

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. A. C. Feller

**Immunhistochemische Analyse der Antigenexpression
von Cdc2, MNDA, p27 und Rb bei Mantelzelllymphomen
im Vergleich zu anderen B-Zell-Lymphomen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Susanne K. Hoffmeister
aus Hamburg

Lübeck 2008

1. Berichtersteller/-in:

- Prof. Dr. med. Hartmut Merz
-

2. Berichtersteller/-in:

- Prof. Dr. med. Lutz Fricke
-

Tag der mündlichen Prüfung:

- 24.06.2008
-

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 24.06.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Klassifikation der Lymphome	2
1.3 Aufbau eines Lymphknotens	4
1.4 Beschreibung der verwendeten Lymphomentitäten	5
1.4.1 Chronisch lymphatische B-Zell-Leukämie	6
1.4.2 Lymphoplasmozytisches Lymphom	6
1.4.3 Follikuläres Lymphom	7
1.4.4 Mantelzelllymphom	7
1.4.5 Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	8
1.4.6 Burkitt-Lymphom	9
1.5 Beschreibung der untersuchten Antigene und Antikörper	9
1.6 Fragestellung	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Untersuchte Gewebeproben	12
2.2 Erstellen der Tissue microarrays	14
2.3 Vorbehandlung	15
2.4 ABC-Methode	15
2.5 Färbeprotokoll	17
2.6 Kontrollen	18
2.7 Antikörper-Verdünnungen und Rezepturen	18
2.8 Statistische Auswertung	21
3 Ergebnisse	22
3.1 Expressionsmuster von Cdc2 bei BCL	22
3.1.1 Cdc2 - Mantelzelllymphome	23
3.1.2 Cdc2 - niedrigmaligne B-Zell-Lymphome	24
3.1.3 Cdc2 – hochmaligne B-Zell- Lymphome	24

3.1.4	Mann-Whitney-Test unter Berücksichtigung der Ausschlusskriterien ...	24
3.2	Expressionsmuster von MNDA bei BCL	25
3.2.1	MNDA – Mantelzelllymphome	26
3.2.2	MNDA – niedrigmaligne B-Zell-Lymphome	27
3.2.3	MNDA – hochmaligne B-Zell-Lymphome	27
3.3	Expressionsmuster von p27 bei BCL	28
3.3.1	p27 – Mantelzelllymphome	29
3.3.2	p27 – niedrigmaligne B-Zell-Lymphome	29
3.3.3	p27 – hochmaligne B-Zell-Lymphome	29
3.4	Expressionsmuster von Rb bei BCL	30
4	Diskussion	31
4.1	Etablierung der untersuchten Antikörper in der Lymphomdiagnostik ...	33
4.2	Das Mantelzelllymphom und seine Subentitäten	35
4.3	Abhängigkeit der Expressionsrate bei den untersuchten Antigenen vom Malignitätsgrad	37
4.3.1	Expression des Tumorsuppressorgens Rb bei BCL	37
4.3.2	Cdc2 als Proliferationsmarker in der Lymphomdiagnostik	38
4.3.3	MNDA: geringer Stellenwert in der Lymphomdiagnostik	40
4.3.4	p27-Expression umgekehrt proportional zur Proliferationsrate	41
4.4	Vergleich mit anderen Studien	42
4.5	Fazit und Ausblick	43
5	Zusammenfassung	45
6	Literaturverzeichnis	47
7	Anhang	56
7.1	Bilder	56
7.1.1	Tissue microarray	56
7.1.2	MNDA-Färbung	57
7.1.3	p27-Färbung von MCL	58
7.1.4	p27-Färbung von niedrigmalignen Lymphomen	59

7.1.5	p27-Färbung von hochmalignen Lymphomen	60
7.1.6	Rb-Färbung	61
7.1.7	Subentitäten des Mantelzelllymphoms	62
7.2	Tabellen	63
7.2.1	WHO-Klassifikation der lymphatischen Neoplasien	63
7.2.2	Färbeergebnisse der untersuchten Lymphome	64
7.2.3	Produktnachweis	67
8	Danksagung	68
9	Lebenslauf	69

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Enzymkomplex
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ALCL	anaplastisches diffus großzelliges Lymphom
ALL	akute lymphatische Leukämie
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
BCL	B-Zell-Lymphom
B-CLL	chronisch lymphatische B-Zell-Leukämie
BL	Burkitt-Lymphom
CBL	diffus zentroblastisches Lymphom
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CKI	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor
DLBCL	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
Foll	follikuläres Lymphom
G _{1/2} -Phase	erste/ zweite „gap“-Phase
HL	Hodgkin-Lymphom
hmL	hochmalignes B-Zell-Lymphom
IBL	immunoblastisches diffus großzelliges Lymphom
IHC	Immunhistochemie
LAB	labelled Avidin-Biotin
LBL	lymphoblastisches Lymphom
LK	Lymphknoten
LPL	lymphoplasmozytisches Lymphom
MCL	Mantelzelllymphom
MGZL	Marginalzonenlymphom
min	Minute
M-Phase	Mitose-Phase
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK	natürliche Killerzellen
nmL	niedrigmalignes B-Zell-Lymphom

REAL-Klassifikation	Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms
SLL	kleinzelliges lymphozytisches B-Zell-Lymphom
S-Phase	DNA-Synthese-Phase
Tab.	Tabelle
TBCL	T-Zell-reiches B-Zell-Lymphom
TMA	Tissue microarray
Tris-Puffer	Trishydroxymethylaminomethan-Puffer
UK-SH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
WHO	World Health Organization

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

Maligne Lymphome sind autonome neoplastische Proliferationen lymphatischer Zellen von den B- und T-Zell-Kompartimenten der primären (Knochenmark und Thymus) und sekundären (Lymphknoten, Milz, Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe) lymphatischen Organe. Man unterscheidet nach der Morphologie die Hodgkin-Lymphome (HL) mit den charakteristischen Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen von den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL), bei denen diese Zellen in der Regel nicht nachweisbar sind. Die Inzidenz der Lymphome beträgt 5-7/100.000 Einwohner pro Jahr, wobei die HL 40% und die NHL 60% ausmachen (Böcker et al., 2001).

Von den jährlich neu auftretenden Krebserkrankungen handelt es sich in 4% um NHL. Trotz dieser geringen Zahl haben sie eine große Bedeutung, da es in den vergangenen 30 Jahren zu einer deutlichen Zunahme dieser Erkrankung gekommen ist. Die Anzahl neu aufgetretener HL hingegen ist regredient (Jaffe et al., 2001). Bei den NHL unterscheidet man nach dem vorherrschenden Zelltyp B-Zell-Lymphome (85%) von T-Zell- und Natürliche Killerzell (NK)-Lymphomen (15%). Außerdem wird zwischen hochmalignen Lymphomen mit überwiegendem Vorkommen von Blasten und niedrigmalignen Lymphomen mit Lymphozyten und Zentrozyten differenziert.

Eine besondere Entität unter den NHL stellt das Mantelzelllymphom (MCL) dar. Es handelt sich um ein reifes B-Zell-Lymphom (BCL), das zytologisch zu den so genannten indolenten NHL mit einer mittleren Überlebenszeit von drei bis vier Jahren gehört, klinisch jedoch einen aggressiven Verlauf zeigt (Armitage und Weisenburger, 1998). Es macht 2,5-4% der NHL in den USA (Lardelli et al., 1990) und 7-9% in Europa (Swerdlow et al., 1983; Carbone et al., 1989) aus. Unter den niedrigmalignen BCL (nmL) besitzt es die schlechteste Prognose, da in mehr als 70% der Fälle die Diagnose erst im Spätstadium gestellt wird. Die Prognose des MCL ist zudem ungünstig, da es bisher keine etablierte kurative Therapie gibt.

Zur Abschätzung der Prognose und Auswahl der Therapie sind bei den NHL unter anderem die Entität, der Malignitätsgrad, die Lokalisation, die Ausbreitung, das Vorhandensein von B-Symptomen (Gewichtsverlust, Fieber, Nachtschweiß, Leistungsminderung), erhöhte LDH- oder β 2-Mikroglobulin-Werte, das Alter, Hepatosplenomegalie und Knochenmarkinfiltration von Bedeutung (Meusers et al., 1997). Bei 50% der Patienten mit MCL besteht eine B-Symptomatik und bei über 60% ist bereits das Knochenmark befallen (Armitage und Weisenburger, 1998).

Einen hohen Stellenwert bei den Erkrankungen des lymphatischen Systems hat die exakte Diagnosestellung. Es gibt eine Vielzahl von Studien, die sich mit der Verbesserung der Diagnostik mittels Histologie, Genetik und Immunphänotypisierung beschäftigt haben. Mit Hilfe der Immunhistochemie (IHC) besteht die Möglichkeit, die morphologische Diagnose zu objektivieren. Diese Methode wird seit langem in der Routinediagnostik genutzt und ist für klinische Zwecke mittlerweile ausreichend, um gute und sichere Diagnosen zu stellen. Es wird jedoch ständig nach weiteren, noch effizienteren Antikörpern in der IHC gesucht, um den interindividuellen Besonderheiten jedes Tumors und damit dem Patienten gerecht zu werden.

1.2 Klassifikation der Lymphome

In den letzten fünfzig Jahren hat es zwei verschiedene Klassifikationen für die HL gegeben. Dagegen lagen über 20 Vorschläge für die NHL vor. Dieses erklärt sich aus der klinischen und pathologischen Vielfalt der NHL. Die erste moderne Einteilung der NHL erfolgte 1963 durch Rappaport (Bennett et al., 1989). Sie basiert auf der Zellmorphologie. Durch die Fortschritte in der Immunologie folgten innerhalb kurzer Zeit unterschiedliche neue Klassifikationen. Von großer Bedeutung war die Einteilung nach Lukes und Collins 1977. Sie unterteilten die NHL in B- und T-Zell-Lymphome und in nicht klassifizierbare Lymphome. Bei dieser Einteilung wird die Kernmorphologie berücksichtigt (Bennet, 1989; Lukes und Collins, 1977). Etwa zur gleichen Zeit entwickelte Lennert die Kiel-Klassifikation.

Als Grundlage benutzte er die Zellmorphologie zusammen mit der Histochemie unter Anwendung des Elektronenmikroskops und der Giemsa-Färbung. Er führte die Begriffe „Zentrozyt“ und „Zentroblast“ ein und berücksichtigte damit im Gegensatz zu Lukes und Collins die Morphologie der gesamten Zelle (Bennett et al., 1989). 1994 wurde der Versuch für eine standardisierte und international akzeptierte Klassifikation unternommen. Unter Berücksichtigung der alten Klassifikationen entstand die Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL-Klassifikation). Die Zuordnung erfolgte nach morphologischen, immunologischen, molekular-genetischen, klinischen und prognostischen Gesichtspunkten (Harris et al., 1994).

Die World Health Organization (WHO)-Klassifikation ist ein Gemeinschaftsprojekt der European Association of Haemaphatology und der Society for Haemaphatology, das seit 1995 besteht. Es stellt die erste weltweit anerkannte Klassifikation für Tumoren des lymphatischen und hämatopoetischen Gewebes dar. Die WHO-Klassifikation basiert auf der REAL-Klassifikation mit starker Anlehnung an die Kiel-Klassifikation. Wie jede Tumorklassifikation wird die WHO-Klassifikation immer wieder dem neuesten Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse angeglichen (Tabelle (Tab.) 7.2.1).

In der WHO-Klassifikation war bei der Einteilung der Lymphome neben der Morphologie unter anderem die zelluläre Herkunft (B- oder T-Zell-System), der Immunphänotyp, bestimmte genetische Charakteristika, das Wachstumsmuster (follikulär, nodulär oder diffus) und klinische Merkmale wie die Lokalisation (primär nodal versus extranodal oder spezifischer anatomischer Sitz) von großer Bedeutung.

Die WHO-Klassifikation unterteilt primär nach den vier Zelllinien: myeloische, lymphatische, histiozytische/dendritische und Mastzellreihe. Bei den lymphatischen Neoplasien unterscheidet man die B-Zell-Neoplasien, die T- und NK-Zell-Neoplasien und die Hodgkin-Lymphome. Sowohl Lymphome als auch lymphoide Leukämien sind in die Klassifikation mit eingeschlossen. In den Kategorien der NHL (B- und T-/NK-Zell-Neoplasien) wird unterteilt in Vorläufer-Neoplasien und reife (periphere) Neoplasien (Jaffe et al., 2001).

1.3 Aufbau eines Lymphknotens

Lymphknoten (LK) sind nierenförmig und von einer Kapsel umgeben. Der Hilus besteht aus einer Arterie, einer Vene und einem abführenden (efferenten) Lymphgefäß. Die zuführenden (afferenten) Lymphgefäße münden an der konvexen Seite. Man unterscheidet bei einem LK die B-Zone, die T-Zone (Parakortikalzone), die Interfollikulärzone und die Pulpa.

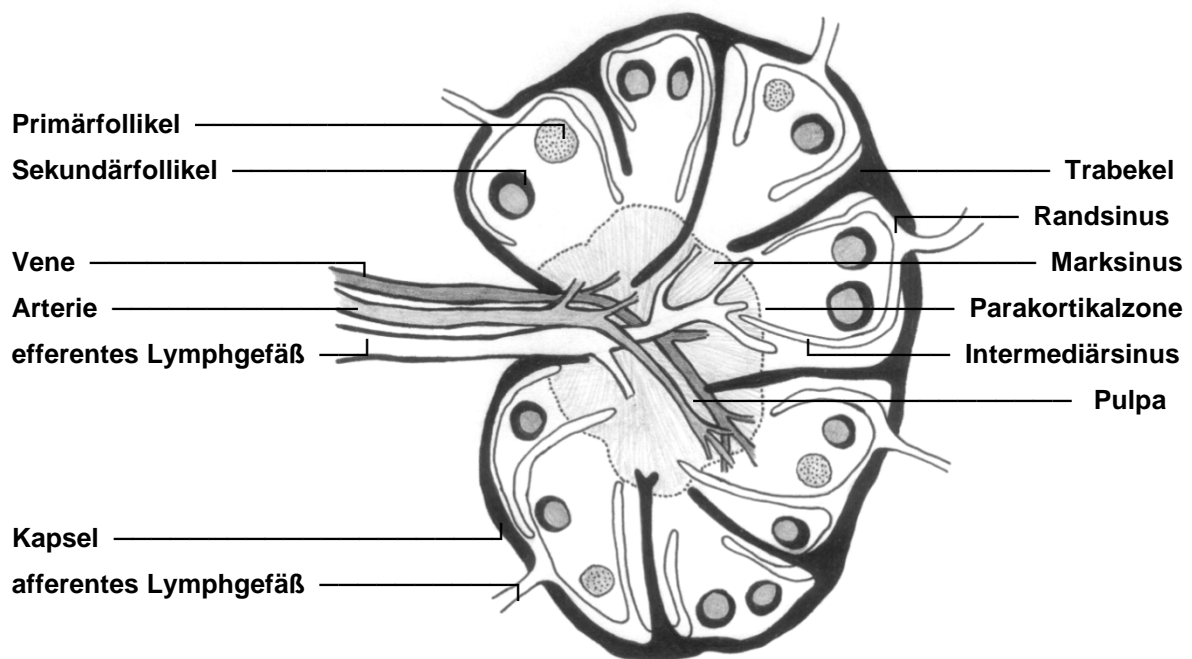


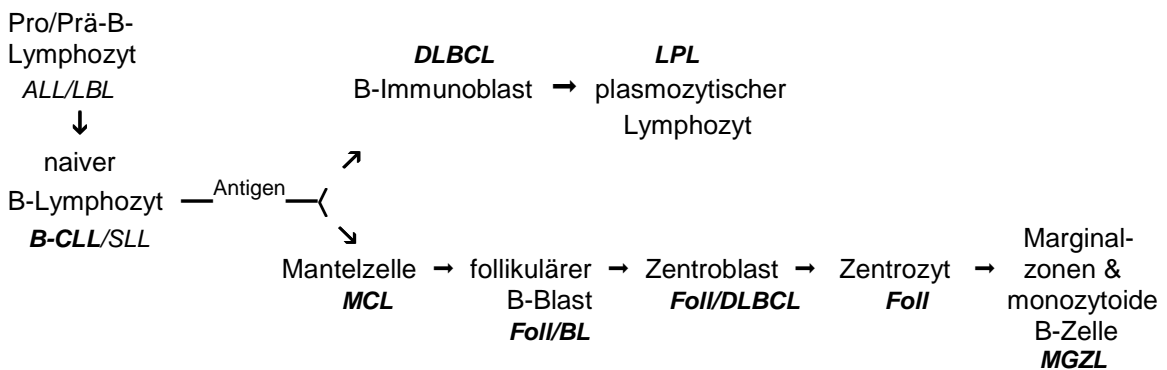
Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines Lymphknotens

Der LK wird durch das Sinussystem aus Rand-, Intermediär-, Mark- und Terminalsinus strukturiert. Im Rindenbereich zwischen Rand- und Intermediärsinus liegen die Lymphfollikel. Man unterscheidet Primärfollikel von Sekundärfollikeln. Von Primärfollikeln spricht man, bevor es zu einem Antigenkontakt gekommen ist. Hat ein Antigenkontakt mit Hilfe der follikulären dendritischen Zellen stattgefunden, differenzieren die B-Zellen zu Zentroblasten und weiter zu Zentrozyten. Die höheren Differenzierungsstufen liegen im hellen Keimzentrum des Sekundärfollikels, das von einem Follikelmantel aus reifen, ruhenden B-Zellen umgeben wird. Plasmazellen findet man sowohl intra- als auch interfollikulär. In der Interfollikulärzone überwiegen die T-Lymphozyten.

Weiter im Lymphknoteninneren liegt die T-Zone mit den kleinen reifen T-Lymphozyten und einzelnen interdigitierenden dendritischen Zellen. Die Pulpa liegt um die Marksinus herum und ist durchsetzt von Blut- und Lymphgefäßen. Von dort gelangen die Lymphozyten in die Lymphbahn (Böcker et al., 2001).

1.4 Beschreibung der verwendeten Lymphomentitäten

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Entitäten nach der Vorlage der WHO-Klassifikation beschrieben (Jaffe et al., 2001). Es wurden nur reife B-Zell-Lymphome untersucht, die die Tendenz haben, Zellen der normalen B-Zell-Differenzierung zu imitieren. Diese Ähnlichkeit zu den normalen Zellen ist eine der Grundlagen für die Klassifikation der B-Zell-Lymphome, wie in der Abbildung (Abb.) 1.2 ersichtlich. Bei der Klassifikation der BCL werden außerdem die genetischen, morphologischen und immunphänotypischen Merkmale berücksichtigt.



ALL: Akute lymphatische Leukämie	LBL: Lymphoblastisches Lymphom
B-CLL: Chronisch lymphatische B-Zell-Leukämie	LPL: Lymphoplasmozytisches Lymphom
BL: Burkitt-Lymphom	MCL: Mantelzelllymphom
DLBCL: Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	MGZL: Marginalzonenlymphom
Foll: Follikuläres Lymphom	SLL: Kleinzelliges lymphozytisches B-Zell-Lymphom

Die fett gedruckten Lymphomentitäten entsprechen den in dieser Arbeit verwendeten.

Abb. 1.2: Schema der B-Zell-Differenzierung mit der Zuordnung der verschiedenen Entitäten der B-Zell-Lymphome zu ihren Ursprungszellen (Jaffe et al., 2001)

1.4.1 Chronisch lymphatische B-Zell-Leukämie

Die chronisch lymphatische B-Zell-Leukämie (B-CLL) zählt ebenfalls zu den reifzelligen B-Zell-Neoplasien. Man unterscheidet die reine von der mutierten Form. Bei der mutierten Form findet man chromosomale Veränderungen wie unter anderem Trisomie 12 und Abnormität von 13q. Die Tumore leiten sich von Zellen der Primärfollikel oder der Follikelmantelzone ab. Man sieht kleine B-Lymphozyten mit dichtem Chromatin und einem schmalen Zytoplasmasaum. Die mitotische Aktivität ist meist sehr gering. Die Lymphomzellen sind in den überwiegenden Fällen IgM+, IgD+, CD5+, CD19+, schwach CD20+, schwach CD22+, CD79a+, CD23+, CD43+ und schwach CD11c+, sowie CD10-, FMC7- und Cyclin D1-. Die Antikörper CD23 und Cyclin D1 sind nützliche Marker in der Unterscheidung zum Mantelzelllymphom. Bei der B-CLL mit nicht mutierten Immunglobulin-Schwereketten-Genen findet man fast immer eine ZAP-70-Expression, die bei der B-CLL mit mutierten Schwereketten-Genen nicht nachzuweisen ist (Rassenti et al., 2004).

Die meisten Erkrankten zeigen keine Symptome. Daher befinden sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung über 50% der Patienten in einem fortgeschrittenen Tumorstadium. Der Krankheitsverlauf ist träge, aber auf Grund einer schlechten Ansprechbarkeit der Lymphome auf die zur Verfügung stehenden Therapien liegt die durchschnittliche Überlebensrate für die nicht-mutierte Form bei fünf und für die mutierte Form bei zehn Jahren.

1.4.2 Lymphoplasmozytisches Lymphom

Die lymphoplasmozytischen Lymphome (LPL) gehören ebenfalls zu den reifzelligen B-Zell-Neoplasien. Das morphologische Bild zeigt kleine Lymphozyten, plasmazytische Lymphozyten und Plasmazellen. Die Morphologie der Zellen ähnelt der der B-CLL. Der Ursprungsort der Tumorzellen ist wahrscheinlich der Follikelmantel, allerdings wird die Lymphknotenarchitektur durch das diffuse Wachstum der Tumorzellen stark verändert. Die Tumorzellen sind IgG oder IgM positiv und IgD negativ, sowie CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+ und CD5-, CD10-, CD23-. Das Fehlen von CD5 dient der Abgrenzung gegenüber der B-CLL, einer Variante des lymphozytischen Lymphoms mit Immunglobulin-Expression (sog. lymphoplasmozytoides Immunozytom der Kiel-Klassifikation).

Oft zeigen die Patienten ein leukämisches Blutbild (etwa 60%). Bei der Mehrheit ist im Serum eine monoklonale IgM-Gammopathie (>3mg/dl, Makroglobulinämie Waldenström) nachweisbar, was in 10-30% der Fälle zu einer Hyperviskosität oder Kryoglobulinämie des Blutes führt.

Das LPL macht nur 1,5% aller nodalen Lymphome aus. Die mittlere Überlebensrate liegt bei fünf Jahren. 5% der LPL gehen in ein hochmalignes, diffus großzelliges B-Zell-Lymphom vom immunoblastischen Typ über.

1.4.3 Follikuläres Lymphom

Bei dem follikulären Lymphom (Foll) liegt eine Proliferation der Keimzentrumzellen (Zentrozyten und Zentroblasten) vor. Daneben finden sich nichtneoplastische follikuläre dendritische Retikulum-Zellen, Plasmazellen und T-Zellen. Der Name follikulär wurde gewählt, da das Wachstumsmuster Keimzentrumsstrukturen nachahmt. Die Foll sind nach ihrem Anteil an Zentroblasten in drei Grade eingeteilt. Je mehr Blasten vorhanden sind, desto höher ist die Malignität des Lymphoms beziehungsweise der Grad der Einteilung.

Die Tumorzellen sind in der Regel Slg+, Bcl-2+, CD10+, CD5- und CD43-. Des Weiteren exprimieren sie B-Zell-assoziierte Antigene (CD19, CD20, CD22, CD79a) und das Kernprotein Bcl-6. In 70-95% der Fälle liegt eine Translokation t(14;18) vor, die zu einer Überexpression des Bcl-2-Onkoproteins führt.

Das Foll macht 22% der NHL aus und ist das einzige niedrigmaligne BCL, das im frühen Stadium durch eine Radiochemotherapie heilbar ist. Bisher weisen allerdings weniger als ein Drittel der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein Stadium I oder II auf, denn selbst im fortgeschrittenen Stadium fallen die Patienten meist nur durch eine indolente Lymphknotenschwellung auf.

1.4.4 Mantelzelllymphom

Auch die Mantelzelllymphome (MCL) zählen zu den reifzelligigen B-Zell-Neoplasien. Sie werden synonym als zentrozytische Lymphome bezeichnet, da ein Infiltrat aus zentrozytenähnlichen Zellen ohne Nachweis von Blasten das Bild prägt. Der Ursprungsort der Tumorzellen ist der Follikelmantel. Die MCL sind eine sehr heterogene Gruppe von BCL. Das zytologische Bild kann kleinzellig, klassisch, blastisch oder pleomorph und nicht selten auch gemischt sein.

Das Ausbreitungsmuster ist diffus, nodulär oder auf die Mantelzone beschränkt. Die Lymphomzellen exprimieren CD5, Bcl-2 und Cyclin D1, jedoch nicht CD10, CD23 und Bcl-6. Charakteristisch ist die Translokation t(11;14), die die Überexpression von Cyclin D1 zur Folge hat.

Das MCL macht 3-10% der NHL aus und gehört zu den niedrigmalignen NHL. Innerhalb dieser Gruppe hat es die schlechteste Prognose. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist bei etwa 60% der Patienten das Knochenmark infiltriert (Stadium IV) und es besteht eine ausgeprägte Hepatosplenomegalie. Die Hälfte der Patienten zeigt B-Symptomatik. Eine Heilung durch konventionelle Radiochemotherapie ist nicht möglich. Die mittlere Überlebensdauer liegt bei drei bis fünf Jahren.

1.4.5 Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom

Es handelt sich um eine diffuse Proliferation großer, zytologisch variabler B-Zell-Blasten. Das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) steht als Oberbegriff für eine Gruppe von Lymphomen mit gleichem Aufbau und sehr verschiedenartiger Zytologie. Sie exprimieren CD19, CD20, CD22 und CD79a, allerdings nicht konstant. Nur einige Fälle sind CD5 positiv. Etwas häufiger wird CD10 exprimiert. Bei 50-75% findet man oberflächliche und/oder zytoplasmatische Immunglobuline. Oft werden Mutationen beobachtet, u.a. in 20-30% der Fälle die Translokation des Bcl-2 Gens t(14;18). Diese ist allerdings auch ein typisches Kennzeichen der folliculären Lymphome.

Die DLBCL machen 30-40% der reifen NHL in den westlichen Staaten aus. In den Entwicklungsländern ist die Rate noch höher. Das mittlere Erkrankungsalter liegt in der siebten Dekade, wobei auch Kinder betroffen sein können.

Eine rasche Größenzunahme ist typisch und führt zu Symptomen. Das Epstein-Barr-Virus und Immunsuppression gelten als Risikofaktoren. Die DLBCL sind aggressiv aber potentiell mit Polychemotherapie kurativ therapierbar.

1.4.6 Burkitt-Lymphom

Das Burkitt-Lymphom (BL) gehört zu den reifzelligen B-Zell-Neoplasien mit drei verschiedenen klinischen Varianten. Man unterscheidet das endemische, das sporadische und das Immundefizit-assoziierte Burkitt-Lymphom. Es handelt sich immer um einen hochmalignen Tumor, der sich vor allem extranodal oder in Form einer akuten Leukämie präsentiert. Das morphologische Bild zeigt mittelgroße B-Zell-Blasten mit schmalen basophilem Zytoplasmasaum und Fettvakuolen. Die runden Kerne haben ein kompaktes Chromatin und mehrere Nukleoli. Die Blasten exprimieren CD10, CD19, CD20, CD22 und Bcl-6. Negativ sind die Tumorzellen für CD5, CD23, Bcl-2 und TdT. In bis zu 100% der Zellen findet sich eine Ki-67-Expression, was für eine extrem hohe Proliferationsrate spricht. Das Genom des Epstein-Barr-Virus ist in den meisten Tumorzellen nahezu aller Patienten mit der endemischen und bei 30% der Patienten mit der sporadischen Form zu finden. Der Tumor spricht gut auf eine hochaggressive Polychemotherapie an. In frühen Stadien liegt die Heilungsrate bei 90%, im fortgeschrittenen Stadium bei 60-80%. Kinder haben eine signifikant bessere Heilungschance als Erwachsene. Die meisten Rezidive treten im ersten Jahr auf. Nach zwei rezidivfreien Jahren kann von einer Heilung ausgegangen werden.

1.5 Beschreibung der untersuchten Antigene und Antikörper

Für diese Arbeit wurden vier Antikörper, die für die Zelldifferenzierung beziehungsweise Zellproliferation notwendig sind, ausgewählt. Zugrunde lag die Vorstellung, neue Marker für die Diagnostik der Mantelzelllymphome zu finden.

Das Antigen (Ag) **Ccd2** – Cell Division Cycle 2-Protein - ist die katalytische Untereinheit des Mitose (M)-Phase-Promotorfaktors, der durch die Bindung von Cdc2 an Cyclin B1 entsteht (Clogan-Foukal et al., 1996). Dadurch kommt es in allen Eukaryontenzellen zum Übertritt von der „gap“2-(G₂-) in die M-Phase. Somit hat Cdc2 eine Schlüsselrolle in der Kontrolle des G₂/M-Phasenwechsels (Hall und Coates, 1995) inne. Durch eine Störung an diesem Kontrollpunkt kann es zu einem unkontrollierten Zellwachstum kommen (Sherr, 1996).

Der **MNDA-Antikörper** (-Ak) richtet sich gegen das myeloid cell nuclear differentiation antigen (MNDA) (Briggs et al., 1994a). Dieses Antigen gehört zu der Familie der Interferon-induzierten Proteine und übermittelt den antiproliferativen Effekt der Interferone in vielen gesunden und neoplastischen Zellen (Stark et al., 1998). MNDA kommt ausschließlich in reifen Zellen der myelomonozytischen Zellreihe und in einem Teil der B-Zellen vor (Goldberger et al., 1984; Goldberger et al., 1986; Cousar und Briggs, 1990). Da die Expression in den neoplastischen Zellen erhalten bleibt, findet man MNDA auch in einigen Untergruppen der BCL (Miranda, 1999).

Das Antigen **p27** gehört zu der Familie der Cyclin-abhängigen-Kinase-Inhibitoren (CKI). Die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) regulieren den Übertritt der eukaryonten Zellen aus der G₁- in die Synthese-(S-)Phase. Dieses geschieht durch Bindung von Cyclin an CDK unter Bildung eines aktiven Komplexes (Sherr, 1994; Morgan, 1995). P27 kann durch Bindung an CDK die Bildung dieser aktiven Komplexe hemmen und auf diese Weise den Zellzyklus unterbrechen (Toyoshima und Hunter, 1994; Polyak et al., 1994). Der Verlust des negativen Zellzyklusregulators p27 scheint eine Rolle in der Initiierung von malignen Transformationen zu spielen (Slingerland und Pagano, 2000).

Der **Rb-Ak** markiert Zellen, die das Retinoblastom-Genprodukt exprimieren. Das variabel phosphorylierte Kernprotein dient als Wachstumssuppressor. In seiner hypophosphorylierten Form blockiert das Rb durch die Bindung des Transkriptionsfaktors E₂F das Voranschreiten des Zellzyklus in der G₁-Phase. CyclinD/E-CDK-Komplexe können zur Phosphorylierung des Rb-Kernproteins führen und den wachstumshemmenden Effekt aufheben. Die Zelle gelangt somit in die S-Phase (Sherr, 2000; Bai et al., 2001). Die mutationsbedingte Inaktivierung des Rb-Gens ist bei einer Reihe von Malignomen nachgewiesen worden (Bartek et al., 1992).

1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Expression der vier Antigene Cdc2, MNDA, p27 und Rb bei 117 B-Zell-Lymphomen. Wir wählten dazu die Immunhistochemie als ein Verfahren, das in der Routinediagnostik weit verbreitet ist. Es sollte gezeigt werden, ob

1. die Anwendung der ausgewählten Zellproteine in der Diagnostik von BCL sinnvoll ist. Hierbei ist die Abgrenzung der MCL gegenüber anderen BCL von besonderem Interesse.
2. mit Hilfe der untersuchten Antigene die verschiedenen Subtypen der MCL voneinander abgrenzbar sind. Die MCL stellen eine heterogene Gruppe mit mehreren Subtypen dar. Diese unterscheiden sich deutlich in der klinischen Prognose.
3. die genannten Antigene geeignet sind, um in der Routinediagnostik eingesetzt zu werden. Die Antigenexpression müsste dann in größeren Patientenstudien mit MCL mit klinischen und prognostischen Markern korreliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchte Gewebeproben

Es wurden 129 maligne B-Zell-Lymphome aus dem Lymphknotenregister des Instituts für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UK-SH), Campus Lübeck, untersucht. Die Diagnosen der Lymphome wurden von erfahrenen Pathologen gemäß der WHO-Klassifikation gestellt. Aus diesen 129 Paraffinblöcken wurden in Zusammenarbeit mit der Firma „Euroimmun Medizinische Labordiagnostika GmbH“ (Lübeck) zwei Tissue microarrays (TMA) hergestellt (Abbildung 7.1.1). Einzelheiten zur Herstellung sind im Abschnitt 2.2 beschrieben.

Zwölf nicht auswertbare Fälle wurden aus der Statistik ausgeschlossen. Ausschlusskriterien waren das Fehlen von Tumorgewebe auf einem oder mehreren der Arrays sowie Färbefehler. Die verbliebenen 117 Fälle wurden für die statistische Auswertung abhängig vom Malignitätsgrad in die Gruppen niedrigmaligne BCL (nmL) und hochmaligne BCL (hmL) eingeteilt. Die MCL wurden auf Grund der Heterogenität innerhalb der Entität einer eigenen Gruppe zugeordnet, so dass sich folgende drei Gruppen ergaben:

- Gruppe 1: 29 Mantelzelllymphome (MCL)
 - davon: 15 klassische MCL
 - 5 blastische MCL
 - 2 pleomorphe MCL
 - 3 gemischt klassisch/ blastische MCL
 - 4 gemischt klassisch/ pleomorphe MCL

- Gruppe 2: 15 andere niedrigmaligne B-Zell-Lymphome (nmL)
 - davon: 6 chronisch lymphatische B-Zell-Leukämien (B-CLL)
 - 3 folliculäre Lymphome Grad 1 (Foll I)
 - 5 folliculäre Lymphome Grad 2 (Foll II)
 - 1 lymphoplasmozytisches Lymphom (LPL)

- Gruppe 3: 73 hochmaligne B-Zell-Lymphome (hmL)
 - davon: 2 Burkitt-Lymphome (BL)
 - 64 diffus großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL)
 - davon: 2 anaplastische diffus großzellige Lymphome (ALCL)
 - 46 diffus zentroblastische Lymphome (CBL)
 - 9 immunoblastisch diffus großzellige Lymphome (IBL)
 - 2 Marginalzonenlymphome (MGZL)
 - 5 T-Zell-reiche B-Zell-Lymphome (TBCL)
 - 5 follikuläre Lymphome Grad 3 (Foll III)
 - 2 unklassifizierte hochmaligne B-Zell-Lymphome

Ein besonderes Augenmerk haben wir auf die Untersuchung der Mantelzelllymphome gelegt, da es sich bei dieser Entität um eine heterogene Gruppe von BCL mit vier Subtypen handelt. Die Abgrenzung der einzelnen Subtypen ist für die jeweilige Therapiestrategie und die Prognose entscheidend. Somit ist die Erstellung eindeutiger Markerprofile zur Differenzierung der Subtypen für die Diagnostik erstrebenswert.

In der vorliegenden Arbeit sollen definierte Antigene auf Zellen nachgewiesen werden. Eine hervorragende Methode stellt die Immunhistochemie dar. Dies ist begründet in der Exaktheit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie der leichten Erkennung markierter Zellen für das menschliche Auge, wodurch eine schnelle Auswertung ermöglicht wird. Das Verfahren eignet sich auch dann, wenn nur eine geringe Anzahl antigentragender Zellen vorhanden ist (Cordell et al., 1984; Krenacs et al., 1999).

2.2 Erstellen der Tissue microarrays

In dieser Arbeit haben wir uns die Technik der Tissue microarrays (TMA) zunutze gemacht. Hergestellt wurden die Arrays von der Firma „Euroimmun Medizinische Labordiagnostika GmbH“ in Lübeck. Bei der hier verwendeten Methode wurden die Paraffinschnitte zunächst auf dünne Glasscheiben („Deckgläser“) gezogen und nachfolgend eingescannt. Am Computer wurde ein Raster über den Paraffinschnitt gelegt, so dass die gewünschten Ausschnitte ausgewählt werden konnten. Im Weiteren wurden die Deckgläser dem Raster entsprechend maschinell in 2 x 2 mm messende Fragmente (Biochips) geschnitten. Mit einem Bestückungsautomaten wurden die ausgewählten Biochips auf einen Objektträger geklebt.

Es besteht die Möglichkeit, Biochips verschiedener Paraffinblöcke nebeneinander auf einem gemeinsamen Reaktionsfeld anzuordnen (Biochip-Mosaik) und so durch Benutzung eines einzelnen Objektträgers - und damit in einem einzigen Färbepgang - verschiedene Präparate immunhistochemisch in Hinblick auf die Antikörperreaktion zu vergleichen.

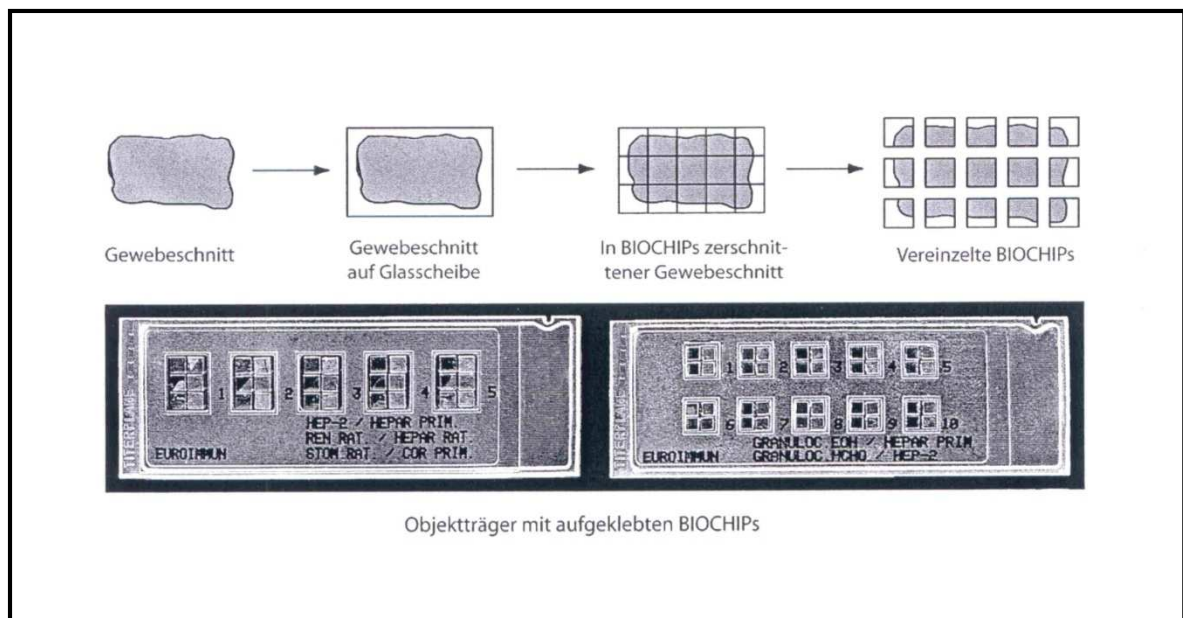


Abb. 2.1: Herstellung eines Tissue microarrays (aus dem Produktkatalog 2004 der Firma Euroimmun Medizinische Labordiagnostika GmbH in Lübeck)

2.3 Vorbehandlung

Die Arrays wurden mittels Xylol (3 x 10 Minuten (min)) entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (Isopropylalkohol 2 x 100%, Ethanol 96%, Ethanol 70%; jeweils für 2 min), in destilliertem Wasser für 2 x 5 min gespült und schließlich in Trishydroxymethylaminomethan-Puffer (Tris-Puffer) mit Tween überführt (Rezeptur siehe Abschnitt 2.7).

Die beste Methode zur Antigen-Demaskierung für die entsprechenden Antikörper wurde in Vorversuchen ermittelt. Bei der Verwendung von MNDA, p27 und Rb wurden die Arrays in Plastikkuvetten mit alkalischem Dekloaker (pH 9,5) gestellt. Diese kamen ohne Deckel für zwei Stunden in den Dampfgerät (Braun MultiGourmet FS10[®]). Bei Nutzung des Ak Cdc2 wurden die Arrays in einem Metallständer für 15 min in einen mit Zitronensäurelösung (4 g Citrat/2 l Aqua destillata, pH 6,0) gefüllten Dampftopf (Fischer Vitavit[®]) gestellt. Gestoppt wurden die Reaktionen jeweils durch zweimaliges Spülen in Tris-Puffer mit Tween.

2.4 ABC - Methode

Die in dieser Arbeit verwendete ABC-Methode (**A**vidin-**B**iotin-**C**omplex) ist ein immunhistochemisches Verfahren, das zu den etablierten indirekten Färbemethoden zum Nachweis zellulärer Antigene gehört. Es basiert auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden (Bourne, 2000). Für das Verfahren werden drei Reagenzien benötigt (Abb. 2.2):

- Primärantikörper, welcher spezifisch an das gesuchte Antigen bindet
- Biotinylierter Sekundärantikörper, auch Brückenantikörper genannt, der an den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet
- Avidin-Biotin-Enzymkomplex (ABC), der durch die freien Bindungsstellen am Avidin mit dem Biotin des Sekundärantikörpers eine Bindung eingeht

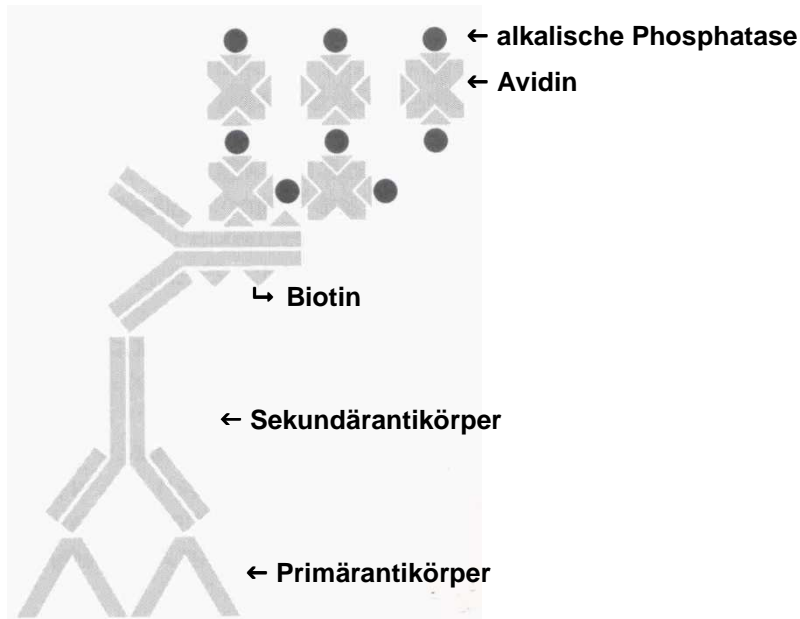


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Prinzips der ABC-Methode (aus Bourne JA: Handbuch 1 Immunperoxidase Färbemethoden. 4. Aufl., Immunhistochemistry Laboratory, DAKO Corporation, Carpinteria, USA, 2000)

Der in unserem Falle mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugierte Avidin-Biotin-Komplex - und damit das gesuchte Antigen – wurde mit Hilfe eines Chromogens sichtbar gemacht.

Die Biotinylierung des Sekundärantikörpers wurde durch kovalente Bindung von Biotin an den Antikörper erreicht. Auf Grund dieses schonenden Verfahrens und der starken Affinität des Avidins gegenüber dem Biotin verfügt die ABC-Methode im Vergleich zu den anderen direkten und indirekten immunhistochemischen Färbemethoden über eine hohe Sensitivität, welche wir uns bei unseren Experimenten zunutze gemacht haben (Bourne, 2000; Lan und Nikolic-Paterson, 2000).

2.5 Färbeprotokoll

	Anti-Cdc2-Ak polyklonaler Maus-Ak	Anti-MNDA-Ak polyklonaler Ziegen-Ak	Anti-p27-Ak polyklonaler Maus-Ak	Anti-Rb-Ak polyklonaler Maus-Ak
Primärantikörper 30 min	Anti-Cdc2-Ak 1: 30	Anti-MNDA-Ak 1: 100	Anti-p27-Ak 1: 20	Anti-Rb-Ak 1:50
Spülen	Tris-Puffer 2x			
Sekundärantikörper 15 min	biotinylierter Ziege-Anti- Maus-Ak	biotinylierter Maus-Anti- Ziegen-Ak 1:100	biotinylierter Ziege-Anti- Maus-Ak	biotinylierter Ziege-Anti- Maus-Ak
Spülen	Tris-Puffer 2x			
Tertiärreagenz 15 min	ABCComplex/AP (30 min. vorher angesetzt)			
Spülen	Tris-Puffer 2x			
Chromogen 30 min auf Rüttler (Gerhardt, Bonn; Typ LS2, 230V, 50Hz, 80W)	Chromogen 30 min. auf Rüttler (50/min)			
Spülen	kaltes Wasser 6 min			
Gegenfärben	Hämatoxylin 5 min			
Bläuen	warmes Wasser 5 min			
Eindeckeln	Aquatex®			

2.6 Kontrollen

Zur Kontrolle der Zuverlässigkeit der ABC-Methode und der Spezifität der Antikörper benutzten wir bei jedem Färbeprogang Positiv- und Negativkontrollen. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse führten wir das Färbeprotokoll unter Auslassen des Primärantikörpers durch. Als Positivkontrolle dienten bereits in der IHC etablierte Antikörper. Bei dem Ziegen-Ak MNDA wählten wir den PAX5-Ak (polyklonaler Ziegen-Ak) in einer Konzentration von 1:100 und gaben diesen Anstelle von MNDA als Primärantikörper auf den TMA. Für die anderen drei Ak Cdc2, p27 und Rb wählten wir entsprechend mit MIB-1 (polyklonaler Maus-Ak) einen etablierten Ak. Diesen verwendeten wir in einer Konzentration von 1:100. Als weitere Positivkontrolle führten wir bei jedem Färbeprogang einen Paraffingewebeschnitt von Organen mit, bei denen eine positive Reaktion für den jeweiligen zu untersuchenden Primärantikörper in der Literatur beschrieben ist. Mit Ausnahme des Rb-Ak waren dieses Tonsillenschnitte. Beim Rb-Ak ist eine positive Reaktion des Hoden-Carcinoms bekannt.

2.7 Antikörper-Verdünnungen und Rezepturen

Primärantikörper

Die Verdünnung der polyklonalen Primärantikörper erfolgte mit Antibody Diluent[®] (Tris-Puffer pH 7,2, 15 mmol/l NaN₃ und Protein). Dieses Produkt ist für Maus- und für Ziegen-Ak geeignet. Es wird kein Maus- bzw. Ziegen-Normalserum zur Reduzierung der Hintergrundfärbung benötigt, da die entsprechende Blockierung bereits im Diluent enthalten ist.

Sekundärantikörper

Als Sekundärantikörper diente für Cdc2, p27 und Rb (Maus-Spezies) ein biotinylierter Ziege-Anti-Maus-Ak. Es wurde die benutzungsfertige Lösung von „Biocare Medical“ verwendet. Für MNDA (Ziegen-Spezies) wurde der biotinylierte Maus-Anti-Ziege-Ak von „Dianova“ in einem Verdünnungsverhältnis von 1:100 benutzt.

Tertiärreagenz

Als Tertiärreagenz haben wir den mit alkalischer Phosphatase markierten Avidin-Biotin-Komplex 30 min vor dem Auftragen angesetzt. Hierfür wurde ein Produkt der Firma „Dako“ benutzt, das sich aus den folgenden Reagenzien A und B zusammensetzt:

Reagenz A : 1 ml Avidin in 0,001 mol/l Phosphat-Puffer, 0,15 mmol/l NaN_3 ;
pH 7,2

Reagenz B: 1 ml biotinylierte alkalische Phosphatase aus Darmmukosa vom Kalb in 0,05 mol/l Tris/HCl, 0,1 mol/l NaCl, 1 mmol/l MgCl_2 , 0,1 mmol/l NaN_3 ; pH 7,2

Auf 5ml Tris-Puffer kamen 45 μl Reagenz A und 45 μl Reagenz B. Die Lösung musste kräftig geschüttelt werden und dann mindestens 30 min ruhig stehen bleiben.

Chromogen

Das Chromogen wurde stets frisch angesetzt. Die folgenden Mengenangaben gelten für eine 8er Glasküvette:

<u>250 ml Becherglas:</u>	37,5 mg	Levamisol
	66,0 ml	APAAP-Puffer (Alkalische-Phosphatase-Anti- Alkalische-Phosphatase-Puffer)
	24,0 ml	Propandiol
<u>1. 10 ml Becherglas:</u>	46,5 mg	Naphtol-AS-Bisphosphat
	562,5 μl	Dimethylformamid
<u>2. 10 ml Becherglas:</u>	19,5 mg	Natriumnitrit
	472,5 μl	Aqua bidestillata
	187,5 μl	Neufuchsin

Die beiden Lösungen in den kleinen Bechergläsern wurden zu der Lösung im großen Becherglas gegeben, anschließend auf einen pH von 8,5 titriert und in eine Glasküvette filtriert. Das Chromogen musste unter dem Abzug hergestellt werden, da bei der Mischung von Natriumnitrit und Neufuchsin durch eine Hexazotierung Ozon freigesetzt wird.

Der APAAP-Puffer und das Propandiol konnten für mehrere Färbetage im Voraus angesetzt werden.

APAAP-Puffer: 8,7 g NaCl
 4,9 g Tris-Base
 1,5 g Tris-HCl
 1,0 l Aqua destillata
 titrieren auf einen pH von 9,75

Propandiol: 21 g 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol
 1,0 l Aqua destillata

Tris-Puffer mit Tween

87,8 g NaCl
 9,0 g Tris Base
68,5 g Tris HCl
10,0 l Aqua destillata
titrieren auf einen pH von 7,4 – 7,6 und hinzufügen von 3 ml Tween-Lösung

Die verwendeten Produkte sind alle mit Angabe der Firma und der Bestellnummer im Anhang unter 7.2.3 zu finden.

2.8 Statistische Auswertung

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde die Menge der angefärbten Tumorzellen in Prozent bewertet. Die mikroskopische Untersuchung wurde von drei Personen unabhängig voneinander vorgenommen und aus den Ergebnissen ein Mittelwert berechnet. Für die statistischen Tests wurde die Anzahl der angefärbten Tumorzellen (Färbequantität) in folgende vier Kategorien eingeteilt: Gruppe 1 enthielt alle Präparate, bei denen weniger als 5% der TZ angefärbt waren; 5 bis < 30% angefärbte Tumorzellen wurden der Gruppe 2, 30 bis < 60% der Gruppe 3 und $\geq 60\%$ der Gruppe 4 zugeordnet.

Da man bei der Verwendung von Prozentzahlen nicht von einer Gauß'schen Normalverteilung ausgehen kann, wurden nicht-parametrische Tests, die empfindlich und effizient für diese Berechnungen sind und eine höhere Trennschärfe gegenüber den parametrischen Tests besitzen, verwendet.

Die Lymphome wurden in die Gruppen Mantelzelllymphome (MCL), andere niedrigmaligne B-Zell-Lymphome (nmL) und hochmaligne B-Zell-Lymphome (hmL) eingeteilt (siehe Abschnitt 2.1). Es handelt sich dabei um unverbundene Stichproben. Daher wurde als Globaltest der Kruskal-Wallis-Test gewählt. Dieses ist ein nicht-parametrischer Rangtest für unverbundene Stichproben. Ergab der Globaltest ein signifikantes Ergebnis, wurden paarweise Tests durchgeführt. Es wurde der entsprechende Rangtest für zwei unverbundene Stichproben, der U-Test nach Mann-Whitney, benutzt.

Von einem signifikanten Ergebnis wurde bei einem $p \leq 0,05$ ausgegangen. Obwohl mehrere statistische Tests durchgeführt wurden, wurde der p-Wert nicht für multiples Testen adjustiert.

Die statistische Analyse wurde mit SPSS von Windows (Version 12.0) durchgeführt.

3. Ergebnisse

Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbung bedienten wir uns nach Bestimmung der Anzahl der gefärbten Tumorzellen gängiger statistischer Tests mit der Frage nach Unterschieden in der Färbequantität bei den verschiedenen Entitäten der BCL in Abhängigkeit zu ihrem Malignitätsgrad.

Alle Ergebnisse der 117 BCL sind in der Tabelle 7.2.2 im Anhang zusammenfassend dargestellt.

3.1 Expressionsmuster von Cdc2 bei BCL

Wir untersuchten die Expression des Cdc2-Ag auf den Tumorzellen von 117 BCL. Bei insgesamt 106 Fällen (91%) konnte das Ag nachgewiesen werden. Wie die statistischen Tests zeigten, bestand dabei ein Unterschied der Quantität in Abhängigkeit zum Malignitätsgrad (Tab. 3.1). Betrachtete man innerhalb der drei definierten Lymphomgruppen den jeweiligen Mittelwert der prozentualen Menge gefärbter Tumorzellen, fand man bei den MCL und den nmL im Vergleich zu den hmL einen signifikant kleineren Wert. Da bei den hmL in den meisten Fällen auch eine höhere Proliferationsrate als bei den nmL vorlag, schien eine Proportionalität zwischen dem Cdc2-Ag und der Proliferationsrate zu bestehen. Um diese Hypothese zu bestätigen, verglichen wir die Ergebnisse der Cdc2-Expression mit denen für den in der IHC etablierten Antikörper MIB-1 (Madewell, 2001), die wir dem immunhistochemischen Befund des Lymphknotenregisters entnommen haben. Hier zeigte sich, dass bei 71% der BCL (83 von 117) eine Proportionalität zwischen dem für die Zellprogression notwendigen Ag Cdc2 und der Proliferationsrate bestand.

MCL gegenüber nmL	MCL gegenüber hmL	nmL gegenüber hmL
0,238	0,001	0,044

Tab. 3.1: p-Werte der paarweisen Testung der drei Lymphomgruppen für das Antigen Cdc2

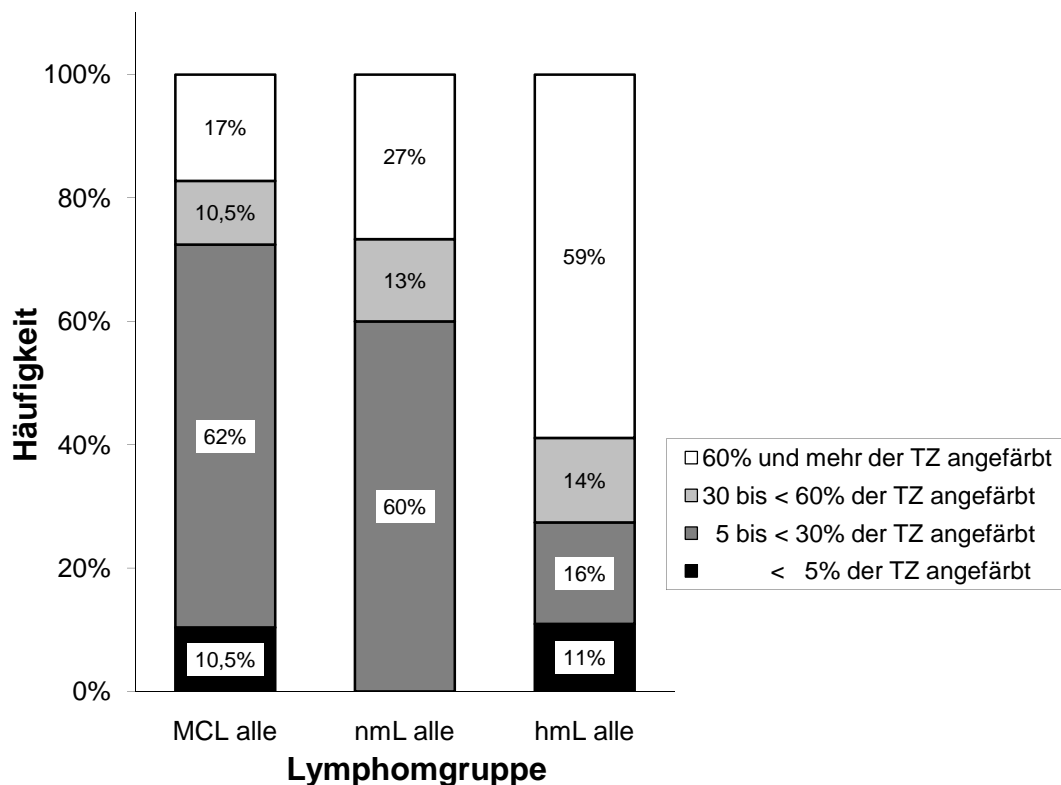


Abb. 3.1: prozentuale Verteilung der Fälle innerhalb der definierten Lymphomgruppen auf die vier Gruppen der Färbequantität für das Antigen Cdc2

3.1.1 Cdc2 - Mantelzelllymphome

Bei den MCL zeigten lediglich drei der insgesamt 29 Fälle keine Cdc2-Expression. Bei den Cdc2-positiven Lymphomen war die Menge der gefärbten Tumorzellen eher gering. Die Proliferationsrate ist bei den MCL abhängig von der Subentität und muss damit beim Vergleich mit der Proliferationsrate in der Auswertung mit bedacht werden. Bei den 15 klassischen MCL war die Anfärberate der Tumorzellen mit einer Ausnahme $\leq 30\%$. Entsprechend der zu erwartenden hohen Proliferationsrate bei den blastischen MCL waren bei 60% mehr als die Hälfte der Tumorzellen gefärbt. Verglichen mit der MIB-1-Expression aus den immunhistochemischen Befunden des Institutes kam es auch bei den beiden pleomorphen MCL zu einer Übereinstimmung zwischen der Proliferationsrate und der Cdc2-Expression. Eine Aussage über die Cdc2-Expression im Vergleich zur Proliferationsrate war bei den sieben Fällen mit einem gemischten histologischen Bild bei der Verwendung von TMA nicht möglich. Man kann keine sichere Aussage über die Proliferationsrate des Präparatanteils, der sich auf dem auszuwertenden TMA befindet, machen.

3.1.2 Cdc2 - niedrigmaligne B-Zell-Lymphome

Die 15 nmL zeigten alle eine Cdc2-Expression auf den Tumorzellen. In 60% der Fälle war allerdings die Expressionsrate gering. Dieses Ergebnis stimmte mit der zu erwartenden niedrigen Proliferationsrate der nmL überein. Bei den übrigen 40% (sechs Fälle) mit über 30% gefärbten Tumorzellen fand man bei der Hälfte der Lymphome (ein LPL und zwei Foll II) für MIB-1 deutlich höhere Werte als für nmL typisch wäre. Somit würde auch für diese Fälle die aufgestellte Hypothese der Proportionalität zwischen Cdc2-Expression und Proliferationsrate zutreffen.

3.1.3 Cdc2 - hochmaligne B-Zell-Lymphome

Die hochmalignen BCL zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate aus. Es zeigte sich auch für Cdc2 eine hohe Anzahl von positiven Tumorzellen in den untersuchten hmL. Bei einer Positivrate von 89% (65 von 73 Fällen) waren bei zwei Drittel der Fälle $\geq 60\%$ der Tumorzellen gefärbt. Nach Betrachtung der ursprünglichen histologischen Schnitte (Giemsa-Färbung) fand man bei 13 der insgesamt 20 gering gefärbten hmL ($\leq 30\%$) neben hochmalignen auch niedrigmaligne Anteile oder es zeigten sich viele Apoptosen, die auf eine Schädigung des Gewebes bereits vor der Fixierung hinweisen.

3.1.4 Mann-Whitney-Test unter Berücksichtigung der Ausschlusskriterien

Wir führten eine erneute Berechnung des Mann-Whitney-Testes unter Ausschluss der mit den histologischen Befunden erklärbaren Ausreißern unter der Annahme einer Proportionalität zwischen der Expression von Cdc2 und der Proliferationsrate, gemessen an der MIB-1-Expression, durch. Hierbei wurden insgesamt 97 BCL eingeschlossen, davon 22 von 29 MCL unter Ausschluss der histologischen Mischentitäten, alle 15 nmL und 60 von 73 hmL unter Ausschluss der Fälle mit zusätzlich niedrigmalignen Anteilen und hoher Apoptoserate. Die Ergebnisse des Mann-Whitney-Testes bestätigten den signifikanten Unterschied für die Cdc2-Expression zwischen den MCL und den nmL zu den hmL. Bei 84% kam es zu einer Proportionalität zwischen der Cdc2-Expression und der Proliferationsrate.

MCL gegenüber nmL	MCL gegenüber hmL	nmL gegenüber hmL
0,435	0,001	0,001

Tab. 3.2: p-Werte der paarweisen Testung der drei Lymphomgruppen für das Antigen Cdc2 unter Berücksichtigung der Ausschlusskriterien

3.2 Expressionsmuster von MNDA bei BCL

Für das MNDA-Ag zeigte sich wie bei dem Cdc2-Ag ein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-Test zwischen den MCL und den nmL gegenüber den hmL. Die Rate der positiven Tumorzellreaktionen war jedoch mit 69% für MNDA deutlich geringer als bei Cdc2 mit 91%. Bei Betrachtung der drei Gruppen fiel auf, dass insbesondere bei den hmL in vielen Fällen gar keine oder nur wenige Tumorzellen gefärbt waren. Bei den MCL und den nmL lag der Mittelwert aller Fälle oberhalb von 60% (Abb. 7.1.2). Im Gegensatz zur Cdc2-Expression ist zu vermuten, dass für MNDA bei den BCL eine umgekehrte Proportionalität zum Malignitätsgrad besteht.

MCL gegenüber nmL	MCL gegenüber hmL	nmL gegenüber hmL
0,469	0,001	0,021

Tab. 3.3: p-Werte der paarweisen Testung der drei Lymphomgruppen für das Antigen MNDA

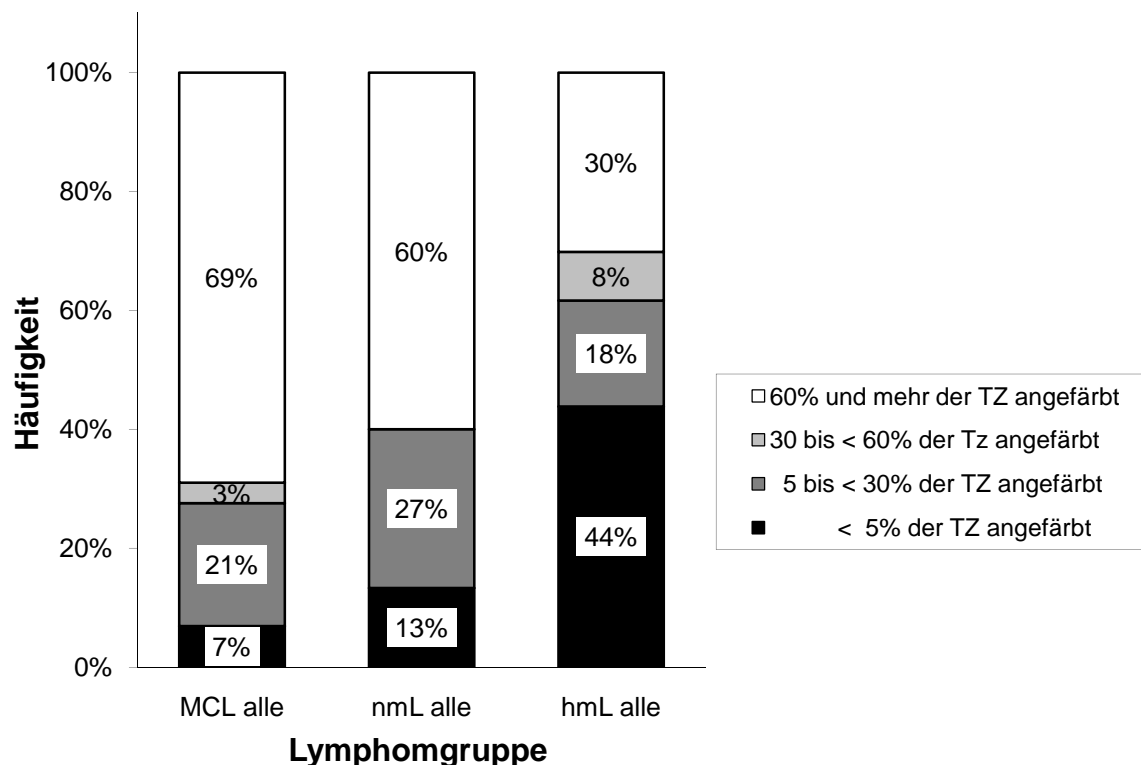


Abb. 3.2: prozentuale Verteilung der Fälle innerhalb der definierten Lymphomgruppen auf die vier Gruppen der Färbequantität für das Antigen MNDA

3.2.1 MNDA - Mantelzelllymphome

Bei den MCL kam es lediglich in zwei Fällen zu keiner MNDA-Expression. Insgesamt waren in der Gruppe der MCL bei 20 der 29 Fälle über 60% der Tumorzellen angefärbt. Die übrigen neun MCL zeigten hingegen $\leq 30\%$ gefärbte Tumorzellen. Ein Zusammenhang zu den verschiedenen Subtypen konnte nicht erarbeitet werden. Sowohl bei den klassischen, als auch bei den blastischen und den histologischen Mischformen kam es in 60-80% der Fälle zu einer Expression von MNDA auf mehr als der Hälfte der Tumorzellen. Bei den zwei pleomorphen MCL waren ebenfalls viele Tumorzellen angefärbt. Eine Proportionalität zur Proliferationsrate war somit nicht herzustellen.

3.2.2 MNDA - niedrigmaligne B-Zell-Lymphome

MNDA wurde bei der Mehrzahl der nML stark exprimiert. Die B-CLL zeigten bei niedriger Proliferationsrate mit einer Ausnahme eine Expressionsrate von > 60% gefärbter Tumorzellen. Ähnlich verhielt es sich bei den Foll I. In der Gruppe der fünf Foll II war die Expressionsrate für MNDA sehr variabel. Es zeigte sich jedoch, dass bei den drei Fällen mit einer geringeren Expressionsrate die Proliferationsrate gemessen durch MIB-1 mit 50% gefärbten Tumorzellen relativ hoch war und damit ebenfalls von einer umgekehrten Proportionalität zwischen den beiden Parametern ausgegangen werden kann. Ähnlich verhielt es sich bei dem LPL. Im immunhistologischen Befund des Institutes wurde eine hohe Expressionsrate für MIB-1 beschrieben. Somit korrelierte auch das Ergebnis für das LPL aus unseren Versuchen mit einer niedrigen Expressionsrate für MNDA mit der angenommenen umgekehrten Proportionalität zwischen MNDA und der Proliferationsrate.

3.2.3 MNDA - hochmaligne B-Zell-Lymphome

Die Anzahl der gefärbten Tumorzellen war bei den hmL deutlich geringer als bei den MCL und den nML. In gut einem Drittel der Fälle kam es sogar zu keiner Reaktion und bei weiteren 13 Fällen waren nur 5-30% der Tumorzellen MNDA-positiv (Abb. 7.1.2). Geht man von einer hohen Proliferationsrate bei den hmL aus, so bestand bei diesen Fällen eine umgekehrte Proportionalität zwischen der MNDA-Expression und der Proliferationsrate. Bei einem weiteren Drittel waren jedoch über 60% der Tumorzellen gefärbt. Diese waren vor allem in der Gruppe der DLBCL zu finden und machten hier fast ein Drittel der Fälle (20 von 64) aus. Eindeutig war das Ergebnis bei den BL. Die beiden untersuchten Fälle zeigten keine MNDA-Expression.

Die zunächst innerhalb der drei Gruppen durch die Mittelwerte der Färbequantität angenommene umgekehrte Proportionalität zur Proliferationsrate ließ sich nur bei den nML und den BL eindeutig bestätigen. Bei den übrigen Entitäten schwankten die Werte stark um den Mittelwert.

3.3 Expressionsmuster von p27 bei BCL

p27 spielt als CDK-Inhibitor eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Zellprogression. Der Vergleich der Antigenexpression von p27 innerhalb der drei definierten Lymphomgruppen zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den MCL und den übrigen BCL. Im Gegensatz zu den MCL gab es bei den 88 nmL und hmL eine Rate von 69%, bei der das p27-Antigen nicht nachgewiesen werden konnte. Lediglich in 12 der 88 Fälle kam es zu einer deutlichen Expression von p27.

MCL gegenüber nmL	MCL gegenüber hmL	nmL gegenüber hmL
0,007	0,001	0,425

Tab. 3.3: p-Werte der paarweisen Testung der drei Lymphomgruppen für das Antigen p27

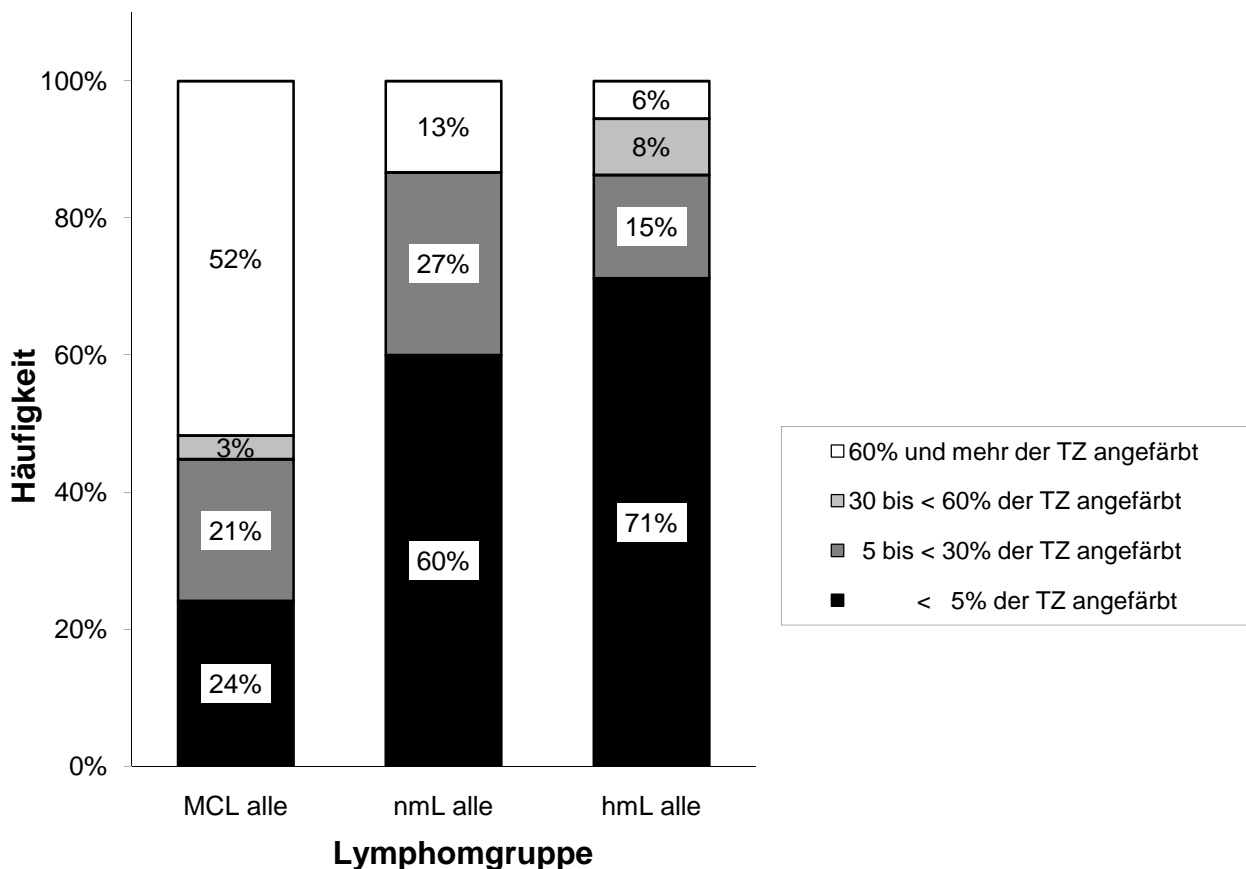


Abb. 3.3: prozentuale Verteilung der Fälle innerhalb der definierten Lymphomgruppen auf die vier Gruppen der Färbequantität für das Antigen p27

3.3.1 p27 - Mantelzelllymphome

76% der MCL zeigten eine positive Reaktion auf den p27-Ak. Bei der Hälfte dieser Fälle waren über 60% der Tumorzellen gefärbt (Abb. 7.1.3). Betrachtete man die einzelnen Subtypen unter der in der Literatur beschriebenen umgekehrten Proportionalität der p27-Expression zur Proliferationsrate, so fand man in den meisten Fällen eine Übereinstimmung. Bei den blastischen MCL kam es in einem Fall zu einer Färbung aller Tumorzellen. In den übrigen Fällen waren maximal 20% der Tumorzellen gefärbt. Bei der klassischen Variante mit einer eher niedrigen Proliferationsrate waren bei zwei Drittel der Lymphome mehr als die Hälfte der Tumorzellen p27-positiv. Auch die beiden pleomorphen MCL mit hohen MIB-1-Werten zeigten entsprechend der Proportionalitätstheorie niedrige p27-Werte. Wie bei den übrigen Antigenen kann man bei den histologischen Mischformen unter Verwendung von TMA keine Aussage über die Proportionalität zur Proliferationsrate machen.

3.3.2 p27 - niedrigmaligne B-Zell-Lymphome

In der Gruppe der nmL kam es in 60% der Fälle (9 von 15) zu keiner positiven Reaktion auf den p27-Ak. In vier weiteren Fällen waren weniger als ein Drittel der Zellen gefärbt (Abb. 7.1.4). Bei den nmL war somit keine umgekehrte Proportionalität zur Proliferationsrate zu finden.

3.3.3 p27 - hochmaligne B-Zell-Lymphome

Wie bei den nmL ergaben die Untersuchungen auch in der Gruppe der hmL mit 68% (50 von 73 Fällen) eine hohe Negativrate (Abb. 7.1.5). Zusätzlich kam es in zwölf Fällen (weitere 16%) zu einer Färberate von weniger als 30%. Bei erneuter Durchschau der ursprünglichen histologischen Schnitte der elf hmL, bei denen es zu einer deutlichen Reaktion auf p27 kam, fiel bei sechs Fällen auf, dass es sich um simultan sekundär hochmaligne BCL handelte. Bei diesen Lymphomen kann es noch Anteile mit geringerer Proliferationsrate und damit nach der Proportionalitätstheorie mit einer höheren p27-Expression geben. Bei einem weiteren hmL mit über 60% gefärbten Tumorzellen zeigte der Paraffinschnitt, dass es sich nach den heutigen Kriterien um ein nmL handelt.

Ließ man diese sieben Fälle aus der Berechnung heraus, kam man auf einen Prozentsatz von 94% mit weniger als 30% gefärbten Tumorzellen. Damit kam es in 94% der Fälle der 73 untersuchten hmL zu der angenommenen umgekehrten Proportionalität zwischen Proliferationsrate und p27-Expression.

3.4 Expressionsmuster von Rb bei BCL

Das Rb-Antigen spielt ebenfalls eine Rolle im Übertritt der Zellen in die S-Phase. Bei den untersuchten BCL wurde Rb unabhängig von der Entität in drei Viertel der Fälle auf den Tumorzellen exprimiert. Der Kruskal-Wallis-Test brachte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen definierten Lymphomgruppen. Bei der Hälfte der Fälle waren mehr als 60% der Tumorzellen angefärbt (Abb. 7.1.6).

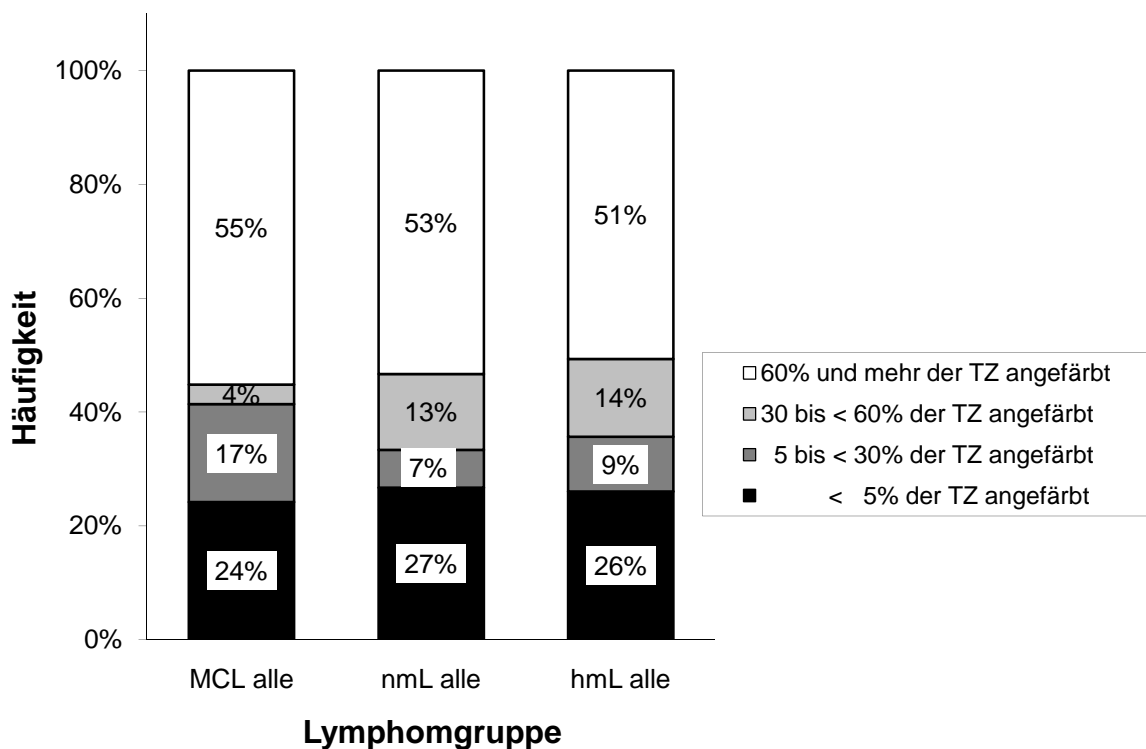


Abb. 3.4: prozentuale Verteilung der Fälle innerhalb der definierten Lymphomgruppen auf die vier Gruppen der Färbequantität für das Antigen Rb

4. Diskussion

In der Lymphomdiagnostik ist die Verwendung spezifischer Antikörper im Rahmen der immunhistochemischen Färbeverfahren von großer Bedeutung. Sowohl in der Erst- als auch bei der Rezidivdiagnostik ist die entnommene Gewebeprobe im Regelfall klein und es steht nur eine geringe Anzahl an Tumorzellen für die Untersuchung zur Verfügung. Diese wenigen Zellen können in histochemischen Färbeverfahren leicht unerkant bleiben. Man benötigt daher spezifische Marker, die in der Lage sind, auch in kleinen, formalinfixierten und paraffingebetteten Gewebeblöcken Tumorzellen zu identifizieren.

Außerdem können Antikörper in der Unterscheidung der einzelnen Entitäten und Subentitäten der Lymphome hilfreich sein. Mit Hilfe charakteristischer Färbemuster einzelner Antikörper kann die Diagnosestellung erleichtert werden. Zu diesem Zweck untersuchten wir bei 117 BCL die Expression der ausgewählten Antikörper Cdc2, MNDA, p27 und Rb, die entscheidende Funktionen in der Zellprogression und Zelldifferenzierung haben.

Eine Sonderstellung in der Diagnostik der BCL hat das MCL auf Grund der Diskrepanz zwischen dem zytologischen Bild eines niedrigmalignen Lymphoms und dem teilweise aggressiven Krankheitsverlauf. Es ist bekannt, dass es innerhalb der MCL verschiedene Subtypen mit unterschiedlicher Prognose gibt. Daher ist die Unterscheidung der MCL von den übrigen BCL sowie die diagnostische Differenzierung der einzelnen Subtypen für den weiteren klinischen Verlauf und die Prognose von großer Bedeutung.

Wir haben in unserer Arbeit die Expression der oben aufgeführten Antigene bei den MCL mit der Expression bei anderen niedrigmalignen und hochmalignen BCL verglichen. Des Weiteren wurde die Färbequantität für die verschiedenen zytologischen Subtypen des MCL ausgewertet.

Die wichtigsten Ergebnisse, die in den Abschnitten 4.1 – 4.3 näher beschrieben werden, sind folgende:

- 1) Alle untersuchten Antigene spielen eine Rolle in der Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Es handelt sich um Antikörper, die bereits in der IHC etabliert sind. Eine ausführliche Analyse der Marker bei den verschiedenen Entitäten der BCL ist in der Literatur bisher nur für p27 und MNDA beschrieben.
- 2) Bei den MCL ist die Expression von p27 und Cdc2 abhängig von der Subentität.
- 3) Mit Ausnahme des Rb-Antigens ist die Expressionsrate der untersuchten Marker abhängig vom Malignitätsgrad der Lymphome. Es besteht somit ein Zusammenhang zur Proliferationsrate, da eine erhöhte Proliferation für die hochmalignen Neoplasien im Vergleich zu den niedrigmalignen BCL bekannt ist.
 - 3a) Das Tumorsuppressorgen Rb wird in drei Viertel der untersuchten 117 BCL exprimiert.
 - 3b) Es zeigt sich bei den BCL eine Proportionalität zwischen der Cdc2-Expression und der Proliferationsrate gemessen am Proliferationsmarker MIB-1.
 - 3c) Für MNDA zeigt sich ebenfalls ein Unterschied in der Expression zwischen den nmL und den hmL. Ein Zusammenhang zur Proliferation kann jedoch nicht dargestellt werden.
 - 3d) p27 ist ein bekannter Ak in der IHC und bereits etabliert in der Lymphomdiagnostik. Dieser Marker zeigt eine starke Expression bei den MCL im Gegensatz zu den übrigen untersuchten BCL.

4.1 Etablierung der untersuchten Antikörper in der Lymphomdiagnostik

Bei den vier untersuchten Antigenen handelt es sich um Proteine, die alle eine Funktion in der Zellproliferation und Zelldifferenzierung haben. Das Myeloische Zellkerndifferenzierungs-Antigen (MNDA) ist ein Kernprotein, das in den Zellen der späten Differenzierungsstufen nachgewiesen werden kann (Briggs et al., 1994a). Die anderen drei untersuchten Antigene haben ihren Angriffspunkt im Zellzyklus aller eukaryonten Zellen. Das Antigen Cdc2 gehört zu den Cyclin-abhängigen Kinasen und ist für den Übertritt der Zelle von der G₂- in die M-Phase notwendig (Hall und Coates, 1995). p27 und Rb greifen beide im Kontrollpunkt von der G₁- in die S-Phase ein. p27 ist ein CDK-Inhibitor (Sherr, 1994; Morgan, 1995). Durch den Verlust des Proteins wird der inhibitorische Effekt auf CDK4 und CDK2 aufgehoben, so dass es zur Komplexbildung (CyclinD-CDK4- und CyclinE-CDK2-Komplex) kommen kann. Die aktivierten Komplexe führen zu einer Phosphorylierung von Rb. Dadurch wiederum verliert das Rb seine Funktion als WachstumsSuppressor, denn in der phosphorylierten Form kommt es zur Freisetzung von E2F. E2F aktiviert verschiedene Gene, die für den Übertritt der Zelle in die Synthesephase des Zellzyklus notwendig sind (Korz et al., 2002).

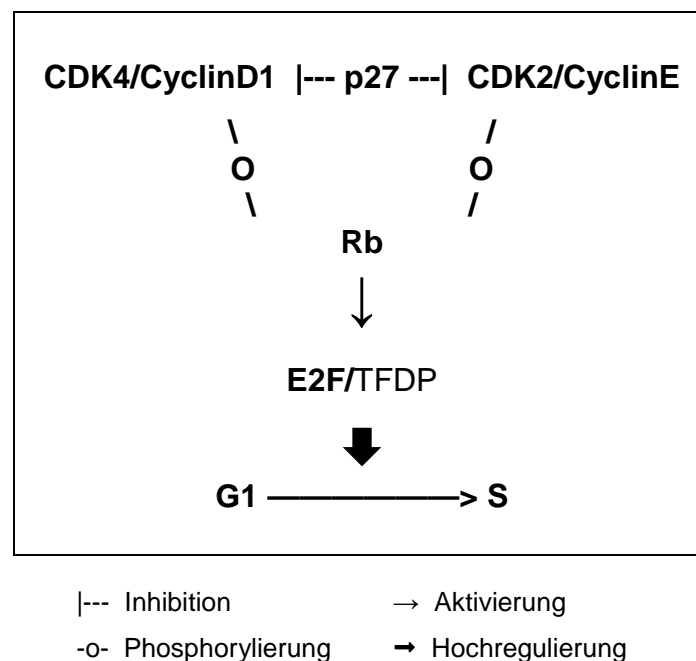


Abb. 4.1: Darstellung des Zusammenhangs von Rb und p27 im Zellzyklus (Korz et al., 2002)

Die untersuchten Antikörper Cdc2, MND A, p27 und Rb sind in der IHC bereits etabliert. In der routinemäßigen Lymphomdiagnostik sind sie jedoch bisher nicht vertreten. Für das p27-Antigen ist in der Literatur eine umgekehrte Proportionalität zur Proliferationsrate in vielen nichtneoplastischen und neoplastischen Geweben beschrieben (Quintalla-Martinez et al., 1998; Sanchez-Beato et al., 1997; Barnouin et al., 1999; Erlanson et al., 1998). Diesen Zusammenhang haben wir in unserer Arbeit bei 117 BCL unterschiedlicher Malignität und somit auch verschiedener Proliferationsraten untersucht. Zusätzlich haben wir drei weitere Ak ausgewählt, bei denen auf Grund ihrer Rolle im Zellzyklus, ein Zusammenhang zwischen der Expressionsrate des Ag und der Proliferationsrate möglich schien.

Für das Cdc2 wird eine Rolle als Prognosefaktor bei den MCL diskutiert (Jin und Park, 2002). Dieses beruht auf einer cDNA-Microarray-Studie. Es gibt bereits immunhistochemische Studien zum Vergleich der Cdc2-Expression bei MCL zur MIB-1-Expression und der Überlebensrate (Hui et al., 2005). Eine breit angelegte Studie für die verschiedenen Entitäten der BCL liegt jedoch nicht vor.

MND A ist bekannt durch Immunoblot-Screening von Kernproteinen (Briggs et al., 1994a). Es gibt in der Literatur immunhistochemische Analysen unterschiedlicher Gewebe. Ein Zusammenhang zwischen der Expression des Ag auf den Tumorzellen und dem Malignitätsgrad beziehungsweise der Proliferationsrate der verschiedenen Lymphome wurde bisher nicht beschrieben.

Das Rb ist ebenfalls ein bekanntes Antigen und in der Literatur als weit verbreitetes Tumorsuppressorgen beschrieben. Die Arbeit von Geradts et al. (1998) konnte in einer immunhistochemischen Studie bei 100 von 101 untersuchten NHL das Rb-Antigen nachweisen.

Nach Variation verschiedener Vorbehandlungsmethoden, Inkubationszeiten und Verdünnungen der Reagenzien optimierten wir schließlich das immunhistochemische Färbeverfahren dahingehend, dass die verwendeten Antikörper gegen Cdc2, MND A, p27 und Rb qualitativ hochwertige Ergebnisse mit nur wenig unspezifischer Hintergrundfärbung lieferten. Wir konnten bestätigen, dass sich alle untersuchten Antikörper zur Detektion von B-Zellen und B-Zellneoplasien in der IHC eignen.

4.2 Das Mantelzelllymphom und seine Subentitäten

Das Mantelzelllymphom ist eine heterogene Entität reifzelliger BCL. Man unterscheidet verschiedene histologische Wachstumsmuster: diffus, nodulär, auf die Mantelzone beschränkt oder eine Kombination dieser drei Typen. Das zytologische Bild kann kleinzellig, klassisch, blastisch oder pleomorph und nicht selten ein Mischbild sein. Im Bildanhang sind die verschiedenen histologischen Schnitte in Giemsa-Färbung dargestellt (Abb. 7.1.7).

Die Proliferationsrate der MCL ist abhängig vom zytologischen Bild. Bei den blastischen MCL ist die Proliferationsrate deutlich höher als bei der klassischen Variante (Quintanilla-Martinez et al., 1998). Bei den pleomorphen MCL wiederum kann die Proliferationsrate sehr unterschiedlich sein. Häufig findet man jedoch hohe Mitoseraten. In der Literatur ist ein Zusammenhang zwischen der Proliferationsrate der MCL, gemessen durch den etablierten Proliferationsmarker MIB-1 (Ki-67), und der Überlebensdauer des Patienten beschrieben. Es zeigte sich in der Studie, dass Patienten mit einem blastischen MCL eine schlechtere Prognose als Patienten mit einem klassischen MCL haben (Katzenberger et al., 2006).

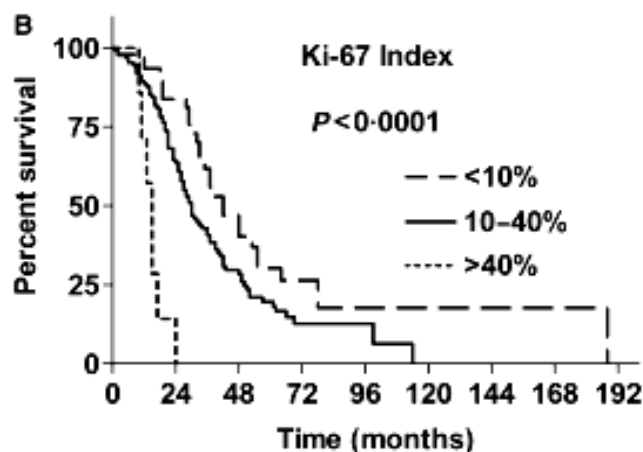


Abb. 4.2: Kaplan-Meier-Kurve bei MCL in Abhängigkeit zum Proliferationsmarker Ki-67 (Katzenberger et al., 2006)

Dieses macht die Notwendigkeit einer genauen Diagnostik der einzelnen Subentitäten deutlich. Da in der IHC für eine Diagnose grundsätzlich ein Panel verschiedener Antikörper herangezogen wird, ist die Untersuchung weiterer Antigene mit einer Funktion im Zellzyklus und einem möglichen Bezug zur Proliferationsrate in Ergänzung zum MIB-1-Ag sinnvoll.

Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen, dass die Expression von p27 und Cdc2 vom zytologischen Bild des MCL abhängig ist. Entsprechend der unterschiedlichen Proliferationsraten der einzelnen Subtypen, konnten wir gleichzeitig einen Zusammenhang zwischen der Proliferationsrate und der Expression von p27 und Cdc2 darstellen (siehe Abschnitt 4.3). Bei den Antigenen MNDA und Rb konnte keine Beziehung zwischen den beiden Parametern gezeigt werden.

An dieser Stelle müssen jedoch kritisch die in der Arbeit verwendeten TMA diskutiert werden. Die TMA sind Prototypen, bei denen für jeden untersuchten Lymphomfall nur ein Biochip pro TMA aufgetragen wurde. Aufgrund der vorherigen Auswahl der Präparatfragmente am Computer sind wir davon ausgegangen, dass die Auswertung des Materials ohne Verluste möglich ist. Es zeigte sich jedoch, dass im Fall der MCL bei einem zu klein gewählten Ausschnitt Informationen verloren gehen. Insbesondere bei den histologischen Mischformen kann es zu Problemen in der Auswertung kommen. Der kleine Ausschnitt auf dem TMA von 2 x 2mm stellt möglicherweise nur einen Teil des histologischen Mischbildes dar. Eine Aussage über die Proliferationsrate ist in diesen Fällen nicht möglich.

In der Literatur über TMA sind als effektive Anzahl drei Biochips pro Fall beschrieben (Rubin et al., 2002; Hoos und Cordon-Cardo, 2001; Camp et al., 2000). Bei diesen Studien handelt es sich um eine andere Methode zur Herstellung von TMA, bei denen in einen Empfänger-Paraffinblock bis zu 100 Stanzen gemacht werden und in diese aus unterschiedlichen Spender-Paraffinblöcken Stanzzylinder eingebracht werden. Von dem so gefertigten neuen Paraffinblock werden Schnitte auf Objektträger aufgebracht.

In weiteren Studien unter Verwendung der in dieser Arbeit beschriebenen Herstellungstechnik der TMA ist ebenfalls nach unseren Erfahrungen die Verwendung mehrerer Biochips pro zu untersuchendem Fall sinnvoll. Gleichzeitig wird der Verlust durch Färbefehler, die insbesondere am Rand von Reaktionsfeldern auftreten und bei einer Biochipgröße von 2 x 2mm zu einer fehlenden Auswertung führen können, vermieden.

4.3 Abhängigkeit der Expressionsrate bei den untersuchten Antigenen vom Malignitätsgrad

Die Auswertung unserer Ergebnisse legt eine Abhängigkeit der Expression vom Malignitätsgrad der BCL bei drei der vier untersuchten Proteine nahe. Die Einteilung in die unterschiedlichen Malignitätsgrade ergibt sich unter anderem durch die Proliferationsrate. Für die hochmalignen Tumoren wird allgemein eine hohe Proliferationsrate im Vergleich zu den niedrigmalignen Tumoren beschrieben. Somit können wir eine Aussage über die Beziehung zwischen der Expression der untersuchten Marker und der Proliferationsrate machen. Um die Ergebnisse zu untermauern, wurden zur Bestimmung der Proliferationsrate die Ergebnisse des etablierten Proliferationsmarkers MIB-1 aus den Unterlagen des Lymphomregisters herangezogen.

4.3.1 Expression des Tumorsuppressorgens Rb bei BCL

Das Rb-Antigen wurde in unseren Versuchen unabhängig von der Lymphomentität und dem Malignitätsgrad in drei Viertel der Fälle exprimiert. Bei der Hälfte der positiven Fälle zeigt sich eine hohe Färbequantität. Die immunhistochemische Arbeit von Geradts et al. (1998) bestätigt unsere Ergebnisse: hohe Positivrate für die Rb-Expression bei BCL. Andere Arbeitsgruppen beschreiben ein Fehlen von Rb bei verschiedenen BCL auf Grund einer Deletion des Rb-Gens (Rosenwald et al., 1999; Stilgenbauer et al., 1998). Dieses widerspricht jedoch unseren Ergebnissen. Auch die Arbeit von Galteland et al. (2002) konnte bei NHL durch In-situ-Hybridisierung keinen Defekt im Rb-Gen nachweisen.

Unsere Arbeit zeigt jedoch auch, dass das Rb-Protein nicht zur Unterscheidung der verschiedenen Lymphomentitäten dienen kann. Bei dem variabel phosphorylierten Retinoblastom (Rb) handelt es sich in der hypophosphorylierten Form um ein Tumorsuppressorgen, das bereits in vielen Tumoren nachgewiesen werden konnte (Sherr, 2000; Gorgoulis et al., 1998; Knudson, 1993; Bartek et al., 1992). Mit unseren Ergebnissen können wir keine Aussage über die Rolle des Rb bei den BCL machen, da der gewählte Ak nicht spezifisch an die phosphorylierte beziehungsweise die hypophosphorylierte Form des Rb-Proteins bindet.

Eine Fortsetzung der immunhistochemischen Analyse dieses Proteins mit Unterscheidung der beiden Phosphorylierungsformen des Rb bei den BCL wäre daher wünschenswert.

4.3.2 Cdc2 als Proliferationsmarker in der Lymphomdiagnostik

Unsere Ergebnisse zeigen mit einer Positivrate von 91% eine deutliche Expression für das Cell Division Cycle 2 (Cdc2)-Protein bei den untersuchten BCL. Dieses bestätigt die Ergebnisse von Jin und Park (2002), die eine Überexpression von Cdc2 bei NHL festgestellt haben. Es ist bekannt, dass es durch eine Störung am Kontrollpunkt des Zellzyklus von der G₂- in die M-Phase zu einem unkontrollierten Zellwachstum und zur malignen Transformation kommen kann (Sherr, 1996). Als Folge konnte bereits bei Tumoren des Gehirns (Collecchi et al., 2000), des Ösophagus (Hiroshi et al., 1999), des Kolons (Wang et al., 1997), der Leber (Ito et al., 2000) und auch bei NHL (Jin und Park, 2002) eine entsprechende Überexpression von Cdc2 festgestellt werden.

Die Auswertung der Färbequantität in unseren Versuchen zeigt einen Unterschied zwischen den niedrigmalignen und den hochmalignen BCL. Hierbei exprimieren die nmL mit einer geringen Proliferationsrate deutlich weniger Cdc2 als die hmL mit einer hohen Proliferationsrate. Somit stellt sich eine Proportionalität zwischen der Cdc2-Expression und der Proliferationsrate bei den BCL dar. Bei den nmL gab es bei Betrachtung der Einzelfälle sechs Lymphome mit mehr als 30% gefärbten Tumorzellen. Jedoch lediglich bei der Hälfte dieser Fälle zeigte sich eine geringe Proliferationsrate und damit keine Proportionalität der Cdc2-Expression zur Proliferationsrate. Bei zwei Foll II und dem LPL hingegen lag die MIB-1-Expression zwischen 50 und 60%.

Bei den Foll II stellt es definitionsgemäß bereits die Grenze zu den hmL und damit dem Grad III der Foll da. Bei dem LPL ist auf Grund der aufgehobenen histologischen Struktur die Beurteilung oft schwierig und daher bei einem einzigen Fall wenig aussagekräftig. Unsere Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen der Arbeitsgruppe um Jin und Park (2002). In deren immunhistochemischer Arbeit mit 54 NHL konnte eine Überexpression von Cdc2 unabhängig von der Entität gezeigt werden. Eine Korrelation zum Proliferationsmarker MIB-1 war nur gering signifikant ($p=0,056$). In der Arbeit von Hui et al. (2005) zeigte sich jedoch bei der immunhistochemischen Untersuchung von 48 MCL eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Markern Cdc2 und MIB-1 ($p<0,05$). Bei den MCL haben wir in der Auswertung ebenfalls die unterschiedlichen Subentitäten berücksichtigt. Unter Ausschluss der zytologischen Mischbilder, die bei Verwendung unserer TMA, wie bereits erläutert, wegen fehlender Aussagekraft über die Proliferationsrate des ausgewählten Biochips nicht mit in die Auswertung eingingen, zeigt sich in 86% der Fälle eine Übereinstimmung der Cdc2-Expression und der Proliferationsrate. In Bezug auf alle 117 untersuchten BCL unter Einbezug der Ausschlusskriterien (siehe Abschnitt 3.1.4) können wir mit unseren Ergebnissen in 84% der Fälle eine Korrelation der Cdc2-Expression auf den Tumorzellen zur Proliferationsrate darstellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass es sich bei Cdc2 um einen Proliferationsmarker handelt, da er bei den NHL eine proportionale Expression zu dem Antigen MIB-1 aufweist und eine wichtige Rolle im Zellzyklus spielt. Zur Untermauerung dieser Annahme müssten Studien folgen, bei denen in einem großen Kollektiv die Expression von Cdc2 und MIB-1 in verschiedenen Geweben verglichen wird.

Über die in der Literatur beschriebene Funktion des Cdc2 als Prognosefaktor können wir mit unseren Ergebnissen keine Aussage machen, da die klinischen Daten der untersuchten Fälle nicht zur Verfügung standen.

4.3.3 MNDA: geringer Stellenwert in der Lymphomdiagnostik

Das MNDA wird nicht in allen Zellen der Eukaryonten exprimiert. Zunächst fand man es mit streng nuklearem Sitz in den späten Differenzierungsstufen der Myeloblasten und Monoblasten (Goldberger et al., 1984+86; Cousar und Briggs, 1990). Bei weiteren Untersuchungen wurde außerdem eine Expression in den peripheren Blutgranulozyten und –monozyten (Briggs et al., 1994b) sowie in bestimmten Differenzierungsstufen der B-Zell-Reihe (Miranda et al., 1999) gefunden.

Die 117 untersuchten Lymphome sind ausnahmslos maligne Transformationen von bestimmten Differenzierungsstufen der B-Zell-Reihe (Abb. 1.2). 69% der Fälle zeigen eine MNDA-Expression. Es besteht dabei ein signifikanter Unterschied der Expression zwischen den nML und den hML. Im Gegensatz zu Cdc2 zeigen unsere Ergebnisse für MNDA bei den nML einschließlich der MCL eine höhere Färbequantität als bei den hML.

In der Literatur wird eine Überexpression von MNDA bei den MCL um das 12- bis 15-fache gegenüber normalen B-Zell-Linien beschrieben (Ek et al., 2002). Hierüber können wir bei fehlenden Vergleichsmöglichkeiten zu normalen B-Zell-Linien keine Aussage machen. Eine deutliche Expression - unabhängig vom zytologischen Bild des MCL - zeigen unsere Ergebnisse allerdings ebenfalls.

Die Überexpression von MNDA ist jedoch nicht spezifisch für die MCL. Wie bereits in der Arbeit von Miranda et al. (1999) beschrieben, kommt es auch bei den nML zu einer deutlichen MNDA-Expression. Eine Ausnahme bilden lediglich die Foll II. Dieses lässt sich damit begründen, dass es sich bei diesen Lymphomen um eine Übergangsform zwischen niedrig- und hochmalignen Lymphomen handelt. Es konnte durch den Vergleich mit den Ergebnissen für die MIB-1-Expression festgestellt werden, dass bei den drei der fünf Foll II mit geringer MNDA-Expression eine entsprechend hohe Proliferationsrate vorliegt. Mit 50% gefärbten Tumorzellen zählen sie jedoch nach der WHO-Klassifikation zu den niedrigmalignen Lymphomen.

Bei den hmL zeigt sich kein eindeutiges Expressionsmuster in Abhängigkeit zur Entität oder zur Proliferationsrate. Eine Ausnahme bilden die zwei BL. Hier zeigt sich, wie bereits von Miranda et al. (1999) beschrieben, keine MNDA-Expression. Auch bei den DLBCL konnte die Arbeitsgruppe um Miranda kein MNDA auf den Tumorzellen nachweisen. Unsere Versuche zeigen jedoch in der Hälfte der Fälle eine MNDA-Expression und stehen somit im Gegensatz zu den vorherigen Berichten in der Literatur.

MNDA eignet sich nicht zur Abgrenzung der einzelnen Entitäten der BCL. Lediglich eine Abgrenzung zu Neoplasien anderer Abstammung, wie von T- oder NK-Zellen, ist durch das Protein möglich. In diesen Zellreihen konnte bisher MNDA nicht nachgewiesen werden.

Ein Vorteil dieses Markers ist die spezifische Kernlokalisierung, die durch eine bessere Abgrenzung zu Nachbarstrukturen einfache Interpretation ermöglicht.

4.3.4 p27-Expression umgekehrt proportional zur Proliferationsrate

Unsere Ergebnisse zeigen einen signifikanten Unterschied in der Expression von p27 bei den MCL gegenüber den anderen BCL. Die MCL zeichnen sich dabei durch eine hohe Färbequantität aus. In der Literatur ist für reaktives lymphatisches Gewebe und für Lymphome eine umgekehrte Proportionalität von p27 zu der Proliferationsrate beschrieben (Quintalla-Martinez et al., 1998; Sanchez-Beato et al., 1997; Barnouin et al., 1999; Erlanson et al., 1998). Passend zu dieser Annahme waren bei 94% der auswertbaren hmL weniger als ein Drittel der Tumorzellen angefärbt. Es konnte keine Abweichung von der Theorie für einzelne Entitäten beobachtet werden.

Die nmL zeichnen sich durch eine geringe Proliferationsrate aus. Bei einer umgekehrten Proportionalität zu p27 würde man eigentlich eine hohe p27-Expression erwarten. Unsere Ergebnisse konnten das jedoch nicht bestätigen. Bei 13 der 15 Fälle waren weniger als ein Drittel der Tumorzellen gefärbt. Lediglich bei einem Foll I und einem Foll II kam es zu einer starken Reaktion. Bei dem Foll II lag die Expression für MIB-1 bei 50% gefärbter Tumorzellen, hingegen für das Foll I entsprechend der Definition nach der WHO-Klassifikation bei 5%.

Aufgrund der geringen Fallzahlen dieser beiden Entitäten und der beobachteten variierenden Expressionsrate für p27 ohne eindeutige Abhängigkeit zur Proliferationsrate, kann man hier keine eindeutige Aussage über einen Zusammenhang zwischen Proliferationsrate und p27-Expression machen.

Bei den MCL zeigte sich insgesamt eine hohe Positivrate für p27. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Subtypen bestand gleichzeitig eine große Übereinstimmung zu der Annahme einer umgekehrten Proportionalität zwischen p27 und der Proliferationsrate. Damit bestätigen wir die Ergebnisse von Izban und seinen Kollegen (2000), dass bei den klassischen MCL eine höhere p27-Expression besteht als bei den blastischen Varianten.

4.4 Vergleich mit anderen Studien

Wir haben die Ergebnisse dieser Arbeit mit Ergebnissen anderer Arbeiten verglichen. Unsere Ergebnisse stimmen nicht in allen Punkten mit denen in der Literatur beschriebenen überein. Es stellt sich die Frage nach der Ursache solcher Diskrepanzen. Da alle Studien auf etablierten Verfahren (ABC-, APAAP-, LAB-Methode) basieren, scheinen technische Fehler weitgehend ausgeschlossen zu sein. Eine Quelle für unterschiedliche Ergebnisse kann der direkte Vergleich dieser zwar ähnlichen, aber dennoch unterschiedlichen Methoden miteinander darstellen. Die ABC-Methode beispielsweise steht im Ruf, sensitiver als die APAAP-Methode zu sein.

Weitere Auswirkungen auf die Ergebnisse könnte vor allem die Verwendung unterschiedlicher Primärantikörper (unter anderem mono-/ polyklonal, unterschiedliche Hersteller) haben. Zum Beispiel kann die Verwendung monoklonaler Ak eine zu geringe Sensitivität mit sich bringen. Das bedeutet im Extremfall negative Färbegergebnisse bei monoklonalen Ak, die möglicherweise bei Verwendung von polyklonalen Ak mit Spezifität für mehrere Epitope positiv ausgefallen wären.

4.5 Fazit und Ausblick

Durch die Untersuchung der Antigene Cdc2, MND A, p27 und Rb ist es uns gelungen, neben den bereits in der Routine eingesetzten Ak weitere Marker für die Diagnostik der BCL zu etablieren. Dabei sollte nicht vergessen werden, dass die von uns untersuchten Ak in der Diagnostik immer im Zusammenhang eines ganzen Panels weiterer Ak zu sehen sind. Eine immunhistochemische Diagnosestellung in der Lymphopathologie mittels eines einzelnen Markers ist auf Grund der Anzahl der Entitäten nicht vorstellbar. Viel mehr ist die Erweiterung des Panels für jede Entität – in unserem Falle der BCL, insbesondere der MCL - zur besseren Abgrenzung gegenüber den anderen Lymphomen der Antrieb für diese Studie gewesen. Da von einer richtigen Diagnosestellung wesentlich die eingesetzten Therapieschemata abhängen (Salles et al., 1994), entsteht durch die verbesserte Diagnostik auch eine erhöhte Sicherheit für die Klinik.

Neben der IHC werden derzeit zur Erforschung weiterer Lymphommarker und Prognosemarker auch andere Methoden herangezogen; beispielsweise Untersuchungen auf DNA-Ebene zur Entwicklung von Genexpressionsprofilen. Dieses Wissen muss übertragen werden auf die leichter anwendbaren und kostengünstigeren konventionellen Techniken wie die IHC.

In dieser Studie wurde ein Kollektiv von 117 NHL unter Verwendung der TMA untersucht. Durch diese Technik war es möglich, auf nur zwei Objektträgern Proben aller Fälle darzustellen. Bei den verwendeten TMA handelt es sich um Prototypen, die in Zusammenarbeit mit der Firma „Euroimmun Medizinische Labordiagnostik GmbH“ für unser Institut hergestellt wurden. Die Herstellung unterscheidet sich von den meisten in der Literatur beschriebenen TMA-Herstellungsverfahren. Bei der herkömmlichen Methode werden aus einem oder mehreren Paraffinblöcken Stenzen entnommen und in einen vorgestanzen Paraffinblock überführt. Aus dem mit bis zu 100 Gewebestanzen gespickten Paraffinblock werden dann die Schnitte für den TMA hergestellt. Bei der in unserem Fall verwendeten Methode werden von jedem zu untersuchenden Paraffinblock Schnitte angefertigt, diese auf dünne Glasscheiben aufgebracht und in kleine Biochips unterteilt. Dann wird die Platte eingescannt.

Am Computer werden die zu untersuchenden Biochips ausgewählt und computergesteuert auf einen Objektträger geklebt. Durch die Möglichkeit der Auswahl am Computer über den entsprechenden Ausschnitt des Präparates wird vermieden, dass fehlerhaftes Material auf den TMA aufgetragen wird. Dieses ist vor allem bei dem heterogenen Gewebe der Lymphome ein großer Vorteil, da die Tumorzellen oft zwischen nicht neoplastischen Zellen liegen und die Abgrenzung des Tumors im Vergleich zu einem soliden Tumor erschwert ist. Dennoch mussten wir feststellen, dass auch bei diesem Verfahren die Verwendung von zwei bis drei Biochips pro Fall notwendig ist. Dieses entspricht den Ergebnissen vieler Studien mit der herkömmlichen Methode (Rubin et al., 2002; Hoos und Cordon-Cardo, 2001; Camp et al., 2000). Durch diese Maßnahme können Färbefehler in den Randzonen vermieden werden. Außerdem ist bei zytologischen Mischbildern mit einem abgebildeten Gewebeausschnitt von 2 x 2mm eine fehlerhafte Interpretation durch Informationsverlust zu umgehen.

Die Vorteile der Technik der TMA in der Krebsdiagnostik, unabhängig nach welcher Herstellungsmethode, sind die Reduktion von Zeit, Material und Kosten (Matysiak et al., 2003). TMA eignen sich zur molekularen Charakterisierung einer großen Zahl von Tumoren zur selben Zeit (Bubendorf et al., 2001; Richter et al., 2000; Mucci et al., 2000; Kononen et al., 1998).

Bei der Lymphomdiagnostik wird die IHC als routinemäßiges diagnostisches Werkzeug benutzt (Jaffe et al., 2001). Viele Marker, die mit einzelnen Entwicklungsstufen und -stadien der B- und T-Zellen assoziiert sind, wurden jedoch bisher noch nicht in Hinblick auf die Biologie und Pathogenese bei den Lymphomen untersucht (Mason et al., 2002). Eine Kombination von TMA und IHC macht unserer Meinung nach ein schnelles und kosteneffizientes Screening der Markerexpression möglich.

Es müssen weitere Studien folgen, um die hier aufgeworfenen Fragen zu klären. Es sollte ein Antikörper gefunden werden, der selektiv den phosphorylierten Anteil des Rb markiert, um den Zusammenhang zur Expression von p27 zu klären. Ein weiterer Ansatz wäre der Nachweis eines Zusammenhanges zwischen der Expression von Cdc2 und p27 in der Pathogenese der MCL.

5. Zusammenfassung

Die Diagnosesicherung lymphatischer Neoplasien erfolgt neben klinischer und bildgebender Verfahren insbesondere durch die histologische Untersuchung. Entscheidend für die Prognose des Patienten und die Auswahl zwischen den verschiedenen Therapieoptionen ist dabei die Bestimmung der einzelnen Entitäten und Subentitäten. In der Untersuchung von B-Zell-Lymphomen findet diese besondere Bedeutung in der Abgrenzung der einzelnen Subtypen der Mantelzelllymphome, da in Studien belegt werden konnte, dass die einzelnen zytologischen Varianten sich in ihrer Prognose für den Patienten unterscheiden.

Im Rahmen der pathologisch-histologischen Routinediagnostik stellt die Immunhistochemie ein verbreitetes und zuverlässiges Verfahren zur Objektivierung der histologischen Diagnose dar. Es ist dabei immer ein Panel verschiedener Antikörper zur sicheren Diagnosestellung der einzelnen Lymphomentitäten notwendig. Die Etablierung zuverlässiger Marker zur Abgrenzung der Mantelzelllymphome von den anderen B-Zell-Lymphomen sowie der einzelnen Subtypen der Mantelzelllymphome untereinander ist anzustreben.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die im Vergleich zu anderen Studien hohe Zahl von 117 paraffingebetteten B-Zell-Lymphomen mit einem Anteil von 29 Mantelzelllymphomen, 15 anderen niedrigmalignen und 73 hochmalignen B-Zell-Lymphomen. Wir ermittelten unter Verwendung eines etablierten immunhistochemischen Verfahrens (ABC-Methode) die Expressionsrate der Zellproliferations- und Zelldifferenzierungsmarker Cdc2, MNDA, p27 und Rb auf den Tumorzellen.

Bei den untersuchten Markern handelt es sich um bereits in der Immunhistochemie etablierte Antikörper. Eine ausführliche Analyse für die verschiedenen Entitäten der B-Zell-Lymphome ist jedoch bisher nur für p27 und MNDA in der Literatur beschrieben.

Mit Ausnahme des Rb-Antigens konnten wir zeigen, dass die Expressionsrate in Abhängigkeit zum Malignitätsgrad steht. Für Cdc2 konnte beim Vergleich der Expressionsrate des in der Literatur etablierten Proliferationsmarkers MIB-1 eine Proportionalität zur Proliferationsrate nachgewiesen werden.

Das MNDA-Antigen zeigt ebenfalls einen Unterschied in der Expressionsrate zwischen den niedrigmalignen und den hochmalignen B-Zell-Lymphomen. Bei den niedrigmalignen Lymphomen färben sich viele Tumorzellen an. Die Färberate bei den hochmalignen B-Zell-Lymphomen ist für MNDA deutlich geringer. Dieses steht im Gegensatz zum Färbemuster für Cdc2. Ein Zusammenhang zur Proliferationsrate für die einzelnen Entitäten konnte für MNDA jedoch nicht dargestellt werden.

P27 ist ein bekannter und gut etablierter Antikörper in der Immunhistochemie und wird bereits in der Lymphomdiagnostik verwendet. Es zeigt sich eine starke Expression bei den Mantelzelllymphomen im Gegensatz zu den übrigen B-Zell-Lymphomen. Es handelt sich allerdings nicht um einen spezifischen Marker für die Mantelzelllymphome, denn auch andere Entitäten zeigen eine Expression des Antigens. Für die meisten Entitäten kann die in mehreren Arbeiten publizierte umgekehrte Proportionalität zur Proliferationsrate bestätigt werden (Quintilla-Martinez et al., 1998; Sanchez-Beato et al., 1997; Barnouin et al., 1999; Erlanson et al., 1998).

Das Tumorsuppressorgen Rb wird in drei Viertel der untersuchten Non-Hodgkin-Lymphome exprimiert. Es kann jedoch in der Diagnostik nicht zur Unterscheidung der einzelnen B-Zell-Lymphome herangezogen werden.

6 Literaturverzeichnis

- Armitage JO, Weisenburger DD: New approach to classifying non-Hodgkin`s lymphomas: Clinical features of the major histologic subtypes. *J Clin Oncol* **16**, 2780-2795 (1998)
- Bai M, Vlachonikolis J, Agnantis NJ, Tsanou E, Dimou S, Nicolaides C, Stefanaki S, Pavlidis N, Kanavaros P: Low expression of p27 protein combined with altered p53 and Rb/p16 expression status is associated with increased expression of cyclin A and cyclin B1 in diffuse large B-cell lymphomas. *Mod Pathol* **14**, 1105-1113 (2001)
- Barnouin K, Fredersdorf S, Eddaoudi A, Mitternacht S, Pan LX, Du MQ, Lu X: Antiproliferative function of p27Kip1 is frequently inhibited in highly malignant Burkitt`s lymphoma cells. *Oncogene* **18**, 6388-6397 (1999)
- Bartek J, Vojtesek B, Grand RJ, Gallimore PH, Lane DP: Cellular localization and T antigen binding of the retinoblastoma protein. *Oncogene* **7**, 101-108 (1992)
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Willman CL: Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. *J Clin Pathol* **42**, 567-584 (1989)
- Böcker W, Denk H, Heitz PU: Pathologie. 2. Aufl., 511-528, Urban&FischerVerlag, München, 2001
- Bourne JA: Handbuch 1 Immunperoxidase Färbemethoden. 4. Aufl., Immunhistochemistry Laboratory, DAKO Corporation, Carpinteria, USA, 2000

- Briggs R, Briggs JA, Ozer J, Sealy L, Dworkin LL, Kingsmore SF, Seldin MF, Kaur GP, Athwal RS, Dessypris EN: The human myeloid cell nuclear differentiation antigen gene is one of at least two related interferon-inducible genes located on chromosome 1q that are expressed specifically in hematopoietic cells. *Blood* **83**, 2153-2162 (1994a)
- Briggs R, Dworkin L, Briggs JA, Dessypris E, Stein J, Stein G, Lian J: Interferon- α selectively affects expression of the human myeloid cell nuclear differentiation antigen in late stage cells in the monocytic but not the granulocytic lineage. *J Cell Biochem* **54**, 198-206 (1994b)
- Bubendorf L, Nocito L, Moch H, Sauter G: Tissue microarray (TMA) technology: Miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* **195**, 72-79 (2001)
- Camp RL, Charette LA, Rimm DL: Validation of tissue microarrays technology in breast carcinoma. *Lab Invest* **80**, 1943-1949 (2000)
- Carbone A, Poletti A, Manconi R, Cozzi M, Sulfaro S, Zagonel V, Tirelli U, Volpe R: Intermediate lymphocytic lymphoma encompassing diffus and mantle zone pattern variants. *Eur J Cancer Clin Oncol* **25**, 113-121 (1989)
- Clogan-Foukal D, Murthy KGK, Prives C, Manley JL: Cell-cycle related regulation of poly(A) polymerase by phosphorylation. *Nature (Lond.)* **384**, 282-285 (1996)
- Collecchi P, Santoni T, Gnesi E, Giuseppe Naccarato A, Passoni A, Rocchetta M, Danesi R, Bevilacqua G: Cyclins of phases G1, S and G2/M are overexpressed in aneuploid mammary carcinomas. *Cytometry* **42**, 254-260 (2000)

-
- Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* **32** (2), 219-229 (1984)
- Cousar JB, Briggs RC: Expression of human myeloid cell nuclear differentiation antigen (MNDA) in acute leukemias. *Leuk Res* **14**, 915-920 (1990)
- Ek S, Högerkorp CM, Dictor M, Ehinger M, Borrebaeck CAK: Mantle cell lymphomas express a distinct genetic signature affecting lymphocyte trafficking and growth regulation as compared with subpopulations of normal human B cells. *Canc Res* **62**, 4398-4405 (2002)
- Erlanson M, Portin C, Linderhol B, Lindh J, Roos G, Landberg G: Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas: Prognostic implications. *Blood* **92**, 770-777 (1998)
- Galteland E, Smedshammer L, Suo Z, DeAngelis P, Stokke T: Proliferation-dependent expression and phosphorylation of pRB in B cell non-Hodgkin's lymphomas: Dependence on RB1 copy number. *Leukemia* **16**, 1549-1555 (2002)
- Geradts J, Andriko JW, Abbondanzo SL: Loss of tumor suppressor gene expression in high-grade but not low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Clin Pathol* **109**, 669-674 (1998)
- Goldberger A, Brewer G, Hnilica LS, Briggs RC: Nonhistone protein antigen profiles of five leukemic cell lines reflect the extent of myeloid differentiation. *Blood* **63**, 701-710 (1984)

-
- Goldberger A, Hnilica LS, Casey SB, Briggs RC: Properties of a nuclear protein marker of human myeloid cell differentiation. *J Biol Chem* **261**, 4726-4731 (1986)
- Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotinas A, Liloglou T, Kyrroudi A, Veslemes M, Rassidakis A, Halazonetis TD, Field JK, Kittas C: Alterations of the p16-pRb pathway and the chromosome locus 9p21-22 in non-small lung carcinomas. *Am J Pathol* **153**, 1749-1765 (1998)
- Hall PA, Coates PJ: Assessment of cell proliferation in pathology – what next? *Histopathology* **26**, 105-112 (1995)
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC: A Revised European-American Classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* **84**, 1361-1392 (1994)
- Hiroshi M, Mutsuo F, Yuji O, Shohei O: Determination of the prognostic significance of cyclin B1 overexpression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* **434**, 153-158 (1999)
- Hoos A, Cordon-Cardo C: Tissue microarrays profiling of cancer specimens and cell lines: Opportunities and limitations. *Lab Invest* **81**, 1331-1338 (2001)
- Hui D, Reiman T, Hanson J, Linford R, Wong W, Belch A, Lai R: Immunohistochemical detection of cdc2 is useful in predicting survival in patients with mantle cell lymphoma. *Mod Pathol* **18**, 1223-12231 (2005)
- Ito Y, Takeda T, Sakon M, Monden M, Tsujimoto M, Matsuura N: Expression and prognostic role of cyclin-dependent kinase 1(cdc2) in hepatocellular carcinoma. *Oncology* **59**, 68-74 (2000)

- Izban KF, Alkan S, Singleton TP, Hsi ED: Multiparameter immunohistochemical analysis of the cell cycle proteins cyclin D1, Ki-67, p21WAF1, p27KIP1, and p53 in mantle cell lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* **124**, 1457-1462 (2000)
- Jaffe ES, Harris LH, Stein H, Vardiman JW: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics; tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 1. Aufl., 10-13 + 120-174, IARC Press, Lyon, 2001
- Jin YH, Park CK: Expression of cyclin B1 and cdc2 in nodal non-Hodgkin-lymphoma and its prognostic implications. *J Korean Med Sci* **17**, 322-327 (2002)
- Katzenberger T, Petzoldt C, Höller S, Mäder U, Kalla J, Adam P, Ott MM, Müller-Hermelink HK, Rosenwald A, Ott G: The Ki67 proliferation index is a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma. *Blood* **107**, 3407 (2006)
- Knudson AG: Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci* **90**, 10914-10921 (1993)
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP: Tissue microarrays for high-throughput moleculare profiling of tumor specimens. *Nat Med* **4**, 844-847 (1998)
- Korz C, Pscherer A, Brenner A, Merzens D, Schaffner C, Leupolt E, Dohner H, Stilgenbauer S, Lichter P: Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. *Blood* **99**, 4554-4561 (2002)
- Krenacs T, Krenacs L, Raffeld M: Multiple antigen immunostaining procedures. *Methods Mol Biol* **115**, 223-233 (1999)

- Lan HY, Nikolic-Paterson DJ: Multiple Immunoenzyme Staining. In: Shi SR, Gu J, Taylor CR: Antigen Retrieval Techniques: Immunohistochemistry and Molekular Morphology. 1. Aufl., 129-138, Eaton Publishing, Natick, MA (2000)
- Lardelli P, Bookman MA, Sundeen J, Longo DJ, Jaffe ES: Lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation. Morphologic and immunphenotypic spectrum and clinical correlations. *Am J Pathol* **117**, 262-272 (1990)
- Lukes RJ, Collins RD: The Lukes-Collins classification and its significance. *Cancer Treatm. Rep* **61**, 971-979 (1977)
- Madewell BR: Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications. *J Vet Intern Med* **15**, 334-340 (2001)
- Mason D, Andre P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, de Haas M, Goyert S, Hadam M, Hart D, Horejsi V, Meuer S, Morrissey J, Schwartz-Albiez R, Shaw S, Simmons D, Uguccioni M, van der Schoot E, Vivier E, Zola H: CD antigens 2001. *Mod Pathol* **15**, 71-76 (2002)
- Matysiak BE, Brodzeller T, Buck S, Frech A, Counts C, Boorsma B, Datta MW, Kajdacsy-Bella AA: Simple, inexpensive method for automating tissue microarray production provides enhanced microarray reproducibility. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **11**, 269-273 (2003)
- Meusers P, Hense J, Brittinger G: Mantle cell lymphoma: Diagnostic criteria, clinical aspects and therapeutic problems. *Leuk* **11**, 60-64 (1997)
- Miranda RN, Briggs RC, Shults K, Kinney MC, Jensen RA, Cousar JB: Immunocytochemical analysis of MNDA in tissue sections and sorted normal bone marrow cells documents expression only in maturing normal and neoplastic myelomonocytic cells and a subset of normal and neoplastic B lymphocytes. *Hum Pathol* **30**, 1040-1049 (1999)

Morgan DO: Principles of Cdk regulation. *Nature* **374**, 131-134 (1995)

Mucci NR, Akdas G, Manley S, Rubin MA: Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: Evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression. *Hum Pathol* **31**, 406-414 (2000)

Polyak K, Lee M-H, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J: Cloning of p27^{Kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* **78**, 59-66 (1994)

Quintanilla-Martinez L, Thieblemont C, Fend F, Kumar S, Pinyol M, Campo E, Jaffe ES, Raffeld M: Mantle cell lymphomas lack expression of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Am J Pathol* **153**, 175-182 (1998)

Rassenti LZ, Huynh L, Toy LT, Chen L, Keating MJ, Gribben JD, Neuberg DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ: ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **351**, 893-901 (2004)

Richter J, Wagner U, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knonagel H, Rist M, Wilber K, Anabitar M, Hering F, Hardmeier T, Schonenberger A, Flury R, Jager P, Fehr JL, Schrami P, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser T, Kallioniemi PO, Sauter G: High-throughput tissue microarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression in urinary bladder cancer. *Am J Pathol* **157**, 787-794 (2000)

Rosenwald A, Ott G, Krumdiek AK, Dreyling MH, Katzenberger T, Kalla J, Roth S, Ott MM, Muller-Hermelink HK: A biological role for deletions in chromosomal band 13q14 in mantle cell and peripheral t-cell lymphomas? *Genes Chromosomes Cancer* **26**, 210-214 (1999)

-
- Rubin MA, Dunn R, Strawderman M, Pienta KJ: Tissue microarrays sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. *Am J Surg Pathol* **26**, 312-319 (2002)
- Salles G, Shipp MA, Coiffier B: Chemotherapy of non-Hodgkin's aggressive lymphomas. *Semin-Hematol* **31**, 46-69 (1994)
- Sanchez-Beato M, Saez AI, Martinez-Montero JC, Sol Mateo M, Sanchez-Verde L, Villuendas R, Troncone G, Piris MA: Cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in lymphoid tissue: P27Kip1 expression is inversely proportional to the proliferative index. *Am J Pathol* **151**, 151-160 (1997)
- Sherr CJ: G1 phase progression: Cycling on cue. *Cell* **79**, 551-555 (1994)
- Sherr CJ: Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672-1677 (1996)
- Sherr CJ: The Pezcoller lecture: Cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* **60**, 3689-3695 (2000)
- Slingerland J, Pagano M: Regulation of the Cdk Inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* **183**, 10-17 (2000)
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD: How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**, 227-264 (1998)
- Stilgenbauer S, Nickolenko J, Wilhelm J, Wolf S, Weitz S, Dohner K, Boehm T, Dohner H, Lichter P: Expressed sequences as candidates for a novel tumor suppressor gene at band 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Oncogene* **16**, 1891-1897 (1998)

Swerdlow SH, Habeshaw JA, Murray LJ, Dhaliwal HS, Lister TA, Stansfeld AG: Centrocytic lymphoma. A distinct clinicopathologic and immunologic entity. A multiparameter study of 18 cases at diagnosis and relapse. *Am J Pathol* **113**, 181-197 (1983)

Toyoshima H, Hunter T: p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**, 67-74 (1994)

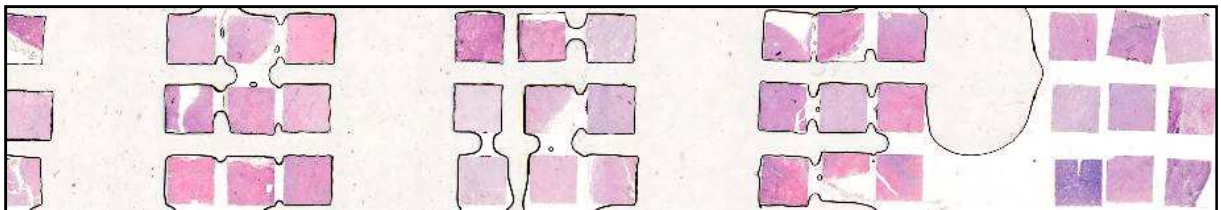
Wang A, Yoshimi N, Ino N, Tanaka T, Mori H: Overexpression of cyclin B1 in human colorectal cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* **123**, 124-127 (1997)

7 Anhang

7.1 Bilder

Die teils mangelbehaftete Bilddarstellung beruht auf den uns zur Verfügung stehenden technischen Möglichkeiten, die eine bessere Bildqualität leider nicht erlaubten. Zur technisch einwandfreien Darstellung der Biochips der Mikroarrays ist eine spezielle Software mit hoher Detailauflösung notwendig, die derzeit noch in der Entwicklung ist. Zusätzlich ist die Verwendung hoch auflösender Objektive, die uns leider noch nicht zur Verfügung standen, notwendig. Des Weiteren kommt es bei den TMA durch die Auflösung des Lösungsmittels im Kleber insbesondere zwischen den einzelnen Biochips zu einer Substanzschrumpfung und dadurch zur Luftblasenbildung. Die vorliegenden Bilder lassen aber die Prinzipien des Verfahrens und einige Ergebnisse erkennen.

7.1.1 Tissue microarray



Ausschnitt eines der beiden verwendeten TMA mit vier von fünf dargestellten Reaktionsfeldern des insbesondere mit den MCL und nmL besetzten Array.

7.1.2 MNDA-Färbung

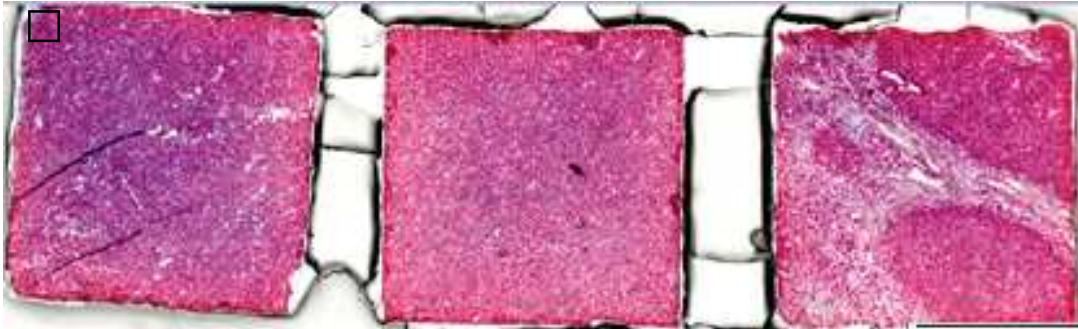


Abb. A: Darstellung von drei BCL: links und in der Mitte jeweils ein klassisches MCL mit 90% beziehungsweise 50% gefärbten Tumorzellen, rechts Fol III (hML) mit nur 5% gefärbten Tumorzellen

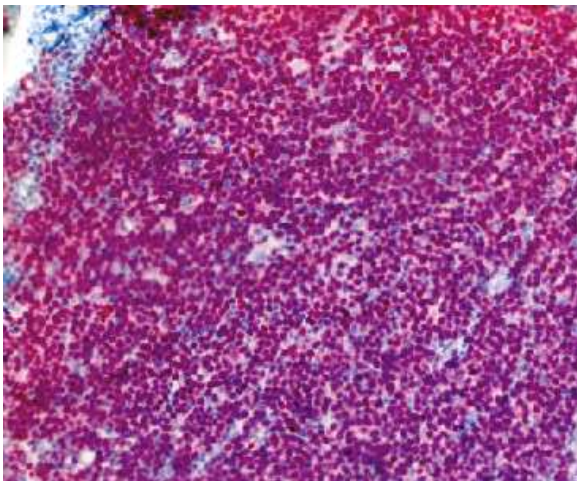


Abb. B: markierter Ausschnitt aus Abb. A (MCL mit 90% gefärbten Tumorzellen)

7.1.3 p27-Färbung von MCL

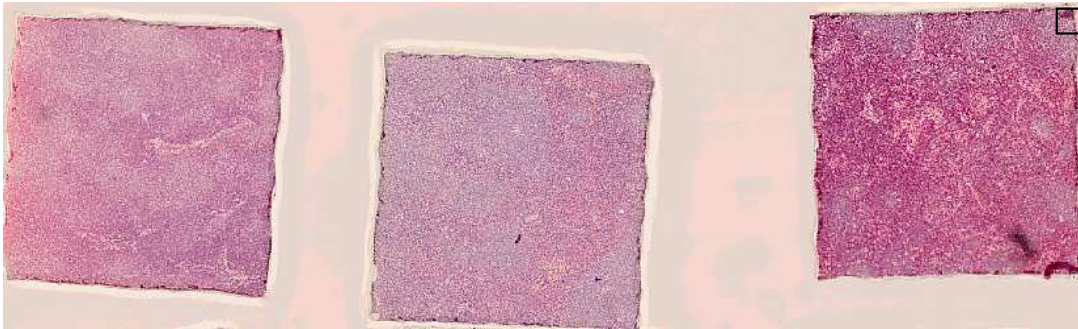


Abb. A: p27-Färbung dreier MCL: links und rechts klassische MCL mit 80% und 70% Färbequantität und in der Mitte ein zytologisches Mischbild aus klassischen und blastischen Anteilen mit einer Färberate von 60%

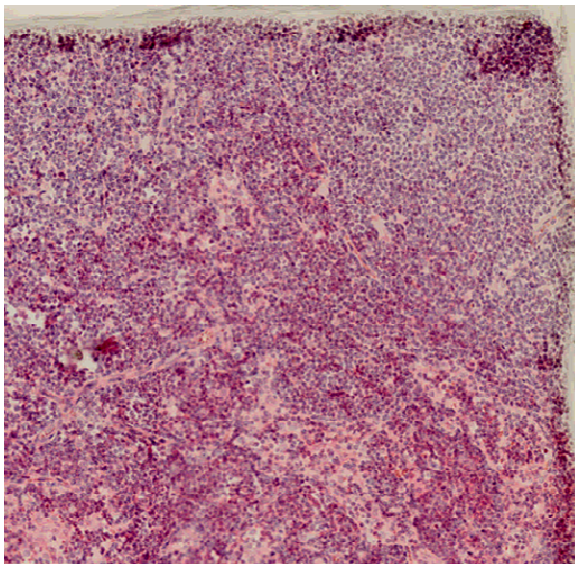


Abb. B: markierter Ausschnitt aus Abb. A mit starker Anfärbung des klassischen MCL

7.1.4 p27-Färbung von niedrigmalignen Lymphomen

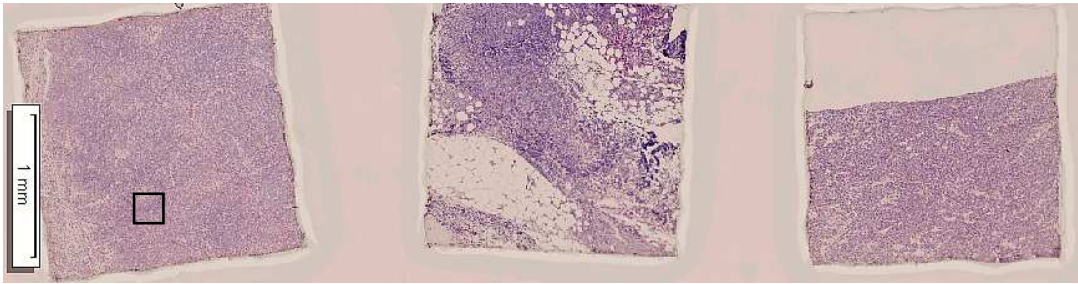


Abb. A: p27-Färbung nmL: links ein B-CLL ohne p27-Reaktion, in der Mitte ein Foll II mit nur 10% gefärbten Tumorzellen und rechts ein klassisches MCL mit ebenfalls einer eher geringen Färbequantität von 20%

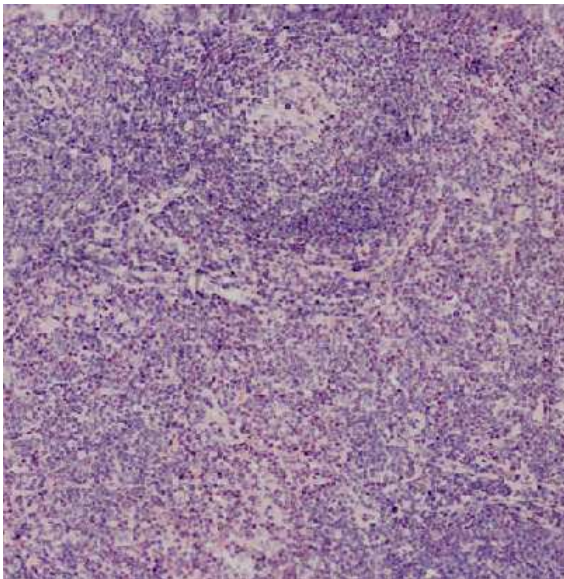


Abb. B: markierter Ausschnitt aus B-CLL der Abb. A

7.1.5 p27-Färbung von hochmalignen Lymphomen

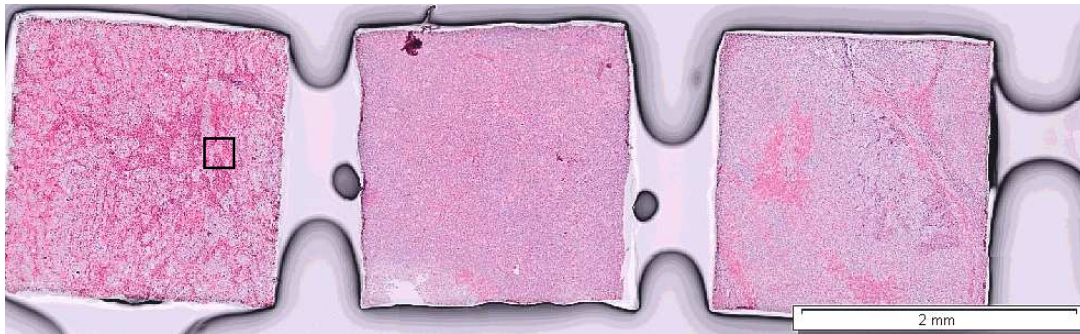


Abb. A: Drei BCL ohne p27-Reaktion: links und in der Mitte zwei DLBCL (ALCL und CB) und rechts ein niedrigmalignes BCL (Fol II)

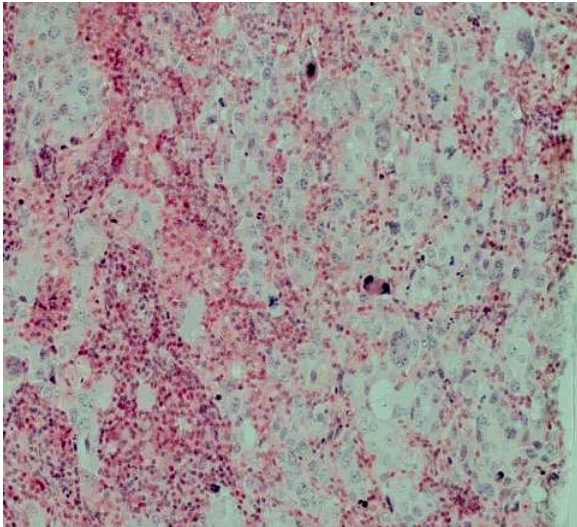
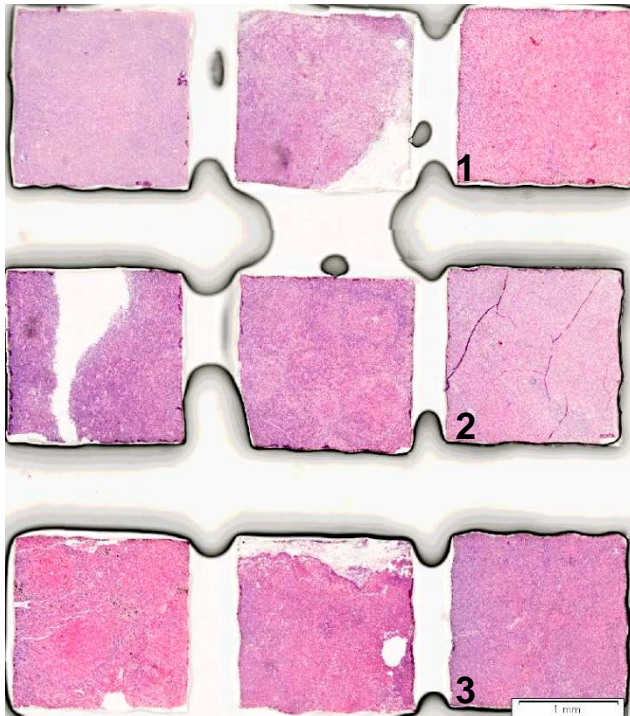
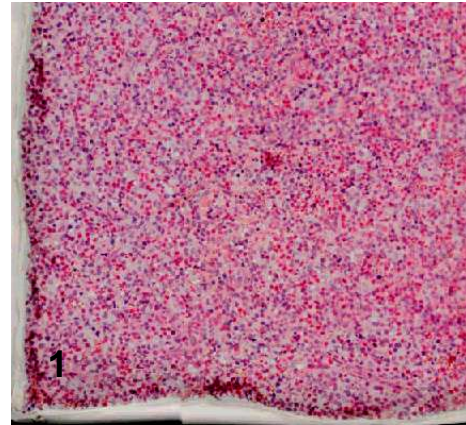


Abb. B: markierter Ausschnitt aus dem ALCL der Abb. A

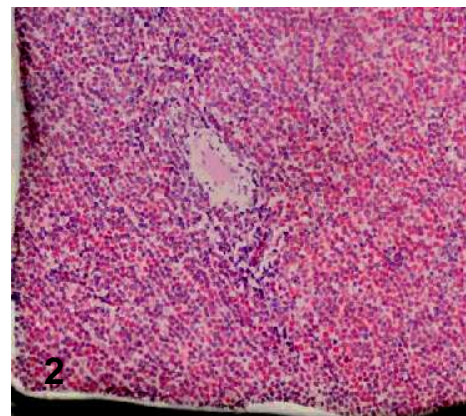
7.1.6 Rb-Färbung



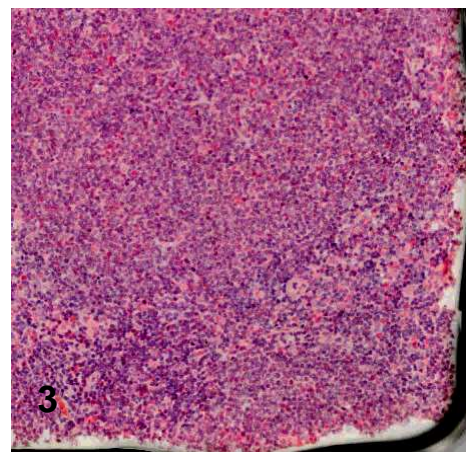
nmL nach Färbung mit dem Antikörper Rb



MCL mit 70% gefärbten Tumorzellen



B-CLL mit 80% gefärbten Tumorzellen



MCL mit 70% gefärbten Tumorzellen

7.1.7 Subentitäten des Mantelzelllymphoms

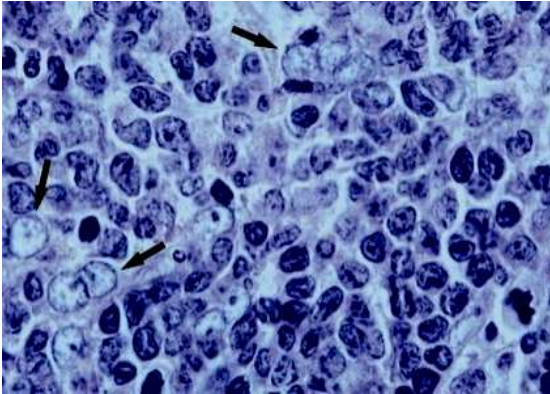


Abb. A: klassisches MCL

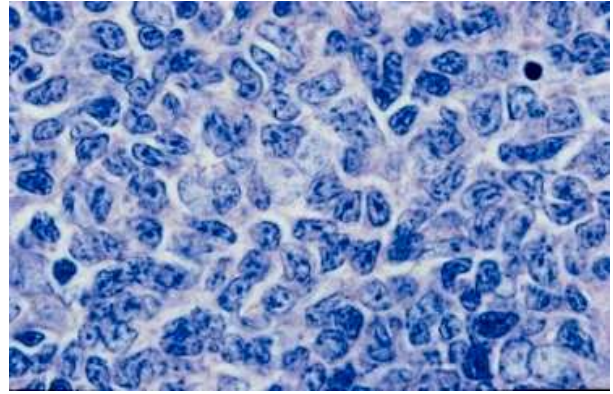


Abb. B: pleomorphes MCL

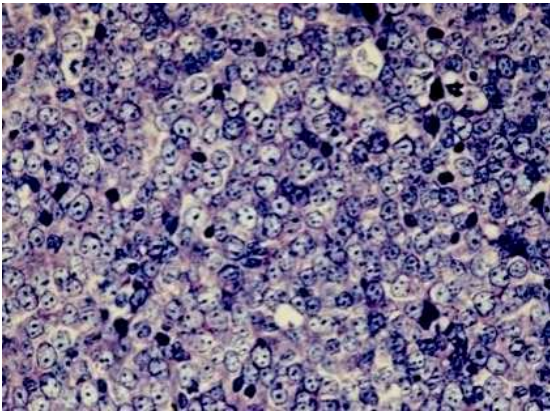


Abb. C: blastisches MCL

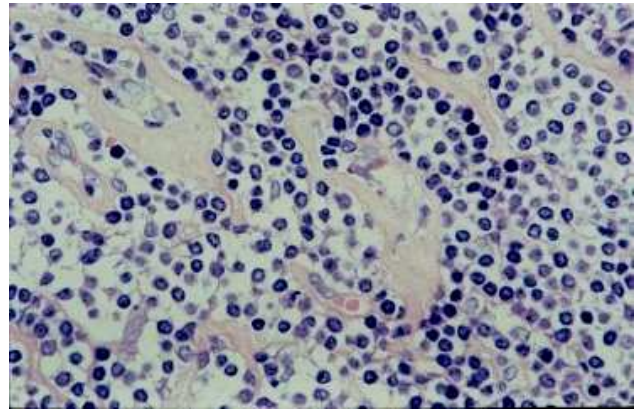


Abb. D: kleinzelliges MCL

Abb. 7.1.6 A-D: Histologische Schnitte des MCL nach Giemsa-Färbungen

7.2 Tabellen

7.2.1 WHO-Klassifikation der lymphatischen Neoplasien

<u>B-Zell Neoplasien</u>	<u>T-Zell Neoplasien</u>	<u>Hodgkin Lymphome</u>
<p><u>Vorläufer-Neoplasien</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Lymphoblastische Vorläufer-B-Zell-Leukämie • Lymphoblastisches Vorläufer-B-Zell-Lymphom <p><u>Reife Neoplasien</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Chronisch lymphatische B-Zell-Leukämie (B-CLL) • Kleinzelliges lymphozytisches B-Zell-Lymphom • Prolymphozyten-B-Zell-Leukämie • Lymphoplasmozytisches Lymphom (LPL) • Splenisches Marginalzonenlymphom • Haarzelleukämie • Plasmazellmyelom • Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz • Solitäres Plasmozytom des Knochens • Extraossäres Plasmozytom • Schwerkettenkrankheit • Primäre Amyloidose • Nodales Marginalzonen-B-Zell-Lymphom • Follikuläres Lymphom (FolI) • Mantelzelllymphom (MCL) • Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL) • Mediastinales (thymisches) großzelliges B-Zell-Lymphom • Intravaskuläres großzelliges B-Zell-Lymphom • Primäres Ergußlymphom • Burkitt-Lymphom (BL) • Burkitt-Leukämie • B-Zell-Proliferationen mit unbekanntem malignem Potential 	<p><u>Vorläufer-Neoplasien</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Lymphoblastische Vorläufer-T-Zell-Leukämie • Lymphoblastisches Vorläufer-T-Zell-Lymphom <p><u>Reife Neoplasien</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Blastisches NK-Zell-Lymphom • Prolymphozyten-T-Zell-Leukämie • Großgranuläre lymphatische Leukämie • Aggressive NK-/T-Zell-Leukämie • Adulte T-Zell-Leukämie • Extranodales NK-Zell-Lymphom, nasaler Typ • Subkutanes Panniculitis-ähnliches T-Zell-Lymphom • Mycosis fungoides • Sezary-Syndrom • Peripheres CD4-positives T-Zell-Lymphom, unspezifiziert • Peripheres CD8-positives T-Zell-Lymphom • Anaplastisches großzelliges Lymphom • Lymphomatoide Papulose • Primär kutanes anaplastisches großzelliges Lymphom, unspezifiziert • Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom 	<ul style="list-style-type: none"> • Noduläres lymphozyten-prädominantes HL • Klassisches HL • Nodulär sklerosierendes klassisches HL • Lymphozytenreiches klassisches HL • Klassisches HL, Mischtyp • Lymphozytenarmes klassisches HL <p><u>Myeloische Neoplasien</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Chronische myeloproliferative Erkrankungen • Myelodysplastische myeloproliferative Erkrankungen • Myelodysplastisches Syndrom • Akute Myeloische Leukämie

Tab. 1.1: Ausschnitte der WHO-Klassifikation für Tumoren des lymphatischen und hämatopoetischen Gewebes 1995 (übersetzt aus: Jaffe ES, Harris NJ, Stein H, Vardiman JW: World Health Organization Classification of Tumours, 1. Aufl., S.10-11, IARC Press, Lyon, 2001); fettgedruckt sind die untersuchten Entitäten

7.2.2 Färbeergebnisse der untersuchten Lymphome

Fall Nr.:	Gewebe	Cdc2 (%)	MNDA (%)	p27 (%)	Rb (%)
1	MCL, klassisch	5 (2)	1 (1)	100 (4)	80 (4)
2	MCL, klassisch	5 (2)	90 (4)	20 (2)	80 (4)
3	MCL, klassisch	10 (2)	90 (4)	20 (2)	90 (4)
4	MCL, klassisch	15 (2)	0 (1)	0 (1)	90 (4)
5	MCL, klassisch	20 (2)	5 (2)	70 (4)	20 (2)
6	MCL, klassisch	10 (2)	90 (4)	70 (4)	20 (2)
7	MCL, klassisch	30 (3)	15 (2)	70 (4)	60 (4)
8	MCL, klassisch	5 (2)	80 (4)	40 (3)	0 (1)
9	MCL, klassisch	0 (1)	5 (2)	100 (4)	80 (4)
10	MCL, klassisch	1 (1)	5 (2)	100 (4)	0 (1)
11	MCL, klassisch	15 (2)	90 (4)	80 (4)	80 (4)
12	MCL, klassisch	80 (4)	90 (4)	0 (1)	90 (4)
13	MCL, klassisch	10 (2)	70 (4)	70 (4)	70 (4)
14	MCL, klassisch	15 (2)	90 (4)	80 (4)	20 (2)
15	MCL, klassisch	0 (1)	80 (4)	20 (2)	80 (4)
16	MCL, blastisch	20 (2)	70 (4)	0 (1)	80 (4)
17	MCL, blastisch	15 (2)	5 (2)	100 (4)	50 (3)
18	MCL, blastisch	60 (4)	90 (4)	0 (1)	0 (1)
19	MCL, blastisch	60 (4)	90 (4)	10 (2)	0 (1)
20	MCL, blastisch	60 (4)	70 (4)	20 (2)	80 (4)
21	MCL, pleomorph	60 (4)	90 (4)	20 (2)	70 (4)
22	MCL, pleomorph	30 (3)	90 (4)	0 (1)	0 (1)
23	MCL, klassisch/blastisch	10 (2)	30 (3)	80 (4)	20 (2)
24	MCL, klassisch/blastisch	10 (2)	90 (4)	0 (1)	90 (4)
25	MCL, klassisch/blastisch	10 (2)	80 (4)	60 (4)	0 (1)
26	MCL, klassisch/ pleomorph	30 (3)	90 (4)	100 (4)	20 (2)
27	MCL, klassisch/ pleomorph	5 (2)	5 (2)	80 (4)	90 (4)
28	MCL, klassisch/ pleomorph	20 (2)	90 (4)	0 (1)	0 (1)
29	MCL, klassisch/ pleomorph	5 (2)	90 (4)	80 (4)	80 (4)
30	B-CLL	5 (2)	90 (4)	0 (1)	30 (3)
31	B-CLL	15 (2)	0 (1)	20 (2)	50 (3)
32	B-CLL	60 (4)	90 (4)	0 (1)	80 (4)
33	B-CLL	70 (4)	90 (4)	0 (1)	90 (4)
34	B-CLL	10 (2)	90 (4)	0 (1)	0 (1)
35	B-CLL	10 (2)	90 (4)	0 (1)	0 (1)
36	Foll I	5 (2)	90 (4)	0 (1)	0 (1)
37	Foll I	50 (3)	15 (2)	100 (4)	70 (4)
38	Foll I	10 (2)	90 (4)	10 (2)	90 (4)

Fall Nr.:	Gewebe	Cdc2 (%)	MNDA (%)	p27 (%)	Rb (%)
39	Foll II	5 (2)	5 (2)	100 (4)	10 (2)
40	Foll II	70 (4)	90 (4)	10 (2)	80 (4)
41	Foll II	15 (2)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
42	Foll II	40 (3)	20 (4)	0 (1)	100 (4)
43	Foll II	10 (2)	80 (4)	0 (1)	100 (4)
44	LPL	70 (4)	5 (2)	10 (2)	70 (4)
45	BL	90 (4)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
46	BL	90 (4)	0 (1)	0 (1)	100 (4)
47	DLBCL (ALCL)	70 (4)	60 (4)	0 (1)	0 (1)
48	DLBCL (ALCL)	50 (3)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
49	DLBCL (CBL)	70 (4)	1 (1)	70 (4)	80 (4)
50	DLBCL (CBL)	80 (4)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
51	DLBCL (CBL)	80 (4)	50 (3)	0 (1)	60 (4)
52	DLBCL (CBL)	40 (3)	80 (4)	0 (1)	0 (1)
53	DLBCL (CBL)	90 (4)	80 (4)	0 (1)	80 (4)
54	DLBCL (CBL)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
55	DLBCL (CBL)	70 (4)	0 (1)	50 (3)	80 (4)
56	DLBCL (CBL)	70 (4)	5 (2)	10 (2)	0 (1)
57	DLBCL (CBL)	80 (4)	80 (4)	20 (2)	80 (4)
58	DLBCL (CBL)	10 (2)	0 (1)	0 (1)	70 (4)
59	DLBCL (CBL)	5 (2)	0 (1)	10 (2)	40 (3)
60	DLBCL (CBL)	50 (3)	0 (1)	0 (1)	70 (4)
61	DLBCL (CBL)	90 (4)	5 (2)	0 (1)	100 (4)
62	DLBCL (CBL)	90 (4)	0 (1)	0 (1)	50 (3)
63	DLBCL (CBL)	60 (4)	0 (1)	10 (2)	60 (4)
64	DLBCL (CBL)	90 (4)	40 (3)	0 (1)	100 (4)
65	DLBCL (CBL)	70 (4)	100 (4)	0 (1)	100 (4)
66	DLBCL (CBL)	70 (4)	90 (4)	0 (1)	100 (4)
67	DLBCL (CBL)	70 (4)	0 (1)	0 (1)	100 (4)
68	DLBCL (CBL)	20 (2)	0 (1)	0 (1)	5 (2)
69	DLBCL (CBL)	0 (1)	30 (3)	0 (1)	10 (2)
70	DLBCL (CBL)	70 (4)	0 (1)	0 (1)	20 (2)
71	DLBCL (CBL)	70 (4)	80 (4)	0 (1)	40 (3)
72	DLBCL (CBL)	90 (4)	10 (2)	30 (3)	100 (4)
73	DLBCL (CBL)	10 (2)	80 (4)	0 (1)	100 (4)
74	DLBCL (CBL)	20 (2)	0 (1)	0 (1)	10 (2)
75	DLBCL (CBL)	90 (4)	5 (2)	10 (2)	100 (4)
76	DLBCL (CBL)	90 (4)	40 (3)	0 (1)	80 (4)
77	DLBCL (CBL)	90 (4)	0 (1)	0 (1)	90 (4)
78	DLBCL (CBL)	0 (1)	100 (4)	0 (1)	100 (4)
79	DLBCL (CBL)	15 (2)	0 (1)	0 (1)	100 (4)
80	DLBCL (CBL)	30 (3)	70 (4)	50 (3)	100 (4)
81	DLBCL (CBL)	80 (4)	0 (1)	0 (1)	70 (4)
82	DLBCL (CBL)	0 (1)	5 (2)	0 (1)	60 (4)

Fall Nr.:	Gewebe	Cdc2 (%)	MNDA (%)	p27 (%)	Rb (%)
83	DLBCL (CBL)	70 (4)	40 (3)	10 (2)	100 (4)
84	DLBCL (CBL)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
85	DLBCL (CBL)	90 (4)	90 (4)	0 (1)	0 (1)
86	DLBCL (CBL)	10 (2)	15 (2)	20 (2)	20 (2)
87	DLBCL (CBL)	30 (3)	70 (4)	0 (1)	100 (4)
88	DLBCL (CBL)	90 (4)	0 (1)	10 (2)	0 (1)
89	DLBCL (CBL)	60 (4)	70 (4)	0 (1)	0 (1)
90	DLBCL (CBL)	50 (3)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
91	DLBCL (CBL)	70 (4)	10 (2)	40 (3)	70 (4)
92	DLBCL (CBL)	70 (4)	0 (1)	20 (2)	70 (4)
93	DLBCL (CBL)	70 (4)	90 (4)	100 (4)	100 (4)
94	DLBCL (CBL)	60 (4)	0 (1)	0 (1)	40 (3)
95	DLBCL (IBL)	80 (4)	20 (2)	0 (1)	70 (4)
96	DLBCL (IBL)	70 (4)	100 (4)	0 (1)	50 (3)
97	DLBCL (IBL)	50 (3)	60 (4)	20 (2)	0 (1)
98	DLBCL (IBL)	90 (4)	100 (4)	0 (1)	100 (4)
99	DLBCL (IBL)	100 (4)	0 (1)	100 (4)	100 (4)
100	DLBCL (IBL)	10 (2)	10 (2)	0 (1)	0 (1)
101	DLBCL (IBL)	5 (2)	70 (4)	0 (1)	0 (1)
102	DLBCL (IBL)	70 (4)	0 (1)	0 (1)	70 (4)
103	DLBCL (IBL)	70 (4)	0 (1)	0 (1)	20 (2)
104	DLBCL (MGZL)	20 (2)	0 (1)	80 (4)	30 (3)
105	DLBCL (MGZL)	0 (1)	0 (1)	10 (2)	0 (1)
106	DLBCL (TBCL)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	80 (4)
107	DLBCL (TBCL)	50 (3)	100 (4)	0 (1)	40 (3)
108	DLBCL (TBCL)	70 (4)	0 (1)	0 (1)	30 (3)
109	DLBCL (TBCL)	80 (4)	100 (4)	0 (1)	80 (4)
110	DLBCL (TBCL)	0 (1)	20 (2)	0 (1)	0 (1)
111	Foll III	20 (2)	50 (3)	30 (3)	50 (3)
112	Foll III	60 (4)	5 (2)	0 (1)	60 (4)
113	Foll III	60 (4)	80 (4)	0 (1)	20 (2)
114	Foll III	50 (3)	70 (4)	40 (3)	50 (3)
115	Foll III	40 (3)	20 (2)	0 (1)	0 (1)
116	unklassifizierte hmL	90 (4)	15 (2)	0 (1)	100 (4)
117	unklassifizierte hmL	60 (4)	0 (1)	10 (2)	0 (1)

Legende:	(1) = < 5% gefärbte Tumorzellen	(3) = 30 - <60 % gefärbte Tumorzellen
	(2) = 5 - < 30% gefärbte Tumorzellen	(4) = ≥ 60% gefärbte Tumorzellen

Tab. 7.2.2: Tabellarische Darstellung der 117 Lymphomfälle mit Angabe der prozentualen Menge gefärbter Tumorzellen und Zuteilung in die entsprechenden Gruppen der Färbequantität für die vier immunhistochemischen Färbungen mit Cdc2, MNDA, p27 und Rb

7.2.3 Produktnachweis

Produkt	Firma	Bestellnummer
ABComplex/AP	Dako	Code No. K 0376
2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol 250g	Merck, Darmstadt	Art.-Nr. 801464
Antibody Diluent	Dako	Code No. S 2022
Anti-Human p27 ^{Kip1} , Clone SX53G8	Dako	Code No. M 7203
Aquatex® Microscopy	Merck, Darmstadt	1.08562
Borg Dekloaker high pH 9,5 1L	Biocare Medical	Cat#: BD1000MM
Anti-CdC2 p34-Antikörper	Santa Cruz	Cat#: sc-8395
Citrat Acid Monohydrate 1 kg	Sigma	C-7129
Haemalaun sauer nach Mayer	Waldeck, Münster	2E038
Anti-MIB-1-Ak	Dako	Code No. M 7240
Levamisol 10 g	Sigma	L-9756
Maus-Anti-Ziege IgG biotinyliert	Dianova	Code 205-065-108
Anti-MNDA-Ak (C-19)	Santa Cruz	Cat#: sc-6051
NaCl 1 kg	Merck, Darmstadt	1.06404.1000
Naphtol AS-BI Phosphate 5 g	Sigma	N-2250
Natriumnitrit krist. 500 g	Merck, Darmstadt	Art.-Nr. 106549
Neufuchsin-Salzsäure (in 200g: 10g Neufuchsin in ~ 2N HCl)	Apotheke der Universität zu Lübeck	
N,N-Dimethylformid 1l	Merck, Darmstadt	1.03053.1000
Anti-pax5-Ak (C-20)	Santa Cruz	Cat#: sc-1974
Anti-RB-1-Ak (IF8)	Santa Cruz	Cat#: sc-102
Tris-Base 1 kg	Sigma	T-1503
Tris-HCl 1 kg	Sigma	T-3253
Tween 20 100 ml	Dako	Code No. S1966
Xylol	Merck, Darmstadt	8685
Ziege-Anti-Maus IgG Plus	Biocare Medical	Cat#:GM601MM plus

8 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. A. C. Feller als Institutsleiter der Pathologie für die Ermöglichung der Durchführung der Experimente in seinen Räumlichkeiten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H. Merz, der mir das Thema dieser Promotion überließ und während der gesamten Zeit der Entstehung dieser Arbeit stets in theoretischen und praktischen Fragen zur Verfügung stand.

Bedanken möchte ich mich bei der Mitarbeiterin des Instituts für medizinische Biometrie und Statistik, Frau Dr. rer. bio. hum. I. R. König, für die biometrische Beratung.

Bei der Firma „Euroimmun Medizinische Labordiagnostik GmbH“ bedanke ich mich für die Herstellung der Tissue microarrays und die sehr informative und freundliche Firmenbesichtigung.

Den Medizinisch-Technischen-Assistenten/innen des Labors im Institut für Pathologie danke ich für die freundliche Aufnahme, die ausgezeichnete Einarbeitung in die Immunhistochemie und die ständige Hilfsbereitschaft.

Des Weiteren möchte ich mich bei dem wissenschaftlichen Mitarbeiter Herrn Dr. med. H.-W. Bernd für die Unterstützung bei der mikroskopischen Auswertung der Präparate bedanken.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, die durch ihre Unterstützung mein Humanmedizinstudium und diese Promotion ermöglicht haben, und meinem Ehemann, der die ganze Zeit an die Fertigstellung dieser Arbeit geglaubt hat.

9 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Susanne Katrin Hoffmeister
Geburtsname: Rehm
Geburtsdatum: 27.03.1980
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1986 – 1990 Besuch der Grundschule in Hamburg
1990 – 1999 Besuch des Walddörfer Gymnasiums in Hamburg
Erlangen der Hochschulreife im Juni 1999

Medizinische Ausbildung

1999 – 2005 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
10/2001 Ärztliche Vorprüfung
08/2002 Erstes Staatsexamen
08/2004 Zweites Staatsexamen
10/2005 Drittes Staatsexamen
01/2006 – 06/2007 Assistenzärztin in der Klinik für orthopädische Rehabilitation am Klinikum Neustadt, Prof. Dr. P. Dufek
seit 07/2007 Assistenzärztin in der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie am Klinikum Eilbek, Prof. Dr. E. Hille

Promotion

01/2003 – 01/2008 Bearbeitung des experimentellen Themas „Immunhistochemische Analyse der Antigenexpression von Cdc2, MNDA, p27 und Rb bei Mantelzelllymphomen im Vergleich zu anderen B-Zell-Lymphomen“ im Institut für Pathologie der Universität Lübeck

Lübeck, den 24.01.2008