

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

---

Etablierung neuer immunhistochemischer Marker  
für das Grading des Follikulären Lymphoms

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
**- Aus der Medizinischen Fakultät -**

vorgelegt von  
Immo Latendorf  
aus Lüdinghausen

Lübeck 2006

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Hartmut Merz

2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Ekkehard Vollmer

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2006

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17.10.2006

## Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	4
2. Einleitung und Fragestellung.....	6
2.1 Übersicht.....	6
2.2 Das Follikuläre Lymphom.....	7
2.3 Das Grading des Follikulären Lymphoms.....	11
2.4 Probleme des Gradings.....	13
2.5 Prognostische Relevanz.....	14
2.6 Untersuchte Marker.....	16
2.6.1 Mib-1/Ki-67.....	16
2.6.2 HSP-90.....	18
2.6.3 Cyclin A.....	21
2.6.4 Jaw-1.....	25
2.7 Fragestellung.....	26
3. Material und Methoden.....	27
3.1 Morphologie und Immunhistochemie.....	27
3.2 Gewebe-Arrays.....	27
3.3 Immunhistochemie-Protokoll.....	29
3.4 Statistik.....	31
4. Ergebnisse.....	32
5. Diskussion.....	42
6. Zusammenfassung.....	51
7. Literaturverzeichnis.....	53
8. Abbildungsverzeichnis des Photo-Anhangs.....	63
9. Danksagung .....	67
10. Lebenslauf .....	68
11. Falltabellen.....	69
12. Photo-Anhang.....	76

## 1. Abkürzungen

17-AAG	17-Allylaminogeldanamycin
A.d.	Aqua destillata
ADP	Adenosin-diphosphat
AIDS	Acquired Immunodeficiency Virus
AK	Antikörper
ATP	Adenosin-triphosphat
CD	Cluster of Differentiation
Cdc2	Cell division cycle 2 (entspricht CDK1)
CDK1	Cyclin Dependent Kinase 1
clg	Zytoplasmatisches Immunglobulin
Cll	Chronische lymphatische Leukämie
cm	Zentimeter
DIC	disseminierte intravasale Koagulation
DNA	desoxyribo nucleic acid
DGBZL	Diffuses Grosszelliges B-Zell Lymphom
EBV	Epstein-Barr-Virus
EMA	Epitheliales Membran Antigen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FDC	Follikulär Dendritische Zellen
FL	Follikuläres Lymphom
FLC	follicular large cell (Einteilung nach Berard, entspricht Grad 3 FL)
FM	follicular mixed cell (Einteilung nach Berard, entspricht Grad 2 FL)
FSC	follicular small cleaved cell (Einteilung nach Berard, entspricht Grad 1 FL)
Hpf	high-power field (0.159 mm <sup>2</sup> )
HE	Hämatoxylin und Eosin
HRP	Horseradish-Peroxidase
HRS	Hodgkin und Reed-Sternberg (-Zelle)
HSF 1	Heat shock transcription factor 1
Ig	Immunglobulin
ILSG	International Lymphoma Study Group

IL-2	Interleukin 2
J-chain	Joining chain (Glykoprotein)
kD	kilo-Dalton
LDH	Laktat Dehydrogenase
LPL	Lymphoplasmozytisches Lymphom
MALT	mucosa associated lymphoid tissue
MBR	major breakpoint region
MCL	Mantelzelllymphom
mRNA	messenger ribonucleic acid
MZL	Marginalzonenlymphom
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NOS	not otherwise specified
PCR	Polymerase chain reaction
pH	potentia Hydrogenii
pRb	phosphoryliertes Retinoblastoma Protein
RT	Raumtemperatur
WF	Working Formulation
WHO	World Health Organization

## 2. Einleitung und Fragestellung

### 2.1 Übersicht

Das Follikuläre Lymphom stellt die zweithäufigste Lymphomentität innerhalb der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) dar. NHL machen in den USA fast 5% aller Malignome aus und sind damit dort mittlerweile die fünft-häufigste Tumorart. Die entsprechenden Zahlen für Westeuropa liegen etwas tiefer. Seit den 1950er Jahren gab es jährliche Zunahmen der Inzidenz von 3-4 %. Damit nahm die Inzidenz der NHL in diesem Zeitraum stärker zu als bei allen anderen Krebs-Arten, mit Ausnahme des malignen Melanoms der Haut und dem Lungenkrebs bei der Frau. Anfang der 1990er Jahre stabilisierten sich die Gesamt-Inzidenzraten für NHL, zwischen 1996 und 2000 fielen diese sogar leicht, als ursächlich hierfür, zumindest teilweise, werden die zurückgehenden Inzidenzraten für AIDS gesehen. Betrachtet man jedoch NHL in Populationsgruppen mit geringem AIDS-Risiko sowie NHL-Untergruppen, welche nicht mit AIDS assoziiert sind, so setzte sich der Anstieg der Inzidenzraten fort. Die Ursachen hierfür sind noch weitgehend unverstanden {13,16}.

Zur Diagnostik dieser an Bedeutung zunehmenden Gruppe von Lymphomen ist in den zurückliegenden Jahrzehnten eine Reihe von zum Teil nicht miteinander vergleichbaren Klassifikationssystemen erarbeitet worden {77, 27}. Die neue WHO-Klassifikation, 2001 publiziert {36}, konnte diesen Mißstand beseitigen und stellt die erste generell akzeptierte Klassifikation lymphatischer Neoplasien dar. Sie bietet eine solide diagnostische Basis für therapeutische Entscheidungen {28}. Eines ihrer Prinzipien ist die gleichrangige Berücksichtigung der Merkmalsbereiche Morphologie, Immunphänotyp, Genotyp, Klinik und zelluläre Herkunft.

Gleichwohl existieren auch in diesem System Schwächen. Eine hiervon betrifft das Grading des Follikulären Lymphoms, welches allein auf der Grundlage zytomorphologischer Charakteristika (Blastenzahl pro Fläche) vorgenommen wird. Es bestehen große Schwierigkeiten hinsichtlich diagnostischer Reproduzierbarkeit wie auch Unklarheiten über die postulierte klinisch-prognostische Relevanz.

## 2.2 Das Follikuläre Lymphom {14, 21, 36}

### a) Morphologie (s. Abb.2, 3) {39}:

In der Regel follikuläres Wachstum, typischerweise keine Hell-/Dunkel-Zonierung wie in reaktiven Follikeln; bisweilen diffuse Areale, selten rein diffuses Wachstum; Gemisch von Zentroblasten (große, transformierte Zellen; runde bis ovale, z.T. gekerbte Kerne mit 1-3 peripher gelegenen Nukleoli, z.T. multilobulierte Kerne) und Zentrozyten (klein bis mittelgroß mit angulierten, elongierten und eingekerbten Kernen, kaum sichtbare Nukleoli), für gewöhnlich mit Dominanz der Zentrozyten. Vergleichsweise monomorphe Keimzentren, keine oder wenige Apoptosen. Immer auch Vorkommen von FDC, Makrophagen und T-Lymphozyten in den Follikeln, z.T. auch uncharakteristische Riesenzellen; z.T. verschmälerte oder sogar fehlende Follikelmäntel; meist keine Sternenhimmel-Makrophagen; variabler bis hoher Sklerose-Grad bei Fällen von diffusem Wachstum (d.h. fokal follikuläres Wachstum in < 25% der Fläche), wesentlich geringer ausgeprägt bei rein follikulärem Wachstumsmuster (d.h. mehr als 75% follikuläre Areale). Interfollikuläre Beteiligung oft kleinerer Zentrozyten mit größerer Kernmonomorphie, z.T. Varianten mit Differenzierung in Richtung Marginalzonenzellen {56}, Plasmazellen (z.T. mit Paraproteinämie) oder Siegelringzellen (mit PAS-positiven, IgM entsprechenden Zelleinschlüssen). Selten Nekrosen bis Totalnekrosen infiltrierter Lymphknoten möglich, abhängig von Gefäßdestruktionen durch Lymphomzellen.

### b) Immunphänotyp:

Antigenprofil der Tumorzellen: CD20+, CD19+, CD22+, CD79 $\alpha$ +, CD77+, CD10+, besonders innerhalb der Follikel (CD10 wird in anderen kleinzelligen B-Zell-Lymphomen nicht exprimiert); Bcl-6+; Bcl-2+ (fast 100% in Grad 1, ca. 75% in Grad 3); bcl-2 Negativität überwiegend in kutanen Follikelzentrums-Lymphomen. Bcl-2 ist hilfreich zur Unterscheidung neoplastischer (positiv auch in vielen anderen low-grade B-Zell Lymphomen) von reaktiven Prozessen. IgM (50%), IgG (50%); CD43- (95%), CD23+/-, CD5-; im Vergleich zu reaktiven Keimzentren meist eine hochgradig verringerte proliferative Aktivität, insbesondere in den Bcl-2+ Fällen. Oft CD10+ B-Zellen in der Interfollikulärregion; reaktive Zellen: dichtes, scharf begrenztes FDC-Maschenwerk in den neoplastischen Follikeln mit

unterschiedlichem Differenzierungsgrad in verschiedenen Fällen von FL: z.T. Expression von allen FDC-Markern entsprechend FDC in reaktiven Keimzentren (CD35, CD21, CD23, XCXL13), assoziiert mit T-Zell-Reichtum, z.T. Fehlen dieses Antigen-Profiles {10}.

c) Genetik {63}:

Translokation t(14;18) (transloziert das Bcl-2-Gen in die unmittelbare Nachbarschaft zum IgH (-Schwerketten)-Gen auf Chromosom 14 mit Überexprimierung von anti-apoptotischem Bcl-2) in 90% der Fälle von FL, jedoch stark populationsabhängig {5}. In einer jüngeren Studie wurde gezeigt, dass nur 13% der FL Grad 3b diese Translokation aufweisen {59}. Strittig bleibt die prognostische Signifikanz der IgH/Bcl-2-Umlagerung. Iqbal et al. 2003 fanden keine Unterschiede in der Überlebenszeit zwischen IgH/Bcl-2 MBR-positiven und -negativen FL-Patienten {34}. Wichtig ist der Befund, dass auch gesunde Personen Träger der t(14;18) sein können {8, 73}. Klonale IgH- und IgL-Umlagerung sowie Mutationen in den umgelagerten Ig-Genen mit „ongoing“ (d.h. anhaltenden) - Mutationen (intraklonale Diversität) sind beschrieben; vielfältige, nicht zufällige und wiederkehrende chromosomale Abnormitäten in 100 % {87}. Höglund et al. 2004 fanden, zusätzlich zur Translokation t(14;18), 28 wiederkehrende Aberrationen des Karyotyps, die in mindestens 5% der Tumoren auftraten. Es zeigte sich eine klare zeitliche Abfolge des Auftretens der Imbalancen, entsprechend einer klonalen Evolution des Tumors {31}; Mutationen des p53-Gens und c-myc Umlagerungen in den transformierten Fällen. Eine vergleichende Untersuchung der Gen-Expressionsmuster von FL-Zellen und deren physiologischem Gegenstück, der Keimzentrums-B-Zelle, ergab eine Vielzahl von deregulierten Genen, darunter solche, die wichtige Funktionen bei der Regulation von Zell-Zyklus, Transkription oder Zell-Zell-Interaktionen besitzen {33}.

d) Klinik und Epidemiologie {2}:

20-30% aller NHL in Europa (40% in den USA, 5 % in Japan); Inzidenzzunahme seit den 1950er Jahren um ca. 4% jährlich, seit den 1990er Jahren fast stabil {13, 16}. Späteres Erwachsenenalter (Median 59 Jahre), nicht vor dem 20. Lebensjahr, m:w wie 1:1,18, somit das einzige Lymphom mit einer (gewissen) Bevorzugung

des weiblichen Geschlechts, ebenso scheint es das einzige Lymphom zu sein, bei dem Rauchen ein Risikofaktor (bis Faktor 1,8) ist {50}; bestimmten Berufsbildern scheint ein erhöhtes Erkrankungsrisiko inhärent zu sein, wie z.B. auch dem Arztberuf {46}. Das FL befällt vornehmlich Lymphknoten, aber auch Milz, Knochenmark und Haut; große Variabilität des klinischen Verlaufes; wegen Symptomarmut (ausgenommen Lymphknoten-Vergrößerungen) in ca. 65% fortgeschrittenes Stadium (III/IV nach Ann Arbor) zum Zeitpunkt der Diagnose; mit konventionellen therapeutischen Regimen nicht kurabel, neue Therapiemodalitäten wie z.B. die Stammzell-Transplantation {41}, Antikörper-Therapie {30}, Vakzinierung oder die Proteasom-Inhibierung sind derzeit in klinischer Erprobung {1}. 5-Jahresüberlebensrate 75%; die besten unabhängigen prognostischen Faktoren sind Patientenalter und Höhe der Serum-LDH, Parameter, die im International Prognostic Index {62} enthalten sind. Mehr als 50% diffuses Wachstum verschlechtert die Prognose signifikant {26}. CD10 und Bcl-6 sind prognostisch bedeutsam {6}. Transformation in ein Diffuses Großzelliges B-Zell-Lymphom in 30%-40% der Fälle.

e) Varianten:

Diffuses Follikel Zentrums Lymphom

Grad 1 : 0-5 Zentroblasten/hpf

Grad 2 : 6-15 Zentroblasten/hpf

Kutanes Follikel Zentrums Lymphom: oft bcl-2 negativ, oft an Kopf oder Stamm auftretend mit der Neigung, lokalisiert zu bleiben.

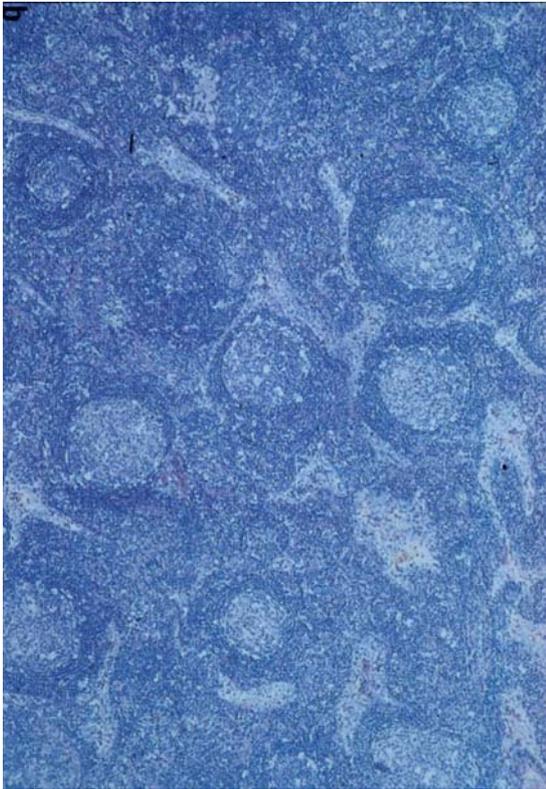
f) Ausgangszelle:

Keimzentrums-B-Zelle (FCC = follicle centre cell) {15}

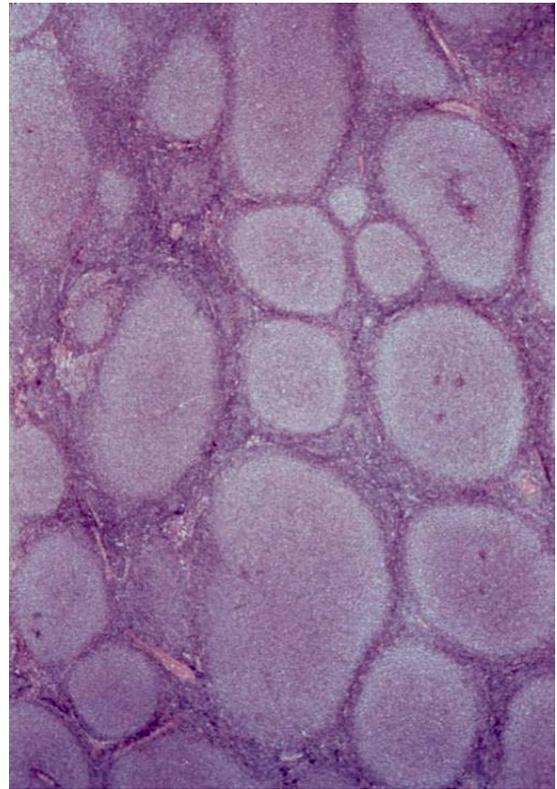
g) Differentialdiagnosen :

- Follikuläre lymphoide Hyperplasie (Abb.1): Hier finden sich in großer Zahl polyklonale Plasmazellen als Bestandteil des Gemisches inflammatorischer Zellen sowie eine sinusoidale B-Zell Reaktion, eine kleinere Anzahl Zentrozyten, mehr Mitosen und das Vorhandensein von starry-sky Makrophagen innerhalb der Follikel, welche eine zonale Kompartimentierung und eine fehlende Ausbreitung über die Kapsel hinaus

aufweisen, wie es besonders in Fällen von Grad 1/2 des FL vorkommt. Immunhistochemischer Nachweis einer Leichtketten-Restriktion und Bcl-2-Positivität beim FL. Wichtig ist auch das Alter des Patienten, da das FL so gut wie nie vor dem 20. Lebensjahr auftritt.



*Abb. 1 Follikuläre Hyperplasie*



*Abb. 2 Follikuläres Lymphom*

*Im Unterschied zur Follikulären Hyperplasie Fehlen einer Hell-/Dunkel-Zonierung der Keimzentren, nur schmale oder fehlende Follikelmäntel und keine Sternhimmel-Makrophagen beim Follikulären Lymphom (Abb.1 aus {20}, Abb.2 aus {21}, S.53.)*

- Vollständig diffus wachsende FL sind eine wirkliche Rarität und können leicht mit Immunozytomen/ lymphozytischen Lymphomen oder Mantelzell-Lymphomen verwechselt werden
- In Fällen einer stärkeren Sklerose des Follikulären Lymphoms muss an die zu einem gewissen Grade bestehende Ähnlichkeit mit einem Hodgkin-Lymphom vom nodulär-sklerosierenden Typ gedacht werden.
- Zuletzt sollen noch die FL mit Marginalzonen-Differenzierung, wie sie in ca. 10% der Fälle auftreten, erwähnt werden. Zum Teil fällt hierbei eine

Abgrenzung zum Marginalzonen-Lymphom sehr schwer, insbesondere da letztere die Eigenschaft aufweisen können, Lymphfollikel zu kolonisieren.

### 2.3 Das Grading des Follikulären Lymphoms

Ein Klassifikationssystem muss vor allem zwei Anforderungen Rechnung tragen: Es muss eine hohe diagnostische Reproduzierbarkeit aufweisen, sowie eine gesicherte klinisch-prognostische Relevanz besitzen. Eine bezüglich beider Kriterien befriedigende Klassifikation ist für das follikuläre Lymphom noch nicht gefunden worden {55}.

Die Einteilung des Follikulären Lymphoms wird heute nach der Dichte der Zentroblasten innerhalb der neoplastischen Zellpopulation vorgenommen. Dieses exakte Auszählen der Zentroblasten ist anderen Methoden, welche die Graduierung anhand des lediglich geschätzten, prozentualen Anteils der großen Zellen innerhalb der Follikel vornehmen, überlegen. Dieses letztere, mehr subjektive Vorgehen war Grundlage der Einteilungen nach Rappaport, Lukes und Collins und des Working Formulation-Systems, welche inzwischen verlassen worden sind {45, 55}.

Angelehnt an die Vorschläge von Mann und Berard {44} befürwortet die WHO folgendes Vorgehen: Die Einteilung in die Grade 1-3 wird vorgenommen, indem man die absolute Anzahl von Zentroblasten pro Gesichtsfeld (bei 40-facher Vergrößerung bzw. 0,159 mm<sup>2</sup> Fläche. Cave: Feldgröße des verwendeten Okulars !) in repräsentativen Ausschnitten von 10 verschiedenen Follikeln auszählt und das Ergebnis mittelt:

Grad 1: 0- 5 Blasten/high-power-field

Grad 2: 6-15 Blasten/high-power-field

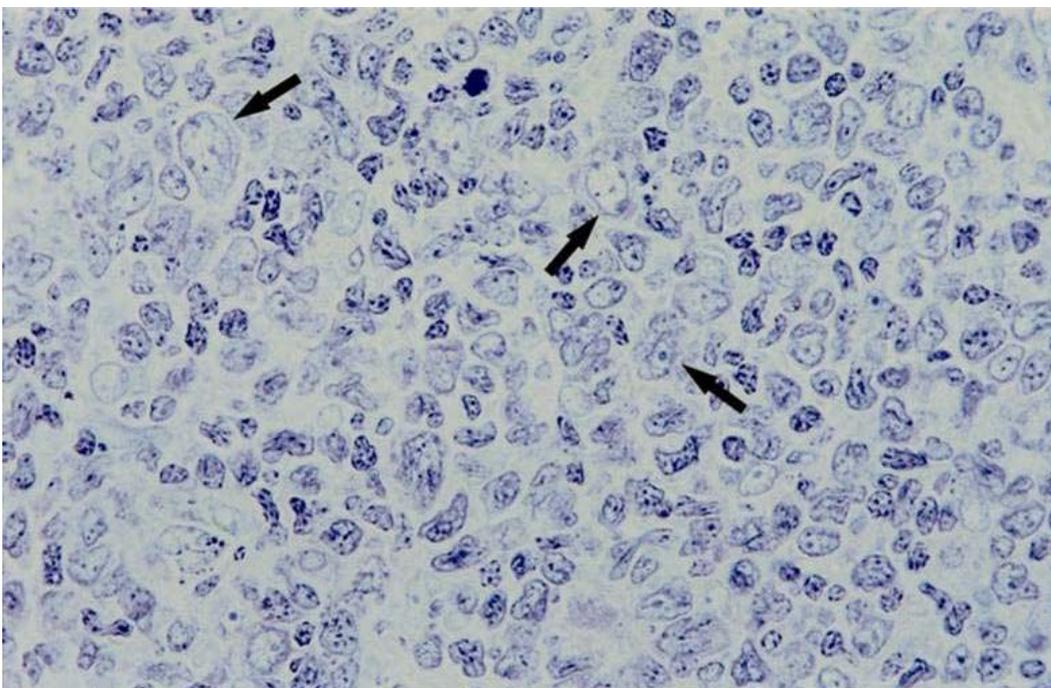
Grad 3: > 15 Blasten/high-power-field

3a: Zentrozyten vorhanden

3b: dichte Zentroblasten-Rasen

Berard hatte die Abstufung anhand der Zahl der Blasten ( $\leq 5$ / 6-15/  $>15$ ) willkürlich vorgenommen, jedoch zeigten statistische Vergleiche von Überlebenskurven, dass diese cut-off Punkte generell valide sind {55}.

Etwa 90% der FL können den Graden 1 und 2 zugeordnet werden. Auf der Grundlage möglicher Unterschiede in der Tumorbilogie befürwortet die WHO eine weitere Unterteilung des Grad 3 FL in die Grade 3a und 3b. Ein Grad 3a wird dann diagnostiziert, wenn die Zentroblasten verteilt liegen, d.h. durch Zentrozyten voneinander getrennt sind (dies korrespondiert mit dem low-grade cb-cc Lymphom mit hohem Blastenanteil der Kiel-Klassifikation).



*Abb.3 Follikuläres Lymphom, Grad 1, die Pfeile markieren typische Blasten. (Giemsa-Färbung, aus {21}, S.56)*

Ein Grad 3b liegt vor bei Vorhandensein von dichten, kohäsiven Rasen von Zentroblasten (dem high-grade folliculär-zentroblastischen Lymphom der Kiel Klassifikation entsprechend). Dieses weist hin auf eine beginnende Transformation in ein Diffuses Großzelliges B-Zell Lymphom (DGBZL).

Bei Vorhandensein kleinflächiger Areale einer Grad 3-Morphologie bei ansonsten vorliegendem Grad 1 oder -2 wird eine separate Diagnose mit proportionaler Angabe der einzelnen Grade gestellt. Die Zentroblasten müssen sorgfältig von zum Teil sehr ähnlich aussehenden Zellen, wie etwa großen Zentrozyten abgegrenzt werden, was schwierig oder sogar unmöglich sein kann: Von den

charakteristischen klein- bis mittelgroßen Zentrozyten besteht ein kontinuierliches morphologisches Spektrum hin zu mehr anaplastischen Zellen mit hellerem Chromatinmuster, welche mittelgroßen Zentroblasten sehr ähnlich sehen können. Ebenso muss eine Differenzierung zu Follikulär Dendritischen Zellen vorgenommen werden, was mit der Darstellung langer, CD21-positiver oder CD23-positiver zytoplasmatischer Ausläufer gelingen kann. Weiterhin muss darauf geachtet werden, dass Histologie und Zytologie innerhalb verschiedener Follikel stark variieren können. Zur Reduzierung dieser Fehlerquelle muss eine entsprechend große Zahl von Gewebeschnitten aus verschiedenen Lymphknoten berücksichtigt werden.

## 2.4 Probleme des Gratings

Problematisch ist die oben geschilderte Durchführung des Gratings allerdings schon deshalb, weil das Auszählen der Blasten kaum reproduzierbar ist - ein Mißstand, dessen Bestehen allgemein anerkannt ist. Somit kann ein konsistentes Grating kaum erreicht werden. Eine 1985 veröffentlichte Studie zur Diagnose-Variabilität bei der morphologischen Subklassifizierung des FL untersuchte zwei verschiedene Methoden in Hinblick auf deren Reproduzierbarkeit. Die erste lehnte sich an die Subklassifikations-Systeme nach Rappaport, Lukes und Collins sowie der Working Formulation an, die zweite basierte, in Anlehnung an die von Berard propagierte Methode, auf der genauen Auszählung bestimmter Zellen; beide Methoden zeigten unbefriedigende Ergebnisse im Sinne einer schlechten „Inter-Observer“ Übereinstimmung {47}. Verantwortlich hierfür dürfte die Schwierigkeit einer genauen Bestimmung der Zellgröße, wie auch der präzisen prozentualen Anteile der unterschiedlichen Zellpopulationen sein. Innerhalb der ILSG betrug die „Inter-Observer“ Reproduzierbarkeit für das Differenzieren der Grade I-III nach REAL gerade einmal 50% (entnommen aus {21}). Eine andere Studie, das Non-Hodgkin's Classification Project {75}, untersuchte unter anderem folgendes: Ein Teil der Konsensus-Fälle sollte am Ende noch einmal begutachtet werden, zunächst nur auf morphologischer Basis mit geringer klinischer Information (Alter, Lokalisation), dann mit zusätzlicher Immunhistochemie, schließlich unter

Einbeziehung aller klinischen Daten (Diagnosen 1, 2 und 3 der folgenden Tabelle 1):

Konsensus-Diagnose	Diagnose 1 (%)	Diagnose 2 (%)	Diagnose 3 (%)
Follikulär, alle Grade	93	94	94
Follikulär, Grad 1	72	73	73
Follikulär, Grad 2	61	61	61
Follikulär, Grad 3	60	61	61

*Tab.1: Übereinstimmung mit der Konsensus Diagnose (The Non-Hodgkin`s Lymphom Classification Project 1997, {75})*

Eine der Hauptschwierigkeiten ist der fehlende Konsens darüber, welche Zellen eigentlich unter der Bezeichnung Blasten firmieren und folglich in die Zählung mit eingeschlossen werden sollen.

## 2.5 Prognostische Relevanz

Insgesamt besteht für das Grading eine im Moment nicht sicher festzulegende klinische und prognostische Relevanz. Martin et al. 1995 fanden, dass die Methode nach Berard prädiktiv sowohl für das Gesamt-Überleben, als auch für das Rückfall-freie Überleben ist: 64 Patienten mit einem FLC hatten bezüglich des Überlebens schlechtere Daten als die kombinierte Gruppe aus 42 Patienten mit FSC und FMC {45}. Chau et al. 2003 fanden jedoch weder zwischen den Graden 1 bis 3 noch zwischen dem Grad 3a und 3b Unterschiede bezüglich Gesamtüberlebenszeit und Rückfall-freiem Überleben {11}. Hans et al. 2003 untersuchten 190 Fälle von FL Grad 3 und fanden ebenfalls, dass eine weitere Subklassifikation in die Grade 3a, 3b sowie einen als „follicular large cleaved cell-type“ bezeichneten Typ keine signifikante Diskrimination bezüglich des klinischen Verhaltens erbrachte, dass andererseits aber ein Anteil an diffusem Areal von > 50% in allen 3 Gruppen eine deutlich schlechtere Prognose, vergleichbar der eines DGBZL, zur Folge hatte {26}). Eine 1997 publizierte Studie zeigte ebenfalls

keine signifikanten Unterschiede in der Überlebenszeit (35-40% nach 10 Jahren) bei Patienten in den Stadien 3/4 (nach Ann Arbor) bezogen auf die Grade 1-3 des FL (bzw. low grade, FSC, low grade, FMC und intermediate grade, FLC gemäß der Working Formulation), sogar der Verlauf der Überlebenskurven erwies sich als fast deckungsgleich {48}. Ähnliches ergab eine 1999 veröffentlichte Arbeit, welche limited-stage Fälle untersuchte {74}. Früher durchgeführte Untersuchungen erbrachten insgesamt widersprüchliche Ergebnisse. Wiederum mag dies eine Frage der Definition der unterschiedlichen Grade gewesen sein. Das Airlie-House Treffen des Clinical Advisory Committee 1997 erbrachte den Konsens, dass die bestehenden kleineren Unterschiede zwischen den Graden 1 und 2 keinen verschiedenartigen therapeutischen Ansatz erforderten und klinisch die Differenzierung dieser beiden Grade keine sehr große Bedeutung habe. Trotzdem solle die Einteilung in drei Grade beibehalten werden, um einer Verwirrung vorzubeugen.

Die wichtigere Unterscheidung und Trennlinie scheint also diejenige zwischen den Graden 1 und 2 auf der einen Seite und dem Grad 3 auf der anderen zu sein {28}. Neben dem Grading scheint eine Beurteilung auf zytogenetischer Basis prognostisch aufschlussreich zu sein: die Anzahl chromosomaler Aberrationen könnte sich als wichtiger prognostischer Faktor erweisen {40, 59, 76, 87}. Zunehmend wird auch die Erstellung von Gen-Expressionsprofilen eine Rolle bei der Stratifizierung der klinischen Aggressivität des FL spielen. Zwei neuere Arbeiten mit dieser Zielrichtung untersuchten die Gen-Expressionsprofile sowohl der Tumorzellen selbst {24}, als auch der umgebenden, nicht-malignen Immunzellen {17}. Auf klinischer Basis konnten der International Prognostic Index (IPI) und der Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) z.T. erfolgreich bei Patienten mit FL angewendet werden {62, 70}. Der FLIPI berücksichtigt die folgenden fünf Faktoren für die Risikostratifizierung: Alter, Ann Arbor-Stadium, Hämoglobin, befallene Lymphknoten und LDH-Serumspiegel. Die Anwendung der verschiedenen klinischen Scoring-Systeme (wie IPI und FLIPI) sollte vom diagnostizierten Grad des FL abhängig gemacht werden {43, 62, 65}.

Neuere Arbeiten ergaben weitere Fragen: Darf man das Follikuläre Lymphom weiterhin als distinkte Krankheitsentität auffassen? Ott et al. 2002 untersuchten das biologische Spektrum des FL {59} und fanden deutliche Hinweise, welche sich

z.B. aus der Verteilung primärer und sekundärer chromosomaler Aberrationen ergaben. Der Grad 3b stellt demnach eher eine folliculäre oder partiell folliculäre Variante des Diffus Großzelligen B-Zell Lymphoms ( DGBZL) dar, als dass er dem FL im engeren Sinne zugerechnet werden darf. Die Negativität für die Translokation t(14;18) in den meisten Fällen des Grad 3b spricht gegen das Konzept, dass diese Tumoren transformierte Stadien eines primär niedrig-malignen Follikelzentrums-Lymphoms darstellen.

## 2.6 Untersuchte Marker

### 2.6.1 Ki-67

Der Ki-67 Antikörper erkennt ein nukleäres Antigen, welches in proliferierenden Zellen vorkommt, in ruhenden Zellen jedoch fehlt. Er markiert solche Zellen, die sich in der G1-, S-, G2- oder M-Phase des Zellzyklus befinden, nicht aber solche in der G0-Phase. Das Färbeverhalten macht also eine direkte Aussage über den *Anteil* an proliferierenden Zellen innerhalb eines Zell-Pools. Keine Rückschlüsse erlaubt es jedoch auf die Länge des Zellzyklus und somit ergeben sich nur indirekte Hinweise auf die Proliferationsrate bzw. den Generationszyklus von Zellen.

Gerdes et al. 1983 berichteten über die Produktion des monoklonalen Antikörpers Ki-67 aus der Maus [22]. Ursprüngliches Ziel war die Herstellung eines nukleären, für HRS-Zellen spezifischen Antikörpers. Gefunden wurde ein Antikörper, welcher proliferierende Zellen markiert. Eine Ki-67 Expression ließ sich nachweisen in Keimzentrumszellen der Tonsille, kortikalen Thymozyten, Nebenzellen des Magens, undifferenzierten Spermatogonien sowie einer Reihe von neoplastischen menschlichen Zell-Linien.

Zuvor negative periphere Lymphozyten zeigten nach Stimulation mit Phytohemagglutinin eine Ki-67 Positivität. Umgekehrt ging die induzierte Reifung von Zellen einer akuten Promyelozyten-Leukämie zu ruhenden Makrophagen mit dem Verlust der Kern-Positivität für Ki-67 einher. Die Ergebnisse stimmten gut

überein mit Daten über das Proliferationsverhalten von Zellen und Geweben, welche mittels Inkorporation radioaktiv markierter Nukleotide gewonnen wurden.

Weinberg berichtete über Untersuchungen an NHL, wonach Zellen mit großen Nuclei, gegenüber solchen mit kleiner Kerngröße, eine deutlich größere Ki-67 Positivität aufwiesen und gleichzeitig einen erheblich höheren Anteil an S+G2/M-Phasen Aktivität zeigten, unabhängig von der Diagnose oder dem Anteil an großen Zellen innerhalb der neoplastischen Zellpopulation {79}.

Weiss et al. 1987 untersuchten die Ki-67 Expression an Non-Hodgkin Lymphomen {80}. Sie legten die Subklassifikation der Working Formulation zugrunde, die die NHL in 3 Malignitätsgrade einteilt. Es bildeten sich 4 Gruppen mit unterschiedlich hoher Proliferationsrate, das FL zeigte intermediäre Proliferations-Indizes (Gruppe 2/4). Jedoch war das Spektrum der Proliferations-Indizes in den meisten Lymphom-Entitäten sehr groß, so dass einzelne Fälle unterschiedlicher Entitäten die gleichen Werte aufwiesen. Innerhalb des FL gab es keine Abstufungen der Proliferationsrate zwischen den verschiedenen Graden („predominantly small-cleaved“, „mixed small cleaved“, „large cell“ sowie „predominantly large cell“).

Martin und Mitarbeiter 1995 fanden hingegen, dass der Proliferationsindex mit der histologischen Einteilung des FL korreliert {45}. Gleichwohl zeigte sich auch hier die große Streubreite des Ki-67 positiven Zellanteils: 8,6-59,5% für die zusammengefasste Gruppe der FSC+ FM, 10,2-62,3% für den Grad FLC (nach Berard).

Feller und Diebold 2004 {21} führten aus, dass das beobachtete Spektrum Ki-67 positiver Zellen innerhalb des FL von 10 bis 80% reicht (mittlerer Wert ca. 35%). Dieser Wert steigt, ganz allgemein gesprochen, mit dem Grad an (siehe hierzu auch {23}), wobei dies nicht für jeden Fall zutrifft. So können Fälle mit anaplastischen Zentrozyten, welche formal dem Grad 1 oder 2 zugeordnet werden müssen, Werte bis 80 % erreichen. Als Störgröße bei der Bestimmung der Ki-67 Positivität spielen zudem residuelle reaktive Keimzentren, Keimzentrumsreste und infiltrierte interfollikuläre Regionen eine Rolle.

## 2.6.2 HSP-90

### Funktion und Induktion

Die zelluläre, molekulare Antwort auf einen Hitzeschock wurde erstmalig für Speicheldrüsen von *Drosophila* beschrieben. Sie bestand zytomorphologisch in einer Änderung des Puffing-Musters der Chromosomen sowie in der *de novo* Synthese bestimmter Proteine {66}.

Die Hitzeschock-Proteine werden, abhängig von Molekulargewicht und dem Grad an Homologie in drei Gruppen eingeteilt. Die erste enthält relativ kleine Proteine mit Gewichten von 15-30 kD. Die am höchsten konservierte zweite Gruppe hat Molekulargewichte um 70 kD. In der dritten Klasse (80-90 kD), als HSP90-Familie bezeichnet, finden sich beim Menschen distinkte Isoformen, die als HSP90- $\alpha$  (induzierbare, Major Form), HSP90- $\beta$  (konstitutive, Minor Form) sowie HSP90N bezeichnet werden. Homologe des HSP-90 finden sich auch im ER (Grp94) und in der mitochondrialen Matrix (TRAP1) {71}.

HSP-90 (heat shock protein) ist ein essentielles molekulares Chaperon, welches im eukaryontischen Zytosol selbst „ungestresster“ Zellen in großer Menge (ca. 1-2% des Proteoms) vorkommt. Es trägt zu einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Signal-Transduktion, Protein-Faltung und -Degradation sowie morphologischer Evolution bei. Dabei bestehen jedoch bestimmte funktionelle Differenzen zwischen den beiden Haupt-Isoformen HSP90- $\alpha$  und - $\beta$ . Dem HSP90- $\beta$  kommt z.B. eine Bedeutung bei der Entwicklung einer Multidrug Resistance wie auch bei der Stabilisierung des Zytoskeletts zu {71}.

Ein möglicher Mechanismus der verstärkten Transkription von HSP-90 unter zellulärem Stress wurde von Zou et al. 1998 beschrieben: HSP-90 sequestriert unter normalen Bedingungen die monomere, inaktive Form des heat shock transcription factors 1 (HSF1). Unkorrekt gefaltete Proteine, wie sie in Stress-Situationen auftreten, konkurrieren mit HSF1 um die Bindung an das HSP-90 und verdrängen es. Das HSF1 kann sich nun zum aktiven Trimer zusammenfügen und die Transkription von Proteinen der Hitzeschock-Antwort, darunter das HSP-90, initiieren {89}.

*In vitro* ist das HSP-90 in der Lage, die Aggregation denaturierter Proteine zu hemmen, ein Befund, dessen *in vivo*-Relevanz gleichwohl nicht bewiesen ist. HSP-90 ist jedoch in der Lage, in Kooperation mit anderen Chaperonen wie dem HSP-70-System, denaturiertes Protein erneut zu falten {51}. *In vivo* assoziiert HSP-90 mit Proteinen, welche bereits in hohem Grade eine Tertiärstruktur aufweisen, und seine Rolle scheint es eher zu sein, zur Reifung und Aktivierung spezifischer Klienten-Proteine beizutragen, als an deren *de novo*-Faltung beteiligt zu sein.

Die hochkonservierte 25 kD N-terminale Domäne ist Trägerin der essentiellen ATPase-Aktivität des Proteins (eine weitere ATP-Bindungsstelle befindet sich in der strukturell flexiblen Mittel-Domäne des Moleküls (35 kD), welche über ein geladenes Verbindungsstück mit der N-terminalen Domäne verbunden ist). Die C-terminale Domäne (12 kD) vermittelt die konstitutive (Homo-) Dimerisation zweier HSP90-Moleküle. Zu einer zusätzlichen Assoziation im Bereich der N-terminalen Domänen kommt es über die dortige Bindung von ATP. HSP90 arbeitet folglich wie eine molekulare Klammer: Die Bindung von ATP bewirkt eine Dimerisation der N-terminalen Domänen (geschlossener Zustand), dies erlaubt die Bindung eines Klienten-Proteins. Das in der anschließenden Hydrolyse gebildete ADP erlaubt das Wieder-Auseinanderweichen der N-terminalen Domänen (offener Zustand). Eine Vielzahl von Co-Chaperonen ist an der Regulation der ATP-Hydrolyse beteiligt und somit an der Oszillation des HSP-90 zwischen seiner offenen und geschlossenen Konformation: Diese gesamte „Superchaperon“-Maschinerie bestimmt in einem dynamischen Prozess die zyklische Rekrutierung und Wiederentfernung bestimmter Co-Chaperone und Klienten-Proteine. Die Funktionen von HSP-90 umfassen dabei nicht nur die Faltung und konformationelle Stabilisierung von Proteinen sondern auch deren Aktivierung/Deaktivierung, z.B. durch Vermittlung der Liganden-Bindung (wie im Falle des Steroid-Hormon Rezeptors) oder Kofaktor-Bindung (wie beispielsweise die Bindung des Häms an eNOS), die Phosphorylierung/Dephosphorylierung (z.B. einiger HSP-90-abhängiger Kinasen wie Raf1, c-Src oder PKB/Akt1) oder die Bildung von Protein/Protein-Komplexen (Raf1/Ras, Cdk4/ZyclinD) {64,86}.

HSP-90 ist an der Aktivierung von Schlüssel-Proteinen verschiedener Signal-Transduktionswege und -netzwerke beteiligt. Die ständig wachsende Anzahl der

entdeckten HSP-90-Klientenproteine umfasst derzeit schon mehr als einhundert. Bei der Regulation des Zell-Zyklus bewirkt die Ausschaltung von HSP-90 die Beeinträchtigung multipler Stadien der mitogenen Signalkaskade, die Cyklin-vermittelte Transition der G1- und G2-Phase sowie die Funktion des Zentrosoms während der Mitose {29}. Dem HSP90- $\alpha$  scheint zudem eine bedeutsame Funktion bei der Invasivität von Tumoren zuzukommen: Eustace et al. fanden an Fibrosarkomzellen, dass HSP90- $\alpha$  auch extrazellulär exprimiert wird und hier maßgeblich an der Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2), einem proteolytisch aktiven Enzym, beteiligt ist {19}.

Darüberhinaus kommt dem HSP-90 eine Rolle bei der morphologischen Evolution von Organismen und Arten zu: Eine partielle Ausschaltung der HSP-90 Aktivität bei *Drosophila* erbrachte die Ausbildung eines großen Spektrums an vererblichen phänotypischen Variationen {67}.

#### HSP-90 und Tumorigenese

HSP-90 wird in vielen Tumoren überexprimiert, wahrscheinlich aufgrund des Stresses, den das Mikromilieu des Tumors induziert, und wohl auch aufgrund von Mutationen und aberranter Expression von Onkoproteinen, welche nur suboptimale Faltungs-Charakteristika aufweisen und somit einen erhöhten Bedarf an Chaperonen erfordern {51}. Die Überexpression von HSP-90-Protein oder seiner mRNA wurde bisher in folgenden neoplastischen Zellen und Geweben nachgewiesen: Embryonales Karzinom, Ovarialkarzinom, Akute Leukämie, Tumoren der Lunge und der Niere, malignes Melanom, Mammakarzinom, Larynx-Karzinom, Magenkarzinom, Pankreaskarzinom {25}, Endometriumskarzinom, Plattenepithelkarzinom der Zunge {35} sowie in EBV-transformierten Lymphozyten (zu Referenzangaben s. {58}, Tab.1, S.468).

Eine positive prognostische Relevanz für die Überexpression von HSP-90 fand sich beim Endometrium-Karzinom {54}.

Die Entwicklung von Medikamenten, welche gegen HSP-90 gerichtet sind, ist zu einem bevorzugten Ziel in der Erforschung neuer antitumoraler Therapieansätze geworden. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass HSP-90 für den Erhalt konformationeller Stabilität und die Funktion zahlreicher Onkoproteine essentiell

ist, darunter Cdk4, c-Raf-1, ErbB2, mutiertes p53, c-Met, Polo-1, Akt und Bcr-abl. Fehlt dieser stabilisierende Effekt (durch eine Inhibition des HSP-90), kommt es zum Abbau der Klientenproteine im Proteasom. Dem HSP-90 wird daher ein anti-apoptotischer, zytoprotektiver Wirkmechanismus zugeschrieben. Hingewiesen sei jedoch auf eine Arbeit, welche das HSP90- $\alpha$  als Vermittler der Nikotin-induzierten Apoptose bestimmter Zelllinien sieht {83}.

Naturstoffe wie die Ansamycine (z.B. Geldanamycin und sein Derivat 17-AAG), erlangen ihre biologische Wirkung, indem sie kompetitiv die ATP-Bindungsstelle der N-terminalen Domäne des Proteins besetzen und so die Chaperon-Aktivität des HSP90 verhindern {82}. Kamal et al. untersuchten die beobachtete Selektivität, mit der HSP-90-Inhibitoren Krebszellen töten, nicht aber normales Gewebe: Es zeigte sich, dass HSP-90 in Tumorzellen in aktivierten, Multi-Chaperon-Komplexen vorliegt und nicht, wie in gesundem Gewebe, überwiegend unkomplexiert. Die Komplexierung mit den Co-Chaperonen HSP-70, HSP-40, Hop und p23 bedingt eine wesentlich erhöhte ATPase-Aktivität wie auch eine stark gesteigerte Bindungsaffinität des 17-AAG an das HSP-90 {37}. Die Anwendbarkeit des 17-AAG in der Tumorthherapie wird bereits in klinischen Studien untersucht {82, 60}.

### 2.6.3 Cyclin A

#### Cyclin A und Kontrolle des Zellzyklus

Cyclin A ist ein besonders interessanter Vertreter der Cyclin-Familie. Es ist in der Lage, zwei verschiedene Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) zu aktivieren wobei es sowohl in der S-Phase als auch in der Mitose funktionell bedeutsam ist {9}.

Neben dem Cyclin A2 als Gegenstand der vorliegenden Arbeit gibt es ein zweites Cyclin A1, welches nur embryonal sowie in normalem Testis-Gewebe vorkommt und essentiell für die Spermio-genese ist. Es kommt jedoch regelhaft und hochexprimiert in Zellen der akuten myeloischen Leukämie (AML) vor, wird aber

auch in normalen CD34+ Vorläuferzellen gefunden {85}. Cyclin A1 und Cyclin A2 besitzen teilweise gemeinsame funktionelle Eigenschaften {53}.

Cyclin A2 liegt zum Zeitpunkt seiner höchsten Konzentration (Übergang G2/M-Phase) in ca. 30-fach geringerer Konzentration vor als sein Partner CDC2 (CDK1) und ungefähr 8-fach schwächer konzentriert als sein zweiter Partner CDK2. Mit der Prometaphase beginnt die Degradation des Cyclin A2, welche mit der Metaphase abgeschlossen ist {84}.

Neben dem klassischen G2/M-Promotorkomplex Cyclin B-CDC2 (CDK1) (Cyclin B ist auch das Hauptcyclin der Mitosephase) wirkt auch Cyclin A2 maßgeblich an der Initiierung des G2/M-Übergangs mit: Anders als der Cyclin A-Spiegel, welcher zum Ende der G2-Phase hin kumuliert, bleibt der Cyclin B-Spiegel im Wesentlichen unverändert beim Zusteuern der Zelle auf die Mitose. Bei der Frage nach den Hauptregulatoren der CDK1-Aktivierung, für welche das Cyclin B also nur begrenzt in Frage kommt, scheint dem Cyclin A eine Schlüsselrolle zuzukommen: es befördert die Aktivierung der Cdc25-Phosphatasen. Diese befördern durch Dephosphorylierung von CDC2 die CDK1-Aktivierung und somit den Übertritt in die Mitose {49}. So bewirken zelluläre Mikroinjektionen von Cyclin A eine Stimulation des Übertritts in die Mitose, Mikroinjektionen von Antikörpern gegen Cyclin A hingegen einen Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase. Jedoch ist die Cyclin A-Funktion innerhalb der Mitose selbst unklar. Im Gegensatz zu Cyclin B, welches die Ubiquitin-vermittelte Degradation von anderen Cyclinen triggert, scheint Cyclin A diese zu inhibieren {84}.

Cyclin A bewirkt darüber hinaus eine Akzeleration des Übertritts von der G1 in die S-Phase. In der Synthese-Phase ist es Aufgabe des Cyclin A2, die DNS-Replikation zu regulieren, d.h. zu initiieren und gleichzeitig dafür zu sorgen, dass nur einmal pro Zellzyklus repliziert wird und es nicht zu einer Re-Replikation kommt. Entsprechend sind viele der bekannten Substrate des Cyclin A2 Bestandteile der DNS-Replikationsmaschinerie. Eine Mikroinjektion von anti-Cyclin A Antikörpern bewirkt einen Stopp der S-Phasen-Progression {84}.

Die Transkription und damit die Synthese des Cyclin A2 ist eng an die Bindung des Transkriptionsfaktors E2F an den Cyclin-Promoter geknüpft. Zuvor muss hypophosphoryliertes pRb, welches E2F bindet und inaktiviert, durch Cyclin

D/E/CDK Komplexe phosphoryliert werden, so dass es E2F freigibt, welches dann die Promotor-Repression, die in der G1/G0-Phase besteht, aufhebt. Dies geschieht ab dem Beginn der S-Phase. Es scheint einen negativen Feedback-Mechanismus der Cyclin A2-Transkription zu geben, indem Cyclin A2/CDK2 E2F phosphoryliert und somit als Transkriptionsfaktor inaktiviert. Diese Inaktivierung ist für den Austritt einer Zelle aus der S-Phase essentiell. Ihre Störung kann zur Apoptose der betroffenen Zelle führen. Dies gilt insbesondere für Zellen, in denen gleichzeitig die pRb-Aktivität herabgesetzt ist, wie dies für eine Vielzahl von Tumorzellen gefunden wurde. Neben E2F scheinen noch eine Reihe weiterer Faktoren an der Transkriptionsregulation von Cyclin A2 beteiligt zu sein. Negativ reguliert wird Cyclin A z.B. durch Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) {18} und p53.

Insgesamt korreliert die Cyclin A RNS- und -Protein-Expression sehr gut mit dem Anteil an Zellen in der S- plus G2-/M-Phase des Zellzyklus {61,81}.

### Cyclin A und Tumorigenese

Eine Deregulation des Zellzyklus ist einer der Hauptmechanismen der Tumorigenese. Eine erhöhte Expression von Cyclin A ist in einer Vielzahl unterschiedlicher Tumoren gefunden worden. In den meisten Fällen dieser Tumoren korreliert die erhöhte Expression von Cyclin A mit einem oder mehreren der folgenden Parameter: schlechtere Prognose für den Patienten, höheres Tumor-Stadium, größere Proliferation und Aneuploidie {84}. Dies gilt, um nur einige Beispiele anzuführen, für das hepatozelluläre- (HCC) {88}, das kolorektale- {57} und das Endometriumkarzinom {69}. Ebenso konnte dies bei Patienten mit Non-Hodgkin Lymphomen gezeigt werden {81}.

Auf der anderen Seite bietet die vorhandene Literatur Hinweise auf eine Korrelation zwischen einer Überexpression von Cyclin A und dem Ansprechen auf Chemotherapie bei einigen Tumorarten {84}. Kawashima et al. untersuchten das Ansprechen verschiedener Tumor-Zelllinien auf eine Exposition gegenüber 5-Fluorouracil (5-FU). 5-FU induzierte in den untersuchten Zelllinien eine dosisabhängige Zunahme der Cyclin A Expression. Darüberhinaus korrelierten die

beobachteten zytotoxischen Effekte mit dem gesteigerten Expressionsmuster des Cyclin A. Die Autoren schlussfolgerten, dass das Ausmaß an Cyclin A Expression eine Evaluierung der Sensitivität von Tumorzellen gegenüber 5-FU ermöglicht {38}.

Darüberhinaus ist für die akute myeloische Leukämie (AML) eine positive Korrelation zwischen mRNA-Spiegeln von Cyclin A2 (das gleiche gilt für Cyclin A1, welches in AML Zellen hoch exprimiert vorkommt) und einer erhöhten Überlebensrate beschrieben. Eine inverse Korrelation besteht für die Expression dieser Cycline mit Parametern, welche die leukämische Zellmasse repräsentieren, wie LDH-Spiegel und initiale Leukozytenzahl. Möglicherweise liegt diesem Befund die Tatsache zugrunde, dass eine erhöhte Cyclin A2 mRNA-Expression (mit konsekutivem, vermehrtem Übertritt der Zellen in die S-Phase) ebenso mit einer erhöhten Sensitivität von AML Zellen gegenüber Chemotherapeutika verbunden ist. Eine Erklärungsalternative wäre die Prädisposition bestimmter, Cyclin A überexprimierender (Tumor-) Zellen zur Apoptose {53}.

Die wichtige Frage, die sich aber stellt, ist: sind erhöhte Cyclin A-Werte ursächlich an der Tumorigenese beteiligt oder sind sie lediglich als Folgeerscheinung der Zell-Proliferation anzusehen? Diese Frage ist jedoch bislang nicht ohne weiteres zu beantworten. Bei transgenen Mäusen, die Cyclin A2 überexprimieren, konnten im Brustdrüsengewebe präneoplastische Veränderungen beobachtet werden {84}. Darüberhinaus wurde bei transgenen Mäusen, welche Cyclin A1 überexprimieren, die Entwicklung einer AML beobachtet {42}. Dem gegenüber steht der Befund, dass *erniedrigte* Cyclin A-Spiegel den Übergang in Meta- und Anaphase beschleunigen und somit eine Tumorigenese durch fehlerhafte Chromosomenverteilung begünstigt werden kann.

Chen et al. untersuchten den Effekt einer Ubiquitin-vermittelten Degradation von Cyclin A/Cdk 2 -Komplexen. Es fand sich eine massive Apoptose von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* ohne erkennbaren toxischen Effekt auf das umgebende, gesunde Gewebe {12}.

#### 6.2.4 Jaw-1

Der Bestand an publizierten Arbeiten über Jaw-1 ist sehr überschaubar, denn nach 1999 gibt es bislang keine Veröffentlichungen zu diesem Gen/Protein. Arbeiten mit klinisch-prognostischer Zielrichtung existieren nicht und wenig ist über die genaue Funktion des Proteins bekannt.

Das Jaw-1-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 12. Es ist ein Typ-II Membran-Protein, d.h. ein Protein, dessen Amino-Terminus zytoplasmatisch und dessen Carboxy-Terminus luminal lokalisiert ist. Es lokalisiert sich in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Die Jaw-1-Expression ist beschränkt auf lymphatische Zellen und kann hier sowohl in der B-Zell-Population als auch in der T-Zell-Linie nachgewiesen werden. Jaw-1- mRNA Expression ist am höchsten im Stadium der prä-T, prä-B und reifer B-Zellen.

Möglicherweise kommt Jaw-1 funktionell eine Rolle in der Differenzierung und Wachstumskontrolle dieser Zellen zu. Eventuell ist es auch an der Bereitstellung und Präsentation der Antigen-Rezeptoren beider Zell-Linien beteiligt {4, 68}.

Die Aminosäure-Sequenz von Jaw-1 zeigt große Übereinstimmung mit MRVI 1, einem Protein, welches spezifisch in Megakaryozyten exprimiert wird {68}.

Mostgert et al. 1998 fanden eine Überexpression von Jaw-1 in testikulären Keimzell-Tumoren. In diesen Tumoren findet sich eine Über-Repräsentation von Sequenzen des kurzen Arms von Chromosom 12, meist durch Isochromosom-Formation. Dieser Zuwachs an 12p-Sequenzen findet sich in allen histologischen Typen und sogar in prä-invasiven Stadien. Innerhalb der amplifizierten 12p-Region ist unter anderen das Gen für Jaw-1 lokalisiert {52}.

## 2.7 Fragestellung

Die Diagnostik und Graduierung des Follikulären Lymphoms ist mit großen Schwierigkeiten im Sinne einer schlechten Reproduzierbarkeit behaftet. Das von der WHO vorgeschlagene und verwendete Kriterium der Blastendichte versagt besonders in den Fällen, in denen eine exakte und sichere Zuordnung und Aufteilung der Zellpopulation zur Gruppe der Zentrozyten bzw. der Gruppe der Zentroblasten nicht gelingt. Von den klassischen Zentroblasten, also großen, transformierten Zellen mit runden bis ovalen Kernen, darin 1-3 gut sichtbaren, peripher gelegenen Nukleoli, erstreckt sich bis hin zu den charakteristischen klein- bis mittelgroßen Zentrozyten mit angulierten, elongierten Kernen und kaum sichtbaren Nukleoli ein morphologisches Kontinuum. Inmitten dieses Spektrums befinden sich z.B. die anaplastischen Zentrozyten, welche bereits ein gelichtetes Chromatinmuster aufweisen und leicht mit mittelgroßen Zentroblasten verwechselt werden können. In diesem kontinuierlichen Spektrum eine sichere Abgrenzung vorzunehmen fällt naturgemäß schwer und ist bis zu einem gewissen Grade arbiträr, mit der Folge, dass es zwischen verschiedenen Gutachtern erhebliche Differenzen in der Bewertung und Einteilung gibt.

Hinzu kommt, dass die auf diese Weise vorgenommene Einteilung des Follikulären Lymphoms eine nur unsichere klinisch-prognostische Relevanz besitzt.

Auch vor dem Hintergrund der großen epidemiologischen Bedeutung des Follikulären Lymphoms wäre es wünschenswert, die geschilderten Schwierigkeiten zu überwinden und verbindliche morphologische und immunhistochemische Kriterien zu definieren, mit denen eine verlässliche Graduierung vorgenommen und somit für die Klinik relevante Entscheidungshilfen generiert werden können.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, neue immunhistochemische Marker für das Grading des Follikulären Lymphoms zu entwickeln, welche als zusätzliche und wenn möglich validere Parameter für eine verlässliche Graduierung des Follikulären Lymphoms verwendet werden könnten um so eine objektivierbare Grundlage für weitreichende Therapieentscheidungen und auch für die Prognose des einzelnen Patienten zu schaffen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Morphologie und Immunhistochemie

Morphologische Merkmale wurden anhand von Haematoxylin und Eosin-, Periodic Acid Schiff-, Giemsa- und Gomori-gefärbten Schnitten von Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe bestimmt.

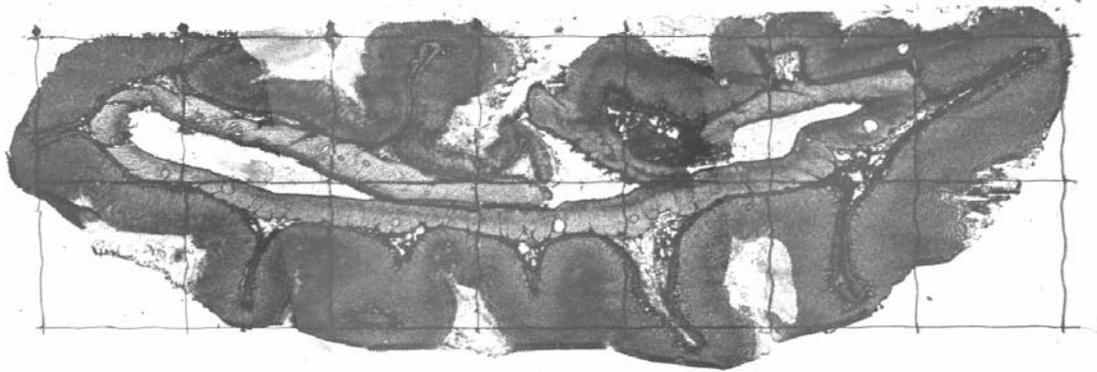
Immunhistochemische Färbungen wurden nach einem standardisierten, dreischriftigen Immunperoxidaseprotokoll mit Diaminobenzidin als Chromogen durchgeführt. Die folgenden Antikörper wurden in der Routine-Diagnostik eingesetzt: CD20, OPD4, Bcl6, CD3, Kappa und Lambda Leichtketten, Cyclin D und Mib/Ki-67, welche von DAKO (Dänemark) bezogen wurden. CD5, CD10, CD30, CD15, CD2, CD56, CD5, CD8 und CD4 wurden von Biocarta (Hamburg, Deutschland) bezogen. CD23 wurde von Novocastra (Newcastle, England) bezogen, OCT2 von Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA) und TIA1 von Immunotech (Marseille, Frankreich).

Cyclin A-Antikörper wurden ebenfalls von Novocastra bezogen, Antikörper gegen Jaw-1 und HSP-90 von Santa Cruz.

#### 3.2 Gewebearrays

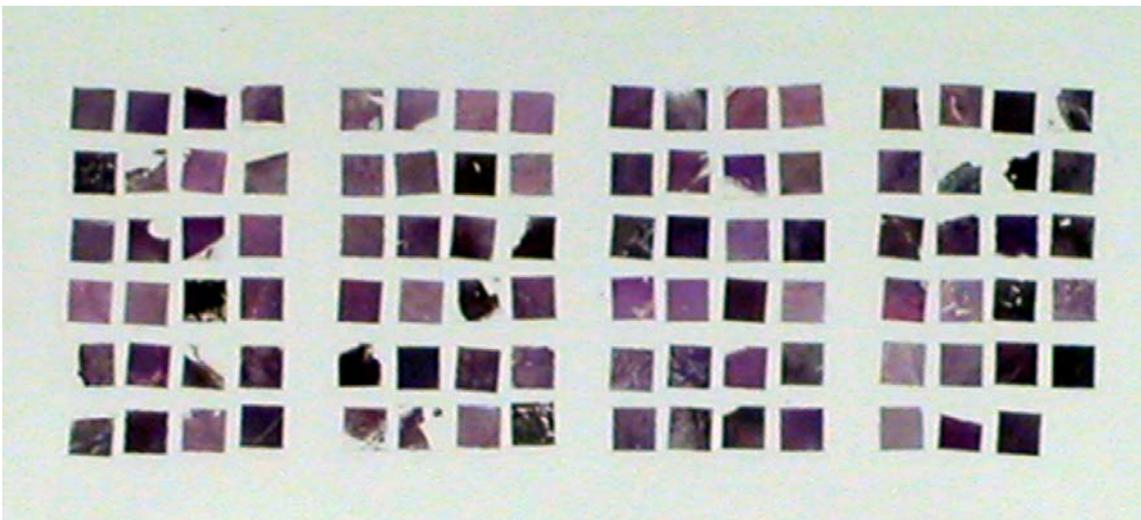
Ein Teil der Fälle wurde mit Hilfe von neu entwickelten Gewebe-Arrays (array, engl. für Anordnung, Aufstellung) untersucht. Die Prinzipien dieser Technik sind bereits 1985 beschrieben worden. Die verwendeten Arrays entstanden unter Modifizierung dieser Technik und in Zusammenarbeit mit der Euroimmun Medizinische Labordiagnostica AG, Lübeck, Deutschland.

Das Herstellungsverfahren beginnt mit Aufbringen von 3-5µm dicken Schnitten von routinemäßig Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebematerial auf chemisch aktivierte Deckgläschen. Diese Gewebeschnitte werden in den Computer eingescannt und mit einem Raster unterlegt, so dass jedes Präparat in genau definierte, 3,25- 4mm<sup>2</sup> messende Quadrate eingeteilt werden kann (s. Abb.4).



*Abb.4 Deckgläschen mit dem kompletten Präparat und Rasterlinien. Jedes Quadrat kann untersucht, ausgewählt und separat auf den Gewebe-Array gebracht werden.*

Repräsentative Areale des Präparates werden ausgewählt, markiert und nach dem Zerschneiden des Deckgläschens entlang der Linien des Rasters zum Bestücken der Gewebe-Arrays verwendet. Hierzu werden sie an definierten Positionen auf einem Objektträger fixiert. Bis zu 100 dieser ca. 4mm<sup>2</sup> großen Gewebeproben können auf einem Array Platz finden (s.Abb.5).



*Abb.5 H&E-gefärbter Gewebe-Array mit 95 Proben.*

### 3.3 Immunhistochemie-Protokoll

#### ABC-Methode

Die in der Arbeit angewandte immunhistochemische Färbemethode ist die sogenannte Avidin-Biotin-Complex- (ABC-) Methode, welche von Hsu et al. 1981 entwickelt wurde {32}.

Prinzip: Bindung des Primär-Antikörpers an das entsprechende Gewebe-Antigen. Im nächsten Schritt erfolgt die Bindung eines biotinylierten Sekundär-Antikörpers an den primären Antikörper. Dann Aufbringen des vorgeformten Avidin-Biotin-Enzym-Komplexes (als Enzym verwendet: Meerrettich-Peroxidase/horseradish peroxidase (HRP) bzw. Alkalische Phosphatase (AP)) und dessen hochaffine Anlagerung an das Biotin-Molekül des Sekundär-Antikörpers. Verwendung von 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) bzw. Neufuchsin als Chromogene unter Bildung eines sichtbaren braunen bzw. roten Reaktionsproduktes.

#### Vorbehandlung:

Gewebeschnitt entparaffinieren (3x10 min. im Xylol-Bad), dann Rehydrieren (100%-96%-70%-70% Ethanol für jeweils 1 min). Anschließend:

HSP-90: 10 min. Proteinase K: 1 Trpf. PK (DAKO Cytomation, Code No.S 2019) in 2 ml Dilutionsmedium (DAKO Cytomation, Code No. S 2032) bei RT.

Cyclin A: 45 min kochen im Dampfgarer (MultiGourmet, Firma Braun) mit Zitronensäure (2g Citric Acid Monohydrate/ 1,0 l A.d., pH6).

Jaw-1 und Ki-67: 20 bzw. 15 min. im Druck-Kochtopf mit Zitronensäure (2g Citric Acid Monohydrate/ 1,0 l A.d. ,pH 6).

#### Primärantikörper:

Verdünnung des Primär-Antikörpers mit ChemMate Antibody Diluent (DAKO Cytomation S 2022) auf folgende Konzentrationen:

Ki-67, mouse-monoclonal (Clone Mib-1, DAKO Cytomation, M7240, DK): 1:100

Cyclin A, mouse-monoclonal (Novocastra Laboratories Ltd., Klon 6E6, UK): 1:50

HSP90- $\alpha/\beta$ , goat-polyclonal (N-17, sc-1055, Santa Cruz Biotechnology, Inc., US),  
Jaw-1, goat-polyclonal (E-19, sc-11688, Santa Cruz Biotechnology, Inc., US):  
beide 1:150

Sekundär-Antikörper (biotinyliert):

- Bei Maus-Primär-AK (Cyclin A):

Goat-anti-Mouse IgG Plus (Biocare Medical, Cat# GM601MM plus),  
gebrauchsfertig

- Bei Ziegen-Primär-AK (HSP-90 und Jaw-1):

Mouse-anti-Goat IgG (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., 205-065-  
108), zu verdünnen mit ChemMate Antibody Diluent (DAKO Cytomation S 2022)  
auf 1:50

Enzym-Chromogen:

- Blockieren der endogenen Peroxidase-Aktivität nach dem Prinzip eines  
Überschusses an  $H_2O_2$  bei fehlendem Elektronendonator mit:

Peroxidazed Blocking Agent (Biocare Medical, Cat# PX968MM)

- Auftragen des Avidin-Biotin-HRP-Komplexes (DAKO, Denmark, K0355)

- Inkubieren mit chromogener Substratlösung:

DAB Chromogen (Biocare Medical, Cat# DB851-60)

DAB Substrate Buffer (Biocare Medical, Ref DS854MM)

Chromogen zu Puffermedium im Verhältnis 1:20

Kurz-Protokoll:

- |                     |            |
|---------------------|------------|
| 1.) Primär-AK:      | 25 min.    |
| 2.) Sekundär-AK:    | 15 min.    |
| 3.) Blocken:        | 3 x 5 min. |
| 4.) AB-HRP-Komplex: | 15 min.    |

- 5.) DAB: 7 min.  
6.) Hämatoxylin: 1 min.  
7.) Anschließend entwässern (aufsteigende Alkoholreihe), Xylol-Bad, Eindeckeln.

Zwischen den einzelnen Schritten spülen mit isotoner Puffer-Lösung.

### 3.4 Statistik

Für die Bestimmung der Protein-Expression mittels Immunhistochemie wurde ein semiquantitativer Score in folgender Weise benutzt: 0=keine Anfärbung, 1=schwache Anfärbung, 2=mittelgradige Anfärbung, 3=starke Anfärbung, 4=sehr starke Anfärbung. Dieser Score integriert die beiden Parameter: Anteil angefarbter Zellen und Intensität der Anfärbung.

Für den statistischen Vergleich der Gruppenzusammensetzung (Gruppen=Follikuläres Lymphom Grad1-3b) wurde der nicht-parametrische Test für zwei unabhängige Stichproben nach Mann-Whitney angewendet. P-Werte < 0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

In einem zweiten Schritt wurde die Diskriminierung der WHO Klassen FL Grad1-3b unter Benutzung eines Kombinations-Scores aus z. T. gewichteten Einzelscores vorgenommen.

#### 4. Ergebnisse

Es wurden 169 B-Zell Non-Hodgkin Lymphome (NHL) untersucht (s.Tab.2). Darunter befanden sich 43 Follikuläre Lymphome (FL), davon 9 FL Grad 1, 18 FL Grad 2, 8 FL Grad 3a sowie 8 FL Grad 3b. Weiterhin 32 Mantelzell-Lymphome (MCL), sowie 94 Diffuse Großzellige B-Zell Lymphome (DGBZL), wobei 70 dem centroblastischen (CB) (mono-/polymorph) und 13 dem immunoblastischen (IB) Subtyp zuzuordnen sind, 11 sind unklassifizierbar (NOS). T-Zell Lymphome wurden nicht untersucht. Vergleichend wurde die Marker-Expression in normalem Tonsillen-Gewebe (Tonsilla palatina), in Milz-Gewebe sowie in reaktiv veränderten Lymphknoten (unspezifische, chronische Lymphadenitis) untersucht.

Entität	n	Mib-1 (%)	HSP-90 (0-4)	Cyclin A (0-4)	Jaw-1 (0-3)
FL 1	9	21,1	1,38	1,44	1,5
FL 2	18	33,89	2,53	2,28	2,12
FL 3a	8	38,75	3,13	2,71	2,5
FL 3b	8	56,25	3,75	3,125	3,0
MCL	32	32,66	1,38	1,93	0,7
CB	70	68,53	3,44	3,25	2,34
DGBZL IB	13	64,23	3,58	3,08	2,15
NOS	11	66,36	3,64	3,55	2,55

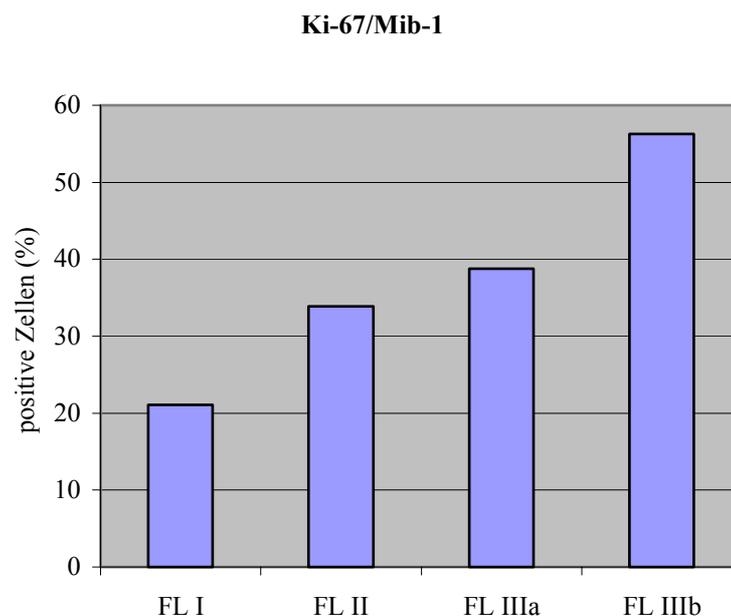
*Tab.2 Fallzahl und Ergebnisse (Mittelwert) der immunhistochemischen Färbung mit Mib-1, HSP-90, Cyclin A und Jaw-1. FL 1-3b Follikuläres Lymphom Grad 1-3b nach WHO. MCL Mantelzell Lymphom. DGBZL Diffuses Großzelliges B-Zell Lymphom, CB centroblastic, IB immunoblastic, NOS not otherwise specified.*

Die Gewebe wurden im Hinblick auf die Intensität der Anfärbung durch die verwendeten 4 Antikörper sowie die Anzahl positiver Zellen untersucht. Diese beiden Größen flossen zu einem semiquantitativen Score zusammen. Im Falle von HSP-90 und Cyclin A wurden 5 Intensitätsstufen (0-4) unterschieden, im Fall des Jaw-1 wurden 4 Abstufungen (0-3) vorgenommen, um eine ausreichend große Trennschärfe zu gewährleisten. Alle Präparate sind von zwei Untersuchern unabhängig begutachtet worden, ein Konsens wurde an einem Multi-Observer Mikroskop hergestellt. Alle Präparate wurden wiederholt begutachtet (3x) mit guter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

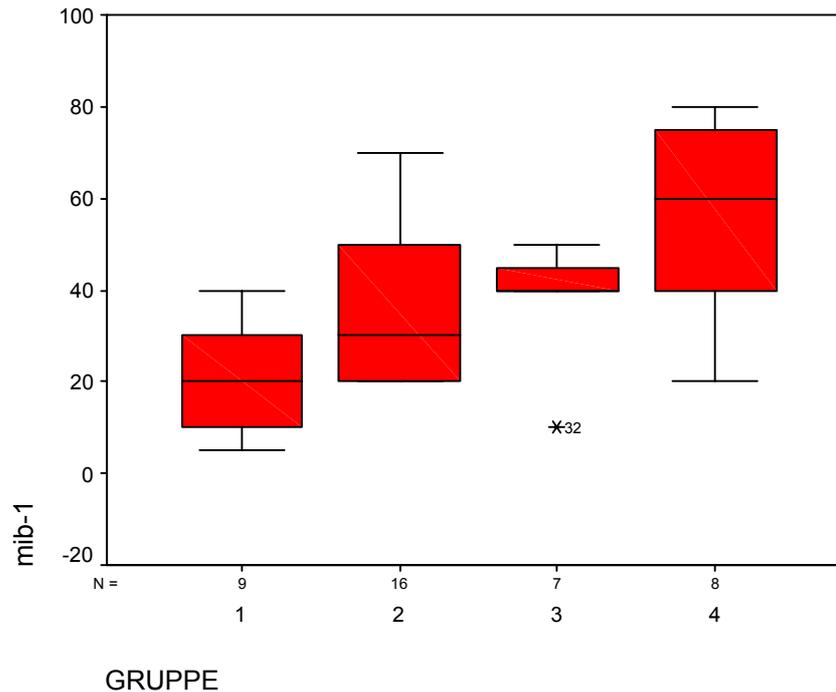
Es wurde anhand von mit Giemsa gefärbten Schnitten ein Grading nach den Kriterien der WHO für die Follikulären Lymphome vorgenommen. Die Proliferationsrate wurde anhand von Mib-1/Ki-67- gefärbten Schnitten bestimmt.

Alle Proben auf den Arrays zeigen repräsentative Ausschnitte des Tumors und enthalten eine ausreichend große Anzahl von Zellen.

Die Abbildungen 6, 8, 10 und 12 zeigen Mittelwerte der Scores bzw. die durchschnittliche Prozentzahl Mib-1-positiver Zellen für die ausgewählten Lymphomentitäten. Neben den Graden 1, 2, 3a und 3b nach WHO für das Follikuläre Lymphom wurden zwei weitere Entitäten aus der Gruppe der Non-Hodgkin B-Zell Lymphome ausgewählt und untersucht,



*Abb.6 Durchschnittlicher Anteil Ki-67/Mib-1 positiver Zellen (%) im Grad 1-3b des Follikulären Lymphoms nach WHO*



*Abb.7 Boxplot-Diagramm zur Verteilung der Anteils Mib-1/Ki-67 positiver Zellen innerhalb der Gruppen 1-4 entsprechend FL 1-3b.*

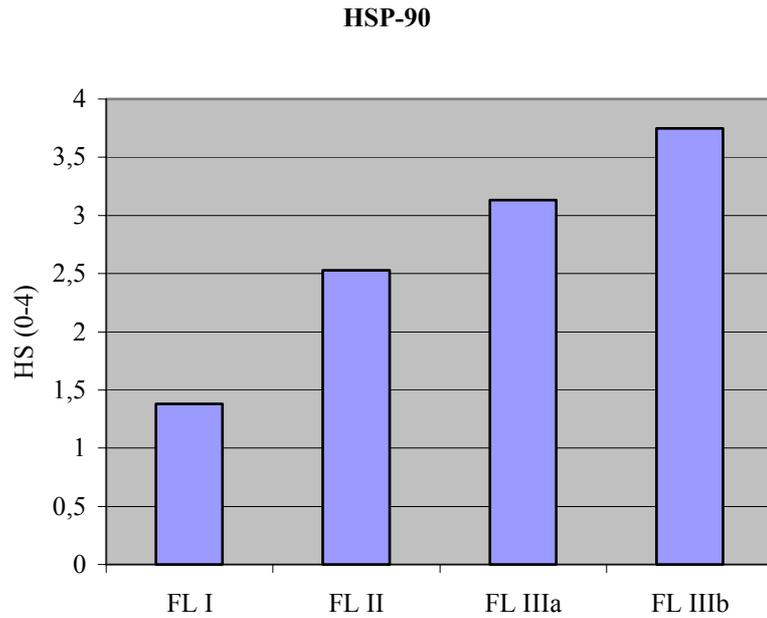
um die gefundenen Ergebnisse besser einordnen zu können: Das Diffuse Großzellige B-Zell Lymphom (DGBZL) sowie das Mantelzell-Lymphom (MCL).

Anhand der Mib-1 Färbung zeigte sich ein durchschnittlicher Proliferationsindex für den Grad 1 des FL nach WHO von 21,1%, für den Grad 2 von 33,89%, für den Grad 3a von 38,75% und für den Grad 3b von 56,25 % (Abb.6).

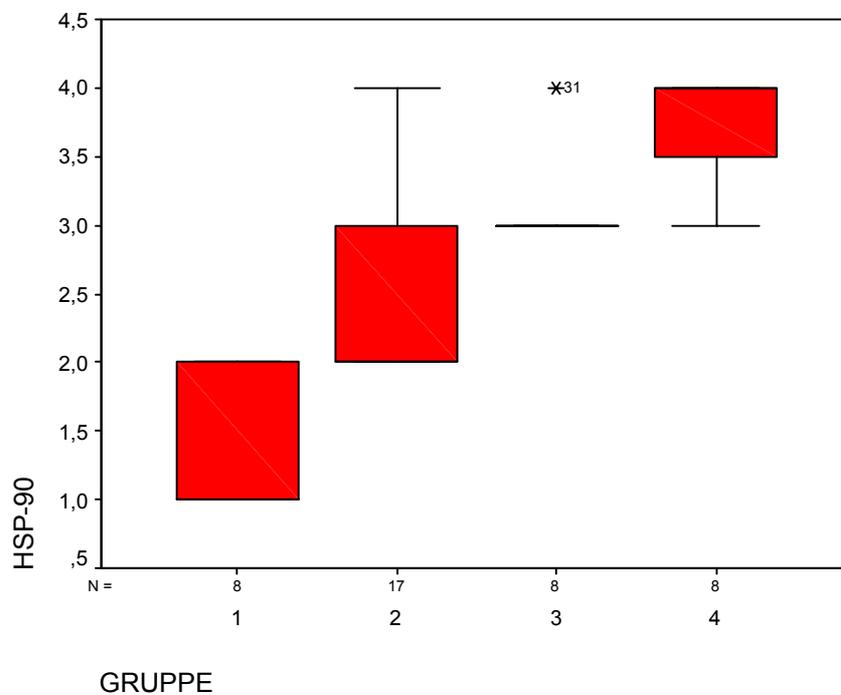
Diese Unterschiede zeigten sich jedoch als statistisch nicht signifikant (FL1 gegen FL2,  $p=0,062$ , FL2 gegen FL3a,  $p=0,304$ , FL3a gegen FL3b,  $p=0,069$ ). Die Verteilung und Streuung der Werte zeigt Abb.7. Es zeigten sich einzelne „Ausreisser“ aus der Gruppe der FL Grad 1, deren Proliferationsindices höher lagen als bei einigen Fällen von FL Grad 3a und 3b!

Die Durchschnittswerte waren für das MCL 32,66% und für das DGBZL 67,66%.

Die HSP-90 Färbung brachte folgende Durchschnittswerte (Scorewerte 0-4): 1,38 für den Grad 1; 2,53 für den Grad 2; 3,13 für den Grad 3a und 3,75 für den Grad 3b (Abb.8).



*Abb.8 Durchschnittliche Anfärbung mit HSP-90 (0-4) im Grad 1-3b des Follikulären Lymphoms nach WHO.*



*Abb.9 Boxplot-Diagramm zur Verteilung der HSP-90-Scorewerte innerhalb der Gruppen 1-4 entsprechend FL 1-3b.*

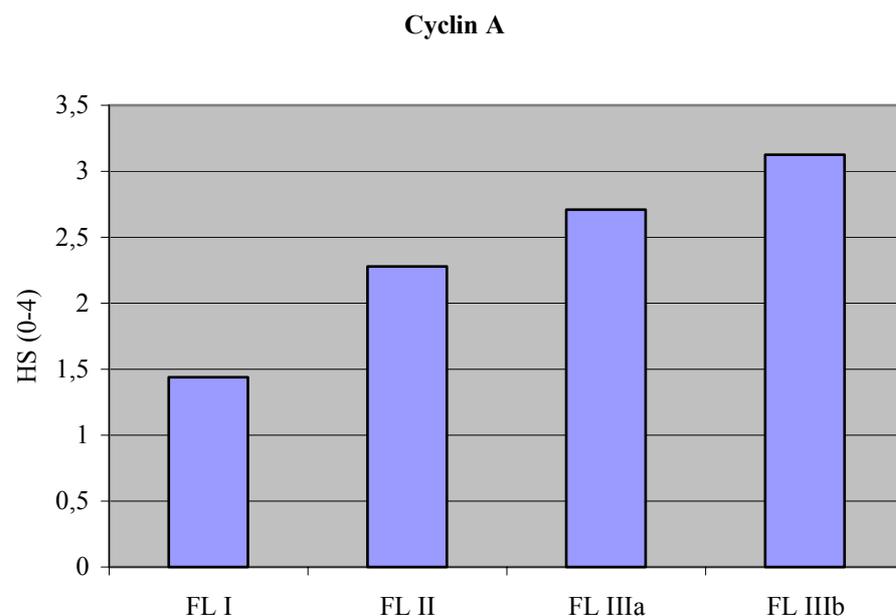
In allen Fällen ergab sich hier eine statistische Signifikanz: Grad 1 gegen Grad 2,  $p=0,001$ ; Grad 2 gegen Grad 3a,  $p=0,017$ ; Grad 3a gegen Grad 3b,  $p=0,015$ . Das Boxplot-Diagramm zeigt hier eine wesentlich deutlichere Spreizung als bei Mib-1/Ki-67 (Abb.9).

Der Durchschnittswert für das MCL betrug 1,38, mit großer Streuung der Werte! Das DGBZL wies einen gemittelten Wert von 3,44 auf.

Beispiele für unterschiedliche Färbeintensitäten/Scorewerte zeigen die Abb. 14-18 des Photo-Anhangs.

HSP-90 in der Tonsille: Angefärbt wird ein Teil der Keimzentrumsblasten, bei nur minimaler Anfärbung der Zellen der Interfollikularregion. (Abb.13 des Anhangs):

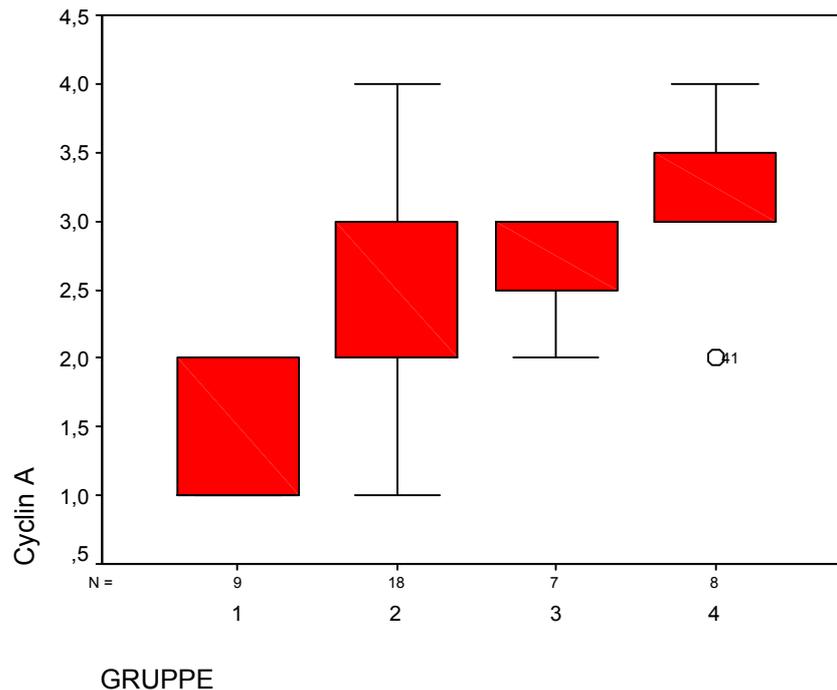
Für das Cyclin A ergaben sich die folgenden Durchschnittswerte: 1,44 für den Grad 1, 2,28 für den Grad 2, 2,71 für den Grad 3a sowie 3,125 für den Grad 3b nach WHO (s. Abb.10). Abb.11 zeigt als Boxplot-Diagramm die Verteilung der Einzelwerte. Statistisch signifikant unterschieden sich dabei die Gruppen jedoch nicht voneinander: Grad 1 gegen Grad 2,  $p=0,12$ ; Grad 2 gegen Grad 3a,  $p=0,168$ ; Grad 3a gegen Grad 3b,  $p=0,188$ . Der gefundene Durchschnittswert für das MCL ist 1,93; ebenfalls mit großer Streuung der Werte.



*Abb.10 Durchschnittliche Anfärbung mit Cyclin A (0-4) im Grad 1-3b des Follikulären Lymphoms nach WHO.*

Das DGBZL kommt auf einen Wert von 3,26 im Durchschnitt.

Beispiele für unterschiedliche Färbeintensitäten in den Graden 1-3b des FL zeigen die Abb. 8-12 des Photoanhangs.



*Abb.11 Boxplot-Diagramm zur Verteilung der Cyclin A-Scores innerhalb der Gruppen 1-4 entsprechend FL 1-3b.*

Das Färbemuster von Cyclin A in der Tonsille zeigt Abb.7 des Anhangs.

Mit Jaw-1 (Score 0-3) unterschieden sich die einzelnen Grade 1-3b nur teilweise statistisch signifikant: Grad 1 hatte einen Durchschnittswert von 1,5; Grad 2 2,12; bei Grad 3a waren es 2,5 und bei Grad 3b 3,0 (Abb.12).

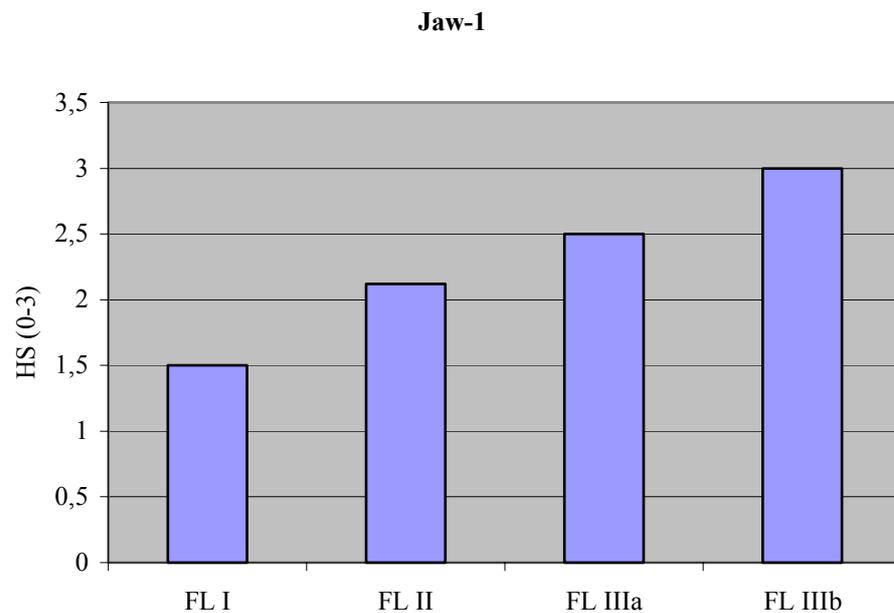
Es unterschied sich der Grad 1 signifikant von Grad 2 ( $p=0,024$ ), ebenso wie der Grad 3a von Grad 3b ( $p=0,035$ ), nicht jedoch Grad 2 von Grad 3a ( $p=0,139$ ). Die Verteilung der Werte zeigt Abb.13.

Das MCL kam auf einen durchschnittlichen Wert von 0,7, das DGBZL auf 2,34. Beispiele für unterschiedliche Färbeintensitäten zeigen die Abb. 20 und 21 des Anhangs.

Wie bei HSP-90 zeigt die Jaw-1 Färbung von Tonsillengewebe eine weitgehende Aussparung der Zellen der Interfollikularregion (s. Abb.19 des Photoanhangs).

Korreliert die Expression der drei Marker HSP-90, Cyclin A und Jaw-1 innerhalb des Follikulären Lymphoms (alle Grade zusammengefasst) mit dem Proliferationsindex, gemessen mit Mib-1/Ki-67? Zur Klärung dieser Frage wurde eine Einteilung in drei „Mib-1-Gruppen“ vorgenommen:

1. 0-20 % Proliferationsrate (n=14), 2. >20-40 % (n=16) und 3. >40-80% (n=13).



*Abb.12 Durchschnittliche Anfärbung mit Jaw-1 (0-3) im Grad 1-3b des Follikulären Lymphoms nach WHO.*

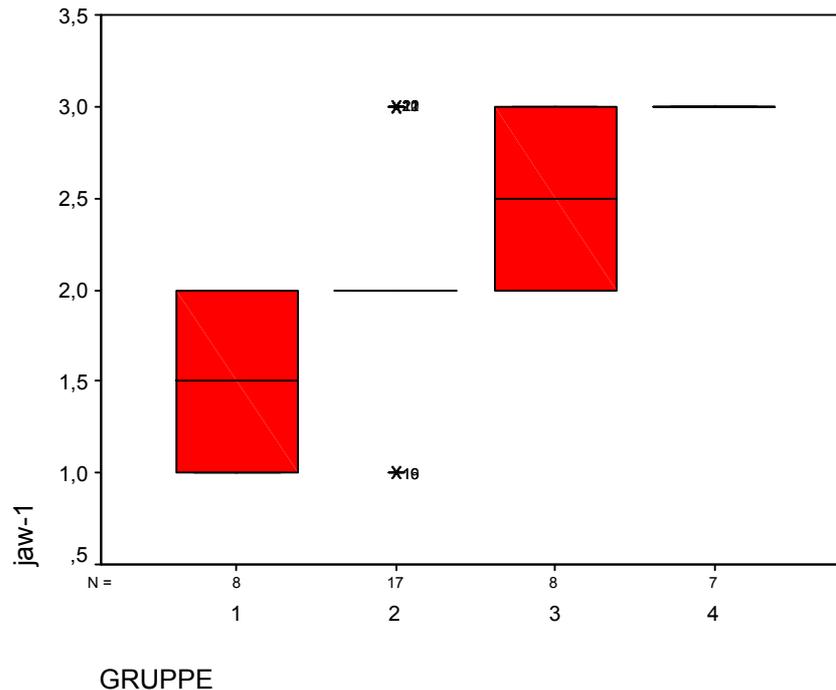


Abb.13 Boxplot-Diagramm zur Verteilung der Jaw-1 Scores innerhalb der Gruppen 1-4 entsprechend FL 1-3b.

Für HSP-90 ergaben sich die folgenden Werte: Mib-1-Gruppe 1: 2,0, Gruppe 2: 2,64, Gruppe 3: 3,38. Es ergibt sich nur eine teilweise statistische Signifikanz: Gruppe 1 gegen Gruppe 2,  $p=0,057$ , Gruppe 2 gegen Gruppe 3,  $p=0,021$ . D.h. es gibt keine statistisch signifikante Korrelation zwischen Zell-Proliferation und HSP-90-Expression.

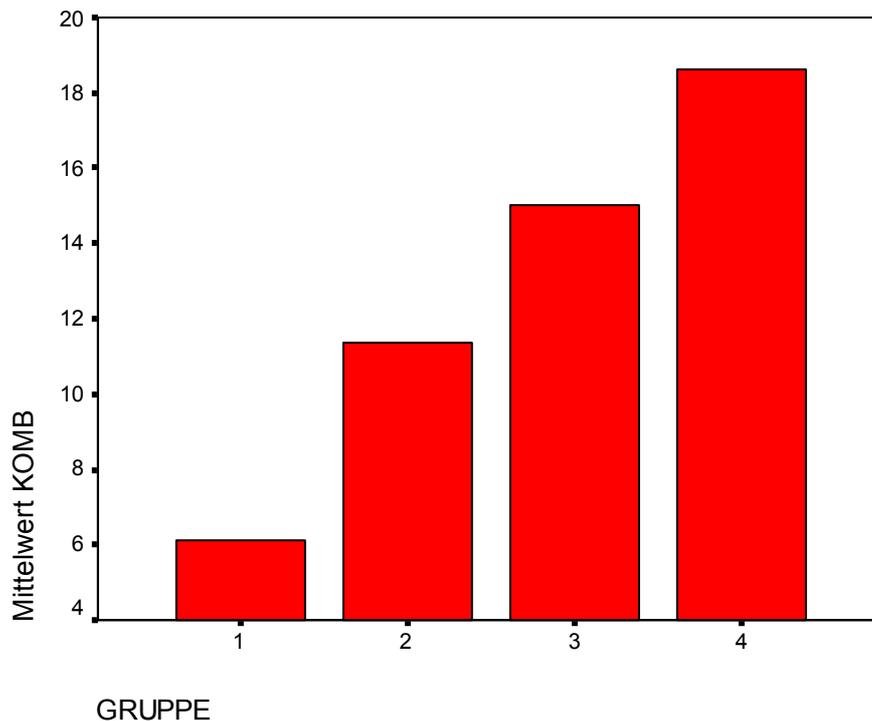
Für das Cyclin A hingegen fand sich eine klare Signifikanz für die Gruppe 1 (Durchschnittswert 1,54) gegen Gruppe 2 (Durchschnittswert 2,37), mit  $p=0,003$ , sowie für Gruppe 2 gegen Gruppe 3 (Durchschnittswert 3,08),  $p=0,005$ .

Jaw-1 war nur teilweise signifikant: Gruppe 1: 1,73, Gruppe 2: 2,13, Gruppe 3: 2,77.  $P=0,123$  bzw.  $0,011$ .

Bei keinem der verwendeten Marker mit Ausnahme von Jaw-1 ( $p=0,019$ ) konnte ein statistisch signifikanter Unterschied der Scorewert-Verteilung zwischen FL Grad 3b und DGBZL gezeigt werden: Weder bei HSP-90 noch Cyclin A noch bei Mib-1 ergab sich eine statistisch signifikante, ungleiche Verteilung in der Gruppe des FL Grad 3b gegenüber der zusammengefassten Gruppe der Diffusen Großzelligen B-Zell Lymphome (DGBZL) mit  $p=0,263$ ,  $p=0,576$  beziehungsweise

$p=0,126$ . Allein anhand der Expressionsstärke von HSP-90, Cyclin A und Mib-1 ist es also *nicht* möglich zwischen einem FL Grad 3b und einem DGBZL zu unterscheiden.

Diskriminierung der WHO-Grade unter Benutzung einer Kombination aus gewichteten Einzelscores.



*Abb.14 Mittelwerte des kombinierten Scores aus WHO-Grad, HSP-90 und Cyclin A für die Grade 1-3b des Follikulären Lymphoms nach WHO.*

Drei Parameter gehen in diesen Score mit folgender Gewichtung ein:

1. Grad 1-3b nach WHO ( Blastenzahl/ Fläche), (1-4 Punkte, Faktor 2)
2. HSP-90 Histo-Score (0-4 Punkte, Faktor 2)
3. Cyclin A Histo-Score (0-4 Punkte, Faktor 1)

Es ergibt sich somit ein möglicher Wertebereich von 2-20. Die Mittelwerte für die Grade 1-3b werden aus der Abb.14 ersichtlich. Die 4 Gruppen unterschieden sich dabei signifikant in der Zusammensetzung und Verteilung ihrer Punktwerte: Gruppe 1/2,  $p<0,001$ , Gruppe 2/3,  $p=0,001$ , Gruppe 3/4,  $p=0,001$  (s. Abb. 15).

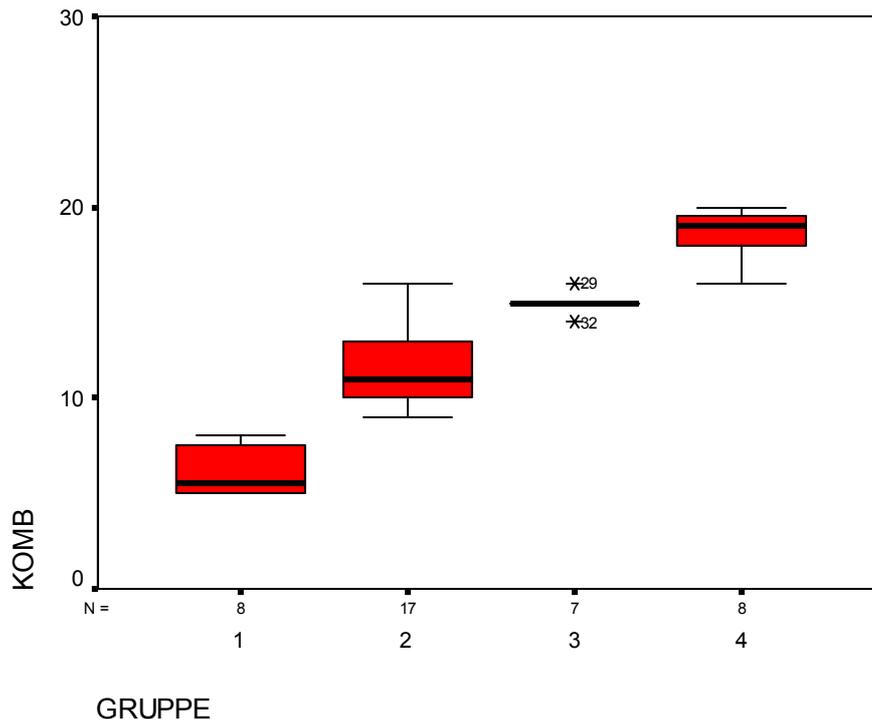


Abb.15 Boxplot-Diagramm zur Verteilung der Punktwerte des kombinierten Scores aus WHO-Grad, HSP-90-Histo-Score und Cyclin A-Histo-Score für das folliculäre Lymphom Grad 1-3b nach WHO (Gruppe 1-4 der x-Achse).

Für das Follikuläre Lymphom Grad 1 nach WHO ergibt sich in den untersuchten Fällen ein Punktebereich von 5-8, für das Grad 2 Lymphom ein Bereich von 9-13, Grad 3a 14-16, Grad 3b 17-20. Bei den untersuchten Fällen müsste, legt man diesen Kombinationsscore zugrunde, ein Fall auf-, ein anderer abgestuft werden: Ein nach WHO als Grad 2 eingestuftes FL (Nr.25 des Anhangs) entspricht nach diesem Kombinationsscore eher einem Grad 3a, da es über dem cut-off Wert von 13 Punkten für das FL Grad 2 liegt, ein Fall von Grad 3b Lymphom (Nr.41 des Appendix) würde durch den Score zu einem Grad 3a herabgestuft werden. Darüber hinaus gibt es aber keine Überschneidungen der Gruppen und somit eine scharfe Diskriminierung untereinander.

## 5. Diskussion

Die Einteilung des Follikulären Lymphoms wird anhand der Blastendichte innerhalb der neoplastischen Zellpopulation vorgenommen. Angelehnt an die Vorschläge von Mann und Berard {44} propagiert die WHO folgendes Vorgehen: Auszählen der Zentroblasten in 10 repräsentativen Ausschnitten ( $0,159\text{mm}^2$ ) der Gewebeprobe bei 40-facher Vergrößerung und Mittelung des Ergebnisses.

Wie in jedem Klassifikationssystem hat die vorgenommene diagnostische Einordnung große Bedeutung für Therapieentscheidung und Prognoseabschätzung. Die Klassifikation des Follikulären Lymphoms ist jedoch nur unsicher reproduzierbar {47, 75}. Dies liegt in der Schwierigkeit begründet, dass zwischen der Kategorie Zentroblast auf der einen und der Kategorie Zentrozyt auf der anderen Seite nur schwer ein klarer Trennstrich gezogen werden kann, da zwischen beiden ein kontinuierliches morphologisches Spektrum besteht, da sich die Zellen kontinuierlich von Zentroblasten zu Zentrozyten differenzieren. Für eine einzelne Zelle ist es somit manchmal kaum möglich, klar zwischen einem Zentroblasten und einem anaplastischen Zentrozyten zu unterscheiden oder sogar einem kleinen Blasten, wie sie manchmal bei der blastischen Variante des Mantelzell-Lymphoms gefunden werden. Es gibt keinen Konsens darüber, welche Zellen verbindlich als Blasten anzusprechen sind. Darüber hinaus ist es in der täglichen Praxis kaum möglich, die Blasten definitiv auszuzählen und das Ergebnis mit der Größe des Gesichtsfeldes zu korrelieren. Schließlich ergeben sich auch färbebedingte Auszählungsunterschiede zwischen HE- und Giemsa-gefärbten Schnitten. Kritische Variablen sind weiter die Qualität und die Dicke des Schnittes bzw. des Materials und die Anzahl der Gesichtsfelder bzw. die Tumorgröße. Darüber hinaus besteht eine unterschiedlich stark ausgeprägte Heterogenität des Tumors beim gleichen Patienten. Ein Klassifikationssystem mit einer Reproduzierbarkeit von 50% unter erfahrenen Hämatopathologen hat sicherlich nur einen begrenzten Nutzen und Wert.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein Stratifizierungssystem für das Follikuläre Lymphom zu finden, welches sich nicht allein auf die Zellmorphologie stützt, sondern biologische Marker heranzieht, von deren zunehmender Expression auf das Stadium des neoplastischen Prozesses geschlossen werden kann. Ziel ist es

also, Marker zu finden, welche mit der zu erwartenden Dynamik der Erkrankung, d.h. zusammen mit den (morphologischen) WHO Graden 1-3b, zunehmend stärker exprimiert werden.

Der Proliferationsindex allein, gemessen mit dem Marker Ki-67/Mib-1, scheint sich für die Graduierung des FL nicht zu eignen. Generell steigt zwar die Anzahl Ki-67/Mib-1 positiver Zellen mit steigendem WHO Grad an, jedoch trifft dies nicht für jeden einzelnen Fall zu. Für die einzelnen WHO Grade gibt es eine große Streuung der Werte {23, 45, 80}. Dies ist zum Teil darin begründet, dass bisweilen residuelle Keimzentren innerhalb der neoplastischen Zellpopulation existieren. Darüber hinaus zeigen Tumoren mit einer erhöhten Anzahl von anaplastischen Zentrozyten, welche nicht alle Charakteristika von Zentroblasten aufweisen und somit formal dem Grad 1 oder 2 zugeordnet werden müssen, z.T. extrem hohe Proliferationsindizes - bis zu 70% (-80%) - auf.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Zahlen stimmen mit diesen Befunden gut überein. Der Proliferationsindex innerhalb des Grad 1 reichte von 5%-40%, mit einem durchschnittlichen Wert von 21,1%. Im Grad 2 fand sich eine Spanne von 20%-70%, in einem Fall von Grad 2 fanden sich in einigen Abschnitten sogar bis 80% positiver Zellen. Der Mittelwert betrug 33,9%. Grad 3a reichte von 10%-50%, mit einem Mittel von 38,8%, Grad 3b 20%-80%, im Mittel 56,3%. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ergab sich aus dieser Verteilung jedoch nicht. Wegen der gefundenen großen Werteüberschneidungen kann also im Einzelfall nicht vom Proliferationswert auf den Grad des FL nach WHO geschlossen werden. Ein Grading des Follikulären Lymphoms anhand von Mib-1/Ki-67 kann also nicht vorgenommen werden.

Die Biologie und die klinische Relevanz der dargestellten Beobachtung sehr divergenter Proliferationsindizes innerhalb der einzelnen Grade des FL sind noch nicht verstanden und werden kontrovers diskutiert.

HSP-90 ist eine der funktionellen Hauptkomponenten in einem wichtigen zytoplasmatischen Chaperon-Komplex und ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Seine Überexpression ist in einer Vielzahl von Tumoren entdeckt worden {25, 54, 58}. Valbuena et al. untersuchten unter Verwendung immunhistochemischer

Methoden die HSP-90 Expression in einer Vielzahl von verschiedenen B- und T-Zell Lymphomen. Es zeigte sich, dass in jeder der untersuchten Lymphom-Entitäten eine Untergruppe von Tumoren HSP-90 exprimierte, im Falle des FL (alle Grade zusammengenommen) waren dies 17 von 28 Fällen, entsprechend 71%. Die Expressionsstärke von HSP-90 (Einteilung in negativ; schwache, mäßige und starke Expression) stieg tendenziell mit steigendem Grad nach WHO an, wobei die Ergebnisse dieser Arbeit eine statistisch signifikante Diskriminierung anhand der Expressionsstärke von HSP-90 nur zwischen den Graden 1 und 2, nicht jedoch zwischen den Graden 2 und 3 zuließen {78}. In der hier vorliegenden Arbeit konnte der Befund bestätigt werden, dass die Expression des HSP-90 mit ansteigendem Grad nach WHO zunimmt. Zwischen den Graden 1-3b des Follikulären Lymphoms zeigte sich im Unterschied zur Arbeit von Valbuena et al. {78} jedoch jeweils ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expressionsstärke. Die Korrelation mit der WHO-Stratifizierung illustrieren die Abb. 8 und 9 (S. 35).

Ergänzend sei hier noch bemerkt, dass auch in nicht neoplastischen, reaktiven Zuständen, wie z. B. dem Pseudolymphom und der follikulären Hyperplasie, sehr intensive Expressionsmuster gefunden werden, welche deutlich stärker sind als viele der hier untersuchten Follikulären Lymphome der Grade 1 und 2.

Bezüglich der Korrelation von HSP-90 mit Mib-1/Ki-67 zeigte sich kein strenger Zusammenhang zwischen beiden. Das HSP-90 ist also in seiner Expression als prinzipiell unabhängig von der Proliferationsaktivität - gemessen an Mib-1 - des Tumors anzusehen.

Der molekulare Mechanismus jedoch, welcher für die Überexpression von HSP-90 in Tumorzellen verantwortlich ist, ist nicht genau bekannt, könnte aber Tumorspezifisch sein. Die Expression der Heat-shock Proteine wird durch den HSF 1 reguliert, welcher als ein Sensor für fehlerhafte Proteinstrukturen fungiert und darauf mit der Bildung von Homo-Trimeren reagiert, welche eine Sequenz-spezifische DNS-Bindungsaffinität besitzen und die Transkription von Proteinen der Hitzeschock-Antwort, darunter das HSP-90, initiieren {51, 86, 89}. Die Überexpression des HSP-90 könnte somit, neben dem zellulären Stress, welcher durch das ungünstige Mikromilieu des Tumors (z.B. durch Ischämie) auslöst wird, auch durch die vermehrte Expression aberranter Onkoproteine oder deregulierter Transkriptionfaktoren bedingt sein. Diese onkogenen „Klienten“-Proteine, wie z.B.

das CDK4, CDK2, c-Raf-1, mutiertes p53 oder ErbB2, sind auf die Konformations-spezifische Stabilisierung durch das HSP-90 angewiesen, ohne die sie ihre zellulären Funktionen nicht mehr hinreichend ausführen könnten {82}. Das Follikuläre Lymphom weist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, neben der t(14;18) Translokation eine durchschnittliche Zahl von 6 weiteren chromosomalen Alterationen pro Karyotyp auf {31}. Der Bcl-2-Aktivierung durch die Translokation t(14;18), durch welche sich die Zelle dem Untergang durch den programmierten Zelltod entzieht, folgt eine charakteristische und zeitlich definierte, konsekutive Anhäufung von chromosomalen Imbalancen. Höglund et al. fanden dabei vier häufig beschrittene zytogenetische Pfade, welche schließlich in eine späte gemeinsame Endstrecke münden, einer Kaskade genomischer Deletionen und Imbalancen {31, 87}. Zusammen mit postulierten, zytogenetisch unsichtbaren Veränderungen wie Punktmutationen, kleinen Deletionen oder Duplikationen kommt es in der Folge zur gesteigerten und z.T. aberranten Expression vieler, mitunter onkogenetisch aktiver Proteine, welche einen vermehrten Bedarf und eine erhöhte Bereitstellung an HSP-90 auslösen. Das Modell der klonalen Evolution mit dem Erwerb zunehmender chromosomaler Imbalancen und Aberrationen, welche sich auf das Protein-Niveau niederschlägt, könnte also die in der Arbeit gefundene Zunahme der HSP-90 Expression mit ansteigendem Grad nach WHO miterklären. Der zelluläre Bestand an HSP-90, welcher immunhistochemisch sichtbar gemacht werden kann, könnte also als Marker für die zunehmende genetische Instabilität der Zellpopulation dienen.

HSP-90 stellt also einen Puffer gegen die negativen Effekte von Mutationen auf der Ebene des veränderten Proteins dar. Die Hauptwirkungen des HSP-90 wie konformationelle Stabilisierung, Ermöglichung der Liganden- oder Kofaktor-Bindung an seine Klienten-Proteine, wie auch deren Phosphorylierung/Dephosphorylierung und ihren Schutz vor Degradation im Proteasom, machen die Ausschaltung dieses Hitze-Schock Proteins zu einem interessanten Ziel pharmakologischer Tumorthherapie. Entsprechende Substanzen stehen bereits zur Verfügung und werden in klinischen Studien an verschiedenen Tumoren auf ihre Wirksamkeit hin überprüft {82}. Möglicherweise könnten die HSP-90-Inhibitoren auch mit therapeutischem Nutzen in der Behandlung von den Fällen von Follikulärem Lymphom oder anderer höhermaligner B-Zell Proliferationen eingesetzt werden, die eine hohe Expression und Aktivierung des HSP-90 zeigen.

Eine Deregulation des Zellzyklus mit der Folge einer erhöhten Proliferation ist einer der Hauptmechanismen der Tumorigenese und essentiell für das Verständnis der Tumorbiologie der NHL. Als funktionell wichtiger Vertreter der Gruppe der Cyclin/CDK-Zellzyklus-Regulatoren wurde für die vorliegende Arbeit das Cyclin A ausgewählt.

Eine erhöhte Expression von Cyclin A ist bereits in einer Vielzahl unterschiedlicher Tumoren gefunden und beschrieben worden. Die Mehrzahl dieser Untersuchungen nahm eine immunhistochemische Detektion des Cyclin A2 in neoplastischem Gewebe im Vergleich zum umgebenden, nicht entarteten Gewebe vor. In den meisten Fällen dieser Tumoren (zu Referenzangaben siehe {84}, S.1321) korreliert die erhöhte Expression von Cyclin A mit einem oder mehreren der folgenden Parameter: schlechtere Prognose für den Patienten, Tumor-Stadium, Proliferation und Aneuploidie {84}. Dies gilt, um nur einige Beispiele erneut zu nennen, für das hepatozelluläre- (HCC) {88}, das kolorektale- {57} und das Endometriumkarzinom {69}. Ebenso konnte dies bei Patienten mit Non-Hodgkin Lymphomen gezeigt werden {81}: Wolowiec et al. untersuchten anhand von 58 Fällen von B-NHL (darunter 15 Fälle von follikulären Lymphomen, es wurden die Klassifikationssysteme nach WF und REAL verwendet) sowie 12 Fällen von T-NHL die Expression verschiedener Cycline und CDK. Sie fanden, dass Cyclin A mit dem Anteil an Zellen in der S und S+G2/M-Phase korreliert und dass es signifikant unterschiedlich gemäß dem Grad an Malignität exprimiert wird. Die niedrigsten Level wurden in den low-grade-, die höchsten in den high-grade NHL (nach der WF-Klassifikation) gefunden. Cyclin A stellte sich signifikant als negativer Prädiktor sowohl für die Lebenszeit ohne Krankheit als auch das Gesamtüberleben („failure free survival“ und „overall survival“) dar.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Cyclin A-Expression mit steigendem Grad 1-3b für das FL nach WHO jeweils zunimmt. Allerdings sind die Werte statistisch nicht signifikant, so dass es als Marker für die Stratifizierung des FL für sich allein genommen nicht verwendet werden kann.

Neben dem wichtigen Befund, dass sich ein hoher Cyclin A- Bestand der Tumorzellpopulation ungünstig auf den klinischen Verlauf des Patienten auswirkt, bietet die vorhandene Literatur bei einigen Tumorarten {84} aber auch Hinweise auf eine Korrelation zwischen einer Überexpression von Cyclin A und dem

positiven Ansprechen auf verschiedene Chemotherapeutika. Kawashima et al. untersuchten das Ansprechen verschiedener Tumor-Zelllinien auf eine Exposition gegenüber 5-Fluorouracil (5-FU). 5-FU induzierte in den untersuchten Zelllinien eine Dosis-abhängige Zunahme Cyclin A-positiver Zellen. Die beobachteten zytotoxischen Effekte korrelierten mit einem gesteigerten Expressionsmuster für Cyclin A {38}.

Darüber hinaus ist für die akute myeloische Leukämie (AML) eine positive Korrelation zwischen mRNA-Spiegeln von Cyclin A2 (das gleiche gilt für Cyclin A1, welches in AML Zellen hoch exprimiert vorkommt) und einer erhöhten Überlebensrate beschrieben.

Jaw-1 lokalisiert sich in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Seine Expression ist beschränkt auf lymphatische Zellen und kann hier sowohl in der B-Zell-Population als auch in der T-Zell-Linie nachgewiesen werden. Über die Funktion des Jaw-1-Gens/Proteins ist bislang nur wenig bekannt. Möglicherweise kommt ihm eine Rolle in der Kontrolle von Wachstum und Differenzierung dieser Zellen zu, möglicherweise ist es auch an der Bereitstellung und Präsentation der Antigen-Rezeptoren beider Zell-Linien beteiligt {4, 68}.

Die Überexpression von Jaw-1 in neoplastischem Gewebe ist in der Literatur bisher nur für den Fall von testikulären Keimzell-Tumoren beschrieben {52}.

Anhand der Expressionsstärke des Jaw-1 ließen sich die einzelnen Grade 1-3b des Follikulären Lymphoms nur teilweise statistisch signifikant unterscheiden; insofern eignet sich auch Jaw-1 nur bedingt für die Stratifizierung des FL. Beim MCL fand sich für Jaw-1 ein durchschnittlicher Wert von nur 0,7, womit das MCL deutlich unter den Werten für das FL liegt. Das DGBZL färbt sich für Jaw-1 hingegen sehr stark an mit einem durchschnittlichen Score von 2,34.

In einem zweiten Schritt wurde ein geeigneter Gesamt-Score mit möglichst großer Trennschärfe für das Grading des FL entwickelt, welcher die (gewichtete) Kombination der folgenden drei Parameter heranzieht: immunhistochemische Expression von HSP-90 (Faktor 2), Expression von Cyclin A (Faktor 1) und (konventionelles) morphologisches Grading nach WHO (Faktor 2) (s. Abb. 14 und 15, S. 40 und 41). Dabei floss der WHO Grad in den Gesamtscore mit ein, da trotz aller diskutierten Problematik in näherer Zukunft wohl zunächst weiter auf das

Kriterium der Blastendichte als Bestandteil des Gradings des FL zurückgegriffen werden wird. Hierbei zeigte sich eine sehr deutliche Auftrennung aller Gruppen mit hohem Signifikanzgrad. Der histomorphologische Grad wird so durch zwei immunhistochemische Marker moduliert, welche die zunehmende Entartung und Deregulierung der Tumorzelle widerspiegeln und wahrscheinlich mit den genetischen Veränderungen und der zunehmend ungünstigeren Prognose der Grade 1-3b korrelieren und somit auch eine Aussage über die Tumorbiologie erlauben. So ist in einem Fall von WHO Grad 2 bei hoher Expression der beiden immunhistochemischen Marker davon auszugehen, dass er biologisch eher dem Grad 3a zuzurechnen und als solcher einzustufen ist. Umgekehrt könnte man Fälle, die nach rein morphologischen Gesichtspunkten als Grad 3a oder 3b einzuordnen wären, möglicherweise „downgraden“, wenn der Score entsprechend niedriger liegt, in der Annahme, dass dies dem malignen Verhalten eher entspricht.

Denkbar ist, dass sich dieser Score um weitere Marker erweitern lässt. Diesbezüglich verweise ich auf die am Institut für Pathologie der Universität Lübeck mit ähnlicher Zielsetzung erarbeiteten Dissertationen.

Eine der wichtigsten Aufgaben, die sich aus den Daten der Arbeit ergibt, ist eine zukünftige Untersuchung auf Korrelation der Expressionsstärke der genannten Marker mit klinischen Daten (Patientendaten, Ansprechen auf Therapie und Überleben).

Ott et al. 2002 untersuchten das biologische Spektrum des Follikulären Lymphoms {59} und fanden deutliche Hinweise, welche sich z.B. aus der Verteilung primärer und sekundärer chromosomaler Aberrationen ergaben, dass der Grad 3b eher eine follikuläre oder partiell-follikuläre Variante des Diffusen Großzelligen B-Zell Lymphoms ( DGBZL) darstellt, als dass er dem FL im engeren Sinne zuzurechnen ist. Die Negativität für die Translokation t(14;18) in den meisten Fällen des Grad 3b spricht gegen die Überlegung, dass diese Tumoren transformierte Stadien eines Follikel-Zentrum Lymphoms darstellen. Unter den drei untersuchten Markern war es allein anhand der Jaw-1 Expression möglich, (schwächer) signifikant zwischen dem Grad 3b FL und dem DGBZL zu unterscheiden ( $p=0,019$ ). Weder bei HSP-90 noch Cyclin A noch bei Mib-1/Ki-67 ergab sich demhingegen eine statistisch signifikante, ungleiche Verteilung in der Gruppe des FL Grad 3b

gegenüber der zusammengefassten Gruppe des DGBZL. Die Daten dieser Arbeit könnten die von Ott et al. {59} aufgestellte Hypothese einer biologischen Zugehörigkeit des Grad 3b zum DGBZL somit stützen.

Ein weiteres Problem des Gratings auf zytomorphologischer Basis ist, dass es keine gesicherte prognostische Relevanz besitzt. Einige Untersucher fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen histologischem Grad und Patientenüberleben sowie Rückfall-freier Zeit {45}, in anderen Arbeiten ließ sich ein solcher nicht entdecken {11, 26, 48, 74}, siehe hierzu Kapitel 2.5 Prognostische Relevanz. Die hauptsächlichen unabhängigen Risikofaktoren sind Alter und Serum LDH-Spiegel. Das Wachstumsmuster hat erst bei einem diffusen Wachstum > 50% einen nachteiligen Einfluss auf die Prognose {26}. Der Einfluss einer Sklerosierung wird widersprüchlich beurteilt. CD10 und Bcl-6 scheinen prognostisch bedeutsam zu sein {6}, ebenso Cyclin B1 {7}. Die Anzahl bzw. das Vorhandensein bestimmter chromosomaler Aberrationen scheint ebenfalls einen Einfluss auf den klinischen Verlauf der Erkrankung zu haben {40, 59, 76, 87}. Die Anwendbarkeit des International Prognostic Index (IPI) für die Abschätzung der Prognose ist in mehreren Studien untersucht worden, von denen jedoch nur einige eine schwache Signifikanz zeigten. Viele dieser Studien waren retrospektiv angelegt, untersuchten Patienten in verschiedenen klinischen Stadien, welche mit verschiedenen Therapiemodalitäten behandelt wurden. Definitive Schlüsse können auf dieser Basis nicht gezogen werden. Aviles et al. untersuchten Patienten in den Krankheitsstadien III und IV und hoher Tumor-Last, die mit uniformen Therapieregimen behandelt wurden und einen langen follow-up Zeitraum aufwiesen {3}. In der durchgeführten multivariaten Analyse blieben lediglich Alter (> 60 Jahre), Vorliegen von B-Symptomen sowie >2 extranodale Manifestationen als valide Prädiktoren eines ungünstigen klinischen Verlaufes übrig.

Die Klinik des FL zeigt, obwohl eine komplette Remission mit den verschiedensten Therapiemodalitäten prinzipiell erreicht werden kann, sehr unterschiedliche Verläufe bzgl. progression-free survival (PFS) und overall-survival (OS). Die Identifizierung und Zuordnung zu diesen unterschiedlichen prognostischen Gruppen muss ein Ziel klinischer Forschung sein, um den beschriebenen Mangel an prognostischen Faktoren für das FL aufzuheben. In jüngerer Vergangenheit

wurden zwei Arbeiten veröffentlicht, welche durch die Erstellung von Gen-Expressionsprofilen (sowohl der Tumorzellen selbst {24}, als auch der umgebenden, nicht-malignen Immunzellen {17}) versuchen, neben den derzeit verwendeten morphologischen und klinischen Stratifikationskriterien eine objektivere Basis für die Beurteilung der klinischen Aggressivität des FL zu erstellen {24}.

Dieser Zielrichtung folgend wäre es wünschenswert, der hier vorliegenden Arbeit, welche unter einer Vielzahl von untersuchten Markern eine Auslese bezüglich Verwendbarkeit für die Stratifizierung des FL vorgenommen hat, eine Untersuchung folgen zu lassen, welche den Grad der Expression mit Patientendaten in Beziehung setzt. Eine mit gleicher Intention durchgeführte Arbeit von Bilalovic et al. setzte die Expression der Marker bcl-6 und CD10 in Beziehung zum klinischen Verlauf und fand eine positive Korrelation zur Überlebensspanne {6}, Björck et al. fanden eine bessere klinische Prognose für Patienten mit hoher Cyclin B1-Expression der FL-Zellen {7}.

Gelingt es mit dem in dieser Arbeit untersuchten Kombinationsscore bzw. einzelnen Markern, insbesondere HSP-90, Patientengruppen mit guter und solche mit schlechter Prognose zu definieren, hätte man im ersteren Fall die Möglichkeit, Patienten zu identifizieren, die mit konventionellen Therapieschemata geführt werden können, für Patienten mit ungünstigerer Prognose bliebe die Möglichkeit innovativer, aggressiverer Behandlungsmodalitäten {1} als first-line Therapie. Für HSP-90 bestünde in der Zukunft außerdem die Option, in Fälle von Follikulärem Lymphom mit hoher HSP-90 Expression, zusätzlich zu anderen Therapieansätzen, mit den bereits erwähnten HSP-Inhibitoren zu behandeln. Diese zeigen den Vorteil einer hohen Tumor-Selektivität und befinden sich z.T. bereits in frühen Phasen klinischer Erprobung {37, 60, 82}. Bisherige, erste experimentelle Ansätze zum Einsatz eines Cyclin A-Inhibitors konnten ebenfalls einen vielversprechenden Tumor-suppressiven Effekt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachweisen {12}.

## 6. Zusammenfassung

Die vorliegende, experimentelle Arbeit befasst sich mit dem Problem des Gradings des Follikulären Lymphoms.

Das Follikuläre Lymphom stellt die zweithäufigste Lymphomentität innerhalb der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) dar. Epidemiologische Daten zeigen eine dramatische Zunahme der Inzidenzraten seit den 1950er Jahren, in einem Maße, wie es bei kaum einer anderen malignen Erkrankung beobachtet werden kann. Die Gründe hierfür sind noch weitgehend unverstanden {13, 16, 46}.

Nicht zuletzt vor dem Hintergrund dieser zunehmenden epidemiologischen Bedeutung des Follikulären Lymphoms ist es von besonderer Wichtigkeit, ein valides und reproduzierbares Klassifikationssystem zu verwenden, welches den klinisch tätigen Arzt in die Lage versetzt, eine Prognoseabschätzung vorzunehmen und therapeutische Konsequenzen abzuleiten.

Das von der WHO vorgeschlagene Klassifikationssystem, welches seit 1999 verwendet wird und allgemein anerkannt ist, stützt sich zur Festlegung der Grade 1-3b des Follikulären Lymphoms allein auf das Kriterium der Zentroblastendichte {27, 72, 75, 77}. Verschiedene Untersuchungen zeigten die ungenügende Reproduzierbarkeit dieses Stratifizierungssystems {47, 75}. Auch in der Frage einer prognostischen Relevanz des auf diese Weise vorgenommenen Gradings besteht weitgehend Unklarheit {11, 26, 28, 45, 48, 74}.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Marker zu finden, welche für eine verbesserte Klassifizierung des FL genutzt werden können.

Untersucht wurden 43 Fälle von Follikulärem Lymphom. Die Marker HSP-90, Cyclin A und Jaw-1 wurden immunhistochemisch dargestellt und die Intensität der Anfärbung beurteilt. Daneben wurden die Fälle auch auf die Expression des bekanntesten Proliferationsmarkers Mib-1/Ki-67 hin untersucht.

Anhand der HSP-90 Expression ist es möglich, signifikant jeweils zwischen den Graden 1-3b des FL zu unterscheiden. Dies gelingt mit dem Proliferationsmarker Mib-1 nicht, ein Befund, der mehrfach in der Literatur beschrieben ist. So korreliert auch die Mib-1 Expression nicht signifikant mit der HSP-90 Expression.

Cyclin A hingegen, als wichtiger Zell-Zyklus-Regulator, korreliert in seiner Expression gut mit Mib-1 und erlaubt eine nur teilweise signifikante Differenzierung der Grade 1-3b.

Ebenso scheint auch das Jaw-1 nur eingeschränkt zwischen den Graden unterscheiden zu können.

Für alle drei untersuchten Marker gilt jedoch, dass eine Untersuchung hinsichtlich der Korrelation ihrer Expression mit Patientendaten und -prognose folgen muss, um ihre Brauchbarkeit für die Stratifizierung des FL abschließend bewerten zu können. Erweist sich dabei, dass ihre Expression tatsächlich einen prognostisch prädiktiven Wert besitzt, könnten sie zur Indikationsstellung der vielfältigen existierenden Therapiemodalitäten {1, 30, 41} beitragen. Wenn, wie es z.B. im Falle des HSP-90 plausibel erscheint, ihnen darüber hinaus eine pathogenetische Bedeutung beim Tumorprogress zukommt, wird zukünftig vielleicht die Möglichkeit bestehen, ihre Aktivität zu blockieren und so die Therapie und Prognose des Patienten zu verbessern.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1) Archuleta TD, Armitage JO: Advances in Follicular Lymphoma. *Semin Oncol* 31, 66-71 (2004)
- 2) Armitage JO, Weisenburger DD (for the Non-Hodgkin`s Lymphoma Classification Project): New Approach to Classifying Non-Hodgkin`s Lymphomas: Clinical Features of the Major Histologic Subtypes. *J Clin Oncol* 16, 2780-2795 (1998)
- 3) Aviles A, Neri N, Cuadra I, Alvarado I, Fernandez R, Calva A, Huerta-Guzman J: Lack of Prognostic Factors in Follicular Lymphoma. *Leuk Lymphoma* 44, 143-147 (2003)
- 4) Behrens TW, Kearns GM, Rivard JJ, Bernstein HD, Yewdell JW, Staudt LM: Carboxyl-terminal Targeting and Novel Post-translational Processing of JAW1, a Lymphoid Protein of the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* 271, 23528-23534 (1996)
- 5) Biagi JJ, Seymour JF: Insights into the molecular pathogenesis of follicular lymphoma arising from analysis of geographic variation. *Blood* 99, 4265-4275 (2002)
- 6) Bilalovic N, Blystad AK, Goulouh R, Nesland JM, Selak I, Trinh D, Torlakovic E: Expression of bcl-6 and CD10 Protein is Associated With Longer Overall Survival and Time to Treatment Failure in Follicular Lymphoma. *Am J Clin Pathol* 121, 34-42 (2004)
- 7) Björk E, Ek S, Landgren O, Jerkeman M, Ehinger M, Björkholm M, Borrebaeck CAK, Porwit-MacDonald A, Nordenskjöld M: High expression of cyclin B1 predicts a favorable outcome in patients with follicular lymphoma. *Blood* 105, 2908-15 (2005)
- 8) Bordeleau L, Berinstein NL: Molecular Diagnostics in Follicular Lymphoma: A Review. *Semin Oncol* 27, 42-52 (2000)
- 9) Brechot C: Oncogenic activation of cyclin A. *Curr Opin Genet Dev* 3, 11-18 (1993)
- 10) Chang KC, Huang X, Medeiros LJ, Jones D: Germinal centre-like versus undifferentiated stromal immunophenotypes in follicular lymphomas. *J Pathol* 201, 404-412 (2003)

- 11) Chau I, Jones R, Cunningham D, Wotherspoon A, Maisey N, Norman AR, Jain P, Bishop L, Horwich A, Catovsky T: Outcome of follicular lymphoma grade 3: is anthracycline necessary as front-line therapy? *Br J Cancer* 89, 36-42 (2003)
- 12) Chen W, Lee J, Cho SY, Fine HA: Proteasome-Mediated Destruction of the Cyclin A/Cyclin-Dependent Kinase 2 Complex Suppresses Tumor Cell Growth *in Vitro* and *in Vivo*. *Cancer Res* 64, 3949-3957 (2004)
- 13) Chiu BC, Weisenburger DD: An Update of the Epidemiology of Non-Hodgkin`s Lymphoma. *Clin Lymphoma* 4, 161-168 (2003)
- 14) Coupland SE, Dallenbach FE, Stein H: Kleinzellige B-Zell-Lymphome: Differentialdiagnostische Leitlinien. *Pathologe* 21,147-161 (2000)
- 15) Coupland SE, Hummel M, Stein H: Lymphatisches System und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten. *Pathologe* 21,106-112 (2000)
- 16) Clarke CA, Glaser SL: Changing incidence of Non-Hodgkin lymphomas in the United States. *Cancer* 94, 2015-2023 (2002)
- 17) Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, Fisher RI, Braziel RM, Rimsza LM, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Greiner TC, Weisenburger DD, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Connors JM, Landsdorp PM, Ouyang Q, Lister TA, Davies AJ, Norton AJ, Muller-Hermelink HK, Ott G, Campo E, Montserrat E, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Yang L, Powell J, Zhao H, Goldschmidt N, Chiorazzi M, Staudt LM: Prediction of survival in follicular lymphomas based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 351, 2159-69 (2004)
- 18) Djaborkhel R, Tvrdik D, Eckschlager T, Raska I, Müller J: Cyclin A Down-Regulation in TGF $\beta$ 1-Arrested Follicular Lymphoma Cells. *Exp Cell Res* 261, 250-259 (2000)
- 19) Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, Zehetmeier C, Lain B, Torella C, Henning SW, Beste G, Scroggins BT, Neckers L, Ilag LL, Jay DG: Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer invasiveness. *Nat Cell Biol* 6, 507-514 (2004)
- 20) Feller AC: Lymphknoten und extranodales lymphatisches System. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU: *Pathologie*. 3.Aufl., 542-565, Elsevier, Urban&Fischer Verlag, München, 2004

- 21) Feller AC, Diebold J: History of Lymphoma Classification. Current Status of Lymphoma Classification. Epidemiology. Follicular Lymphoma. In: Histopathology of nodal and extra-nodal non-Hodgkin's lymphomas. 3. Auflage, 1-18, 53-66, Springer Verlag, Berlin, 2004
- 22) Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31, 13-20 (1983)
- 23) Gerdes J, Dallenbach F, Lennert K, Lemke H, Stein H: Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal Ki-67. *Hematol Oncol* 2, 365-371 (1984)
- 24) Glas AM, Kersten MJ, Delahaye LJM, Witteveen AT, Kibbelaar RE, Velds A, Wessels LFA, Joosten P, Kerkhoven RM, Bernards R, van Krieken JHJM, Kluin PM, van't Veer LJ, de Jong D: Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. *Blood* 105, 301-7 (2005)
- 25) Gress TM, Müller-Pillasch F, Weber C, Lerch MM, Friess H, Büchler M, Beger HG, Adler G: Differential Expression of Heat Shock Proteins in Pancreatic Carcinoma. *Cancer Res* 54, 547-551 (1994)
- 26) Hans CP, Weisenburger DD, Vose JM, Hock LM, Lynch JC, Aoun P, Greiner TC, Chan WC, Bociek RG, Bierman PJ, Armitage JO: A significant diffuse component predicts for inferior survival in grade 3 follicular lymphoma, but cytologic subtypes do not predict survival. *Blood* 101, 2363-2367 (2003)
- 27) Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Issacson PG, Knowles KM, Mason DY, Müller-Hermelink HK, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiaer E, Warnke RA: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84, 1361-1392 (1994)
- 28) Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Müller-Hermelink KM, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD: World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 17, 3835-3849 (1999)

- 29) Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L: Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif* 33, 341-365 (2000)
- 30) Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, Schmitz N, Lengfelder E, Schmits R, Reiser M, Metzner B, Harder H, Hegewisch-Becker S, Fischer T, Kropff M, Reis HE, Freund M, Wormann B, Fuchs R, Planker M, Schimke J, Eimermacher H, Trumper L, Aldaoud A, Parwaresch R, Unterhalt M: Front-line therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome of patients with advanced stage follicular lymphomas as compared to CHOP alone – results of a prospective randomized study of the German low grade lymphoma group (GLSG). *Blood* 106, 3725-32 (2005)
- 31) Höglund M, Sehn L, Connors JM, Gascoyne RD, Siebert R, Sall T, Mitelman F, Horsman DE: Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways of clonal evolution in follicular lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 39, 195-204 (2004)
- 32) Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques; a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29, 577-580 (1981)
- 33) Husson H, Carideo EG, Neuberg D, Schultze J, Munoz O, Marks PW, Donovan JW, Chillemi AC, O'Connell P, Freedman AS: Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays. *Blood* 99, 282-289 (2002)
- 34) Iqbal S, Jenner MJR, Summers KE, Davies AJ, Matthews J, Norton AJ, Calaminici M, Rohatiner AZ, Fitzgibbon J, Lister TA, Goff LK: Reliable detection of clonal IgH/Bcl-2 MBR rearrangement in follicular lymphoma: methodology and clinical significance. *Br J Haematol* 124, 325-328 (2003)
- 35) Ito T, Kawabe R, Kurasono Y, Hara M, Kitamura H, Fujita K, Kanisawa M: Expression of heat shock proteins in squamous cell carcinoma of the tongue: an immunohistochemical staining. *J Oral Pathol Med* 27, 18-22 (1998)
- 36) Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW: World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon, 2001

- 37) Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ: A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumor selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 425, 407-410 (2003)
- 38) Kawashima R, Haisa M, Kimura M, Takaoka M, Shirakawa Y, Takeda H, Uetsuka H, Gunduz M, Nagai N, Tanaka N, Naomoto Y: Cyclin A correlates with the sensitivity of human cancer cells to cytotoxic effects of 5-FU. *Int J Oncol* 24, 272-278 (2004)
- 39) Lennert K, Feller AC: *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*. 2<sup>nd</sup> edn., Springer Verlag, New York, 1992
- 40) Lestou VS, Gascoyne RD, Sehn L, Ludkovski O, Chhanabhai M, Klasa RJ, Husson H, Freedman AS, Connors JM, Horsman DE: Multicolour fluorescence *in situ* hybridization analysis of t(14;18)-positive follicular lymphoma and correlation with gene expression data and clinical outcome. *Br J Haematol* 122, 745-759 (2003)
- 41) Lenz G, Dreyling M, Schiegnitz E, et al. Myeloablative radiochemotherapie followed by autologous stem cell transplantation in first remission prolongs progression-free survival in follicular lymphoma – results of a prospective randomized trial of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 104, 2667-74 (2004)
- 42) Liao C, Wang XY, Wei HQ, Li SQ, Merghoub T, Pandolfi PP, Wolgemuth DJ: Altered myelopoiesis and the development of acute myeloid leukemia in transgenic mice overexpressing cyclin A1. *PNAS* 98, 6853-6858 (2001)
- 43) Maartense E, Le Cessie S, Kluin-Nelemans HC, Kluin PM, Snijder S, Wijermans PW, Noordijk EM. Age-related differences among patients with follicular lymphoma and the importance of prognostic scoring systems analysis from a population-based non-Hodgkin's lymphoma registry. *Ann Oncol* 13, 1275-1284 (2002)
- 44) Mann RB, Berard CW: Criteria for the cytologic subclassification of follicular lymphoma: a proposed alternative method. *Hematol Oncol*. 1, 187-192 (1983)
- 45) Martin AR, Weisenburger DD, Chan WC, Ruby EI, Anderson JR, Vose JM, Bierman PJ, Bast MA, Daley DT, Armitage JO: Prognostic Value of Cellular Proliferation and Histologic Grade in Follicular Lymphoma. *Blood* 85, 3671-3678 (1995)

- 46) Mester B, Nieters A, Deeg E, Elsner G, Becker N, Seidler A: Occupation and malignant lymphoma: a population based case control study in Germany. *Occup Environ Med* 63, 17-26 (2006)
- 47) Metter GE, Nathwani BN, Burke JS, Winberg CD, Mann RB, Barcos M, Kjeldsberg CR, Whitcomb CC, Dixon DO, Miller TP, Jones SE: Morphological subclassification of follicular lymphoma: variability of diagnoses among hematopathologists, a collaborative study between the Repository Center and Pathology Panel for Lymphoma Clinical Studies. *J Clin Oncol* 3, 25-38 (1985)
- 48) Miller TP, LeBlanc M, Grogan TM, Fisher RI: Follicular lymphomas: do histologic subtypes predict clinical outcome? *Hematol Oncol Clin N Am* 11, 893-900 (1997)
- 49) Mitra J, Enders GH: Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells. *Oncogene* 23, 3361-3367 (2004)
- 50) Morton LM, Holford TR, Leaderer B, Boyle P, Zahm SH, Zhang Y, Flynn S, Tallini G, Zhang B, Owens PH, Zheng T: Cigarette smoking and risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes among women. *B J Cancer* 89, 2087-2092 (2003)
- 51) Mosser DD, Morimoto RI: Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 23, 2907-2918 (2004)
- 52) Mostert MC, Verkerk AJ, van de Pol M, Heighway J, Marynen P, Rosenberg C, van Kessel AG, van Echten J, de Jong B, Oosterhuis JW, Looijenga LH: Identification of the critical region of 12p over-representation in testicular germ cell tumors of adolescents and adults. *Oncogene* 16, 2617-2627 (1998)
- 53) Nakamaki T, Hamano Y, Hisatake JI, Yokoyama A, Kawakami KI, Tomoyasu S, Honma Y, Koeffler P: Elevated levels of cyclin A1 and A (A2) mRNA in acute myeloid leukaemia are associated with increased survival. *Br J Haematol* 123, 72-80 (2003)
- 54) Nanbu K, Konishi I, Mandai M, Kuroda H, Hamid AA, Komatsu T, Mori T: Prognostic Significance of Heat Shock Proteins HSP70 and HSP90 in Endometrial Carcinomas. *Cancer Detect Prev* 22, 549-555 (1998)
- 55) Nathwani BN, Metter GE, Miller TP, Burke JS, Mann RB, Barcos M, Kjeldsberg CR, Dixon DO, Winberg CD, Whitcomb CC, Jones SE: What Should be the Morphologic Criteria for the Subdivision of Follicular Lymphomas? *Blood* 68, 837-845 (1986)

- 56) Nathwani BN, Anderson JR, Armitage JO, Cavalli F, Diebold J, Drachenberger MR, Harris NL, MacLennan KA, Müller-Hermelink HK, Ullrich FA, Weisenburger DD: Clinical significance of follicular lymphoma with with monocytoid B cells. Non-Hodgkin`s Lymphoma Classification Project. Hum Pathol 30, 263-268 (1999)
- 57) Nozoe T, Inutsuka S, Honda M, Ezaki T, Korenaga D: Clinicopathologic significance of cyclin A expression in colorectal carcinoma. J Exp Clin Cancer Res 23, 127-133 (2004)
- 58) Ochel HJ, Gademann G: Heat-Shock Protein 90: Potential Involvement in the Pathogenesis of Malignancy and Pharmacological Intervention. Onkologie 25, 466-473 (2002)
- 59) Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rüdiger T, Wilhelm M, Kalla J, Rosenwald A, Müller JG, Ott MM, Müller-Hermelink HK: Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. Blood 99, 3806-3812 (2002)
- 60) Pacey S, Banerji U, Judson I, Workman P: Hsp90 inhibitors in the clinic. Handb Exp Pharmacol 172, 331-358 (2006)
- 61) Paterlini P, Suberville AM, Zindy F, Melle J, Sonnier M, Marie JP, Dreyfus F, Brechet C: Cyclin A Expression in Human Hematological Malignancies: A New Marker of Cell Proliferation. Cancer Res 53, 235-238 (1993)
- 62) Perea G, Altes A, Montoto S, Lopez-Guillermo A, Bosch F, Jimenez M, Esteve J, Domingo E, Ribera JM, Pedro C, Martino R, Briones J, Sureda A, Brunet S, Sierra J, Montserrat E: International and Italian prognostic indices in follicular lymphoma. Haematologica 88, 700-704 (2003)
- 63) Pott C, Bolz I, Bonnekesen K, Linke B, Tieman M, Kneba M: Molekulargenetische Befunde bei malignen Lymphomen-Nachweis und klinische Bedeutung. In: Höffkes HG, Uppenkamp M: Maligne Lymphome. 1. Aufl., 51-64, Springer Verlag, Berlin, 1997
- 64) Prodromou C, Pearl LH: Structure and Functional Relationships of Hsp90. Curr Cancer Drug Targets 3, 301-323 (2003)
- 65) Project TIN-HsLPP: A predictive model for aggressive non-Hodgkin`s lymphoma. N Engl J Med 329, 987-994 (1993)
- 66) Ritossa F: A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. Experientia 18, 571-573 (1962)

- 67) Rutherford SL, Lindquist S: Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396, 336-342 (1998)
- 68) Shaughnessy JD, Largaespada DA, Tian E, Fletcher CF, Cho BC, Vyas P, Jenkins NA, Copeland NG: Mrvi1, a common MRV integration site in BXH2 myeloid leukemias, encodes a protein with homology to a lymphoid-restricted membrane protein Jaw1. *Oncogene* 18, 2069-2084 (1999)
- 69) Shih HC, Shiozawa T, Kato K, Imai T, Miyamoto T, Uchikawa J, Nikaido T, Konishi I: Immunohistochemical expression of cyclins, cyclin-dependent kinases, tumor-suppressor gene products, Ki-67, and sex-steroid receptors in endometrial carcinoma: positive staining for cyclin A as a poor prognostic indicator. *Hum Pathol* 34, 471-478 (2003)
- 70) Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, Au WY, Bellei M, Brice P, Caballero D, Coiffier B, Conde-Garcia E, Doyen C, Federico M, Fisher RI, Garcia-Conde JF, Guglielmi C, Hagenbeek A, Haioun C, Le Blanc M, Lister AT, Lopez-Guillermo A, McLaughlin P, Milpied N, Morel P, Mounier N, Proctor SJ, Rohatiner A, Smith P, Soubeyran P, Tilly H, Vitolo U, Zinzani PL, Zucca E, Montserrat E: Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 104, 1258-65 (2004)
- 71) Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, Shen YF: Hsp90 isoforms: function, expression and clinical importance. *FEBS Letters* 562, 11-15 (2004)
- 72) Stein H: Die neue WHO Klassifikation der malignen Lymphome. *Pathologe* 21,101-105 (2000)
- 73) Summers KE, Goff LK, Wilson AG, Gupta RK, Lister TA, Fitzgibbon J: Frequency of the Bcl-2/IgH Rearrangement in Normal Individuals: Implications for the Monitoring of Disease in Patients with Follicular Lymphoma. *J Clin Oncol* 19, 420-424 (2001)
- 74) Tezcan H, Vose JM, Bast M, Bierman PJ, Kessinger A, Armitage JO: Limited Stage I and II Follicular Non-Hodgkin's Lymphoma: The Nebraska Lymphoma Study Group Experience. *Leuk Lymphoma* 34, 273-285 (1999)
- 75) The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project: A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 89, 3909-3918 (1997)

- 76) Tilly H, Rossi A, Stamatoullas A, Lenormand B, Bigorgne C, Kunlin A, Monconduit M, Bastard C. Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma. *Blood* 84, 1043-1049 (1994)
- 77) Uppenkamp M, Feller AC: Classification of Malignant Lymphoma. *Onkologie* 25, 563-570 (2002)
- 78) Valbuena JR, Rassidakis GZ, Lin P, Atwell C, Georgakis GV, Younes A, Jones D, Medeiros LJ: Expression of heat-shock protein-90 in non Hodgkin`s-lymphomas. *Mod Pathol* 18, 1343-9 (2005)
- 79) Weinberg DS: The role of cell cycle activity in the generation of morphologic heterogeneity in non-Hodgkin`s lymphoma: *Am J Pathol* 135, 759-770 (1989)
- 80) Weiss LM, Strickler JG, Medeiros LJ, Gerdes J, Stein H, Warnke RA: Proliferative Rates in Non-Hodgkin`s Lymphomas as Assessed by Ki-67 Antibody. *Hum Pathol* 18, 1155-1159 (1987)
- 81) Wolowiec D, Berger F, Ffrench P, Bryon PA, Ffrench M: CDK1 and Cyclin A Expression is Linked to Cell Proliferation and Associated with Prognosis in Non-Hodgkin Lymphomas. *Leuk Lymphoma* 35, 147-157 (1999)
- 82) Workman P: Overview: Translating Hsp90 Biology into Hsp90 Drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 3, 297-300 (2003)
- 83) Wu Y, Kita K, Suzuki N: Involvement of Human Heat Shock Protein 90 $\alpha$  in Nicotine-Induced Apoptosis. *Int J Cancer* 100, 37-42 (2002)
- 84) Yam CH, Fung TK, Poon RYC: Cyclin A in cell cycle control and cancer. Review. *Cell Mol Life Sci* 59, 1317-1326 (2002)
- 85) Yang R, Nakamaki T, Lübbert M, Said J, Sakashita A, Freyaldenhoven BS, Spira S, Huynh V, Müller C, Koeffler HP: Cyclin A1 Expression in Leukemia and Normal Hematopoietic Cells. *Blood* 93, 2067-2074 (1999)
- 86) Young JC, Moarefi I, Hartl FU: Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol* 154, 267-273 (2001)
- 87) Yunis JJ, Frizzera G, Oken MM, McKenna J, Theologides A, Arnesen M: Multiple Recurrent Genomic defects in Follicular Lymphoma. *N Engl J Med* 316, 79-84 (1987)
- 88) Zhou Q, He Q, Liang LJ: Expression of p27, cyclin E and cyclin A in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 9, 2450-2454 (2003)

89) Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R: Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 94, 471-480 (1998)

## 8. Abbildungsverzeichnis des Photo-Anhangs

- Abb.1 Mib-1/ Ki-67, Tonsille, Vergrößerung 40-fach. Starke Anfärbung der proliferierenden Zellen durch Mib-1/Ki-67. Bevorzugt wird die Blastenregion der Keimzentren; dabei sieht man einen geschichteten Aufbau (im Gegensatz zu den folliculären Lymphomen).
- Abb.2 Giemsa, Follikuläres Lymphom Grad 1 (L 1445/04), Vergrößerung 100-fach. Vergl. hierzu Abb.8. Infiltration des Lymphknotens durch ein zentrozytenreiches Infiltrat, nur gelegentlich finden sich Blasten. Die Schichtung der Keimzentren ist aufgehoben, das Sternhimmelbild fehlt vollständig, die Follikelmantelzone ist häufig nicht scharf abgrenzbar, ebenso die T-Zonen.
- Abb.3 Giemsa, Follikuläres Lymphom Grad 2 (L 7685/02), Vergrößerung 100-fach. Vergl. hierzu Abb.15. Im Vergleich zum folliculären Lymphom Grad 1 (Abb. 2) etwas mehr Blasten (6-15 Blasten pro HPF). Auch hier ist die Architektur des normalen lymphatischen Gewebes nicht nachweisbar.
- Abb.4 Giemsa, Follikuläres Lymphom Grad 2/ Übergang in ein Diffuses Großzelliges B-Zell-Lymphom (L 1398/04); Vergrößerung 100-fach. Der Bildausschnitt zeigt eine deutliche Erhöhung des Zentroblastenanteils entsprechend einem folliculären Lymphom Grad 2 (vgl. Abb. 3) und zusätzlich eine diffuse Lymphominfiltration mit signifikant erhöhtem Blastenanteil entsprechend einem Übergang in ein Diffuses Großzelliges B-Zell-Lymphom. Dieses nimmt den überwiegenden Bildteil ein, lediglich am linken Bildrand ist das folliculäre Lymphom Grad 2 dargestellt.
- Abb.5 Giemsa, Follikuläres Lymphom Grad 3b (L 2762/02); Vergrößerung 200-fach. Vgl. hierzu die Abbildungen 2 und 3. Man sieht signifikant vermehrt Zentroblasten gegenüber dem folliculären Lymphom Grad 2. Fokal sieht man geschlossene Blastengruppen (beim folliculären Lymphom Grad 3a wären keine geschlossenen Blastengruppen, aber mehr als 15 Blasten pro HPF zu erwarten).
- Abb.6 Giemsa, Follikuläres Lymphom Grad 2/ Übergang Diffuses

Großzelliges B-Zell-Lymphom (L 1398/04); Vergrößerung 100-fach. Der Bildausschnitt zeigt eine deutliche Erhöhung des Zentroblastenanteils entsprechend einem follikulären Lymphom Grad 2 (vgl. Abb. 3) und zusätzlich eine diffuse Lymphominfiltration mit signifikant erhöhtem Blastenanteil entsprechend einem Übergang in ein Diffuses Großzelliges B-Zell-Lymphom (links).

Abb.7 Cyclin A, Tonsille; Vergrößerung 200-fach. Hier sind die blastären Zellen mit Cyclin A angefärbt. Cyclin A färbt die Kerne der Blasten deutlich positiv. Dabei werden im Vergleich zur Abbildung 1 wesentlich weniger Zellen markiert (Cyclin A wird während des Zellzyklus kürzer exprimiert als Mib-1/Ki-67).

Abb.8 Cyclin A, Follikuläres Lymphom Grad 1 (L 1445/04). Vergrößerung 100-fach. Auch hier lassen sich wie in der Tonsille (vgl. Abb. 7) Cyclin A-positive Zellen morphologisch Zentroblasten zuordnen. Das Verteilungsmuster ist im Gegensatz zur Tonsille diffus und es werden wesentlich weniger Zellen markiert (Score=1).

Abb.9 Cyclin A, Follikuläres Lymphom Grad 2/ Übergang Diffuses Großzelliges B-Zell-Lymphom (L 1398/04), Vergrößerung 100-fach. Vgl. hierzu Abb. 6 und 8. Hier werden im Vergleich zum follikulären Lymphom Grad 1 zahlreiche Cyclin A-positive Zellen nachgewiesen. Dargestellt ist in diesem Bildausschnitt nur der Grad 2 Anteil des Follikulären Lymphoms.

Abb.10 Cyclin A, Follikuläres Lymphom Grad 3a (L 4662/03). Vergrößerung 40-fach. Hier werden follikuläre und diffuse Anteile nachgewiesen. Keine geschlossenen Blastengruppen (vgl. follikuläres Lymphom Grad 3b, Abb.5 und 11). (Score=3)

Abb.11 Cyclin A, Follikuläres Lymphom Grad 3b (L 2762/02), Vergrößerung 100-fach. Vgl. Abb.5 und 10. Hier werden signifikant mehr Zellen mit Cyclin A markiert (Score=4). Morphologisch handelt es sich dabei um klassische Zentroblasten, vereinzelt Immunoblasten. Kleine Zellen werden kaum markiert.

Abb.12 Cyclin A, Follikuläres Lymphom Grad 2/ Übergang diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (L 1398/04), Vergrößerung 100-fach. Vgl. hierzu Abb. 4, 6 und 9. Hier werden im Vergleich zum

follikulären Lymphom Grad 1 zahlreiche Cyclin A-positive Zellen nachgewiesen, es gelingt morphologisch eine eindeutige Unterscheidung zwischen dem follikulären Lymphom und dem Übergang in ein Diffuses Großzelliges B-Zell-Lymphom (links).

Abb.13 HSP-90, Tonsille; Vergrößerung 100-fach. Hier werden Keimzentrumsblasten markiert, Zentrozyten werden nur wenige markiert. In den Interfollikulärregionen werden nur vereinzelt Blasten nachgewiesen (vgl. hierzu Abb. 1 und 7).

Abb.14 HSP-90, Follikuläres Lymphom Grad 1 (L 1445/04), Vergrößerung 100-fach. Vgl. hierzu Abb. 2 und 7. Hier werden wie bei der Färbung mit Cyclin A nur wenige Blasten markiert; im Vergleich zu Mib-1 werden signifikant weniger Zentrozyten markiert. ( Score=1).

Abb.15 HSP-90, Follikuläres Lymphom Grad 2 (L 7685/02), Vergrößerung 100-fach. Vgl. Abb. 3 und 9. Hier werden etwas zahlreicher Blasten markiert, die Anzahl der Blasten ist in etwa vergleichbar mit der Cyclin A-Färbung, die Anzahl der positiven Zellen ist geringer als bei der Mib1-Färbung. ( Score=2).

Abb.16 HSP-90, Follikuläres Lymphom Grad 2/ Übergang Diffuses Großzelliges B-Zell-Lymphom (L 1398/04); Vergrößerung 100-fach. Morphologisch erkennt man, daß überwiegend große Blasten, welche dem Diffusen Großzelligen B-Zell-Lymphom entsprechen, zur Darstellung kommen.

Abb.17 HSP-90, FL Grad 3a (L 7895/03), Vergrößerung 100-fach. Beim vorliegenden Material handelt es sich um die Infiltration durch ein follikulär aufgebautes B-Zell-Lymphom, mit starker Vermehrung von Zellen, welche anaplastischen Zentrozyten entsprechen. Der Anteil der echten Zentroblasten ist nur mäßig erhöht, z.T. sind diese multilobuliert. ( Score=3).

Abb.18 HSP-90, FL Grad 2; Übergang Highgrade (L1398/04), Vergrößerung 100-fach. Vgl. Abb.4, 6, 9, 12, 16. Links im Bild ist der Übergang in das diffuse blastäre Infiltrat erkennbar.

Abb.19 Jaw-1, Tonsille, Vergrößerung 100-fach. Kaum Anfärbung der Zellen der Interfollikularregion.

- Abb.20 Jaw-1, FL Grad 2 (L1398/04), Vergrößerung 100-fach. Vgl. Abb. 4, 6, 9, 12, 16, 18. Mäßig erhöhter Blastenanteil (Score=2), nicht dargestellt ist der Übergang in das Diffuse Großzellige B-Zell-Lymphom.
- Abb.21 Jaw-1, FL Grad 3b (L 699/02), Vergrößerung 100-fach. Infiltrat von mittelgroßen blastären Zellen mit überwiegend starker Anfärbung durch Jaw-1 (Score=3).

## 9. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Alfred C. Feller für den mir eingeräumten Arbeitsplatz sowie für die Überlassung des Materials bedanken!

Ein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Merz, der mir mit konstruktiver Kritik und weiterführenden Verbesserungsvorschlägen immer hilfreich und unterstützend zur Seite stand und dem ich mich in einem vertrauensvollen Verhältnis verbunden fühlte. Die Zusammenarbeit war geprägt von Fairness und gegenseitiger Wertschätzung.

Dank aussprechen möchte ich auch den Mitarbeitern des „Ecklabors“, in besonderem Maße der Laborleiterin Frau Ilona Schliephake sowie Frau Katharina Vogel für ihre exzellente Unterstützung in labortechnischen Belangen.

Danken möchte ich meinen Eltern, denen ich diese Arbeit widme.

## 10. Lebenslauf

Immo Latendorf, geboren am 29.04.1976 in Lüdinghausen/ Westfalen, als zweites von drei Kindern.

Eltern : Peter Latendorf, geb. am 03.04.1946; Beruf: Elektromaschinenbaumeister,  
Diethild Latendorf (geb. Magunia), geb. am 19.03.1944; Beruf: Hausfrau; gelernte Hauswirtschaftsberaterin.

Schulbildung: 1982-1986 Paul-Gerhardt Gemeinschaftsgrundschule,  
1986-1995 Gymnasium Canisianum in Lüdinghausen, Abitur

Zivildienst : Staatliches Amt für Insel- und Küstenschutz, Norden

Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck seit dem Wintersemester 1996/97,

3.Staatsexamen im Mai 2004; Gesamtnote: sehr gut

Berufstätigkeit:

Seit dem 01.09.2004 Tätigkeit als Arzt am Städtischen Krankenhaus Dresden-Neustadt, Lehrkrankenhaus des Uniklinikums der TU Dresden, Abteilung Innere Medizin, Chefarzt Prof. Dr. T. Lohmann.

Nr.	Diagnose und Subtypisierung/Besonderheiten	L- Nummer	Mib-1 (% pos.)	HSP-90 (0-4)	Cyclin A (0-4)	Jaw-1 (0-3)
1	FL Grad 1; geringe Marginalzonen-Differenzierung	1001/01	5		1	1
2	FL Grad 1	358 /01	10		1	1
3	FL Grad 1	510 /01	10		1	nu
4	FL Grad 1	161 /02	20		2	2
5	FL Grad 1	1167/02	30		1	2
6	FL Grad 1	3590/02	30		2	1
7	FL Grad 1	7812/03	40		2	1
8	FL Grad 1	8164/03	40		nu	2
9	FL Grad 1	1445/04	5		1	2
10	FL Grad 2	1865/96	40		3	3
11	FL Grad 2	118/98	50		3	3
12	FL Grad 2	317/01	20		2	2
13	FL Grad 2	206 /01	20		2	2
14	FL Grad 2	560 /02	50		3	2
15	FL Grad 2	629 /02	20		2	2
16	FL Grad 2	1275/02	20		2	1
17	FL Grad 2	1502/02	20		3	2
18	FL Grad 2	1751/02	40		3	2
19	FL Grad 2	2725/02	30		2	1
20	FL Grad 2	7685/02	20		2	nu
21	FL Grad 2	3065/03	50		3	3
22	FL Grad 2 (anaplastische Zentrozyten)	3070/03	50		2	3
23	FL Grad 2	3152/03	30		nu	2
24	FL Grad 2	4651/03	30		2	2
25	FL Grad 2	7320/03	70		4	2
26	FL Grad 2	1198/04	20		3	2
27	FL Grad 2 (mit Übergang in DGBZL)	1398/04	30		2	2
28	FL Grad 3a	3961/02	40		3	3
29	FL Grad 3a	4695/02	50		3	2

Diagnose und Subtypisierung/Besonderheiten	L- Nummer	Mib-1 (% pos.)	HSP-90 (0-4)	Cyclin A (0-4)	Jaw-1 (0-3)	
30 FL Grad 3a (Grad 2/3a)	4830/02	40		3	3	2
31 FL Grad 3a (zytologisch Grad 1, aber zentrozytoides cb)	7353/02	40		4	2	3
32 FL Grad 3a	3157/03	10		3	nu	2
33 FL Grad 3a	4662/03	40		3	3	3
34 FL Grad 3a	7895/03	50		3	3	3
35 FL Grad 3a	1168/04	40		3	2	2
36 FL Grad 3b	699 /02	50		4	3	3
37 FL Grad 3b	746 /02	30		4	3	3
38 FL Grad 3b	2661/02	60		4	3	3
39 FL Grad 3b	2762/02	60		4	4	3
40 FL Grad 3b	3708/02	80		4	4	3
41 FL Grad 3b	4532/02	70		3	2	3
42 FL Grad 3b (Grad 1/3b Transformation)	4776/02	20		3	3	nu
43 FL Grad 3b	7724/03	80		4	3	3
44 Mantelzell-Lymphom; Zytologie spricht für klassischen Subtyp	2691/99	20		0	1	0
45 Mantelzell-Lymphom; teils klassische, teils pleomorphe/blastoide Variante	680/99	70		1	2	0
46 Mantelzell-Lymphom; zytologisch unterschiedliche Anteile mit identischem Immunphänotyp !	557/99	20		0	2	0
47 Mantelzell-Lymphom(zentrozytisches Lymphom) mit Marginalzonendifferenzierung	796/98	5		4	1	0
48 Mantelzell-Lymphom; klassischer Subtyp; niedrige Proliferationsrate, noduläres Ausbreitungsmuster	1417/98	20		2	1	1
49 Mantelzell-Lymphom; teils klassische, teils pleomorphe Variante	2891/98	40		0	1	1
50 Mantelzell-Lymphom;klinisch langsam progredienter Verlauf	1752/98	20		1	2	0
51 Mantelzell-Lymphom; deutliche Nodularität !	2232/98	20		4	1	0
52 Mantelzell-Lymphom; klassischer Subtyp; niedrige Proliferationsrate, noduläres Ausbreitungsmuster	3237/99	30		0	2	1

Diagnose und Subtypisierung/Besonderheiten	L- Nummer	Mib-1 (% pos.)	HSP-90 (0-4)	Cyclin A (0-4)	Jaw-1 (0-3)	
53 Mantelzell-Lymphom; zytologisch klassischer Subtyp;sehr hohe Proliferationsrate, noduläres/diffuses Ausbreitungsmuster	2997/99	60		2	3	1
54 Mantelzell-Lymphom; zytologisch teils klassischer, teils anaplastischer Subtyp	2436/98	70		2	3	1
55 Mantelzell-Lymphom; leukämische Ausschwemmung	1297/98	80		3	3	0
56 Mantelzell-Lymphom, pleomorph; Pat. hat weitere maligne hämatologische Erkrankungen !	2542/98	30		2	2	0
57 Mantelzell-Lymphom, pleomorph mit teils nodulärer, teils diffuser Ausbreitung; mittelhohe Prolif.	3585/99	50		2	2	2
58 Mantelzell-Lymphom; klassischer Subtyp,sehr hohe Proliferationsrate, diffuses Ausbreitungsmuster	1473/99	90		1	3	2
59 zentrozytisches Lymphom; relativ hohe Proliferationsrate	1250/94	30		0	2	0
60 Mantelzell-Lymphom	1336/98	40		0	3	1
61 Mantelzell-Lymphom; primäre Annahme: Marginalzonen-Lymphom	796/98	10		2	1	0
62 Mantelzell-Lymphom; klassischer Subtyp; mässig hohe Proliferationsrate, noduläres Ausbreitungsmuster	3737/99	20		3	1	0
63 Mantelzell-Lymphom, pleomorphe Variante, diffuses Ausbreitungsmuster, hohe Prolif.	2328/99	60		2	4	2
64 Mantelzell-Lymphom; mit extremer Splenomegalie und Blutleukozytose	2518/99	40		4	3	1
65 Mantelzell-Lymphom; klassischer Subtyp	2402/98	20		2	2	1
66 Mantelzell-Lymphom; klassischer Subtyp, diffuses Ausbreitungsmuster, mässig hohe Prolif.; langer Krankheitsverlauf !	2179/99	20		0	1	2
67 Mantelzell-Lymphom, pleomorph; Pat. hat weitere maligne hämatologische Erkrankungen !	1703/98	20		0	2	1
68 Mantelzell-Lymphom	822/98	10		2	nu	0
69 Mantelzell-Lymphom; klassischer Subtyp; niedrige Proliferationsrate, noduläres Ausbreitungsmuster, z.T.noch Mantelzellen-Ausbreitungsmuster(Marginalzonen-Diff)	3680/99	15		0	1	1
70 Mantelzell-Lymphom, pleomorph; Pat. hat weitere maligne hämatologische Erkrankungen !	89/95	20		2	nu	1

Diagnose und Subtypisierung/Besonderheiten	L- Nummer	Mib-1 (% pos.)	HSP-90 (0-4)	Cyclin A (0-4)	Jaw-1 (0-3)
71 Mantelzell-Lymphom, klassischer Typ, diffuses Ausbreitungsmuster, stark erhöhte Proliferationsrate	1807/99	20		2	nu
72 MCL	3204/01	15		0	2
73 MCL	1347/03	20		1	2
74 MCL	6202/03	30		0	1
75 MCL	6239/03	30		0	2
76 hm-NHL, speziell folliculär, zentroblastisch	550/97	50		3	3
77 hm B-NHL, polymorph-zentroblastisch	467/95	70		4	4
78 hm B-NHL, zentroblastisch( z.T. multilobuliert)	1628/97	80		4	4
79 hm B-NHL, zentroblastisch, multilobulierter Subtyp	995/97	80		4	4
80 hm B-NHL, polymorph-zentroblastisch	825/98	80		3	3
81 hm B-NHL, monomorph-zentroblastisch	2256/96	80		4	4
82 hm B-NHL, polymorph-zentroblastisch; herdförmig Immunobl.anteil erhöht	2257/96	40		4	4
83 hm B-NHL, polymorph-zentroblastisch	1295/97	30		3	3
84 hm B-NHL, polymorph-zentroblastisch	931/97	70		4	4
85 hm B-NHL, polymorph-zentroblastisch, Perineuralscheiden-Infiltr.!, Angiozentrität!	924/97	70		4	4
86 hm B-NHL, zentroblastisch	638/96	50		3	3
87 hm B-NHL, zentroblastisch	604/96	80		4	4
88 hm B-NHL, polymorph-zentroblastisch	598/96	90		4	4
89 hm B-NHL, zentroblastisch, multilobulierter Subtyp	608/99	80		3	3
90 Follikuläres, zentroblastisches Lymphom	294/98	Nu		3	3
91 hm B-NHL, polymorph-zentroblastisch	2618/97	70		4	4
92 hm B-NHL, zentroblastisch	1609/96	50		4	4
93 hm B-NHL, polymorph-zentroblastisch	1872/98	70		4	4
94 hm B-NHL, polymorph-zentroblastisch (CD 10 negativ)	2019/98	30		3	3
95 hm B-NHL, monomorph-zentroblastisch	1646/98	90		4	4
96 hm B-NHL, polymorph-zentroblastisch	377/00	70		4	4
97 hm B-NHL, polymorph-zentroblastisch	1574/98	70		2	2

Diagnose und Subtypisierung/Besonderheiten	L- Nummer	Mib-1 (% pos.)	HSP-90 (0-4)	Cyclin A (0-4)	Jaw-1 (0-3)	
98 hm B-NHL,zentroblastisch, multilobulierter Subtyp	1536/98	70		4	4	3
99 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	1385/98	90		2	2	2
100 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	1951/97	60		4	4	3
101 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	797/98	80		3	3	3
102 hm B-NHL,monomorph-zentroblastisch	1207/95	80		3	3	2
103 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	876/94	70		4	4	3
104 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch; teilweise follikulär	199/95	80		3	3	1
105 hm B-NHL,monomorph-zentroblastisch	195/95	80		4	4	1
106 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	645/94	70		3	3	1
107 hm B-NHL,zentroblastisch, multilobulierter Subtyp	154/95	70		4	4	3
108 hm B-NHL, speziell teilweise follikuläres, zentroblastisches Lymphom	1019/97	80		3	3	3
109 sek.hm cb Lymphom	703/94	60		4	4	2
110 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	327/94	nu		3	3	2
111 hochmalignes, teilweise foll., zentrob. Lymphom	795/98	40		3	3	2
112 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	1991/97	70		3	3	1
113 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch; mit erheblicher Sklerose	1418/98	30		2	2	3
114 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	570/98	60		3	3	3
115 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	881/98	70		2	2	3
116 hm B-NHL,zentroblastisch, z.T.multilobulierter Subtyp	1628/97	70		3	3	3
117 hm B-NHL,polymorph-zentroblastischfollikulär)	1523/95	70		3	3	3
118 hm B-NHL,zentroblastisch,multilobulierter Subtyp	671/98	80		3	3	3
119 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch( wohl aus cb-cc Lymphom)	1314/95	60		3	3	1
120 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	827/98	60		4	4	3
121 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	1746/96	70		3	3	1
122 sek./simultan hm zentroblastisches Lymphom mit Marginalzonen-Diff. auf dem Boden eines cb-cc Lymphoms	1022/01	50			3	1
123 sek./simultan hm zentroblastisches Lymphom mit Marginalzonen-Diff. auf dem Boden eines cb-cc Lymphoms	1022/01	80		3	3	3
124 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	879/94	30		3	nu	2
125 hm B-NHL,zentroblastisch; multilobulierter subtyp	400/97	70		nu	2	3
126 hm B-NHL,monomorph-zentroblastisch	921/97	70		4	3	3

Diagnose und Subtypisierung/Besonderheiten	L- Nummer	Mib-1 (% pos.)	HSP-90 (0-4)	Cyclin A (0-4)	Jaw-1 (0-3)	
127 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	993/97	80		4	4	2
128 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	1064/97	70		4	3	2
129 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	1102/97	70		nu	3	2
130 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	1298/97	80		nu	3	2
131 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	942/97	80		nu	3	1
132 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	1910/97	50		4	3	2
133 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	662/94	90		nu	3	3
134 zentroblastisches Lymphom	132/95	90		nu	3	2
135 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	153/95	80		nu	3	2
136 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	672/94	50		nu	3	3
137 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	683/95	20		nu	3	1
138 hm B-NHL,monomorph-zentroblastisch	745/95	90		4	3	3
139 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	780/95	70		4	nu	3
140 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	1339/95	80		nu	3	2
141 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	1440/95	80		nu	3	1
142 hm B-NHL,monomorph-zentroblastisch	1665/96	70		nu	3	2
143 hm B-NHL,polymorph-zentroblastisch	1805/96	70		nu	nu	2
144 DGBZL (mit partieller plasmoblastischer Differenzierung)	95 /03	80		4	3	nu
145 DGBZL	7676/03	90		4	3	3
146 hm B-NHL,B-immunoblastisch	1412/95	70		3	4	3
147 hm B-NHL,B-immunoblastisch, partiell plasmobl. Differenzierung	2291/98	80		2	2	3
148 hm B-NHL,B-immunoblastisch, mit plasmobl. Differenzierung	1519/98	90		4	4	3
149 hm B-NHL,am ehesten B-immunoblastisch, mit plasmobl. Differenzierung	960/94	90			4	1
150 hm B-NHL,B-immunoblastisch, mit plasmobl. Differenzierung	1764/96	25		3	3	3
151 hm B-NHL,B-immunoblastisch, mit plasmobl. Differenzierung	2721/99	80		4	4	1
152 hm B-NHL,B-immunoblastisch	1442/95	50		3	3	2
153 hm B-NHL,B-immunoblastisch	919/97	50		4	2	2
154 hm B-NHL,B-immunoblastisch mit plasmoblastischer Differenzierung	1125/97	70		4	3	3
155 hm B-NHL,B-immunoblastisch mit plasmoblastischer Differenzierung	1919/97	40		4	2	3
156 hm B-NHL,B-immunoblastisch	320/94	60		4	3	2

Diagnose und Subtypisierung/Besonderheiten	L- Nummer	Mib-1 (% pos.)	HSP-90 (0-4)	Cyclin A (0-4)	Jaw-1 (0-3)	
157 hm B-NHL,B-immunoblastisch	686/94	80		nu	3	1
158 hm B-NHL,B-immunoblastisch	167/95	50		4	3	1
159 DGBCL, großzellig anaplastisch	1212/95	80		4	4	3
160 DGBCL, großzellig anaplastisch	666/96	90		4	4	1
161 sek./simultan hochmalignes B-NHL, speziell Marginalzonen- L./monozytoides B-Zell-Lymphom	3601/99	20		3	3	3
162 hm B-NHL, unklassifiziert	878/94	60		4	4	2
163 hm B-NHL, unklassifiziert	685/95	70		3	3	2
164 hm B-NHL, unklassifiziert	162/95	10		3	3	2
165 hm B-NHL (nicht weiter zu klassifizieren)	1373/97	80		4	3	3
166 DGBZL	3.. /03	60		4	3	3
167 DGBZL (zentrozytoides DGBZL)	4... /03	90		3	4	3
168 DGBZL	103 /03	90		4	4	3
169 DGBCL (sek/simultan aus FL Grad 2)	1398/04	80		4	4	3

nu = nicht untersucht