplanin-IF) wurden zunächst Abschnitte der Sinuswand mit einer abschnittsweise durchgehenden Podoplanin-Markierung identifiziert. Im FITC-Filter (Y-FISH) in Kombination mit dem DAPI-Filter (Gegenfärbung Zellkerne) wurden in sämtlichen Podoplanin-gefärbten Sinusabschnitten Y-FISH-Sondersignale in Zellkernen mit der für SWZ typischen Kernmorphologie gesucht.

Alle vorliegenden Abbildungen wurden mit einer Digitalkamera (AxioCam MRc, Zeiss) aufgenommen; bezüglich der FISH-Abbildungen wurde die Gewichtung der einzelnen FISH-Kanäle mit der dazugehörigen Kamerasoftware (AxioVision Version 4.3, Zeiss) justiert.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Histopathologischer Befund

#### Autoptisch gewonnene Lymphknoten

Histomorphologisch stellte sich in den autoptisch gewonnenen Lymphknoten ein offener Randsinus dar, in zwei Lymphknoten durchgehend und in acht von zehn Lymphknoten zumindest abschnittsweise. In einem Lymphknoten (Präparat 8a) war ein weiter, zentraler Marksinus zu beobachten. Ansonsten waren Intermediär- und Marksinus nicht eindeutig differenzierbar, und daher wurden alle Sinusstrukturen außer dem Randsinus als Intranodalsinus angesehen und zusammengefasst. Mehrere Lymphknoten wiesen unspezifische Veränderungen auf wie z.B. Anthrakose, diese waren jedoch ohne wesentlichen Einfluss auf die Beurteilbarkeit der Sinus.

Das Sinuslumen war in einem tracheobifurkalen Lymphknoten (Präparat 8a, siehe Abb. 16) ausgedehnt blutgefüllt und in den restlichen Lymphknoten weitgehend zellfrei.

Der Gehalt an lymphatischen Zellen war in den autoptisch gewonnenen Lymphknoten verschieden (siehe Abb. 12). Zudem wiesen alle Lymphknoten eine gestörte Lymphknotenarchitektur mit fehlenden Lymphfollikeln und Keimzentren auf und das Retikulum trat je nach Gehalt an lymphatischen Zellen in den Vordergrund. Dabei lag in einem axillären Lymphknoten (Präparat 10a, siehe Abb. 18) bei hohem Zellgehalt eine leukämische Infiltration vor.

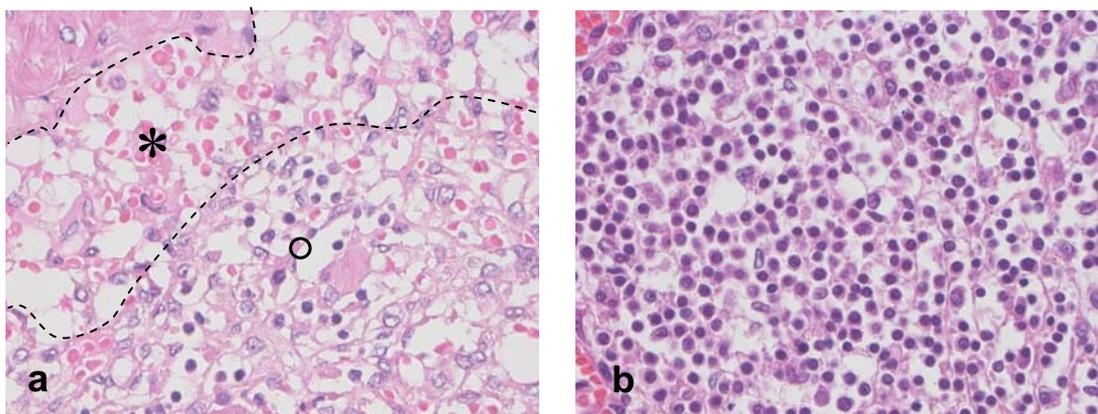


Abbildung 12: Gehalt an lymphatischen Zellen in den Lymphknoten. a) In einem inguinalen Lymphknoten (Präparat 9a,  $\frac{1}{4}$  Monat nach SZT) sind angrenzend an den Randsinus (gestrichelte Linien und Stern) nur wenige, angedeutet aggregierte lymphatische Zellen an Stelle der Lymphfollikel zu erkennen (Kreis). b) Ein paraaortaler Lymphknoten (Präparat 1a) 54  $\frac{3}{4}$  Monate nach SZT weist einen hohen Gehalt an lymphatischen Zellen auf (ein Lymphsinus ist hier nicht erfasst) (Vergrößerung a) und b) 400x).

### **Bioptisch gewonnene Lymphknoten**

In allen Präparaten waren ein offener Randsinus partiell oder nahezu vollständig und in einem Lymphknoten (Präparat 1b, siehe Abb. 14) auch Intranodalsinus deutlich zu identifizieren.

Alle Lymphknoten wiesen einen geringen Gehalt an lymphatischen Zellen auf. In einem zervikalen Lymphknoten (Präparat 3b, siehe Abb. 15) lag eine Lymphominfiltration vor, welche das lymphatische Gewebe verdrängte und weite Teile des Lymphknotens einnahm.

## **5.2 Nachweis von SWZ**

Eine zunächst durchgeführte Färbereaktion mit einem Antikörper gegen VEGFR-3 stellte auch nach Wiederholung lediglich ganz vereinzelt SWZ dar und wurde daher nicht weiter verfolgt (siehe Abb. 13).

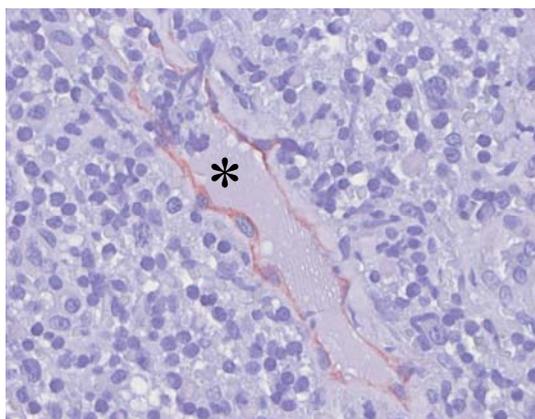


Abbildung 13: Immunhistologische Darstellung der Lymphsinus mit einem VEGFR-3-Antikörper (Lymphknotenpräparat 3b). Ein anfänglicher Versuch der Darstellung der Lymphsinus mit einem Antikörper gegen VEGFR-3 zeigte ganz vereinzelt in den Lymphknoten eine positive Färbereaktion (braun) in einem Lymphsinus (Stern), welche in der Spezifität mit der Podoplanin-Markierung übereinstimmte (Vergrößerung 630x).

### **Autoptisch gewonnene Lymphknoten**

Die Podoplanin-Färbung von SWZ in den Lymphsinus war in acht von zehn Lymphknoten positiv, dabei zeigte ein Lymphknoten (Präparat 2a) allein in der IH eine Färbereaktion bei negativ ausfallender IF. In der IH ließen zwei Lymphknoten eine kräftige Markierung der SWZ des Randsinus und eine weniger intensive Reaktion in SWZ der Intranodalsinus erkennen. Sechs Lymphknoten wiesen eine schwache Färbereaktion der SWZ des Randsinus auf, nur vereinzelt waren auch die SWZ der Intranodalsinus gefärbt. Zwei von zehn Lymphknoten (Präparat 6a und 10a, siehe Abb. 18) waren auch bei spärlicher oder auch fehlender Färbereaktion in perinodalen Lymphspalten ohne Markierung der SWZ in der IH als auch IF. Ein Lymphknoten (Präparat 5a) zeigte einen nahezu durchgehend Podoplanin-gefärbten Randsinus, in den restlichen Lymphknoten waren der Rand- und zum Teil auch Intranodalsinus in den Lymphknoten zumindest abschnittsweise Podoplanin-gefärbt. Die Lymphsinus grenzten sich stellenweise deutlich durch eine Zelllage aus SWZ von dem anliegenden Parenchym bzw. Bindegewebe ab, dabei war die Sinuswand unter der Lymphknotenkapsel strichförmig Podoplanin-markiert und dadurch die Zelllage aus SWZ hier am deutlichsten zu verfolgen. Die SWZ wiesen in dieser Position langgezogene, abgeflachte Zellkerne auf und ähnelten damit

Gefäßendothelien, diese endothelialen Podoplanin-gefärbten SWZ waren aber ebenfalls in Intranodalsinus zu beobachten und hoben sich durch ihre besonders intensive Podoplanin-Markierung hervor. Dahingegen boten SWZ der parenchymseitigen Wand des Randsinus eine weniger intensive Färbereaktion und eine durchgehende strichförmige Podoplanin-Markierung lag meist nicht vor, dadurch erschien die parenchymseitige Wand des Randsinus aufgelockert. In dieser Position wiesen die SWZ z.T. auch ovaläre, plumpe Zellkerne auf und die parenchymseitige Zelllage aus SWZ unterschied sich damit von der kapselseitigen Lage aus überwiegend endothelialen SWZ. Eine luminale oder abluminale Podoplanin-Markierung war in den SWZ der Lymphsinus nicht zu differenzieren.

In der IF wies einer von sieben Lymphknoten eine kräftige Markierung der SWZ der Lymphsinus auf und sechs Lymphknoten eine schwache Markierung vor allem der SWZ des Randsinus. In drei von zehn Lymphknoten war die Färbereaktion –bei interner Positivkontrolle in perinodalen Lymphspalten– negativ. Die IF korrelierte mit einer Ausnahme (Präparat 2a) gut mit der immunhistologischen Färbereaktion. Eine kräftige Markierung perinodaler Lymphspalten oder hilärer Lymphgefäße war in allen Lymphknoten festzustellen mit einer im Vergleich zu der in den SWZ der Lymphsinus intensiveren Färbereaktion.

Ein Netzwerk aus FDZ wurde im Lymphknotenparenchym an keinem der zehn Lymphknoten vorgefunden.

### **Bioptisch gewonnene Lymphknoten**

Alle Lymphknoten zeigten in der Podoplanin-IH eine kräftige Färbereaktion in wandständigen SWZ, in einem Lymphknoten (Präparat 1b, siehe Abb. 14) war der Randsinus nahezu durchgehend Podoplanin-gefärbt und die SWZ der Intranodalsinus waren den SWZ des Randsinus vergleichbar intensiv gefärbt. Die Abgrenzung eines Randsinus erwies sich in einem zervikalen Lymphknoten (Präparat 3b, siehe Abb. 15) als schwierig, da in diesem Lymphknoten die Sinus durch die Lymphominfiltration überwiegend überwuchert waren. Hier waren dann jedoch mit Hilfe der Podoplanin-IH SWZ in obliterierten Intranodalsinus zu identifizieren. In

einem mesenterialen Lymphknoten (Präparat 1b) war neben den wandständigen auch ein Maschenwerk aus intrasinusoidalen SWZ Podoplanin-markiert (siehe Abb. 14). Zwei Lymphknoten färbten sich in der Podoplanin-IF an, davon einer mit kräftiger und ein weiterer mit schwacher Intensität vor allem im Randsinus. In einem von drei Lymphknoten fehlte bei interner Positivkontrolle in perinodalen Lymphgefäßen eine Podoplanin-IF-Markierung der Lymphsinus.

Ein Netzwerk aus Podoplanin-gefärbten FDZ fehlte im Parenchym der drei Lymphknoten.

### **5.3 Nachweis eines Chimärismus**

#### **Autoptisch gewonnene Lymphknoten**

In der Y-FISH-Einzelfärbung waren in fünf von zehn Lymphknoten chimäre Zellen nachweisbar. In der Mehrzahl waren diese lymphatischen Zellen, entsprechend dem histologischen Bild, obgleich allerdings nicht genau zu differenzieren war, ob darunter auch einzelne nicht-lymphatische Zellen waren.

Die Signalintensität in diesen Zellen war in vier Lymphknoten schwach und in einem Lymphknoten kräftig.

In der Doppelfärbung wiesen acht von zehn Lymphknoten relativ schwache Y-FISH-Sondensignale in Zellen des Lymphknotens auf, hiervon waren allerdings vier Lymphknoten in der zugehörigen Einzelfärbung negativ. Zwei von zehn Lymphknoten waren ohne Sondensignale in der Doppelfärbung, davon wies ein Lymphknoten jedoch in der Einzelfärbung Y-FISH-Signale auf. Alle positiven Lymphknoten wiesen in der Doppelfärbung, im Vergleich mit der Y-FISH-Einzelfärbung, schwächere Sondensignale auf, so dass die Detektion der Sondensignale bei gleichzeitig bestehender schwacher Hintergrundfluoreszenz schwierig war. Die DAPI Kernfärbung war gut zu erkennen.

In der Podoplanin-IF der Doppelfärbung wiesen sechs Lymphknoten eine positive Färbereaktion auf, dabei war ein Lymphknoten kräftig und fünf schwach Podoplanin-

markiert. In der FISH und/oder IF-Komponente der Doppelfärbung fehlte in vier von zehn Lymphknoten eine Färbereaktion.

An zwei verschiedenen Stellen in einem Lymphknoten (Präparat 5a) ließen sich in einer kräftig durchgehend Podoplanin-gefärbten Sinuswand Y-FISH-Sondensignale in DAPI-positiven Zellkernen nachweisen. Die Zellkerne dieser Zellen waren ovalär und relativ breit und die Y-FISH-Sondensignale in der Kernperipherie gelegen (siehe Abb. 19).

#### *Bioptisch gewonnene Lymphknoten*

Alle diese Lymphknoten wiesen in der Y-FISH-Einzelfärbung in zahlreichen Zellen kräftige, intensive Sondensignale auf.

In der Doppelfärbung fiel die Podoplanin-IF in einem Lymphknoten kräftig, in einem schwach und in einem negativ aus. Die DAPI Kernfärbung war in allen Präparaten gut zu erkennen. In einem Lymphknoten (Präparat 2b) mit kräftiger Podoplanin-Färbereaktion konnten in der Doppelfärbung Y-FISH-Signale in nicht Podoplanin-markierten Zellen des Lymphknotens nachgewiesen werden mit –im Vergleich zur Y-FISH-Einzelmarkierung– schwachen Sondensignalen; allerdings keine Y-FISH-Signale in Zellkernen von Podoplanin-gefärbten SWZ.

## **5.4 Die einzelnen Lymphknotenpräparate**

In den einzelnen Lymphknotenpräparaten war die Morphologie in der Lichtmikroskopie, die Podoplanin-IH, die FISH-Einzelfärbung und die Doppelfärbung wie folgt zu beschreiben:

### **Autoptisch gewonnene Lymphknoten**

**Präparat 1a** Der paraaortale Lymphknoten (81 mm<sup>2</sup>) zeigte einen relativ hohen Gehalt an lymphatischen Zellen ohne Infiltration durch die zugrunde liegende AML. Der Rand- und die Intranodalsinus waren schmal sowie stellenweise mit Erythrozyten angefüllt. Ein wandständig Podoplanin-gefärbter Randsinus war weder kapsel- noch parenchymseitig abgrenzbar. In Intranodalsinus war eine wandständige

Anfärbung zu erkennen. Der Lymphknoten wies in der Y-FISH (Einzel- und Doppelfärbung) schwache Sondersignale in zahlreichen Zellen auf; die überwiegend den lymphatischen Zellen entsprachen.

**Präparat 2a** Der mesenteriale Lymphknoten (26 mm<sup>2</sup>) zeigte einen geringen Gehalt an lymphatischen Zellen mit fokal kleinen lymphozytären Ansammlungen anstelle der Follikel ohne Infiltration durch die vorbekannte CML. Der Randsinus war weit und nahezu durchgehend identifizierbar, auch die Intranodalsinus waren gut abgrenzbar und hiläre Lymphgefäße zu erkennen. Einzelne endotheliale SWZ im Randsinus unterhalb der Lymphknotenkapsel färbten sich schwach mit Podoplanin an, wohingegen in der parenchymseitigen Wand des Randsinus sowie in Intranodalsinus eine Färbereaktion fehlte. Perinodale Lymphgefäße färbten sich ebenfalls schwach mit Podoplanin an. In der Y-FISH (Einzelfärbung) einzelne lymphatische Zellen mit schwachen Sondersignalen.

**Präparat 3a** Der hepatohiläre Lymphknoten (14 mm<sup>2</sup>) lag in mehreren Anteilen vor. Der Lymphknoten zeigte einen mäßigen Gehalt an lymphatischen Zellen und war ohne Infiltration durch die bekannte AML. Der Rand- und die Intranodalsinus waren schmal, zentrale Sinusräume waren durch endotheliale, schwach Podoplanin-gefärbte SWZ ausgekleidet. Die Podoplanin-Färbung im Randsinus entsprach im Wesentlichen dem Lymphknoten in Präparat 1. In der Y-FISH (Einzelfärbung) konnten keine Sondersignale nachgewiesen werden.

**Präparat 4a** Der tracheobifurkale Lymphknoten (11 mm<sup>2</sup>) zeigte einen geringen Gehalt an lymphatischen Zellen und war ohne Infiltration durch die vorbekannte CML. Weiterhin lag eine mittelgradige Fibrose sowie Anthrakose im Lymphknotenparenchym vor. Der Rand- und die Intranodalsinus waren schmal, die parenchymseitige Wand des Randsinus unscharf. Endotheliale SWZ im Randsinus unter der Kapsel färbten sich kräftig mit Podoplanin an und SWZ der parenchymseitigen Sinuswand weniger durchgehend und in geringer Intensität. Die Y-FISH (Einzel- und Doppelfärbung) zeigte schwache Sondersignale in lymphatischen Zellen.

**Präparat 5a** Der inguinale Lymphknoten (9 mm<sup>2</sup>) zeigte einen geringen Gehalt an lymphatischen Zellen ohne Infiltration durch die vorbekannte ALL, zudem multifokale dystrophe Verkalkungen. Der Rand- und die Intranodalsinus waren mittelweit, die parenchymseitige Wand des Randsinus war deutlich abzugrenzen und hiläre Lymphgefäße zu erkennen. Intranodalsinus färbten sich teils kräftig mit Podoplanin an, die Sinuswand war hier entsprechend der parenchymseitigen Wand des Randsinus aufgelockert oder ähnlich der kapselseitigen Wand des Randsinus durchgehend und strichförmig Podoplanin-markiert (siehe Abb. 19). In der Doppelfärbung wiesen lymphatische Zellen Y-Sondensignale in schwacher Intensität auf, welche hier auch an zwei verschiedenen Stellen in Zellkernen von Podoplanin-gefärbten Zellen der Sinuswand nachzuweisen waren (siehe Abb. 19).

**Präparat 6a** Der inguinale Lymphknoten (14 mm<sup>2</sup>) zeigte einen geringen Gehalt an lymphatischen Zellen und war ohne Infiltration durch die vorbekannte CML. Der Randsinus war schmal und durchgehend zu erkennen. Die IH und IF für Podoplanin waren komplett negativ ausgefallen mit fehlender Podoplanin-Färbung in Lymphgefäßen der Lymphknotenkapsel und des angrenzenden Bindegewebes. Lymphatische Zellen wiesen FISH-Sondensignale (Doppelfärbung) in schwacher Intensität auf.

**Präparat 7a** Der tracheobifurkale Lymphknoten (132 mm<sup>2</sup>) zeigte einen mäßigen Gehalt an lymphatischen Zellen ohne Infiltration durch die vorbekannte CML. Eine deutliche Anthrakose lag vor. Der Rand- und die Intranodalsinus waren weit und mit Erythrozyten locker angefüllt. Im Randsinus als auch in den Intranodalsinus färbten sich einige endotheliale SWZ schwach mit Podoplanin an. Lymphatische Zellen wiesen in der Y-FISH (Doppelfärbung) Y-Sondensignale in schwacher Intensität auf.

**Präparat 8a** Der tracheobifurkale Lymphknoten (81 mm<sup>2</sup>) zeigte einen mäßigen Gehalt an lymphatischen Zellen ohne Infiltration durch die vorbekannte CML, zudem eine deutliche Anthrakose. Der Randsinus weit und vollständig blutgefüllt, die parenchymseitige Wand nicht deutlich abzugrenzen und in intranodalen Abschnitten waren ebenfalls alle Gefäß- und Sinusstrukturen hyperämisch. Die kapselseitige Wand des Randsinus war abschnittsweise Podoplanin-gefärbt, zudem

intrasinusoidale Zellen. Ein zentraler Marksinus und hiläre Lymphgefäße waren gut zu erkennen. Lymphatische Zellen wiesen sowohl in der Einzel- als auch Doppelfärbung Y-FISH Sondersignale in schwacher Intensität auf.

**Präparat 9a** Der inguinale Lymphknoten (8 mm<sup>2</sup>) zeigte einen geringen Gehalt an lymphatischen Zellen ohne Infiltration durch die vorbekannte AML. Der Randsinus war schmal und nahezu durchgehend gut zu erkennen, Intranodalsinus waren nicht eindeutig abgrenzbar. Die Podoplanin-Färbereaktion entsprach weitgehend der Färbereaktion in dem Lymphknoten in Präparat 2a. Lymphatische Zellen wiesen in der Einzelfärbung Y-FISH Sondersignale in kräftiger Intensität auf.

**Präparat 10a** Der axilläre Lymphknoten (42 mm<sup>2</sup>) wies eine diffuse lockere Infiltration des Parenchyms durch die vorbekannte common-ALL auf, der Gehalt an lymphatischen Zellen war insgesamt relativ hoch. Der Randsinus und die Intranodalsinus waren schmal und durchgehend zu erkennen, Intranodalsinus nicht eindeutig abgrenzbar. Bei positiv ausgefallener Färbereaktion in perinodalen Lymphgefäßen waren die Lymphknotensinus allerdings nicht gefärbt (siehe Abb. 18). In lymphatischen Zellen konnten Y-FISH-Sondersignale (Doppelfärbung) mit geringer Intensität nachgewiesen werden.

### **Bioptisch gewonnene Lymphknoten**

In den einzelnen Lymphknotenpräparaten konnten folgende Befunde bezüglich der Histomorphologie, Podoplanin- und FISH-Färbungen erhoben werden:

**Präparat 1b** Der mesenteriale Lymphknoten (13 mm<sup>2</sup>) zeigte einen geringen Gehalt an lymphatischen Zellen ohne Infiltration durch die vorbekannte CML. Der Randsinus war mittelweit, Intranodalsinus waren weit und überall abgrenzbar. Podoplanin färbte durchgehend und in vergleichbar kräftiger Intensität Rand- und Intranodalsinus als auch die parenchymseitige und kapselseitige Wand des Randsinus. Kapselseitig waren sowohl Podoplanin-gefärbte endotheliale als auch SWZ mit plumpen Zellkernen zu beobachten. Hiläre Lymphgefäße waren abzugrenzen. Podoplanin zeichnete die Wand der Sinus nach, die Markierung ging dabei auf Zellen in den Sinus über, die strebenartig das Lumen durchquerten, und

erreichte stellenweise wiederum die gegenseitige Sinuswand. Alle Sinusabschnitte mit Betonung zentraler Sinus waren durch hellzytoplasmatische, Podoplanin negative Makrophagen angefüllt. Diese waren auch in der konventionellen Histologie von den maschenwerkartig die Sinus durchziehenden SWZ differenzierbar (siehe Abb. 14). Lymphatische Zellen wiesen in der Einzelfärbung Y-FISH-Sondensignale in kräftiger Intensität auf.

**Präparat 2b** Der pulmohiläre Lymphknoten ( $169 \text{ mm}^2$ ) wies einen mäßigen Gehalt an lymphatischen Zellen auf ohne Infiltration durch die bekannte ALL. Der Randsinus war sehr schmal und Intranodalsinus nicht eindeutig zu identifizieren. Endotheliale SWZ im Randsinus färbten sich kapselseitig z.T. durchgehend kräftig mit Podoplanin an und parenchymseitig war die Sinuswand durch unregelmäßig Podoplanin-gefärbte Zellen begrenzt. Intranodalsinus wurden dem Randsinus vergleichbar intensiv markiert (siehe Abb. 14); die Y-FISH mit kräftigen (Einzel-) bzw. schwachen (Doppelfärbung) Sondensignalen.

**Präparat 3b** Der zervikale Lymphknoten ( $42 \text{ mm}^2$ ) war durch ein großzelliges B-Zell-Lymphom flächig infiltriert, dabei mit einem geringen Gehalt an normalen lymphatischen Zellen. Die Sinuswand mit endothelialen SWZ unter der Lymphknotenkapsel war abschnittsweise durchgehend kräftig und die parenchymseitige Sinuswand war schwächer Podoplanin-gefärbt, Intranodalsinus waren nicht eindeutig zu identifizieren (siehe Abb. 14). In der Doppelfärbung fehlte eine Podoplanin-Färbung vollständig. Lymphatische Zellen wiesen Y-FISH-Sondensignale in kräftiger (Einzel-) bzw. schwacher (Doppelfärbung) Intensität auf.

## 5.5 Konditionierung, Transplantation und Verlauf

Zwischen dem Gehalt an lymphatischen Zellen der Lymphknoten und der Überlebenszeit war eine positive Korrelation zu beobachten,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{3}{4}$ ,  $1 \frac{1}{4}$  und  $2 \frac{1}{4}$  Monate nach SZT autoptisch gewonnene Lymphknoten wiesen einen geringen,  $3$ ,  $3 \frac{1}{4}$  und  $6 \frac{1}{4}$  Monate nach SZT einen mäßigen und  $3 \frac{1}{4}$  und  $54 \frac{3}{4}$  Monate nach SZT einen hohen Gehalt an lymphatischen Zellen auf. In allen bioptisch gewonnenen

Lymphknoten wurde ein geringer Gehalt an lymphatischen Zellen vorgefunden, sie wurden 1 ½, 2 ½ und 24 ¾ Monate nach SZT gewonnen.

In dem vorliegenden Kollektiv ergab die Obduktion bei vier der verstorbenen Patientinnen Residuen einer GvHD und bei zwei weiteren Patientinnen eine geringgradige aktive GvHD (siehe Tabelle 1), dabei unterschieden sich diese Lymphknoten in Zellgehalt und Nachweis von SWZ nicht grundsätzlich von den restlichen. Aufgrund der Zusammensetzung des Kollektivs und der begrenzten Fallzahl konnten keine validen Ergebnisse bezüglich des Einflusses der Konditionierung, Transplantationsart und GvHD-Chemoprophylaxe erhoben werden.

## 5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Histopathologisch wiesen die Lymphknoten in Korrelation mit der Überlebenszeit einen geringen bis hohen Zellgehalt, überwiegend Lymphozyten, auf. Die Lymphsinus ließen sich in zwei Lymphknoten (Präparat 5a und 1b, vgl. Abb. 19 und 14) besonders gut abgrenzen, neben dem Randsinus kamen auch Intranodalsinus zur Darstellung, ansonsten waren offene Sinus zumindest partiell zu beobachten. Der Gewebeerhalt war insgesamt in bioptisch gewonnenen Lymphknoten im Vergleich zu autoptisch gewonnenen Lymphknoten besser.

Insgesamt korrelierte die Einzel- und Doppelfärbung der Y-FISH in fünf von dreizehn Lymphknoten, in acht Lymphknoten lagen unterschiedliche Ergebnisse vor. In der Gruppe der autoptisch gewonnenen Lymphknoten wies einer allein in der Einzelfärbung und vier allein in der Doppelfärbung Y-FISH-Sondensignale auf. In der Gruppe der bioptisch gewonnenen Lymphknoten waren alle drei in der Einzelfärbung und einer in der Doppelfärbung mit Sondensignalen. Somit war in der Gruppe der autoptisch gewonnenen Lymphknoten die Doppelfärbung und in der Gruppe der bioptisch gewonnenen Lymphknoten die Einzelfärbung überwiegend positiv. Lediglich ein autoptisch gewonnener Lymphknoten war in beiden Färbungen Y-FISH-negativ.

Die Podoplanin IH- und IF-Färbungen korrelierten gut, dabei waren mit zwei Ausnahmen in allen autoptisch und bioptisch gewonnenen Lymphknoten

Podoplanin-gefärbte Lymphsinus und perinodale Lymphgefäße oder hiläre Lymphgefäße zu beobachten. Unterschiedlich ausfallende Färberesultate lagen lediglich in zwei Lymphknoten vor (in Präparat 2a und 3a war allein in der Podoplanin-IH eine Färbereaktion zu verzeichnen bei negativem Ausfall der Podoplanin-IF), außerdem fehlte in einem Lymphknoten (Präparat 6a) in der IH und IF sowohl in den Lymphsinus als auch in perinodalen Lymphspalten eine Färbereaktion.

Ein bioptisch gewonnener Lymphknoten (Präparat 1b) hob sich in den Färbecharakteristika vor allem von den autoptisch gewonnenen Lymphknoten ab. Zum einen stellten sich hier die Lymphsinus besonders gut dar, dabei waren kapselseitig neben endothelialen SWZ auch SWZ mit relativ breiten, ovalären Kernen zu erkennen. Zum anderen war die, in autoptisch gewonnene Lymphknoten aufgelockerte und entsprechend schwächer markierte parenchymseitige Sinuswand, hier der kapselseitigen Sinuswand vergleichbar kräftig strichförmig markiert. Nur in diesem Lymphknoten stellte sich ein deutliches Podoplanin-gefärbtes intraluminales Maschenwerk aus SWZ dar, von dem sich die reichlich vorhandenen Podoplanin-negativen intrasinusoidalen Makrophagen abgrenzten.

Intranodalsinus waren in autoptisch gewonnenen Lymphknoten schwächer markiert oder eine Färbung fehlte vollständig, wohingegen sich in den bioptisch gewonnenen Lymphknoten (Präparat 1b und 2b) die Färbeintensität von Rand- und Intranodalsinus nicht unterschied.

Insgesamt war in keinem der untersuchten Lymphknoten im Lymphknotenparenchym ein Netzwerk aus FDZ zu erkennen.

Die Signalintensität der Y-FISH-Einzelfärbung war in den bioptisch gewonnenen Lymphknoten durchgehend kräftig, in autoptisch gewonnenen Lymphknoten hingegen schwach bis kräftig.

Autoptisch und bioptisch gewonnene Lymphknoten unterschieden sich in der Doppelfärbung bezüglich der Intensität der Podoplanin-Färbung und der FISH-Sondensignale nicht wesentlich voneinander. In sechs von zehn autoptisch und in einem bioptisch gewonnenen Lymphknoten waren beide Komponenten der

Doppelfärbung gleichzeitig positiv ausgefallen. Neben Y-FISH-Sondensignalen in nicht Podoplanin-markierten Zellen der Lymphknoten wurden dabei an zwei Stellen in einem inguinalen Lymphknoten (Präparat 5a) Y-FISH-Sondensignale in Zellkernen von Podoplanin-gefärbten Zellen nachgewiesen (siehe Abb. 19).

Die Ergebnisse der Färbereaktionen sind in Tabelle 6 bis 9 zusammengefasst.

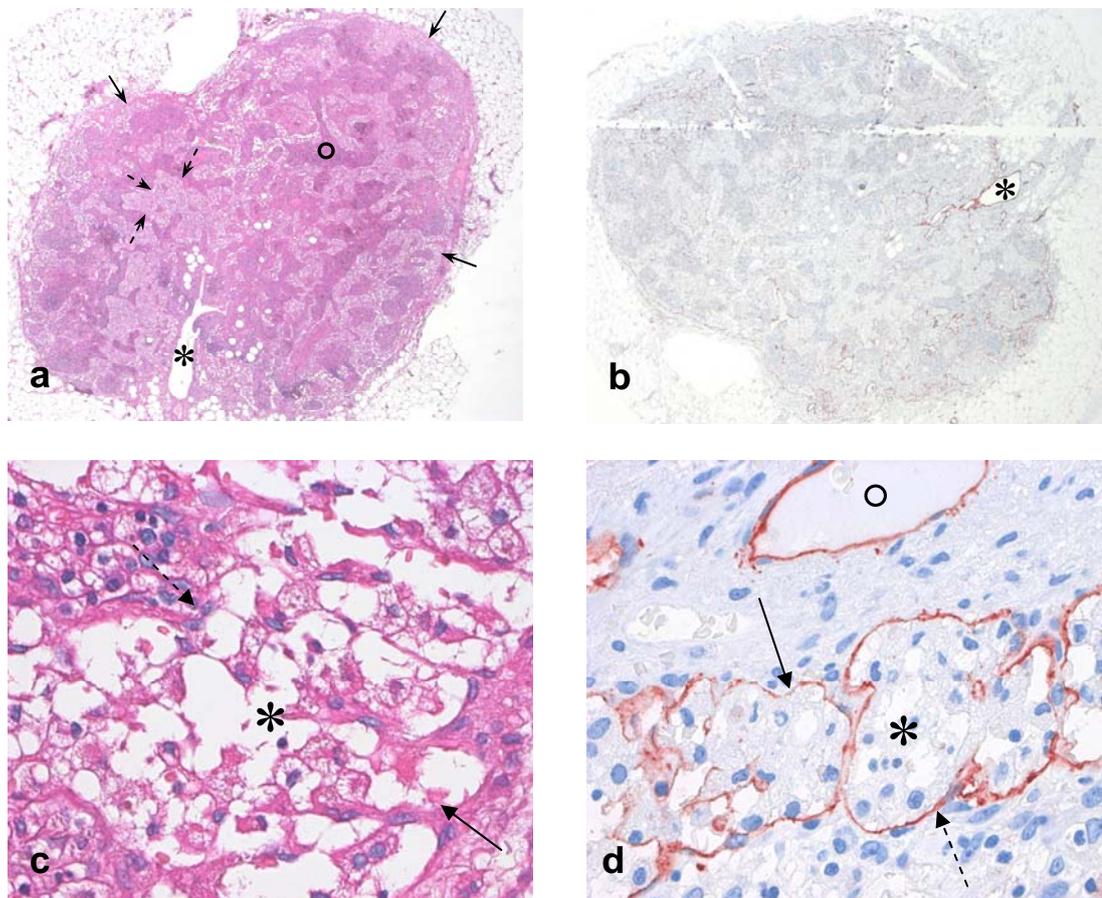


Abbildung 14 **a)** In der Übersicht eines mesenterialen Lymphknotens (Präparat 1b) in der Haematoxylin-Eosin (HE)-Färbung sind der Rand-(durchgehende Pfeile) und die Intranodalsinus (gestrichelte Pfeile) weit, das angrenzende Parenchym spärlich (Kreis). Am Hilus entspringt ein größeres Lymphgefäß (Stern). **b)** Die Podoplanin-Färbung (braun) zeichnet die Lymphsinus als auch das hiläre Lymphgefäß nach, das Parenchym ist in der Gegenfärbung (hellblau) nur schattenhaft zu erkennen. **c)** Der Randsinus (Stern) ist sowohl unter der Lymphknotenkapsel (durchgehender Pfeil) als auch parenchymseitig (gestrichelter Pfeil) deutlich begrenzt. **d)** Dieser Lymphknoten zeigt das insgesamt vollständigste Färbeergebnis, sowohl die kapselseitige als auch parenchymseitige Sinuswand werden strichförmig dargestellt und Podoplanin-gefärbte SWZ durchziehen maschenwerkartig das Sinuslumen. Neben dem Randsinus ist eine perinodale Lymphspalte Podoplanin-gefärbt (Kreis) (Vergrößerung a) und b) 25x, c) und d) 630x).

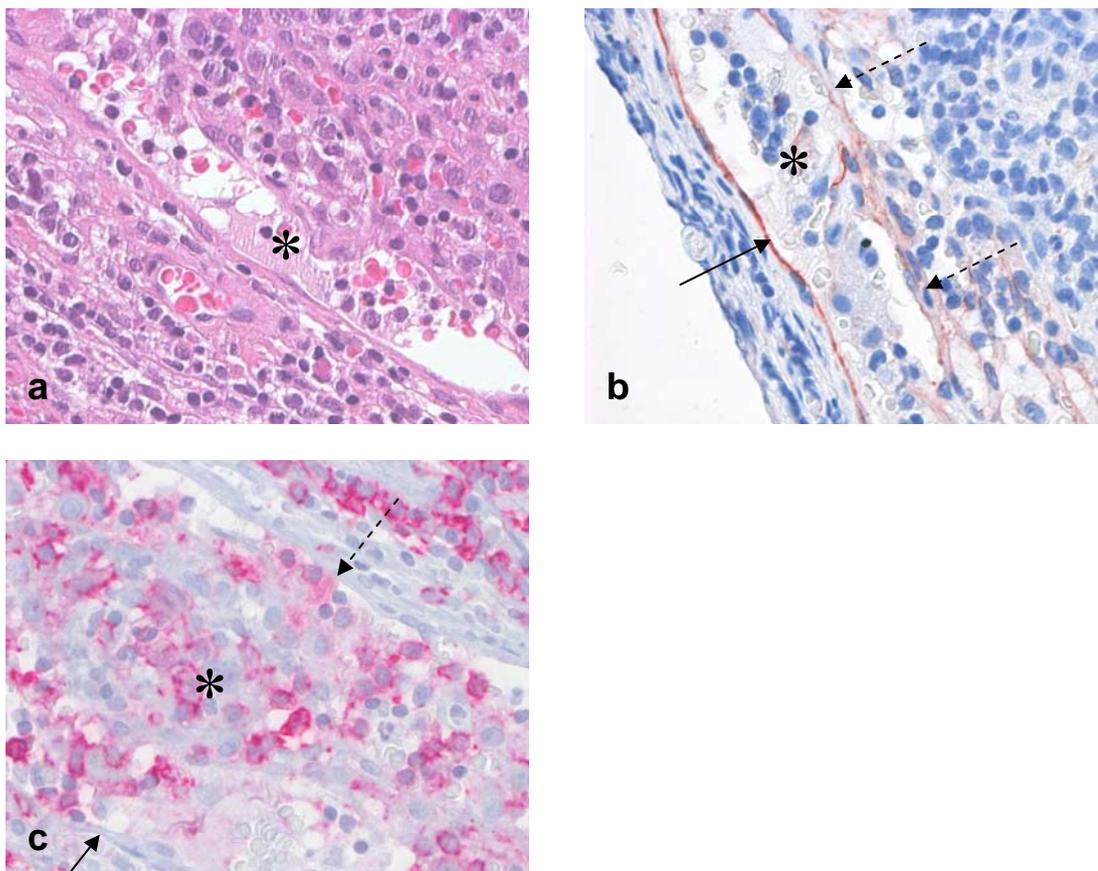


Abbildung 15 **a**) In einem zervikalen Lymphknoten (Präparat 3b) ist der Randsinus (Stern) schmal (HE-Färbung). **b**) Podoplanin färbt die kapselseitige Sinuswand des Randsinus (Stern) kräftig und strichförmig an (durchgehender Pfeil), die parenchymseitige Sinuswand ist schwach und diskontinuierlich Podoplanin-gefärbt (gestrichelter Pfeil). Die kapselseitigen SWZ sind langgezogen und flach und ähneln damit Gefäßendothelien, die parenchymseitigen SWZ bilden keine durchgehende Zelllage. **c**) Es liegt eine Lymphominfiltration des Lymphknotens vor, die Lymphomzellen färben sich mit einem Antikörper gegen das Antigen CD20 an (rot), sie infiltrieren den Randsinus (Stern, Pfeile siehe d)) (Vergrößerung c)-e) 630x).

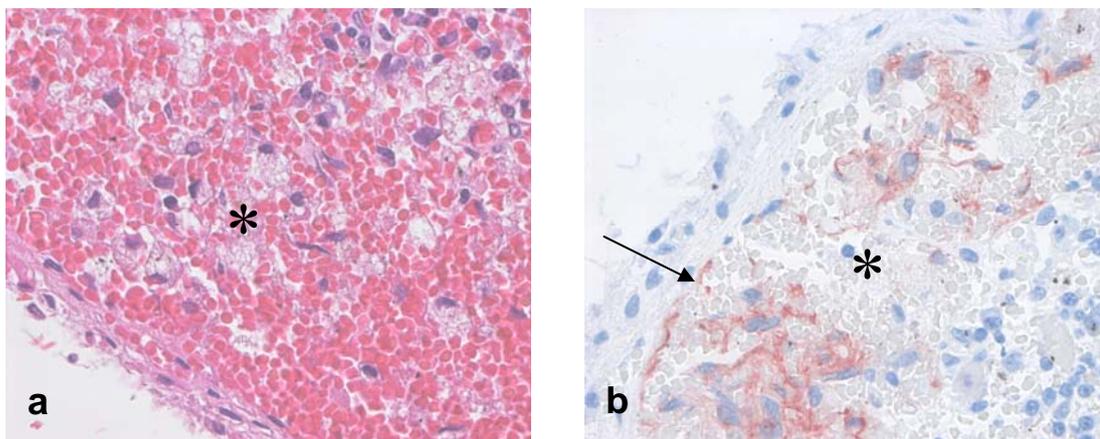


Abbildung 16 **a**) In einem tracheobifurkalen Lymphknoten (Präparat 8a) ist der Randsinus (Stern) durch Erythrozyten angefüllt (rot) (HE-Färbung). **b**) Im Randsinus (Stern) sind zahlreiche Podoplanin-gefärbte intrasinusoidale SWZ zu beobachten (braun), die Erythrozyten sind schattenhaft zu erkennen. Stellenweise ist ebenfalls die kapselseitige Sinuswand durch Podoplanin schwach angefärbt (Pfeil) (Vergrößerung a) und b) 630x).

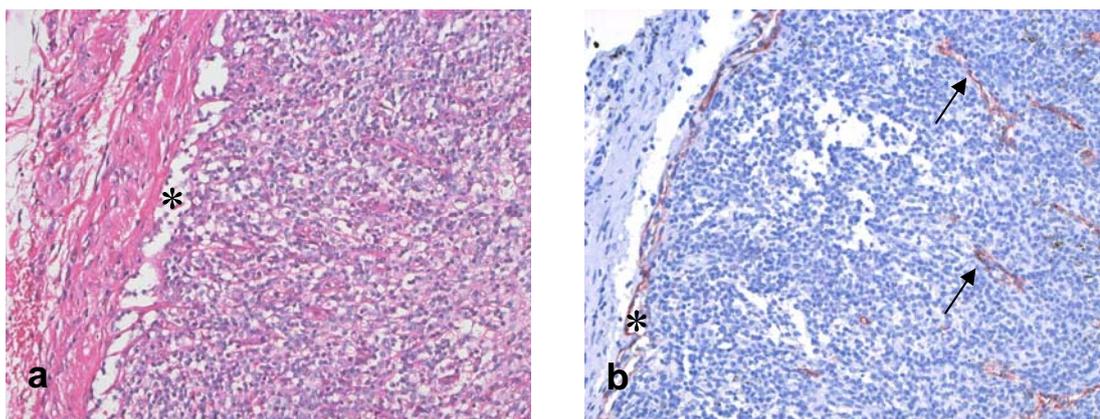


Abbildung 17 **a**) In einem pulmonalen Lymphknoten (Präparat 2b) sind neben dem Randsinus (Stern) in der HE-Färbung offene intranodale Sinus nicht eindeutig zu erkennen, **b**) die Podoplanin-Markierung hebt schmale, überwiegend kollabierte Intranodalsinus deutlich hervor (Pfeile) (Vergrößerung a) und b) 200x).

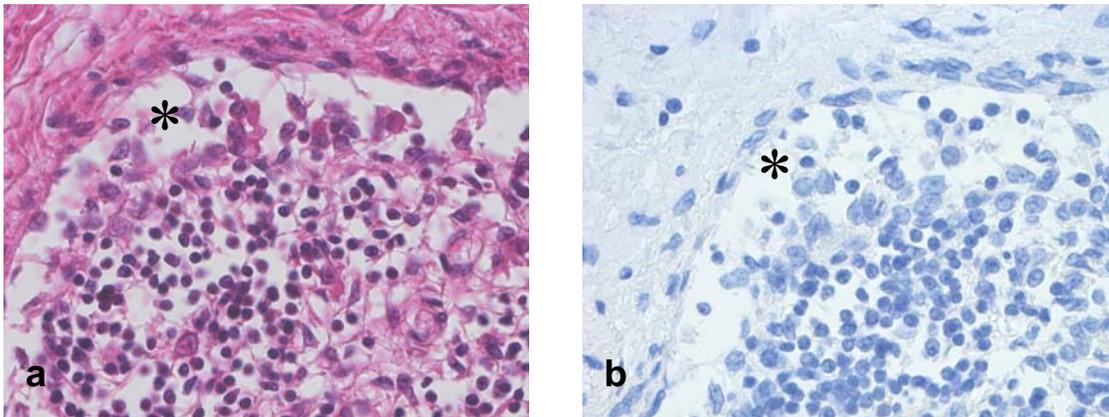


Abbildung 18 **a**) In einem axillären Lymphknoten (Präparat 10a) besteht eine Infiltration durch eine ALL, das Infiltrat ist in der HE-Färbung nicht von den lymphatischen Zellen zu unterscheiden. **b**) Die Podoplanin-Markierung des Randsinus (Stern) ist in diesem Präparat negativ ausgefallen (Vergrößerung a) und b) 630x).

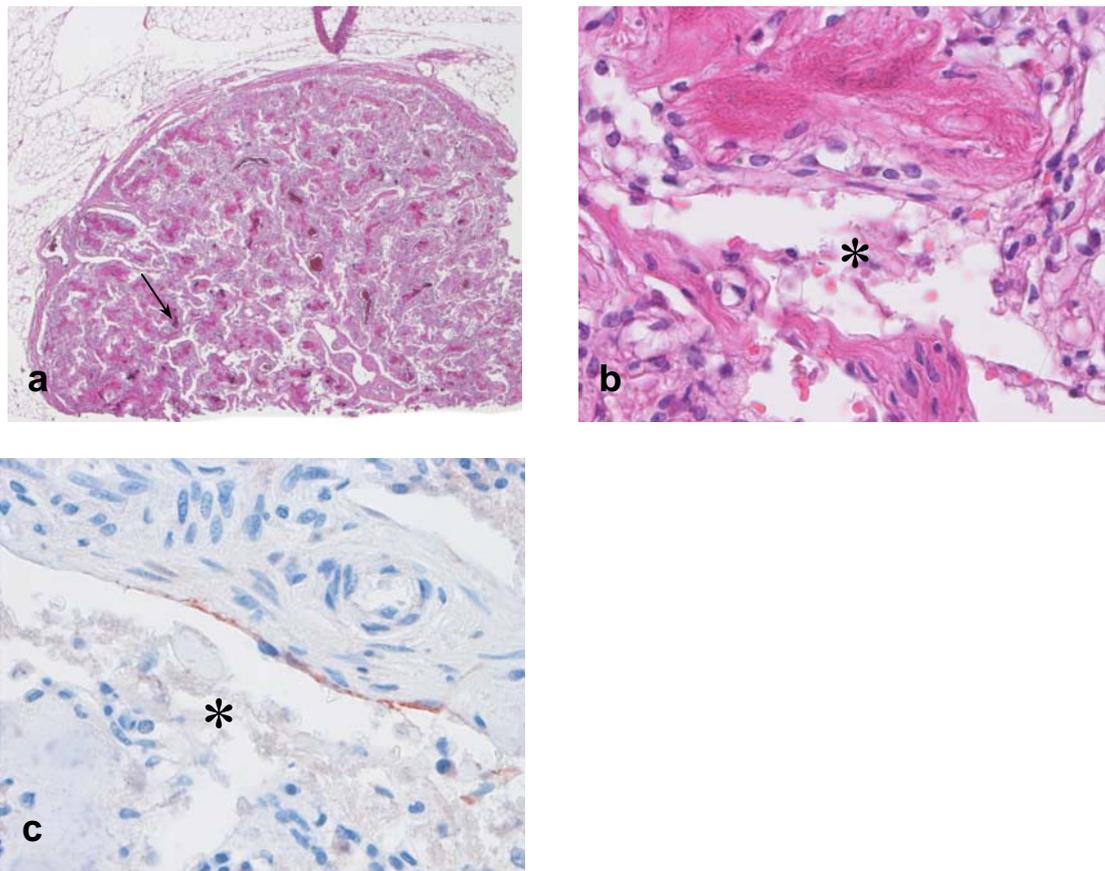
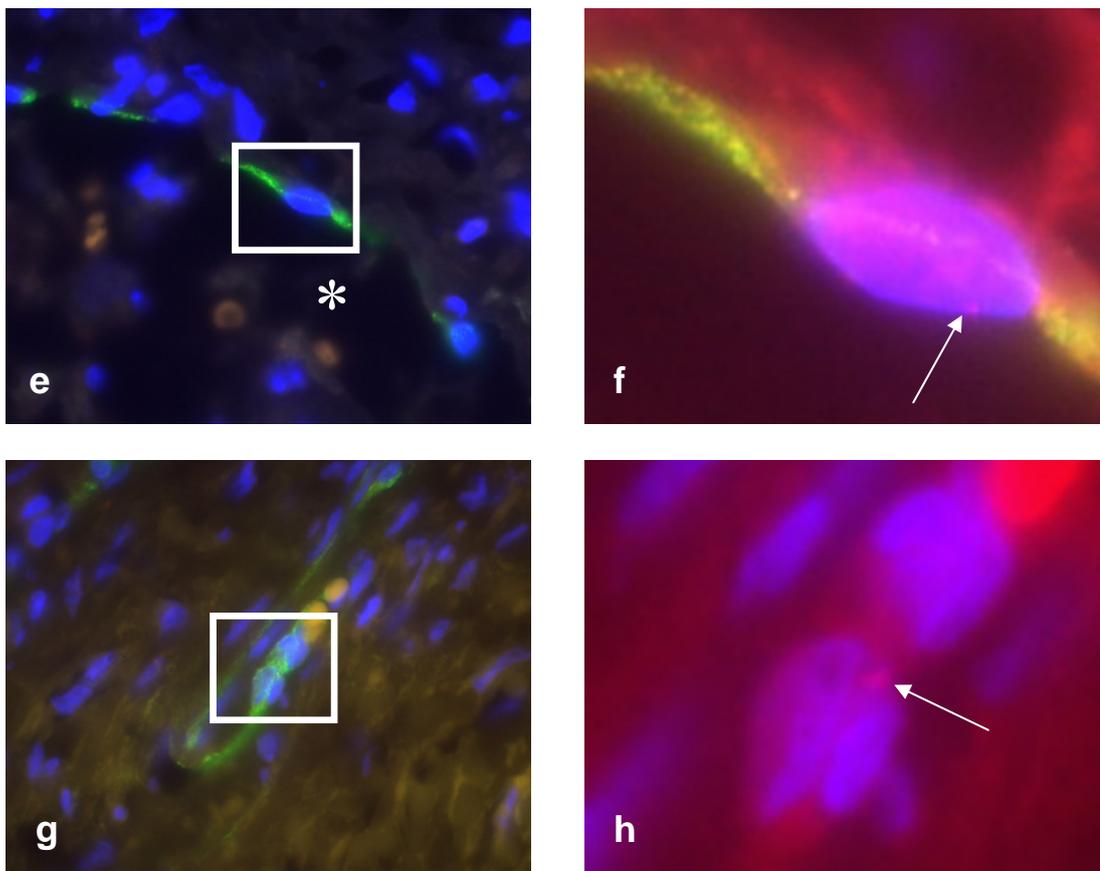


Abbildung 19 **a**) In der konventionellen Histologie (Haematoxylin-Eosin-Färbung) weist ein inguinaler Lymphknoten (Präparat 5 **a**) einen geringen Gehalt an lymphatischen Zellen auf, multifokal sind kleinherdige Verkalkungen zu erkennen (Pfeil). **b**) Ein Intranodalsinus (Stern) ist zu beobachten, **c**) Podoplanin färbt hier die Sinuswand abschnittsweise strichförmig an (Vergrößerung **a**) 25x, **b**) und **c**) 630x).



*e)* In diesem Lymphknoten (Präparat 5 a) wurde in der Doppelfärbung in einem korrespondierenden Areal ein Chimärismus in SWZ beobachtet. In der Überlagerung des Grün- (Podoplanin) und Blau-Kanals (Kernfärbung) stellen sich Podoplanin-gefärbten SWZ in der Wand eines Lymphsinus (Stern) dar, *f)* in der Überlagerung mit dem Rot-Kanal (Y-FISH) ist in der Vergrößerung in einem DAPI-gefärbten Zellkern ein typischerweise wandständig gelegenes Y-FISH-Sondensignal zu beobachten. *g)* In einem anderen Areal desselben Lymphknotens sind wiederum Podoplanin-gefärbte SWZ zu erkennen, *h)* in der Vergrößerung ist ein weiteres Y-FISH-Sondensignal in einem DAPI-gefärbten Zellkern zu beobachten (die Grün- überstrahlte die Rot-Fluoreszenz und ist deswegen in *h)* nicht dargestellt). (Vergrößerung *e)* und *g)* 630x).

Tabelle 5: Ergebnisse der Färbereaktionen von autoptisch gewonnenen Lymphknoten. ALL: akute lymphatische Leukämie, NHL: Non-Hodgkin-Lymphom, n=nein, j=ja.

Nr.	Lymphknoten	Größe[mm <sup>2</sup> ]	Gehalt an lymphatischen Zellen	Pathologie der Lymphknoten	Identifikation von		
					Randsinus	Intranodalsinus	Hilären Lymphgefäßen
1a	paraaortal	81	+++		+	+	n
2a	mesenterial	26	+		++	++	j
3a	hepatohilär	14	++		+	+	n
4a	tracheobifurkal	11	+	Anthrakose, Fibrose	+	+	n
5a	inguinal	9	+	Kalzifikationen	+++	+++	j
6a	inguinal		+		+	+	
7a	tracheobifurkal	132	++	Anthrakose	+	+	n
8a	tracheobifurkal	81	++	Anthrakose, Sinushämorrhagie	+	+	j
9a	inguinal	8	+		++	-	n
10a	axillär	42	+++	Infiltration durch ALL	+++	-	n

Tabelle 6: Ergebnisse der Färbereaktionen von bioptisch gewonnenen Lymphknoten. Legende siehe Tabelle 5.

Nr.	Lymphknoten	Größe[mm <sup>2</sup> ]	Gehalt an lymphatischen Zellen	Pathologie der Lymphknoten	Identifikation von		
					Randsinus	Intranodalsinus	hilären Lymphgefäßen
1b	mesenterial	13	+		+++	+++	j
2b	pulmonal	169	+	Sinushistiozytose	+	+	n
3b	zervikal	144	+	Infiltration durch NHL	+	-	n

Tabelle 7: Ergebnisse der Färbereaktionen von autoptisch gewonnenen Lymphknoten. e: Einzelfärbung, d: Doppelfärbung.

<b>Nr. Lymphknoten</b>	<b>Y-FISH e</b>	<b>Y-FISH d</b>	<b>Pod-IF d</b>	<b>Pod-IH e</b>
1a paraaortal	+	+	+	+
2a mesenterial	+	-	-	+
3a hepatohilär	-	-	+	+
4a tracheobifurkal	+	+	+	++
5a inguinal	-	+	++	++
6a inguinal	-	+	-	-
7a tracheobifurkal	-	+	+	+
8a tracheobifurkal	+	+	+	+
9a inguinal	++	+	+	+
10a axillär	-	+	-	-

Tabelle 8: Ergebnisse der Färbereaktionen von bioptisch gewonnenen Lymphknoten. Legende siehe Tabelle 7.

<b>Nr.Lymphknoten</b>	<b>Y-FISH e</b>	<b>Y-FISH d</b>	<b>Pod-IF d</b>	<b>Pod-IH e</b>
1b mesenterial	++	-	+	++
2b pulmonal	++	+	++	++
3b zervikal	++	-	-	++

## 6 Diskussion

### *Methodische Aspekte*

Für eine Doppelfärbung an Formalin-fixiertem Paraffinmaterial müssen die Färbeprotokolle der Einzelfärbungen arbeitsintensiv angepasst werden (58). Das Gewebe muss entparaffiniert und die Quervernetzung durch Formalin aufgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit versagte eine kommerziell erwerbliche FISH-Sonde in der Doppelfärbung und deshalb musste eine Sonde eigens generiert werden. Trotz dieser Schwierigkeiten konnten wir eine simultane Podoplanin-IF und Y-FISH an Formalin-fixiertem Paraffinmaterial etablieren. Eine solche Doppelfärbung an Lymphknotenpräparaten wurde bisher in der einschlägigen Literatur nicht beschrieben.

Aus vorhergehenden Untersuchungen hatten wir die Erfahrung gemacht, dass die eigens hergestellte Sonde erfahrungsgemäß schwache, feine Sondersignale liefert; die Y-FISH-Einzel- und Doppelfärbung unterschieden sich daher deutlich in der Intensität und Qualität der Sondersignale. Infolge dessen war die Doppelfärbung schwierig auszuwerten, zum einen in der Detektion der Sondersignale gegenüber der unspezifischen Hintergrundfärbung und zum anderen in der Fotodokumentation, bei der begrenzten Bildauflösung der Digitalkamera.

Bei Auswertung der Färbungen durch einen erfahrenen Untersucher wichen die Ergebnisse für die Y-FISH-Sondersignale (Signale vorhanden oder fehlend) in den jeweils korrespondierenden Einzel- und Doppelfärbungen in sieben Fällen voneinander ab.

So wiesen ein autoptisch bzw. zwei bioptisch gewonnene Lymphknoten allein in der Einzelfärbung Sondersignale auf, die Doppelfärbung war ohne Signale. Weiterhin zeigten vier autoptisch gewonnene Lymphknoten allein in der Doppelfärbung Sondersignale, in diesen Fällen war die Einzelfärbung ohne Signale. Wahrscheinlich hybridisierte die FISH-Sonde in diesen Fällen nicht mit der Zielsequenz. Außerdem stellte die Doppelfärbung ein Novum dar und war erst nach mehrfachen optimierten Versuchsreihen auswertbar.

In einem autoptisch gewonnenen Lymphknoten (Präparat 3a) konnte weder in der Y-FISH- Einzelfärbung noch in der Doppelfärbung ein lymphatischer Chimärismus nachgewiesen werden. Möglicherweise konnte ein Chimärismus aufgrund einer „abortiven“ Population der Lymphknoten durch persistierende und proliferierende Lymphozyten des Empfängers, wie in bestrahlten Lymphknoten ohne folgende SZT beschrieben, nicht nachgewiesen werden (20). Klinischerseits wurde ein Transplantatversagen bei dieser Patientin aber ausgeschlossen, in Folge dessen wurden die peripheren lymphatischen Gewebe wahrscheinlich durch lymphatische Spenderzellen und nicht durch residuelle proliferierende Lymphozyten des Empfängers repopuliert. Abschließend kann hier eine ausbleibende Hybridisierung der FISH-Sonde in beiden Färbungen, bei womöglich schlechtem Erhaltungszustand der Ziel-DNA, eine komplett negativ ausgefallene Y-FISH-Untersuchung in diesem Präparat bedingt haben.

Zusammenfassend waren somit in neun von zehn autoptisch gewonnenen Lymphknoten und in allen drei bioptisch gewonnenen Lymphknoten chimäre Zellen vorhanden und Spenderzellen repopulierten demnach nachweislich die Lymphknoten.

In der Podoplanin-IF der Doppelfärbung waren je ein autoptisch und ein bioptisch gewonnener Lymphknoten ohne Färbereaktion bei erfolgreichem Nachweis von SWZ in der entsprechenden Podoplanin-IH, was u.a. möglicherweise auf eine ausbleibende Antikörperbindung in diesen Präparaten aufgrund der bekanntermaßen empfindlicheren und daher anfälligeren IF-Methode zurückzuführen war (53).

In beiden Methoden (Podoplanin-IH noch -IF) färbten sich die SWZ in zwei autoptisch gewonnenen Lymphknoten (Präparat 6a und 10a) nicht an. Darunter war ein axillärer Lymphknoten (Präparat 10a), 3 ¼ Monate nach SZT gewonnen, durch ein leukämisches Rezidiv infiltriert. SWZ können aber durchaus in neoplastisch infiltrierten Lymphknoten nachgewiesen werden, wie die positive Podoplanin-Färbung in einem zervikalen bioptisch gewonnenen Lymphknoten (Präparat 3b) mit Infiltration durch ein NHL aufzeigt. Somit waren wohl auch in dem besagten Lymphknoten die SWZ existent, aber die Inkubation mit den verschiedenen

Antikörpern führte zu keiner Bindung oder die antigenen Epitope waren zu schlecht erhalten.

Zusammenfassend war in der Podoplanin-IH und/oder -IF in acht von zehn autoptisch und in allen drei bioptisch gewonnenen Lymphknoten eine positive Färbereaktion in SWZ und perinodalen Lymphspalten zu verzeichnen. Dabei waren alle morphologisch identifizierbaren Blutgefäße unmarkiert und intrasinusoidale Zellen wie Makrophagen und Lymphozyten ebenfalls negativ, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen verschiedener anderer Arbeiten zur Expression von Podoplanin in Lymphknoten (46,10,51,85,86).

VEGFR-3 als auch Podoplanin markieren bekanntlich sowohl SWZ als auch FDZ (10,11,47,72), ein voll ausgeprägtes Netzwerk aus FDZ wurde an dem vorliegenden Kollektiv jedoch zu keinem Zeitpunkt erkannt, möglicherweise sind dabei einzelne FDZ dem Nachweis durch Podoplanin entgangen.

Erwartungsgemäß war der Erhaltungszustand der autoptisch gewonnenen Lymphknoten schlechter als der bioptisch gewonnenen. Dies liegt überwiegend an der sofort nach Ableben einsetzenden Autolyse, die in den inneren Organen meist unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Die proteasenreiche Lymphe führt möglicherweise postmortal zu einer akzentuierten Autolyse in Lymphknoten, diese kann zu einer Schädigung der Epitope oder einem Verlust des Transmembranproteins Podoplanin in SWZ und zugleich in perinodalen Lymphgefäßspalten führen.

Damit unterschieden sich die Färbeergebnisse eher aufgrund einer unterschiedlich starken Autolyse des Lymphknotengewebes.

Es erschien daher nahe liegend, die Färbeergebnisse in Hinblick auf den Zeitraum vom Zeitpunkt des Todes bis zur Autopsie zu untersuchen. Die Färberesultate von ein bis zwei und drei bis vier Tage nach Exitus gewonnenen Lymphknoten unterschieden sich nicht erkennbar in der Intensität der Färbungen. Dies widerspricht nicht grundsätzlich dem Einfluss der Autolyse, allerdings sind dabei die den Gewebeerfall beeinflussenden Faktoren zahlreich und lassen sich im Einzelnen nicht trennen.

Der Gewebeerhalt wird durch die Fixation mitbestimmt und eine rasche und gleichmäßige Fixation garantiert morphologisch gut erhaltenes Gewebe. Autoptisch gewonnenes Material ist meist länger fixiert und muss für die FISH dementsprechend länger permeabilisiert werden (Proteinasenverdau), was sich wiederum negativ auf das Färbeergebnis auswirken kann. Aus diesem Grund lieferten möglicherweise die grundsätzlich kürzer fixierten bioptisch gewonnenen Lymphknoten bessere Färberesultate. Hier kommt hinzu, dass der Rand von großen Lymphknoten besser und schneller fixiert wird als das Zentrum und daher färbten sich hiläre Lymphgefäße und perinodale Lymphspalten im Vergleich zu den SWZ der Lymphsinus (betont in autoptisch gewonnenen Lymphknoten) kräftiger an.

Unterschiedlich gut erhaltene und fixierte Präparate können bei der in Serie vorgenommenen Aufarbeitung der Präparate im Labor ein unterschiedliches Färbeergebnis erzielen, zumal eine individuelle Anpassung der Laborparameter an jedes einzelne Präparat angesichts des erforderlichen Aufwandes nicht möglich ist.

Neben den färberischen Unterschieden zwischen autoptisch und bioptisch gewonnenen Lymphknoten war das Färbeergebnis innerhalb beider Gruppen nicht einheitlich. Dabei fiel in der Gruppe der bioptisch gewonnenen Lymphknoten eine Diskrepanz zwischen der kräftigen immunhistologischen Podoplanin-Markierung in allen, und der in einem bioptisch gewonnenen Lymphknoten kräftig ausfallenden Podoplanin-IF auf. Diese kann nicht nur durch den Gewebeerhalt sondern auch durch Schwierigkeiten in der durchzuführenden Doppelfärbung mit arbeitsintensiven Anpassungen der Laborprotokolle erklärt werden, denn eine Kombination aus FISH und IF stellt höhere Anforderungen an die Protokollanpassungen als eine IH-Einzelfärbung.

#### *Die Feinstruktur der Sinuswand*

In allen Podoplanin-gefärbten autoptisch gewonnenen Lymphknoten wurden der Randsinus und nur spärlich die Intranodalsinus dargestellt. Die kapselseitige Wand des Randsinus mit langgezogenen flachen SWZ war kräftiger und durchgehender markiert als die unscharf abgrenzbare und schwach gefärbte parenchymseitige

Sinuswand. Eine Erklärung bietet die verschiedene Feinstruktur der unterschiedlichen Sinuswandabschnitte.

Kapselseitig kleiden langgezogene, von Wacker als „endotheliale“ SWZ bezeichnete, und in den übrigen Sinusabschnitten organellenreichere Zellen mit breiterem Zytoplasma die Sinus aus (96). Die endothelähnliche Gestalt der kapselseitigen Zellen könnte vermuten lassen, dass es sich nicht um SWZ sondern um die endotheliale Auskleidung der afferenten, in den Randsinus mündenden Lymphgefäße handelte, welche sich in denselben fortsetzte, und sich dieser kapselseitig deswegen besonders intensiv mit Podoplanin anfärbt. Dem widersprechen allerdings die Ergebnisse von Wacker, der endotheliale und „breitzytoplasmatische“ Zellen als unterschiedliche Erscheinungsform desselben Zelltyps, nämlich der SWZ, betrachtet (96). Andererseits könnten diese histomorphologisch distinkten Erscheinungsformen der SWZ unterschiedlich stark Podoplanin exprimieren, mit demzufolge unterschiedlichem Färbereultat, hierzu haben allerdings bisher keine Ergebnisse vorgelegen.

Daneben durchtreten Entzündungszellen die Sinuswand und daher erscheint die parenchymseitige Sinuswand des Randsinus und vor allem der Intranodalsinus „gefenstert“ (14,15,18,29,31,32,63,69,81). Dies würde erklären, weshalb sich die parenchymseitige, im Vergleich zu der kontinuierlichen kapselseitigen Sinuswand und nicht-gefensterten perinodalen Lymphgefäßspalten, weniger intensiv mit Podoplanin anfärbte. Dementgegen färbten sich in einem bioptisch gewonnenen Lymphknoten (Präparat 1b) der Rand- und Intermediärsinus sowie die kapsel- und parenchymseitige Wand des Randsinus vergleichbar intensiv mit Podoplanin an, die einheitliche Intensität der Färbereaktion war hier vermutlich am ehesten auf den besonders guten Erhaltungszustand zurückzuführen.

#### *Konditionierung, Transplantation und Verlauf*

Bezüglich der Konditionierung (Radiochemotherapie oder Chemotherapie), der Art der Transplantation (KMT oder PBSZT) oder dem Auftreten einer GvHD nach Transplantation waren keine prinzipiellen Unterschiede im Nachweis von SWZ oder

dem Gehalt an lymphatischen Zellen zu erkennen und bei begrenzter Fallzahl nicht interpretierbar.

#### *Chimärismus in Sinuswandzellen*

Um SWZ auf einen Chimärismus nach allogener SZT hin zu untersuchen, wurden in einer Doppelfärbung die SWZ phäno- und allotypisch dargestellt. Hierbei wurden in einem autoptisch gewonnenen Lymphknoten Y-FISH-Sondensignale in zwei Podoplanin-reaktiven Zellen beobachtet. Der Allotyp dieser SWZ scheint auf den ersten Blick erwiesen und der Nachweis eines Chimärismus in SWZ erbracht zu sein. In Chimärismusstudien an Gefäßendothelien ist aber ein Übertritt von Entzündungszellen durch die Gefäßwand nicht außer Acht zu lassen (4,5,52). Ebenso wie die Gefäßendothelien stehen die SWZ in engem Kontakt mit Lymphozyten und Makrophagen, die den Zelleib der SWZ durchwandern (Emperipolese) oder durch Lücken zwischen den SWZ in die Lymphsinus übertreten (Diapedese). Mehrere Argumente sprechen dafür, dass es sich bei den in der Doppelfärbung beobachteten chimären Zellen in der Sinuswand nicht um in Diapedese oder Emperipolese befindliche lymphatische Zellen des Spenders handelt. Zum einen war die Podoplanin-Markierung in dem untersuchten Lymphknoten (Präparat 5a) linear und kontinuierlich und in korrespondierenden Arealen in der konventionellen Lichtmikroskopie war die Sinuswand nicht gefenstert, ein extensiver Übertritt von Entzündungszellen war folglich nicht zu konstatieren. Zum anderen spricht auch die Kernmorphologie der chimären Zellen mit oval-eckigen Zellkernen, im Gegensatz zu den typischerweise kleinen runden Zellkernen der reifen Lymphozyten oder den größeren, gebuchteten Zellkernen der Makrophagen/Monozyten, für SWZ. In einem untersuchten bioptisch gewonnenen Lymphknoten (Präparat 1b) bestand eine Sinushistiozytose, dabei waren die intrasinusoidalen Makrophagen aufgrund ihrer Größe von den SWZ zu unterscheiden und die Assoziation von Makrophagen und SWZ beeinträchtigte nicht die Untersuchung auf Chimärismus in SWZ.

Somit sind die in der Doppelfärbung vereinzelt beobachteten chimären Zellen also nicht als chimäre Lymphozyten oder Makrophagen sondern als Hinweis auf einen Chimärismus in SWZ zu werten. Da wenige Lymphknoten auswertbar waren und

sich die Lymphsinus partiell mit Podoplanin färbten, waren auswertbare SWZ in begrenzter Anzahl vorhanden und das tatsächliche Ausmaß eines Chimärimus in SWZ ließ sich nicht eindeutig bestimmen.

#### *Stammzelle der SWZ*

Dies und die enge Verwandtschaft zu den FDZ (90,96,97,98), für die bereits ein Ursprung aus dem Knochenmark aufgezeigt worden ist (50,91), deutet auf eine Stammzelle im Knochenmark hin; der Typ an Stamm- bzw. Vorläuferzelle bleibt aber prinzipiell offen, denn das Knochenmark ist Reservoir verschiedener Stammzelltypen (78).

Die histogenetische Einordnung der SWZ als dendritische, immunakzessorische Zellen, welche bekanntlich von Monozyten abstammen (49) lässt allerdings auf die Natur der Stammzelle schließen, weil es sich demnach um die pluripotente hämatopoietische, bis heute nicht identifizierte, Knochenmarksstammzelle bzw. ein Abkömmling derselben handelt.

Neben der Hypothese des myelomonozytären Ursprungs ist auch eine stromale Stammzelle als Ursprung der SWZ zu diskutieren, zumal eine solche auch für FDZ diskutiert aber nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte (91).

In der IH und IF waren SWZ früh und im Langzeitverlauf (bis 54  $\frac{3}{4}$  Monate) nach allogener KMT nachweisbar, d.h. SWZ des Empfängers persistieren oder SWZ werden nach Konditionierung eliminiert und durch persistierende stromale Stammzellen des Empfängers oder allogene hämatopoetische Stammzellen des Spenders relativ rasch regeneriert.

#### *Radio-und Chemoresistenz der SWZ und Zellumsatz*

Um diese Hypothesen beantworten zu können, müssen die Effekte einer Bestrahlung und Chemotherapie auf die SWZ und ihre Stammzellen, d.h. die Frage einer Persistenz nach Konditionierung und die Regenerationsrate der SWZ betrachtet werden.

Nach Durchsicht der einschlägigen Literatur ist das Schicksal von SWZ nach Bestrahlung bisher nicht beschrieben worden. Zu anderen dendritischen Zelltypen

existieren Untersuchungen, denen zufolge die den SWZ verwandten FDZ wahrscheinlich radioresistent sind (44,50).

Zudem ist neben einer Radio- vermutlich auch von einer Chemoresistenz der SWZ auszugehen (59); die SWZ werden somit nach konventioneller Konditionierung wahrscheinlich nicht destruiert und persistieren. Sie sind aber anscheinend keine langlebigen Zellen, denn die SWZ wurden im Parabioseversuch von Wacker und nach Gabe von Cyclophosphamid innerhalb weniger Tage bzw. einer Woche regeneriert (59,96).

Ihre vermutlichen Vorläuferzellen hingegen, die Monozyten des peripheren Blutes, sind ebenso wie ihre hämatopoietischen Stammzellen nicht radioresistent (12). Unter der Annahme einer stromalen Stammzelle ist es anders, denn mesenchymale Knochenmarksstammzellen werden als relativ radioresistent betrachtet (13) und würden daher nach Konditionierung persistieren, zu einem Chimärismus in mesenchymalen Stammzellen nach allogener SZT liegen allerdings gegensätzliche Resultate vor (77,95).

#### *Schlussfolgerung*

In Zusammenschau der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde und der Ergebnisse der angeführten Literatur kommt also in erster Linie eine hämatopoietische Stammzelle als Vorläufer der SWZ in Frage, welche sich monozytär/dendritisch differenziert und SWZ regeneriert. Für das Schicksal von SWZ nach allogener SZT ist dabei anzunehmen, dass SWZ nach Konditionierung persistieren, hämatopoietische, strahlensensible Stammzellen des Empfängers aber bekanntermaßen nach Konditionierung eliminiert werden und hämatopoietische Stammzellen des Spenders somit nach SZT weitgehend „konkurrenzlos“ alle abstammenden Zelllinien, also auch die SWZ, regenerieren, hierfür spricht der in dieser Arbeit in einzelnen SWZ nachgewiesene Chimärismus.

## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Lymphknoten von weiblichen Patientinnen, die eine allogene gegengeschlechtliche SZT erhalten hatten, auf einen Chimärismus in den Geschlechtschromosomen (sex-mismatch) in SWZ untersucht. Damit knüpft die vorliegende Arbeit an Untersuchungen auf Chimärismus nach allogener SZT von im peripheren Blut zirkulierenden dendritischen Zellen an und erfüllt das Desiderat einer entsprechenden Studie an dendritischen Zellen im Gewebe (in situ).

Sinuswandzellen (SWZ) kleiden die luminale Sinuswand der Lymphknotensinus aus und bilden ein Maschenwerk in den Sinus. SWZ sind in älteren Arbeiten als in luminale Position gewanderte Retikulumzellen der Lymphknoten angesehen worden. Wacker hat die SWZ, vor allem wegen ihrer Verwandtschaft zu follikulären dendritischen Zellen (FDZ) als dendritische, immunakzessorische Zellen der humoralen Immunantwort klassifiziert. Nach Übertragung markierter mononukleärer Zellen des peripheren Blutes hat Wacker bereits Stunden danach markierte SWZ identifiziert und daraus abgeleitet, dass SWZ Abkömmlinge monozytärer (hämatopoietischer) Vorläuferzellen sind.

Ausgehend von dieser Hypothese sollte die vorliegende Untersuchung klären, ob Stammzellen aus dem Knochenmark in SWZ differenzieren bzw. SWZ regenerieren können.

Dazu wurden retrospektiv zehn Lymphknoten unterschiedlicher Lokalisation von  $\frac{1}{4}$  bis  $54 \frac{3}{4}$  Monate nach allogener, gegengeschlechtlicher SZT verstorbenen Patientinnen und drei bioptisch gewonnene Lymphknoten auf einen Chimärismus in SWZ untersucht. Zu diesem Zweck wurde an den archivierten, Paraffin-eingebetteten Lymphknoten eine Doppelfärbung mit einer Y-FISH zum Nachweis von Abkömmlingen von Knochenmarkszellen des Spenders und einer Podoplanin-Immunfluoreszenz zur Darstellung der SWZ und FDZ vorgenommen.

In Übereinstimmung mit bereits vorliegenden Arbeiten zur Morphologie und Regeneration von Lymphknoten nach SZT fand sich in den Lymphknoten ein geringer Gehalt an lymphatischen Zellen, mit längerem Überleben nahm der Gehalt

an lymphatischen Zellen zu, dabei wurden die Lymphknoten nachweislich durch Spenderzellen repopuliert.

SWZ waren in 11 von 13 Lymphknoten ab eine Woche nach allogener SZT nachweisbar, ein voll ausgebildetes Netzwerk aus FDZ zu keinem Zeitpunkt. In einem untersuchten inguinalen Lymphknoten (Präparat 5a) waren  $\frac{3}{4}$  Monate nach allogener SZT in verschiedenen Arealen einzelne chimäre SWZ zu erkennen.

Somit können chimäre dendritische Zellen nach allogener SZT nicht nur im peripheren Blut und in der Haut (Langerhans-Zellen) sondern auch als SWZ der Lymphknoten nachgewiesen werden.

Dabei ist der Nachweis chimärer SWZ nach allogener SZT als Hinweis auf eine Vorläuferzelle im Knochenmark zu werten, wobei die Einordnung der SWZ als von Monozyten abstammende, dendritische Zellen auf eine hämatopoietische Stammzelle hindeutet.

Anders als ihre Stamm- und Vorläuferzellen sind SWZ möglicherweise radio- und chemoresistent, persistieren daher zunächst nach Konditionierung und werden dann aber durch dem Spender-Knochenmark entstammende hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen regeneriert.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralt S, Mackinnon S, Spitzer T, Weisdorf D (2001) Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 7(9), 473-85.
2. Aschoff L (1924) Das reticuloendotheliale System. *Ergeb Inn Med Kinderheilkd* 26, 1-118.
3. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T (2005) How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant* 35(2), 107-19.
4. Bailey AS, Jiang S, Afentoulis M, Baumann CI, Schroeder DA, Olson SB, Wong MH, Fleming WH (2004) Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood* 103(1), 13-9.
5. Bailey AS, Willenbring H, Jiang S, Anderson DA, Schroeder DA, Wong MH, Grompe M, Fleming WH (2006) Myeloid lineage progenitors give rise to vascular endothelium. *Proc Nat Acad Sci USA* 103(35), 12959-60.
6. Bailey R, Weiss L (1975) Ontogeny of Human Fetal Lymph Nodes. *Am J Anat* 142, 15-28.
7. Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M, Jackson DG (1999) LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 144(4), 789-801.
8. Boeck S, Hamann M, Pihusch V, Heller T, Diem H, Rolf B, Pihusch R, Kolb H-J, Pihusch M (2006) Kinetics of dendritic cell chimerism and T cell chimerism in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Bone Marrow Transplant* 37, 57-64.

9. Boeck S. Chimärismus dendritischer Zellen im peripheren Blut bei Patienten nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation. Medizinische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2005.
10. Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D (1997) Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 151(4), 1141-52.
11. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, Diem K, Weninger W, Tschachler E, Alitalo K, Kerjaschki D (1999) Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 154(2), 385-94.
12. Buescher ES, Gallin JI (1984) Radiation effects on cultured human monocytes and on monocyte-derived macrophages. *Blood* 63(6), 1402-7.
13. Chen MF, Lin CT, Chen WC, Yang CT, Chen CC, Liao SK, Ming Liu J, Lu CH, Lee KD (2006) The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66 (1), 244-53.
14. Clark SL Jr (1962) The reticulum of lymph nodes in mice studied with the electron microscope. *Am J Anat* 110, 217-258.
15. Compton CC, Raviola E (1985) Structure of the sinus-lining cells in the popliteal lymph node of the rabbit. *Anat Rec* 212, 408-423.
16. Cotran RS (1965) Endothelial phagocytosis: An electron-microscopic study. *Exp Mol Pathol* 28, 217-31.
17. Crivellato E, Mallardi F (1997) Stromal cell organisation in the mouse lymph node. A light and electron microscopic investigation using the zinc iodide-osmium technique. *J Anat* 190(1), 85-92.

18. Crivellato E, Mallardi F (1998) The sinus endothelial cell architecture in the mouse lymph node. Structural peculiarities and close correlation with the fibroblastic reticular cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 30(4), 495-502.
19. Crocker J, Williams M (1984) An enzyme histochemical study of the sinuses of reactive lymph nodes. *J Pathol* 142(1), 31-8.
20. deBruyn PPH (1948) The effect of X-rays on the lymphatic nodule, with reference to the dose and relative sensitivities of different species. *Anat Rec* 101(3), 373-405.
21. Dijkstra CD, Kamperdijk EWA, Dopp EA (1984) The ontogenic development of the follicular dendritic cell. *Cell Tissue Res* 236, 203-06.
22. Dilly SA, Sloane JP, Psalti IS (1986) The cellular composition of human lymph nodes after allogenic bone marrow transplantation: an immunohistological study. *J Pathol* 150(3), 213-21.
23. Downey H (1922) The structure and origin of the lymph sinuses of mammalian lymph nodes and their relations to endothelium and reticulum. *Haematologica* 3, 431-468.
24. Drenguis WR, Sale GE (1978) Lymph node repopulation after bone marrow transplantation (Abstract). *Clin Res* 26, 161A.
25. Düllmann J, Van Damme EJ, Peumans WJ, Ziesenitz M, Schumacher U (2002) Lectin histochemistry of the rat lymph node: visualisation of stroma, blood vessels, sinuses, and macrophages. A contribution to the concept of an immune accessory role of sinus-lining endothelia. *Acta Histochem* 104(1), 77-83.
26. Ebner Vv. A. Koelliker's Handbuch der Gewebelehre des Menschen. 3. Bd., 6. Aufl., Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig, 1902.
27. Evangelou E, Kyzas PA, Trikalinos TA (2005) Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: Bayesian approach. *Mod Pathol* 18(11), 1490-7.

28. Fändrich F, Schröder J, Jahnke T, Waaga AM, Pawaresch MR, Wacker HH (1997) Migration and activation pattern of specialized dendritic cells after heterotopic small bowel transplantation in a graft-versus-host model of the rat. *Front Biosci* 2, b1-11.
29. Farr AG, Cho Y, De Bruyn PP (1980) The structure of the sinus wall of the lymph node relative to its endocytic properties and transmural cell passage. *Am J Anat* 157(3), 265-84.
30. Fleischmann P. Untersuchungen über die zelluläre Regeneration von Lymphknoten des Hundes nach autologer und allogener Transplantation von aus dem Blut gewonnenen Stammzellen. Medizinische Dissertation, Universität Ulm, 1984.
31. Fossum S, Forf WL (1985) The organization of cell populations within lymph nodes: their origin, life history and functional relationships. *Histopathology* 9, 469-99.
32. Fresen O, Wellensiek HJ (1959) Zur elektronoptischen Struktur des Lymphknotens. *Verh Dtsch Ges Pathol* 42, 353-63.
33. Friedrich T, Kupper H, Püschel W, Pönisch W, Helbig W (1991) Immunhistochemische Untersuchungen an Paraffin-eingebetteten Lymphknoten Verstorbener nach Knochenmarktransplantation. *Verh Dtsch Ges Pathol* 75,136-40.
34. Gebhard H, Ludwig M. Von Drachen, Yetis und Vampiren – Fabeltieren auf der Spur. Blv, München, 2005.
35. Geleff S, Schoppmann SF, Oberhuber G (2003) Increase in Podoplanin-expressing lymphatic vessels in inflammatory bowel disease. *Virchows Arch* 442, 231-37.
36. Haley ST, Tew JG, Szakal AK (1995) The monoclonal antibody FDZ-M1 recognizes possible follicular dendritic cell precursors in the blood and bone marrow. *Adv Exp Med Biol* 378, 289-91.

37. Han SS (1961) The ultrastructure of the mesenteric lymph node of the rat. *Am J Anat* 109, 183-225.
38. Heinemann DE, Peters JH (2005) Follicular dendritic-like cells derived from human monocytes. *BMC Immunol* 6, 23.
39. Hessel H, Mittermüller J, Zitzelsberger H, Weier HU, Bauchinger M (1996) Combined immunophenotyping and FISH with sex chromosome-specific DNA probes for the detection of chimerism in epidermal Langerhans cells after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Histochem Cell Biol* 106, 481-85.
40. Hirakawa S, Hong YK, Harvey N, Schacht V, Matsuda K, Libermann T, Detmar M (2003) Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol* 162(2), 575-86.
41. Hirano M, Arase H, Arase-Fukushi N, Ogasawara K, Iwabuchi K, Miyazaki T, Good RA, Onoe Kazunori (1993) Reconstitution of lymphoid tissues under the influence of a subclinical level of graft versus host reaction induced by bone marrow T cells or splenic T cell subsets. *Cell Immunol* 151, 118-32.
42. Hoelzer D, Seipelt G. *Leukämitherapie*, 2. Aufl., Uni-Med Verlag, Bremen, 2004.
43. Horny HP, Horst HA, Ehniger G, Kaiserling E (1988) Lymph node morphology after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: a histological and immunohistological study focusing on the phenotype of the recovering lymphoid cells. *Blut* 57(1), 31-40.
44. Humphrey JH, Grennan D, Sundaram V (1984) The origin of follicular dendritic cells in the mouse and the mechanism of trapping of immune complexes on them. *Eur J Immunol* 14(9), 859-64.
45. Ikeda K, Shichishima T, Teshima T, Ogawa K, Nakamura-Shichishima A, Tajima H, Noji H, Hashimoto Y, Takeyama K, Ishibashi T, Ohto H, Abe M,

- Maruyama Y (2006) Complete donor chimaerism of Langerhans cells in lymph node early after allogeneic bone marrow transplantation. *Eur J Haematol* 76(3), 261-64.
46. Kahn HJ, Bailey D, Marks A (2002) Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol* 15(4), 434-40.
47. Kaipanen A, Korhonen J, Mustonen T, vanHinsbergh VWM, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K (1995) Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* (92), 3566-70.
48. Kaiserling E (2004) Immunohistochemical identification of lymph vessels with D2-40 in diagnostic pathology. *Pathologe* 25(5), 362-74.
49. Kamperdijk EWA, van Vugt E, Richters CD, Beelen RHJ. Morphology of dendritic cells, 45-61. In: Bruijnzeel-Koomen CA, Hoefsmit EC (Hrsg.) *Immunopharmacology of macrophages and other antigen-presenting cells*. Academic Press Havcourt Brace and Company, New York, 1994.
50. Kapasi ZF, Qin D, Kerr WG, Kosco-Vilbois MH, Shultz LD, Tew JG, Szakal AK (1998) Follicular dendritic cell (FDZ) precursors in primary lymphoid tissues. *J Immunol* 160(3), 1078-84.
51. Katakai T, Hara T, Sugai M, Gonda H, Shimizu A (2004) Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *J Exp Med* 200(6), 783-95.
52. Kerjaschki D, Huttary N, Raab I, Regele H, Bojarski-Nagy K, Bartel G, Kröber SM, Greinix H, Rosenmaier A, Karlhofer F, Wick N, Mazal PR (2006) Lymphatic endothelial progenitor cells contribute to de novo lymphangiogenesis in human renal transplants. *Nature Med* 12(2), 230-34.
53. Khosrotehrani K, Stroh H, Bianchi DW, Johnson KL (2003) Combined FISH and Immunolabeling on Paraffin-embedded tissue sections for the study of microchimerism. *Biotechniques* 34:242-244.

54. Kinet-Denoel C, Heinen E, Radoux D, Simar LJ (1982) Follicular dendritic cells in lymph nodes after X-irradiation. *Int J Radiat Biol* 42(2), 121-30.
55. Kolb H, Sale GE, Lerner KG, Storb R, Thomas ED (1979) Pathology of acute graft-versus-host disease in the dog. An autopsy study of ninety-five dogs. *Am J Pathol* 96(2), 581-94.
56. Kriehuber E, Breiteneder-Geleff S, Groeger M, Soleiman A, Schoppmann SF, Stingl G, Kerjaschki D, Maurer D (2001) Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J Exp Med* 194(6), 797-808.
57. Leiber B. Der menschliche Lymphknoten: Anatomie, Physiologie und Pathologie; nach Ergebnissen der vergleichenden klinischen und histologischen Zytodiagnostik. Urban & Schwarzenberg, München und Berlin, 1961.
58. Leitch AR. In-situ-Hybridisierung. Labor im Fokus. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994.
59. Loc NK, Olah I, Kittner Z, Takacs L, Toro I (1981) Effects of cyclophosphamide on the rat's mesenteric lymph node. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 29(4), 335-51.
60. Lymboussaki A, Partanen TA, Olofsson B, Thomas-Crusells J, Fletcher CD, deWaal RM, Kaipainen A, Alitalo K (1998) Expression of the vascular endothelial growth factor C receptor VEGFR-3 in lymphatic endothelium of the skin and in vascular tumors. *Am J Pathol* 153(2), 395-403.
61. Mannick JA, Lochte HL Jr, Ashley CA, Thomas ED, Ferrebee JW (1960) Autografts of bone marrow in dogs after lethal total-body radiation. *Blood* 15, 255-66.
62. Matsui K, Breiteneder-Geleff S, Kerjaschki D (1998) Epitope-specific antibodies to the 43-kD glomerular membrane protein podoplanin cause proteinuria and rapid flattening of podocytes. *J Am Soc Nephrol* 9(11), 2013-26.

63. Moe RE (1963) Fine structure of the reticulum and sinuses of lymph nodes. *Am J Anat* 112, 311-35.
64. Mori Y und Lennert K (Hrsg.) *Electron Microscopic Atlas of Lymph Node Cytology and Pathology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1969.
65. Müller-Ruchholtz W, Wottge HU, Müller-Hermelink HK. Restitution potentials of allogeneically or xenogeneically grafted lymphocyte-free hemopoietic stem cells, 153-91. In: Thierfelder S, Rodt H, Kolb HJ (Hrsg.) *Immunobiology of bone marrow transplantation*. Haematology and Blood Transfusion Vol. 25. Springer-Verlag, New York, 1980.
66. Nelson B, Wenceslao C, Flidner TM, Herbst E, Bruch C, Schnappauf H-P, Flad H-D (1976) The Repopulation of Lymph Nodes of Dogs After 1200R Whole-Body-Irradiation and Intravenous Administration of Mononuclear Blood Cells. *Am J Pathol* 84, 259-82.
67. Nibbs RJ, Kriehuber E, Ponath PD, Parent D, Qin S, Campbell JD, Henderson A, Kerjaschki D, Maurer D, Graham GJ, Rot A (2001) The beta-chemokine receptor D6 is expressed by lymphatic endothelium and a subset of vascular tumors. *Am J Pathol* 158(3), 867-77.
68. Noll S, Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie*. 1. Aufl.. Urban und Fischer. München, Jena. 2000.
69. Nopajaroonsri C, Luk SC, Simon GT (1971) Ultrastructure of the normal lymph node. *Am J Pathol* 65(1), 1-24.
70. Nopajaroonsri C, Simon GT (1971) Phagocytosis of colloidal carbon in a lymph node. *Am J Pathol* 65(1), 25-42.
71. Partanen TA, Alitalo K, Miettinen M (1999) Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer* 86(11), 2406-12.

72. Partanen TA, Paavonen K (2001) Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microsc Res Technol* 55(2), 108-21.
73. Parwaresch MR, Radzun HJ, Feller AC, Peters KP, Hansmann ML (1983) Peroxidase-positive mononuclear leukocytes as possible precursors of human dendritic reticulum cells. *J Immunol* 131(6), 2719-25.
74. Parwaresch MR, Radzun HJ, Hansmann ML, Peters KP (1983) Monoclonal antibody Ki-M4 specifically recognizes human dendritic reticulum cells (follicular dendritic cells) and their possible precursor in blood. *Blood* 62(3), 585-90.
75. Peters J, Krams M, Wacker HH, Carstens A, Weisner D, Hamann K, Menke M, Harms D, Parwaresch R (1997) Detection of rare RNA sequences by single-enzyme in situ reverse transcription-polymerase chain reaction. High-resolution analyses of interleukin-6 mRNA in paraffin sections of lymph nodes. *Am J Pathol* 150(2), 469-76.
76. Petz LD. Documentation of engraftment and characterization of chimerism following bone marrow transplantation, 136-48. In: Forman SJ, Blume KG, Thomas ED (Hrsg.) *Bone marrow transplantation*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, 1994.
77. Rieger K, Marinets O, Fietz T, Korper S, Sommer D, Mucke C, Reufi B, Blau WI, Thiel E, Knauf WU (2005) Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation. *Exp Hematol* 33(5), 605-11.
78. Rodewald HR und Friedrich W (2002) Blutstammzelltransplantation. Ein Beispiel praktizierter Stammzelltherapie. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 45, 85-91.
79. Sabin FR (1905) The development of the lymphatic nodes in the pig and their relationship to the lymphatic hearts. *Am J Anat* 4, 355-89.

80. Sackstein R (1993) Physiologic migration of lymphocytes to lymph nodes following bone marrow transplantation: role in immune recovery. *Semin Oncol* 20(5) Suppl 6, 34-9.
81. Sakuma H, Kasajima T, Imai Y, Kojima M (1981) An electron microscopic study on the reticuloendothelial cells in the lymph nodes. *Acta Pathol Jpn* 31(3), 449-72.
82. Sale GE, Alavaikko M, Schaeffers KM, Mahan CT (1992) Abnormal CD4:CD8 ratios and delayed germinal center reconstitution in lymph nodes of human graft recipients with graft-versus-host disease (GVHD): an immunohistological study. *Exp Hematol* 20(8), 1017-21.
83. Sale GE, Shulman HM. Pathology of the lymphoreticular system, 171-91. In: Sale GE (Hrsg.) *The pathology of bone marrow transplantation*. Masson, New York, 1984.
84. Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, Alitalo K, Rafii S (2003) VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood* 101(1), 168-72.
85. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M (2005) Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 166(3), 913-21.
86. Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hiraoka S, Feng D, Harvey N, Williams M, Dvorak AM, Dvorak HF, Oliver G, Detmar M (2003) T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J* 22(14), 3546-56.
87. Schoppmann SF, Birner P, Studer P, Breiteneder-Geleff S (2001) Lymphatic microvessel density and lymphovascular invasion assessed by anti-podoplanin immunostaining in human breast cancer. *Anticancer Res* 21(4A), 2351-5.

88. Slavin RE, Santos GW (1973) The graft versus host reaction in man after bone marrow transplantation: pathology, pathogenesis, clinical features, and implication. *Clin Immunol Immunopathol* 1(4):472-98.
89. Stuart AE. *The Reticulo-endothelial System*. E. & S. Livingstone, Edinburgh and London, 1970.
90. Szakal AK, Holmes KL, Tew JG (1983) Transport of immune complexes from the subcapsular sinus to lymph node follicles on the surface of nonphagocytic cells, including cells with dendritic morphology. *J Immunol* 131(4), 1714-27.
91. Szakal AK, Kapasi ZF, Haley ST, Tew JG (1995) Multiple lines of evidence favoring a bone marrow derivation of follicular dendritic cells (FDCs). *Adv Exp Med Biol* 378, 267-72.
92. Tew JG, Kosco MH, Burton GF, Szakal AK (1990) Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol Rev* 117, 185-211.
93. Tew JG, Thorbecke GJ, Steinman RM (1982) Dendritic cells in the immune response: characteristics and recommended nomenclature (A report from the Reticuloendothelial Society Committee on Nomenclature). *J Reticuloendothel Soc* 31(5), 371-80.
94. Villadangos JA, Williams RH (2005) Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: Limitations of the Langerhans cells paradigm. *Semin Immunol* 17, 262-72.
95. Villaron EM, Perez-Simon JA, San Miguel JF, Canizo CdE (2006) Bone marrow mesenchymal stem cells chimerism after allogeneic hematopoietic transplantation. *Exp Hematol* 34(1), 7.
96. Wacker HH (1994) Sinuswandzellen. Immunakzessorische Zellen des Lymphknotensinus. *Veröffentlichungen aus der Pathologie*, Bd. 143. Gustav Fischer Verlag; Stuttgart, Jena, New York.

97. Wacker HH, Frahm SO, Heidebrecht HJ, Parwaresch R (1997) Sinus-lining cells of the lymph nodes recognized as a dendritic cell type by the new monoclonal antibody Ki-M9. *Am J Pathol* 151(2), 423-34.
98. Wacker HH, Heidebrecht HJ, Radzun HJ, Parwaresch MR (1992) Sinus lining cells:morphology, function and neoplasia. *Verh Dtsch Ges Pathol* 76, 219-25.
99. Weninger W, Partanen TA, Breiteneder-Geleff S, Mayer C, Kowalski H, Mildner M, Pammer J, Sturzl M, Kerjaschki D, Alitalo K, Tschachler E (1999) Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 and podoplanin suggests a lymphatic endothelial cell origin of Kaposi's sarcoma tumor cells. *Lab Invest* 79(2), 243-51.
100. Werner M, Chott A, Fabiano A, Batifora H (2000) Effects of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 24(7), 1016-9.

## 9 Danksagung

Herrn Professor Dr. U. Löhrs danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit am Pathologischen Institut der LMU durchzuführen. Seinem Nachfolger, Herrn Prof. Dr. T.Kirchner danke ich für die Übernahme der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. R. Huss. Sein wissenschaftliches Engagement und Begeisterung haben die Arbeit ermöglicht und die Fertigstellung kontinuierlich vorangetrieben.

Herrn Dr. G. Babaryka danke ich ganz herzlich, als Ideengeber und unermüdlicher Lektor trägt er entscheidend am Zustandekommen und Abschluss der Arbeit bei.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau S. Moosmann, Frau A. Hirschmann und bei Frau A. Sendelhofert für ihre intensive zeitaufwendige Laborarbeit und Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit bedanken.

Herrn Prof Dr. J. Kolb, Leiter der Abteilung für hämatopoietische Stammzelltransplantation der Medizinischen Klinik III am Klinikum Großhadern, danke ich für die Bereitstellung der klinischen Daten zur Stammzelltransplantation.

**LEBENS LAUF***Persönliche Angaben*

- 22.10.1974 Geboren in Hannover als drittes Kind der Eheleute Dr. med. Monica und Dr. med. Jens Bahlmann
- 1993 Abitur an der Schillerschule Hannover
- 1993/1994 Zivildienst am Oststadtkrankenhaus Hannover

*Ausbildung*

- 1994 Immatrikulation im Studienfach Medizin an der Universität Regensburg
- 1996 Ärztliche Vorprüfung
- 1996-2001 Klinischer Studienabschnitt an der Technischen Universität München
- 1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2000/2001 Praktisches Jahr:  
1. Tertial: Innere Medizin (Deutsches Herzzentrum München)  
2. Tertial: Chirurgie (Krankenhaus München-Bogenhausen)  
3. Tertial: Pathologie (Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München)
- 2001 Ärztliche Prüfung

*Berufserfahrung*

- 2001-2003 Arzt im Praktikum am Pathologischen Institut der Universität München (Direktor Prof. Dr. U. Löhrs)
- 2003-2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pathologischen Institut der Universität München