

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. H. K. Müller-Hermelink

**Etablierung und Validierung
eines Gewebemicroarrays
für Non-Hodgkin-Lymphome**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Sylvia Meister
aus Ingolstadt

Würzburg, Mai 2003

Referent:

Priv.-Doz. Dr. med. G. Ott

Koreferent:

Prof. Dr. med. H. K. Müller Hermelink

Dekan:

Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2003

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung

1.1. Definition	S.1
1.2. Epidemiologie	S.1
1.3. Ätiologie	S.3
1.4. Klassifikation	S.4
1.5. Genetik	S.6
1.6. Immunhistochemie	S.7
1.7. Zielsetzung	S.11

2. Material und Methoden

2.1. Material und Untersuchungsgut	S.12
2.2. Histopathologische Klassifikation	S.12
2.3. Erstellung des Arrayblocks	S.13
2.4. Herstellung der Arrayschnitte	S.14
2.5. Theoretische Grundlagen zur Arraykonzeption	S.15
2.6. Immunhistochemie	S.17
2.7. Auswertung des Arrays	S.19
2.7.1. Allgemeines	S.19
2.7.2. Auswertekriterien der Immunhistochemie	S.19
2.7.3. Referenzgewebe	S.21
2.7.4. Genetische Daten	S.21

3. Ergebnisse

3.1. Gewebeverlust	S.22
3.2. Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse	S.22
3.3. Vergleich der immunhistochemischen Färbungen am Tissue Microarray mit denen am herkömmlichen Schnittpräparat	S.25
3.4. Vergleich von immunhistochemischen Färbungen an Paraffin- und Frischmaterial	S.28
3.5. Anwendung der Gewebemicroarray Technik für die immunhistochemische Analyse selektiver Marker	S.28
3.5.1. Färbeverhalten für IgD	S.28
3.5.2. Immunhistochemischer Vergleich von p53 und p21	S.28
3.5.2.1. Korrelation der immunhistochemischen Färbeergebnisse von p53 mit der Deletionsanalyse für 17p13 durch klassische Zytogenetik und FISH	S.30
3.5.3. P27 Expression und Korrelation mit Morphologie und Immunphänotyp für Ki67, p53 und p21	S.31

4. Diskussion

4.1. Anwendungsmöglichkeiten und Grenzen der neuen Tissue Microarray Technik	S.34
4.2. Ursachen des Verlustes von Tumorgewebe bei der Erstellung eines Tissue Microarrays	S.35
4.3. Vergleich der immunhistochemischen Färbungen am Tissue Mikroarray mit dem herkömmlichen Schnittpräparat	S.35
4.4. Vergleich der Antikörpern CD5, CD10 und BCL-2 für Frischmaterial mit dem entsprechenden Paraffinantikörpern	S.39
4.5. Immunphänotypisierung von 210 NHL vom B-Zell Typ	S.41
4.6. Vergleich der Expression von Ki67, p53, p21 und p27	S.45

5. Zusammenfassung	S.50
---------------------------	-------------

1. Einleitung

1.1. Definition

Lymphome sind Neoplasien lymphatischen Ursprungs. Sie kommen primär in lymphatischen Geweben vor, d.h. sowohl nodal in Lymphknoten, als auch extranodal in Tonsillen und Milz. Ebenso können sie aber auch primär extranodal in nicht lymphatischen Organen, wie z.B. Magen, Hoden, ZNS und Knochenmark auftreten, in denen sie sich sekundär aus eingewanderten lymphatischen Zellen entwickeln (Jaffe et al. 2001).

1.2. Epidemiologie

Jährlich erkranken in Deutschland 3-5/100000 Einwohner an einem Non Hodgkin Lymphom (NHL), wobei Männer ein höheres Erkrankungsrisiko haben, als Frauen (m:w 1,5:1). In immunschwachen Patienten, wie AIDS Patienten, therapeutisch Immunsupprimierten, transplantierten Patienten oder Patienten mit Autoimmunerkrankungen (Sjögren Syndrom oder Hashimoto Thyreoiditis) treten NHL bis zu 1000 mal häufiger auf als bei gesunden Vergleichspersonen. (Herold et al. 1999, Jaffe et al. 2001). AIDS Patienten erkranken vor allem an hochmalignen NHL (Burkitt Lymphom und diffuses großzelliges B-Zell Lymphom), Patienten mit Autoimmunerkrankungen gehäuft am extranodalen Marginalzonen Lymphom vom MALT Typ und transplantierte Patienten haben ein erhöhtes Risiko an PTLN (post transplant lymphoproliferative disorder) zu erkranken (Jaffe et al. 2001).

Weltweit gehören 80-85% aller NHL der B-Zellreihe an. 90% davon sind reife B Zell Neoplasien (Anon et al. 1997, Armitage et al. 1998). Am häufigsten erkranken NHL Patienten an diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen (DLBL) oder folliculären Lymphomen (FL), die zusammen 50% aller NHL Fälle ausmachen (Jaffe et al. 2001). Alle weiteren Entitäten treten wesentlich seltener

auf. Die nachfolgende Tabelle faßt die Inzidenzen der einzelnen NHL Subgruppen zusammen.

Inzidenzen (Jaffe et al. 2001):

<u>Diagnose</u>	<u>Fallzahlen in %</u>
Diffuse großzellige B-Zell Lymphome	30,6%
Follikuläre Lymphome	22,1%
EMBZL vom MALT- Typ	7,6%
Reife T-Zell Lymphome (außer ALCL)	7,6%
Chronische lymphatische Leukämie/ kleinzellige B-Zell-Lymphome	6,7%
Mantelzell Lymphome	6,0%
Mediastinale großzellige B-Zell-Lymphome	2,4%
Anaplastische großzellige Lymphome	2,4%
Burkitt Lymphome	2,5%
Nodale Marginalzonen B-Zell Lymphome	1,8%
Akute T-lymphoblastische Leukämie/ Lymphoblastisches Lymphom vom T-Zell Typ	1,7%
Lymphoplasmozytisches Lymphom	1,2%
Andere	7,4%

NHL sind in industrialisierten Ländern, wie beispielsweise den USA, Australien oder Europa (15/100000) weiter verbreitet als in China (1,2/100000) oder Afrika (Parkin et al. 1999). Circa 4% aller jährlich neu auftretenden Tumore sind NHL vom reifen B-Zell Typ.

1.3. Ätiologie

Als gesicherte Ursachen für das Auftreten von NHL gelten unter anderem Viren wie das Humane T-Zell Lymphom Virus Typ 1 (HTLV1 Virus), das Epstein Barr Virus (EBV Virus) und wahrscheinlich auch das Humane Herpesvirus Typ 8 (HHV8 Virus). Darüberhinaus können auch das HIV Virus (human immunodeficiency virus) und das Hepatitis C Virus ein Lymphom auslösen.

Für die Pathogenese der in Japan und der Karibik vermehrt vorkommenden T-Zell-Lymphome, spielt das HTLV1 Virus eine entscheidende Rolle. Dieses Virus führt über die Aktivierung des HTLV kodierten TAX Gens, zu einer Erhöhung von IL2 und GM-CSF. Sowohl das Interleukin, als auch der Wachstumsfaktor führen letztendlich über verschiedene Wirkungsmechanismen zu einer T-Lymphozytenproliferation. Wirken zusätzlich noch Mutagene auf die proliferierenden T-Lymphozyten, kann dadurch ein Lymphom induziert werden. (Cotran et al. 2001).

Das in Afrika endemisch auftretende Burkitt-Lymphom ist auf Epstein-Barr Viren (EBV) zurückzuführen. In nahezu 100% dieser endemischen Burkitt Lymphome läßt sich dieses Virus nachweisen, in sporadisch auftretenden Fällen jedoch nur in bis zu 40% (Prevot S et al. 1992).

Das EBV Virus immortalisiert infizierte B-Zellen und greift zusätzlich in die Zellproliferation ein. Das EBNA-2 Protein von EBV führt zu einer Erhöhung von Cyclin D, scr und LMP-1 (inhibiert die Apoptose durch die Hochregulierung von BCL-2 und immortalisiert dadurch die Zelle) und EBNA-1 Protein aktiviert das Rearrangement von Immunglobulinen, was ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer t(8;14) und damit einer Aktivierung von c-myc darstellt. Allerdings läßt eine c-myc Aktivierung alleine noch kein Lymphom entstehen. Andere Mutationen, wie beispielsweise eine Alteration von N-ras müssen noch hinzukommen. Die in Afrika häufig auftretenden Infektionserkrankungen, wie beispielsweise Malaria verursachen eine Stimulation und Proliferation dieser immortalisierten EBV infizierten B-Lymphozyten und erhöhen damit das Risiko für ein Lymphom. Demzufolge ist das EBV Virus alleine noch nicht onkogen, jedoch führt es zu einer polyklonalen Lymphoproliferation, einer

Beeinträchtigung der Zellzyklusregulation und einer Veränderung der an der Oberfläche von infizierten B-Zellen exprimierten Antigene, so daß infizierte B-Zellen von zytotoxischen T-Zellen schlechter erkannt werden (Cotran et al. 1999).

Weitere Viren, die ein Lymphom auslösen können sind zum einen das humane Herpesvirus 8 (HHV8), das in der Pathogenese des primären Effusions-Lymphoms eine Rolle spielt (Hengge et al. 2002) und das Hepatitis C Virus, das mit lymphoplasmazytischen Lymphomen und mit einigen Lymphomen von Leber und Speicheldrüsen assoziiert ist (Jaffe et al. 2001, Pozzato et al. 1994). Aber nicht nur Viren, sondern auch verschiedene Bakterien und die durch sie ausgelöste Immunantwort sind als Ursache für die Entstehung von NHL anzusehen. Die Helicobacter pylori Infektion des Magens ist eng mit der Entstehung von extranodalen Marginalzonen B-Zell-Lymphomen vom MALT Typ des Magens verbunden (Wotherspoon et al. 1991).

Auch Borrelia burgdorferi steht im Verdacht in der Pathogenese von kutanen MALT Lymphomen beteiligt zu sein (Cerroni et al. 1997).

1.4. Klassifikation

Durch den zunehmenden Fortschritt in Forschung und Klinik wurden zahlreiche Klassifikationsvorschläge formuliert, von denen zwei bis in die neunziger Jahre hinein Gültigkeit behielten. Dabei handelt es sich um die Kiel Klassifikation, die auf Lennert zurückgeht und die Working Formulation of Clinical Usage, die vor allem in den USA Anwendung fand (Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project 1982). Während sich die Kiel Klassifikation bei der Einteilung der Lymphome an deren Zytologie orientierte, basierte die Working Formulation im wesentlichen auf klinischen Ergebnissen im Hinblick auf Verlauf und Prognose der lymphatischen Neoplasien.

Da diese Klassifikationen von völlig unterschiedlichen Ansätzen ausgingen, waren sie auch kaum miteinander zu vergleichen, was die Zusammenarbeit im Hinblick auf Forschung und Klinik enorm erschwerte. Aufgrund dieser

Problematik wurde eine neue Klassifikation ins Leben gerufen, die REAL Klassifikation (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms). Sie war im wesentlichen eine Weiterführung der Kiel Klassifikation unter Einbeziehung von extranodalen Lymphomen und des Morbus Hodgkin. Es wurde soweit wie möglich versucht jedem Lymphom eine normale Differenzierungsform einer lymphatischen Zelle gegenüberzustellen. Um die neuen Erkenntnisse der letzten Jahre in einer allgemeingültigen Klassifikation einzubinden, wurde die REAL Klassifikation weiter überarbeitet, so daß jetzt seit kurzem (2001) eine weltweit gültige WHO Klassifikation zur Verfügung steht (Jaffe et al. 2001). Diese Klassifikation gliedert die Gruppe der NHL im wesentlichen in drei Hauptgruppen, die B-Zell Neoplasien, die T-Zell Neoplasien und den Morbus Hodgkin. Sowohl B- als auch T-Zell Lymphome werden desweiteren in Vorläufer und periphere B- bzw. T-Zell Neoplasien unterteilt (Ott, 1999).

Der Hauptteil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit ausgewählten Entitäten aus der Gruppe der peripheren (reifen) B-Zell-Neoplasien.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die derzeit gültige WHO Klassifikation der B-Zell Lymphome.

WHO-Klassifikation der B-Zell-Lymphome: (Jaffe et al. 2001)

B-Zell Neoplasien

Vorläufer B-Zell Neoplasien

- Akutes B-lymphoblastisches Lymphom/Leukämie

Reife B-Zell Neoplasien

- Chronische lymphatische Leukämie / kleinzelliges B-Zell-Lymphom
- Prolymphozyten- Leukämie vom B-Typ
- Lymphoplasmozytisches Lymphom
- splenisches Marginalzonenlymphom
- Haarzell-Leukämie
- Multiples Myelom
- Monoklonale Gammopathie ungewisser Signifikanz (MGUS)
- solitäres Plasmozytom des Knochens
- Extraossäres Plasmozytom

- Primäre Amyloidose
- Schwerketten Erkrankungen
- extranodales Marginalzonen B-Zell-Lymphom des Mukosa assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT Lymphom)
- Nodales Marginalzonen B-Zell-Lymphom
- Follikuläres Lymphom
- Mantelzell-Lymphom
- Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
- Mediastinales (thymisches) B-Zell-Lymphom
- Intravasales großzelliges B-Zell Lymphom
- Primäres Effusions-Lymphom
- Burkitt Lymphom/Leukämie

B-Zell Proliferationen von unklarem malignen Potential

- Lymphomatoide Granulomatose
- PTLD (post-transplant lymphoproliferative disorder)

1.5. Genetik

In einigen dieser Lymphomentitäten finden sich bestimmte genomische Alterationen gehäuft wieder. Wichtige Beispiele hierfür sind das Mantelzell-Lymphom (t(11;14) (q13;q32)), das Follikuläre Lymphom (t(14;18) (q32;q21)) und das Marginalzonen B-Zell Lymphom vom MALT Typ (t(11;18) (q21;q21)). Ein Teil dieser Translokationen sind allerdings weder hoch spezifisch noch sehr sensitiv, so daß sich die gleiche genomische Alteration auch in anderen Lymphomentitäten wiederfinden kann, und das Fehlen einer charakteristischen Translokation die Diagnose dieses Lymphomtyps nicht automatisch ausschließt.

MCL zeigen in 70 – 75 % (Williams et al. 1990, Rosenberg et al. 1991, Vandenberghe et al. 1991) eine Translokation t(11;14)(q13;q32) zwischen dem Immunglobulin Schwerketten Gen und dem Cyclin D1 Gen. In beinahe allen Fällen läßt sich jedoch diese Alteration mit Hilfe der Fluoreszenz in situ Hybridisierung nachweisen (Li et al. 1999, Vaandrager et al. 1996). Außerdem existieren weitere genetische Alterationen wie beispielsweise der negativen Zellzyklusregulationsproteine (p16, p18 oder TP53) in der blastoiden Variante oder genetische Anomalien, die ebenso bei der chronischen lymphatischen

Leukämie (CLL) vorkommen, wie die Deletion 13q14 oder 17p sowie die teilweise oder vollständige Trisomie 12 und andere (Cuneo et al. 1999).

In der Entität der FL weisen 80-90% (Takimoto et al., 1996) eine t(14;18)(q32;q21) unter Einbeziehung des Rearrangements des BCL-2 Gens auf. Jedoch findet sich diese Translokation nur in 10% als alleinige Alteration. Der Rest der Fälle zeigt vor allem Brüche in den Chromosomen 1, 2, 4, 5, 13, und 17 oder Zugewinne in den Chromosomen X, 7, 12 oder 18 (Tilly et al. 1994). t(14;18) tritt auch in 20-30% der DLBL auf. Bis zu 30% aller DLBL weisen eine Alteration des 3q27 Locus unter Einbeziehung des Protoonkogens BCL6 auf. Viele Fälle zeigen komplexe zytogenetische Alterationen (Jaffe et al. 2001).

Die Translokation t(11;18)(q21;q21) ist mit 30-50% die häufigste strukturelle chromosomale Aberration in extranodalen Marginalzonen B-Zell Lymphom (MZBL) vom MALT Typ (Auer et al., 1997, Ott et al., 1997). Diese Alteration ist jedoch auf niedrigmaligne extranodale MZBL vom MALT Typ beschränkt. In aggressiven, hochmalignen extranodalen Lymphomen konnte diese Translokation nicht nachgewiesen werden (Rosenwald et al. 1999).

1.6. Immunhistochemie

In den letzten Jahren sind auf dem Gebiet der Immunhistochemie große Fortschritte erzielt worden, besonders auch im Hinblick auf das bessere Verständnis der biologischen Vorgänge in einer Lymphomzelle und auch in der Abgrenzung unterschiedlicher Entitäten untereinander. Damit wurde es möglich, die verschiedenen Lymphomarten exakter zu klassifizieren (REAL- und WHO-Klassifikation) und verschiedene immunhistochemische Profile der einzelnen Entitäten zu erstellen, wodurch exaktere Aussagen sowohl über die Pathogenese und Proliferation, als auch über den klinischen Verlauf und die Prognose der jeweiligen Lymphomerkkrankung getroffen werden konnten.

Als Beispiele sind hier die Abgrenzung des prognostisch ungünstigen Mantelzell-Lymphoms von der CLL/SLL mit ihrem wesentlich günstigeren klinischen Verlauf anhand der Marker: CD5, CD23 und Cyclin D1 anzugeben.

(MCL: CD5 +, CD23 -, Cyclin D1 +; CLL/SLL: CD5 +, CD23 +, Cyclin D1 -), oder auch die Abgrenzung des ALCL vom Morbus Hodgkin mit Hilfe der Marker CD15, EMA und ALK. Allerdings muß dabei beachtet werden, daß die jeweiligen Markerprofile von Lymphomen in den meisten Fällen nur aussagekräftig sind, wenn sie in genauer Kenntnis der Lymphommorphologie angewandt werden. So sind beispielsweise die neoplastischen Follikel in einigen kutanen follikulären Lymphomen BCL-2 negativ, obwohl sie in nodalen FL typischerweise BCL-2 exprimieren (Jaffe et al. 2001).

Als besonders hilfreich erweist sich die Immunhistochemie auch in der Diagnostik von morphologischen Varianten, wie beispielsweise des blastoiden Mantelzelllymphoms in Abgrenzung zum DLBL, aber auch bei diagnostisch schwierigen Fällen, in denen die Morphologie alleine nicht für eine eindeutige Diagnose ausreicht, wie beispielsweise die Abgrenzung des Mantelzelllymphoms (MCL) zum nodalen Marginalzonen B-Zell Lymphoms (MZBL), die Unterscheidung zwischen dem diffusen großzelligen B-Zell Lymphom (DLBL) und dem anaplastischen großzelligen Lymphom (ALCL) oder auch die Diagnose eines follikulären Lymphoms (FL) statt einer follikulären Hyperplasie (Knowles et al. 1993, Kurtin et al. 1999).

Ziel gegenwärtiger Forschungen auf dem Gebiet der Immunhistochemie ist es, prognostische Marker zu finden, die einen eindeutigen Hinweis auf den zu erwartenden klinischen Verlauf zwischen, aber auch innerhalb von Entitäten geben können. Durch diese Erkenntnis könnten Therapiemaßnahmen innerhalb eines Tumortyps genauer auf den jeweiligen Patienten zugeschnitten werden. Damit würde auf der einen Seite vermieden, Patienten mit besserer Prognose zu übertherapieren, auf der anderen Seite jedoch könnten Patienten mit schlechter Verlaufsprognose selektiv aggressiver behandelt werden. Ihre Chancen auf Remission oder Heilung könnten damit erhöht werden.

Zu den Antigenen, die in Zusammenhang mit einer schlechteren klinischen Prognose stehen, zählen nach heutigem Kenntnisstand die Überexpression des Transkriptionsproduktes des Tumorsuppressorgens p53 (Greiner et al. 1996, Wilson et al., 1997) und des Onkogens c-myc (Chung-Che et al. 2000), das

Transkriptionsprodukt des Oncogens BCL2 (Gascoyne et al. 1997, Hermine et al. 1996, Hill et al. 1996), die Expression des Proliferationsmarkers MIB1 (Hill et al. 1996; Astaturov et al. 1997) sowie das Oberflächenprotein CD38 bei der CLL (Hamblin et al. 2002).

Eine P53 Überexpression in der Mehrheit der Tumorzellen ist mit einer schlechteren Prognose sowohl in der Gruppe der DLBL (Chung-Che et al. 2000), der CLL (Cordone et al. 1998) als auch in der Gruppe der MCL (Greiner et al. 1996) verbunden. P53 Positivität tritt vor allem in Tumoren in höheren Tumorstadien auf. Exprimiert ein DLBL sowohl p53 als auch c-myc, so wurde für diese Tumore ein besonders aggressiver klinischer Verlauf beobachtet (Chung-Che et al. 2000).

Patienten mit einem p53 positiven MCL überlebten im Durchschnitt nur 12 Monate im Gegensatz zu 63 Monaten bei p53 negativen MCL (Greiner et al. 1996).

Darüber hinaus sind p53 mutierte und damit in den meisten Fällen auch p53 überexprimierende NHL auch vermehrt resistent gegenüber Chemotherapeutika. Die Patienten zeigten im Mittel ein kürzeres progressionsfreies Überleben und eine kürzere Gesamtüberlebenszeit, als eine Vergleichsgruppe ohne p53 Mutation. Ebenso wirkte sich eine Proliferationsrate von unter 80% negativ auf das Ansprechen von Chemotherapeutika oder das Erreichen einer kompletten Remission aus (Wilson et al. 1997).

Auch die BCL2 Proteinexpression ist ein hoch signifikanter Marker für die Prognose von DLBL. (Hill et al. 1996). Nur die Überexpression dieses apoptoseinhibierenden Proteins, nicht aber das Genrearrangement bedingt offenbar eine schlechtere Prognose. Nur 35% der Patienten mit BCL-2 positiven DLBL sind nach 10 Jahren nach kompletter Remission noch rezidivfrei, während es bei den BCL-2 negativen DLBL noch 69% sind. Darüber hinaus sterben auch mehr DLBL- Patienten aufgrund ihres Tumors, wenn dieser BCL-2 überexprimiert als mit BCL-2 negativen (Hill et al. 1996).

Mit einer besseren Prognose ist eine ALK Positivität im anaplastischen großzelligen T-Zell Lymphom verbunden. 80% der Patienten überleben

mindestens 5 Jahre. Jedoch überleben nur 40% der Patienten mit einem ALK negativen ALCL mindestens 5 Jahre (Fallini et al. 1999; Gascoyne et al. 1999).

Auf der Suche nach immuntherapeutisch nutzbaren Targetproteinen und deren Nachweis im Vorfeld einer geplanten Therapie nimmt die Immunhistochemie in der Hämatopathologie einen hohen Stellenwert ein. Hierfür ist als Beispiel der gegen CD20 positive lymphatische Neoplasien gerichtete Anti-CD20 Antikörper (Rituximab) zu nennen, der bereits innerhalb von Studien in unterschiedlichen Therapieplänen eingesetzt wird (Coiffier et al. 2002).

In den nächsten Jahren wird auch der Vergleich von immunhistochemischen Daten mit den am cDNA Array erhobenen Ergebnissen von hohem Interesse sein.

Die Arbeitsgruppe von Staudt et al. / Bethesda entwarf einen cDNA Array von B-Zellen unterschiedlichen Differenzierungsgrades und verglich damit die cDNA unterschiedlicher DLBL (Alizadeh et al. 2000). Diese konnten aufgrund unterschiedlicher m-RNA Expressionsmuster in 3 Gruppen unterteilt werden: aktivierter B-Zell-Typ, Keimzentrumstyp und Typ3, die sich auch signifikant in ihrer klinischen Prognose voneinander unterschieden (Rosenwald et al. 2002).

Mit Hilfe der Immunhistochemie ließe sich überprüfen, ob unterschiedliche DLBL Subgruppen auch auf Proteinexpressionsebene Unterschiede zeigen, und in wie weit die in diesen Tumoren vorhandene m-RNA in Proteine übersetzt wird. Dabei stellt sich die Frage, wie sich die Proteinexpression zusammen mit der m-RNA-Expression dieser „neuen“ Lymphomsubgruppen auf Progression und Prognose auswirkt.

Besonders in den letzten Jahren, steht eine zunehmende Anzahl neuer, noch nicht auf dem Gebiet der NHL erprobter Antikörper zur Verfügung. Um das Färbeverhalten dieser Marker an unterschiedlichen Entitäten untersuchen zu können, wird eine Methode benötigt, mit der viele Fälle in kurzer Zeit analysiert werden können. Es sollte dafür das für die Routinediagnostik aufbereitete

Paraffinmaterial verwendet werden können und nur wenig Gewebe für diese Untersuchung verbraucht werden. Dazu bietet sich der von der Baseler Arbeitsgruppe erstmalig für urologische Tumoren etablierte Gewebemicroarray besonders an (Kononen et al 1998).

1.7. Zielsetzung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, diese neue Technik auch auf dem Gebiet der malignen Lymphome zu etablieren. Dabei sollte besonders der Frage nachgegangen werden, wie repräsentativ und verlässlich die Ergebnisse des Gewebemicroarrays im Vergleich zum herkömmlichen Schnittpräparat sind. Darüber hinaus sollten Anwendungsmöglichkeiten, aber auch Grenzen dieser Methode untersucht werden und die dabei gewonnenen neuen immunhistochemischen Ergebnisse diskutiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material und Untersuchungsgut

Die vorliegende Studie wurde an 210 NHL der B-Zell-Reihe durchgeführt. Die dazugehörigen Paraffinblöcke stammten aus dem Referenzzentrum für Lymphknotenpathologie des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg aus den Jahren 1988 bis 2000. Von den meisten Fällen waren mehrere Blöcke vorhanden. Für den „Tissue Microarray“ wurde ein Block mit gut erhaltenem und fixierten Tumorgewebe ausgewählt.

2.2. Histopathologische Klassifikation

Die Lymphome wurden nach den Kriterien der neuen WHO-Klassifikation (Jaffe et al. 2001), anhand von HE, Giemsa, PAS und Gomöri Färbungen diagnostiziert.

Zusätzlich gingen immunhistochemische und zytogenetische Daten in die Diagnostik mit ein.

Dabei ergab sich folgende Zusammensetzung des Untersuchungsmaterials:

Entitäten des Untersuchungsmaterials

210 NHL der B-Zell-Reihe

82 diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBL):

50 nodale

43 zentroblastische

7 immunoblastische

19 extranodale

13 Kombination eines FL Grad 3b mit einem DLBL

54 folliculäre Lymphome (FL):

17 Grad1 (< 5 Centroblasten im „high power field“ (=HPF) bei 40 facher Vergrößerung)

25 Grad2 (5-15 Centroblasten im HPF) incl. 5 FL mit überwiegend diffusem Wachstumstyp

9 Grad 3a (>15 Centroblasten im HPF) mit Ausreifung zum Zentrozyten

3 Grad 3b ohne Ausreifung zum Zentrozyten

74 Mantelzell Lymphome (MCL)

54 klassisch

20 blastoid

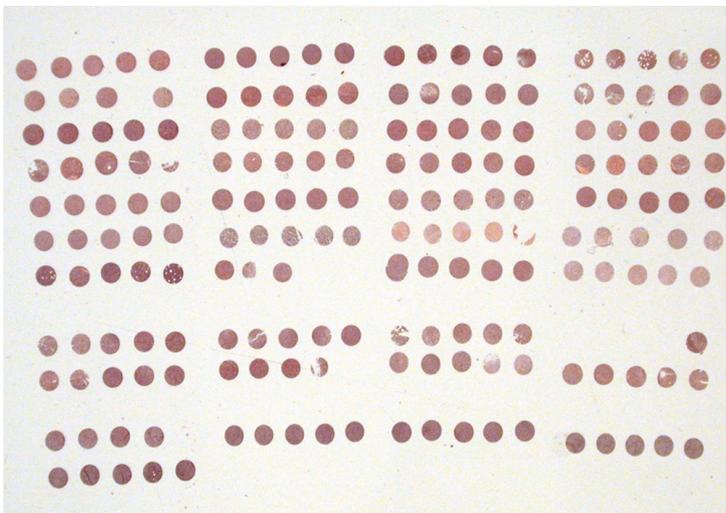
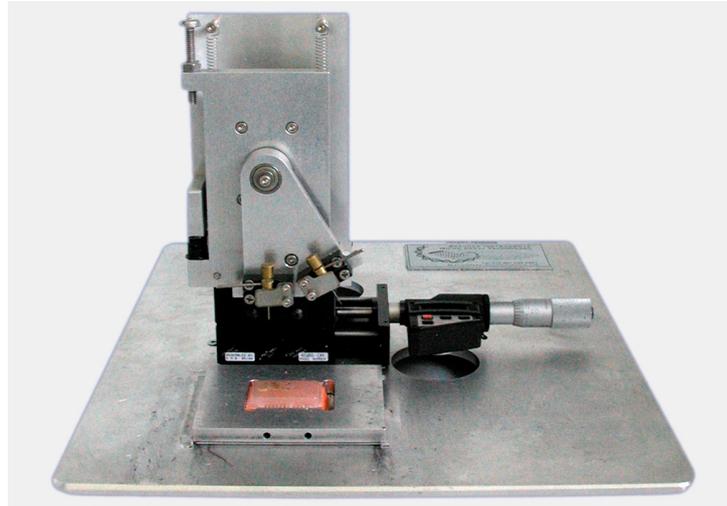
2.3. Erstellung des Arrayblockes

Mit einem Manual tissue puncher/Arrayer der Firma Beecher Instruments, Silver Spring, Maryland, USA, wurden pro Fall fünf 0,6 mm dicke Stanzen aus in Paraffin eingebettetem Lymphomgewebe entnommen und in einen eigenen Empfängerblock im Abstand von 1 mm eingebracht. Für den größten Anteil der Fälle (136 DLBL und FL) wurde vor dem Stanzen am Giemsaschnitt ein „stanzwürdiges“ Areal ausgewählt, während die verbleibenden 74 MCL „blind“, d.h. ohne vorherige lichtmikroskopische Kontrolle, gestanzt wurden. Diese Stanzen wurden soweit möglich subkapsulär entnommen, um gut fixiertes Material zu gewinnen.

Die histologischen Untergruppen der einzelnen Entitäten wurden der Übersichtlichkeit wegen durch einen Absatz getrennt aufgetragen. Damit fanden je Reihe 4 Fälle Platz und ein Block enthielt bis zu 15 Reihen, d.h. maximal 60 Fälle pro Block (= 300 Stanzen).

Insgesamt wurden 6 Blöcke erstellt, davon zwei mit nodalen großzelligen B-Zell Lymphomen, einer mit extranodalen großzelligen B-Zell Lymphomen, einer mit folliculären Lymphomen und zwei Blöcke mit Mantelzell Lymphomen.

Abb. 1:



Manual Tissue puncher (oben) und HE Schnitt eines fertigen Tissue Microarrays (unten).

2.4. Herstellung der Arrayschnitte

Vom Arrayblock wurden mit einem herkömmlichen Microtom in 1 μm dicke Schnittpräparate angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend auf silanisierte Objektträger aufgezogen und für ca. eine Woche im Brutschrank bei 56°C getrocknet, um das Abschwimmen der Stenzen beim anschließenden Färben zu verhindern.

Das in der Literatur beschriebene (Kononen et al.1998) kosten- und arbeitsintensive Klebefoliensystem hat sich bei den Lymphomen nicht bewährt. Die Stenzen blieben durch den langen Trockenvorgang auf den silanisierten Objektträgern auch ohne Folie haften und darüberhinaus wurde ohne Klebefoliensystem eine bessere Tumormorphologie erzielt.

2.5. Theoretische Grundlagen zur Arraykonzeption

Pro Fall wurden 5 Stenzen für den Array verwendet. Einerseits kann mit 5 Stenzen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit repräsentatives Tumormaterial gewonnen werden als mit zwei oder drei Stenzen, andererseits gibt es Tumorantigene mit nicht homogener Expression, die mit Hilfe von Immunhistochemie nachgewiesen werden, die nicht auf jeder Lymphomzelle exprimiert werden und deshalb nicht auf der gesamten Tumorphäche gleichstark ausgeprägt sind.

In Abbildung 2 ist dargestellt, wie sich die Trefferwahrscheinlichkeiten in Relation zum positiven Markeranteil eines Tumors verhalten. Um die Abhängigkeit von der Anzahl der Stenzen zu veranschaulichen wurden die einzelnen Graphen übereinanderprojiziert. Dabei zeigt sich, daß bei nur einer Stanze eine lineare Beziehung zwischen Trefferwahrscheinlichkeit und Tumorpositivitätsanteil besteht, bei allen anderen Stanzanzahlen aber eine exponentielle. Nimmt beispielsweise der Tumor 20% der Schnittfläche eines Lymphknotens ein oder entspricht das Areal im Tumor mit der Expression eines Antikörpers 20% der gesamten Tumorphäche, so ergibt sich bei einer Stanze eine theoretische Wahrscheinlichkeit von 20%, diese zu treffen, bei 2 Stenzen 36%, bei 3 schon 49%, bei 4 60%, bei 5 68% und bei 10 Stenzen bereits 90%, d.h. daß 5 Stenzen in mehr als 2/3 der Fälle ein positives Ergebnis liefern würden (vgl. Abb. 2 und 3).

Zwar wurde ein Teil der Lymphomblöcke anhand von angefertigten Schnitten zuvor lichtmikroskopisch auf ihre „Stanzwürdigkeit“ überprüft, jedoch darf dabei nicht außer Acht gelassen werden, daß durch das zusätzliche Anschneiden des Donorblockes beim Gewinnen des HE Schnittes Gewebe verloren geht, und

sich damit auch die Morphologie des zu stanzenden Tumors in den tieferliegenden Schichten ändert. Mit einer höheren Anzahl an Stanzen erhöht sich deshalb auch die Wahrscheinlichkeit, auswertbares Tumorgewebe zu erfassen.

Allerdings besteht einer der wesentlichen Vorteile des Microarrays darin, daß möglichst viele Fälle auf einem Paraffinblock vereint, und unter gleichen Färbe- und Fixierungsbedingungen ausgewertet werden können. Dieser Vorteil würde durch eine hohe Anzahl an Stanzen je Fall gemindert werden. Aufgrund dieser Überlegung wurde der Array mit 5 Stanzen pro Fall konzipiert, so daß mit höherer Wahrscheinlichkeit (als beispielsweise mit 2 Stanzen) repräsentatives Tumormaterial gestanzt wurde, aber trotzdem noch 60 Fälle auf einem Block Platz fanden (statt z.B. 30 bei 10 Stanzen pro Fall).

Abb.2:

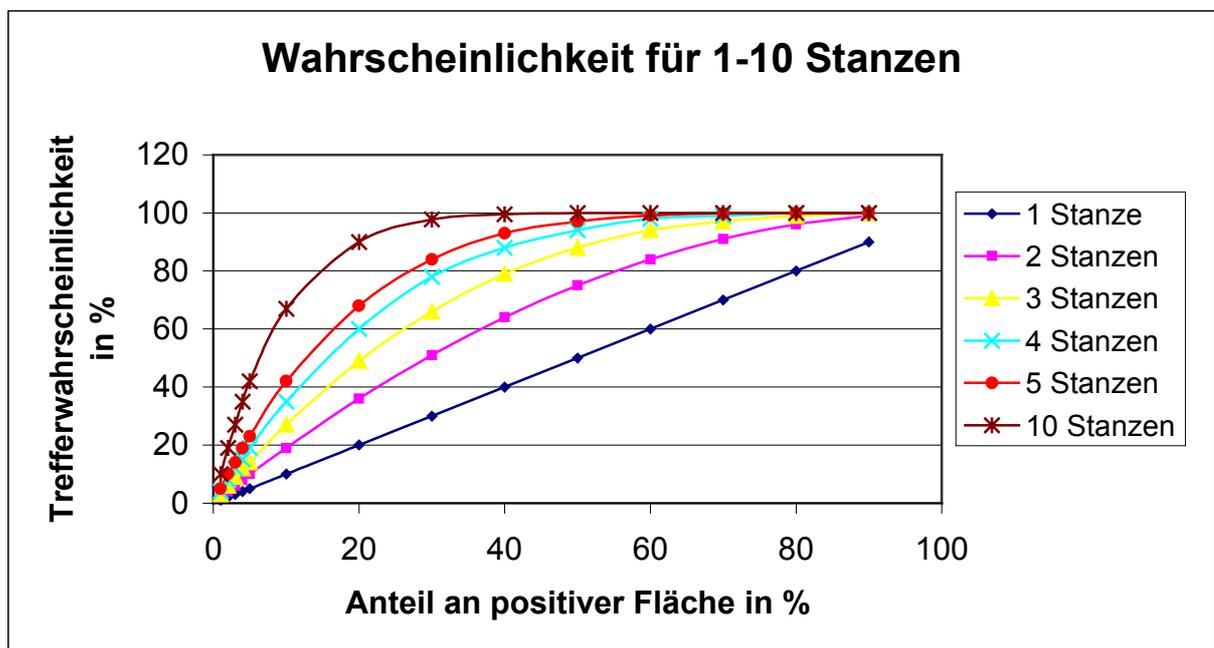
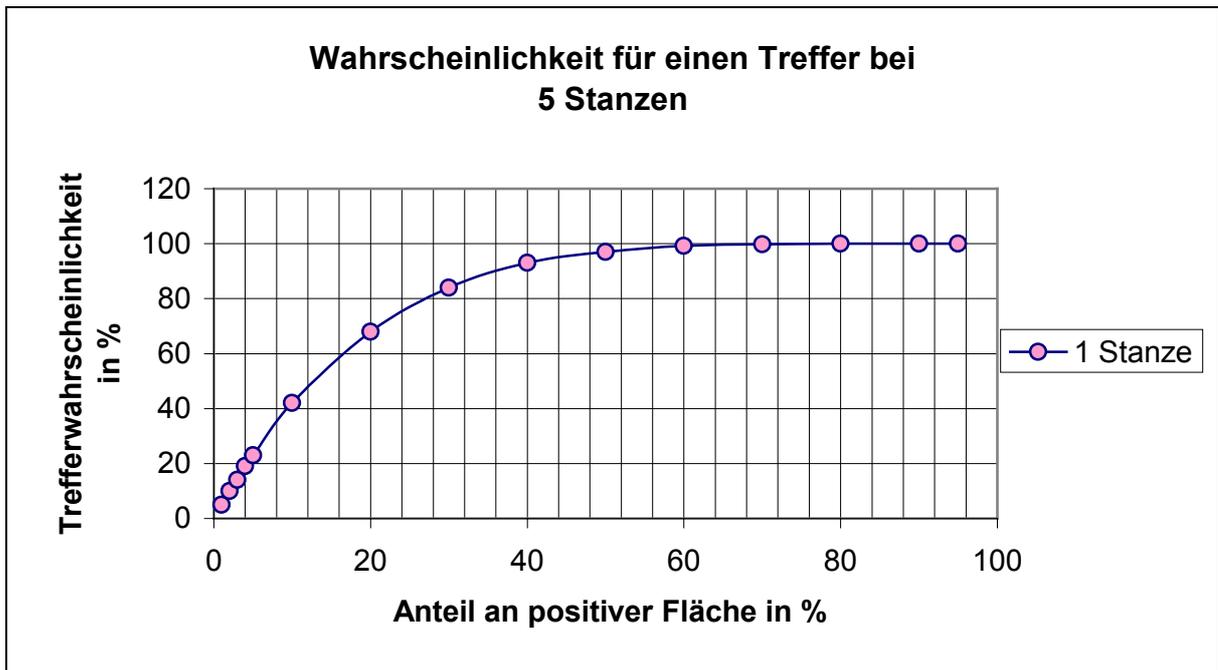


Abb.3:



2.6. Immunhistochemie

Von jedem Arrayblock wurden vor den immunhistochemischen Färbungen mit HE und/oder Giemsa angefärbte Schnitte angefertigt, um festzulegen, ob repräsentatives Tumormaterial in den einzelnen Stanzen erfaßt wurde.

Für die immunhistochemischen Färbungen (CD20, CD3, CD5, CD10, CD23, bcl2, Ki67, p53, p21, p27, IgM, kappa, lambda und IgD) wurde die indirekte Immunperoxidasetechnik (Rüdiger et al. 1998) mit Hilfe des Pipettierautomaten TECAN Genesis RSP 200 angewandt.

Verwendet wurden folgende Antikörper:

Antikörper für Paraffinmaterial:

	Verdünnung:
CD20cy (L26): DAKO, clone: L26	1:1000
CD3 : Novocastra, clone: PS1	1:20
CD5: Novocastra, clone: CD5/4C7	1:40
CD10: Novocastra, clone: 56C6	1:5
IgM: DAKO, code No. A426	1:20000
kappa: DAKO, code No. A191	1:40000
lambda: DAKO, code No. A193	1:20000
IgD: DAKO, A0093	1:200
Ki67: Novocastra, clone:MM1	1:30
BCL-2: DAKO, clone: 124	1:50
CD23: Novocastra, clone: 1B12	1:10
p21: CALBIOCHEM, clone: EA10	1:10
p27: Transduction Laboratories, clone: 57	1:1000
p53: DAKO, clone: DO-7	1:50

Antikörper für Frischmaterial:

CD5: BL1a Immunotech	1:200
CD10: ALB1 Immunotech	1:100
BCL-2: clone 124 Immunotech	1:100

2.7. Auswertung der Arrays

2.7.1. Allgemeines

Zunächst wurde anhand von Giemsa und HE gefärbten Schnitten überprüft, inwieweit die Arraystanzen Tumorgewebe enthielten. Falls nötig, wurden auch die immunhistochemischen Färbungen dazu herangezogen.

Nur Fälle mit 2 oder mehr morphologisch gut erhaltenen tumortragenden Stanzen gingen in die Wertung ein.

2.7.2. Auswertekriterien der Immunhistochemie

Antikörper mit homogener Expression

Die Marker CD20, CD3, CD5, CD10, IgM, IgD, CD23 und BCL-2 wurden aufgrund der Oberflächen- oder zytoplasmatischen Expression in den Tumorzellen als positiv oder negativ bewertet. Darüber hinaus wurde CD10 in starke und schwache Färbeintensität untergliedert, da während der Auswertung immer wieder schwache CD10 Färbungen auffielen, die jedoch klar über der normalen Hintergrundfärbung lagen. BCL-2 wurde in Positivitätsgruppen von mehr als 50% der Tumorzellen und weniger als 50% der Tumorzellen untergliedert.

Antikörper mit nicht homogener Expression

Sekretorische Differenzierung

Dazu wurde das Expressionsmuster für kappa, lambda und evt. IgM untersucht. Maligne Lymphome mit einer eindeutigen monotypischen, zytoplasmatischen Leichtkettenexpression in den Tumorzellen wurden als sekretorisch differenziert gewertet. Auf der kleinen Fläche der Arraystanze genügten deshalb schon

wenige Tumorzellen mit einer deutlichen monotypischen, zytoplasmatischen Leichtkettenexpression für eine Wertung als positiv.

p53 und p21

Die nukleäre Färbung dieser Antikörper wurden in 10% Schritten von 0 bis 100% erfaßt.

Für die späteren Auswertungen galten diese Marker als positiv, wenn sie $\geq 20\%$ erreichten. Grenzwertig signifikante Ergebnisse von 10-20% wurden in den Analysen getrennt ausgewiesen. Für den Vergleich wurde immer die Stanze mit der höchsten Färbeintensität herangezogen.

p27

P27 wurde in 10% Schritten und nach seiner Expressionsstärke beurteilt. Als interne Referenz wurden die Kerne von T-Zellen herangezogen, wonach die Färbung der Tumorzellen in negativ, schwach oder stark positiv unterteilt wurde.

Um auszuschließen, daß positive T-Zellen in die Wertung eingingen, wurde die Stanze vor ihrer Bewertung mit der CD3 Färbung kontrolliert.

Proliferationsindex

Die Bestimmung des Proliferationsindex erfolgte durch Bewertung der nukleären Positivität der Tumorzellen für Ki67 (MIB1) in Schritten von 10%. Dabei wurde innerhalb der Stanze die höchste Expression bestimmt (hot spot), d.h. das Areal mit dem höchsten Proliferationsindex. Der höchste Wert in einer der fünf Stanzen bildete dann das Endergebnis für alle fünf Stanzen zusammen.

2.7.3. Referenzgewebe

Als Referenzgewebe dienten zuvor angefertigte herkömmliche Schnittpräparate der danach gestanzten Tumorblöcke. Diese wurden mit den identischen Antikörpern wie die Arrayschnitte gefärbt. Auch galten für diese Schnittpräparate die gleichen Auswertekriterien. Diese Daten wurden dann mit denen des Arrays verglichen. Für Ki67 wurde am Schnittpräparat sowohl der Wert für die maximale Expression des Tumors, als auch der Mittelwert der Tumorexpression für Ki67 ermittelt und diese Werte mit dem Ergebnis des Arrays korreliert. Eine Übereinstimmung der in 10 % Schritten graduierten Marker (p53, p21 und Ki67) mit dem Tissue Microarray wurde nur dann angenommen, wenn beide Ergebnisse nicht mehr als 10 % auseinander lagen. Für den Vergleich von Paraffininstanzen des Arrays mit herkömmlichen Schnitten von Frischmaterial wurde vom Frischmaterial der gleichen Tumore Kryostatschnitte angefertigt und für die Marker BCL-2, CD10 und CD5 mit den jeweiligen Antikörpern für Frischmaterial gefärbt (vgl. Kapitel Immunhistochemie).

2.7.4. Genetische Daten

Der Expressionsstatus von p53 wurde mit klassischen zytogenetischen oder FISH-Analysen des p53-Locus in 17p13 korreliert.

3. Ergebnisse

3.1. Gewebeverlust

Von ursprünglich 240 gestanzten Fällen waren nach Herstellung und Aufbereitung des Arrayblockes und nach der immunhistochemischen Färbung der Arrayschnitte 210 Fälle auswertbar.

Darunter waren 136 von ursprünglich 148 (92%) DLBL und FL. 12 Fälle mußten aus der Wertung genommen werden. In 11 Fällen (7%) waren in mehr als 3 Stenzen, trotz vorheriger Auswahl des tumorhaltigen Areals am HE Schnitt, kein Tumormaterial, sondern reaktives Lymphknotengewebe, Kapselanteile oder Nekrose erfaßt worden. Ein Fall ging während der Aufarbeitung des Tissue Microarray Blockes verloren.

Von 92 MCL Fällen, die nicht unter HE Kontrolle gestanzt wurden, konnten nur 74 Fälle (80%) ausgewertet werden. 12 (13%) Fälle entfielen wegen nicht erfaßten Tumors und 6 Fälle (7%) waren nach der immunhistochemischen Färbung nicht mehr vorhanden.

Diese Stenzen gingen sowohl beim Schneiden mit dem Microtom, im Wasserbad für das Aufziehen auf silanierte Objektträger oder während der immunhistochemischen Färbung verloren. Besonders Fälle mit hohem Bindegewebsanteil waren anfällig, während des Färbens abzuschwimmen.

3.2. Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse

100% aller 210 ausgewerteten B-NHL waren für CD20 positiv. Keiner dieser Fälle zeigte eine Positivität für CD3. Sämtliche MCL waren CD5 positiv, während nur 5 nodale DLBL mit diesem Antikörper eine Reaktion zeigten. CD10 färbte alle FL Grad 1-3a und alle FL Grad 3b, aber nur 46% aller FL3b mit DLBL Anteil. Nodale DLBL und extranodale DLBL waren zu 34% bzw. 53% positiv. 2 klassische MCL zeigten eine schwache Reaktivität für CD10. Für CD23 waren die Tumorzellen nur in der Gruppe der nodalen DLBL für CD23 positiv (12%).

Bei den FL Grad 1-3a waren 33% positiv, während in der Gruppe der FL Grad 3b 2 von 3 Fällen für CD23 positiv waren.

Nodale DLBL waren in 46% der Fälle sekretorisch differenziert und exprimierten in 50% der Fälle auf der Zelloberfläche IgM. IgD war in 24% positiv, BCL-2 in 58% und p53 in 20% der Fälle. Die Zellzyklusregulationsproteine p21 und p27 wurden in 8% und 32% (davon in 13 von 16 Fällen mit starker Färbeintensität) überexprimiert. Extranodale DLBL hingegen waren in 74% IgM positiv und in 37% sekretorisch differenziert. P53 wurde in 21% der Fälle überexprimiert. IgD und p27 wurde in keinem der extranodalen DLBL nachgewiesen. Im Vergleich von FL Grad1-3a und FL Grad3b ergaben sich Übereinstimmungen bei den Markern CD20, CD10, CD3, CD5, p53 und p21. Alle FL exprimierten CD20 und CD10, keines jedoch CD3, CD5, p53 und p21. P27 exprimierte nur ein FL Grad2 vom überwiegend diffusen Wachstumstyp. Bei den FL 3b exprimierten von drei Fällen jeweils zwei CD23, BCL-2, IgM und IgD. Ebenfalls zwei waren sekretorisch differenziert. Von den FL Grad1-3a exprimierten 24% CD23, 61% IgM, 22% IgD und 100% BCL-2. Sekretorisch differenziert waren lediglich 6%. Im Vergleich dazu, waren FL mit einem DLBL Anteil nur in 46% CD10 positiv, aber in 31% sekretorisch differenziert und überexprimierten p53 in 38% der Fälle.

In der Gruppe der MCL zeigten klassische und blastoide MCL ein ähnliches Färbeverhalten. Klassische MCL exprimierten CD10 in 4%, IgD in 7%, p53 in 24%, p21 in 0%, p27 in 9% (alle starke Färbeintensität), BCL-2 in 100%. Kein Fall zeigte eine Positivität für CD23. Blastoide MCL waren für IgD in 10%, p53 in 35%, p21 in 5%, p27 in 15% (alle starke Färbeintensität) und BCL-2 in 100% der Fälle positiv. Jedoch gingen bei den blastoiden Tumoren 3 p53 positive MCL für die Auswertung verloren, da nach der Aufbereitung des Tissue Microarrays nur noch eine auswertbare Stanze vorhanden war und deshalb diese Fälle aus der Wertung genommen werden mußten. CD10 und CD23 wurden nicht exprimiert. Eine Aufschlüsselung aller Entitäten mit ihren Markerexpressionen zeigt die Tabelle 1.

Tabelle 1:

Ergebnisse der am Gewebemicroarray durchgeführten immunhistochemischen Färbungen von B-NHL

Marker	DLBL, nodal (n=50)		DLBL, extranodal (n=19)		FL, Grad 1-3a (n=51)		FL, Grad 3b (n=3)		FL3b+DLBL (n=13)		MCL klassisch (n=54)		MCL blastoid (n=20)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
CD20 +	50	100%	19	100%	51	100%	3	100%	13	100%	54	100%	20	100%
CD3 +	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
CD5 +	5	10%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	54	100%	20	100%
CD10 +	17	34%	10	53%	51	100%	3	100%	6	46%	2	4%	0	0%
CD23 +	6	12%	0	0%	17	33%	2	67%	0	0%	0	0%	0	0%
IgM +	25	50%	14	74%	31	61%	2	67%	10	77%	nd		nd	
clg +	23	46%	7	37%	3	6%	2	67%	4	31%	nd		nd	
IgD +	12	24%	0	0%	11	22%	2	67%	2	15%	4	7%	2	10%
p53 +	10	20%	4	21%	0	0%	0	0%	5	38%	13	24%	7	35%
p21 +	4	8%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	1	5%
p27 +	16	32%	0	0%	1	2%	0	0%	0	0%	5	9%	3	15%
Bcl-2	29	58%	11	58%	51	100%	2	67%	12	92%	54	100%	20	100%

3.3. Vergleich der immunhistochemischen Färbungen am Tissue Microarray mit dem herkömmlichen Schnittpräparat

Im Vergleich der Marker CD20, CD3, CD5 und BCL-2 wurde eine vollständige Übereinstimmung erzielt (vgl. Tabelle 2). Alle Fälle waren sowohl im Tissue Microarray als auch im konventionellen Schnittpräparat für CD20 positiv und CD3 negativ und auch die Färbeargebnisse für CD5 und BCL-2 stimmten gänzlich überein (100%).

CD10 korrelierte in 95% der Fälle. Dabei waren alle nicht übereinstimmenden Lymphome (4 von 130 Fällen: 3 DLBL nodal, 1 DLBL extranodal) am Tissue Microarray positiv, während sie am normalen Schnittpräparat als negativ klassifiziert worden waren. Aus nicht bekannten Gründen färbt CD10 an der Stanze stärker im Vergleich zum herkömmlichen Schnitt. Alle diskordanten Fälle zeigten am Schnittpräparat eine schwache Färbung, die aber nicht ausreichte, um den Fall als positiv zu qualifizieren, während aber der Antikörper die Tumorzellen der Stanze so stark anfärbte, daß diese als positiv bewertet wurde. Auch bei CD23 wurde eine hohe Übereinstimmung von 93% festgestellt. Ähnlich wie bei CD10 war bei allen diskordanten Fällen (9 von 130 (3 FL Grad 1, 3 FL Grad 2, 1 FL Grad 3a und 2 FL Grad 3b)) die Zelloberfläche am Array positiv, während sie sich am Schnittpräparat negativ darstellte. Ebenso verhielt es sich bei IgD. 7 Fälle (1 DLBL nodal, 3 DLBL extranodal, 2 FL mit DLBL Anteil, 1 FL Grad 2) waren am Gewebe Microarray positiv, im Schnittpräparat dagegen negativ.

Bezüglich der sekretorischen Differenzierung wurde eine Übereinstimmung von 91% erreicht, jedoch konnte in 9 von 101 Fällen die zytoplasmatische Leichtkettenexpression mit dem Tissue Microarray nicht erfaßt werden.

92% der mit p53 gefärbten Fälle stimmten mit dem am Schnitt erhobenen Ergebnis überein, in den restlichen 8% (16 von 206 Fälle) wurde die Expression im Array, bei einer Abweichung der Ergebnisse von mehr als 10%, in 9 Fällen zu hoch und in 7 Fällen zu niedrig eingestuft.

Eine Übereinstimmung des höchsten Proliferationsindex (= „hot spot“ der Tumorpheriferation) zwischen Array und Schnittpräparat konnte nur in 71% der DLBL und FL gezeigt werden (148 von 208). Beim Vergleich der durchschnittlichen Ki67 Expression korrelierten jedoch 90% der Fälle, bei denen im Vergleich mit dem „hot

spot“ keine Übereinstimmung erzielt werden konnte (42 der 48 diskordanten DLBL und FL Fälle)

MCL hingegen korrelierten im Vergleich des „Ki67-hot spots“ in 83% der Fälle.

Abb.4:



Übersicht über zwei DLBL Fälle mit unterschiedlicher Ki67 Expression

Tabelle 2:

Vergleich der immunhistochemischen Ergebnisse des Tissue Microarrays mit dem herkömmlichen Schnittpräparat

	DLBL (nodal, extranodal, FL3b+DLBL)	N=82	FL (FL Grad1- 3b)	N=54	MCL	N=74	Überein- - stim- mung	
	Anzahl der vergleichenen Fälle	Anzahl der diskor- danten Fälle	Anzahl der verglich- enen Fälle	Anzahl der diskor- danten Fälle	Anzahl der verglich- enen Fälle	Anzahl der dis- kordan- ten Fälle		
homogen exprimierte Marker								
CD20	82	0	54	0	74	0	210/210	100%
CD3	82	0	54	0	74	0	210/210	100%
CD5	82	0	41	0	74	0	197/197	100%
IgD	20	4	36	3	nd		49/56	88%
clg	82	6	19	3	nd		92/101	91%
nicht homogen exprimierter Marker								
p53	82	3 ^{***} /7	54	1 ^{***} /2	70	1 ^{***} /7	190/206	92%
p21*	34	5	6	0	nd		36/40	90%
Ki67 (hot spot)	82	30	54	18	72	12	148/208	71%
Ki67 ^{**} (Durch- schnitt)	14	2	18	2	nd		38/42	90%

*) herkömmliche Schnittpräparate waren nur in einem Teil der Fälle verfügbar

***) Daten basieren auf Vergleich der durchschnittlichen Ki67 Expression in 42 nicht übereinstimmenden Fällen von Tissue Microarray Daten mit dem herkömmlichen Schnittpräparat

****) Daten mit >20%= positiv Regel, Daten ohne Stern= Abweichung >10% vom herkömmlichen Schnittpräparat

3.4. Vergleich von immunhistochemischen Färbungen am formalinfixierten Paraffinmaterial mit immunhistochemischen Färbungen am Frischmaterial

Für CD10 wurden 130, für CD5 122 und für BCL-2 136 FL und DLBL sowohl mit einem unterschiedlichen Antikörper am Frischmaterial, als auch mit dem neueren für formalinfixiertes Paraffinmaterial geeigneten Antikörper gefärbt.

Von 130 für CD10 gefärbten Fällen waren 6 Fälle (5 nodale DLBL und ein extranodales DLBL) am Frischmaterial negativ, während das Paraffinmaterial sowohl im Tissue Microarray, wie auch im Schnittpräparat positiv war.

Ein Fall von 122 (ein FL3b mit DLBL Anteil) war mit dem CD5 Antikörper für Frischmaterial positiv, jedoch nicht mit dem Antikörper für Paraffinmaterial (sowohl Tissue Microarray als auch Schnittpräparat). Auch bei BCL-2 waren 3 Fälle von 136 (alle DLBL extranodal) am Frischmaterial positiv, jedoch nicht am Paraffin.

3.5. Anwendung der Gewebemicroarray-Technik für die immunhistochemische Analyse selektiver Marker

3.5.1. Färbeverhalten für IgD

In allen Entitäten wurden IgD positive Fälle gefunden. Unter den nodalen DLBL waren 24% (12 der 50 Fälle) für IgD positiv. FL3b mit Anteilen eines DLBL waren zu 15% (2 von 13) positiv, während alle extranodalen DLBL keine Positivität aufwiesen. 6 von 74 MCL (8%) waren ebenfalls positiv, wobei sich klassische und blastoide MCL nicht signifikant voneinander unterschieden (7%: klassisch versus 10% blastoid).

In der Gruppe der FL war in 7 von 54 Fällen der neoplastische Follikel positiv. In 5 Fällen war nur der erhaltene Follikelwall, jedoch nicht das neoplastische Keimzentrum positiv. Beide Kompartimente waren nur in einem Fall positiv. Somit war in 6 von 54 FL Fällen der physiologische Follikelwall noch erhalten, während in 48 Fällen der Follikelwall bereits zerstört war.

3.5.2. Immunhistochemischer Vergleich von p53 und p21

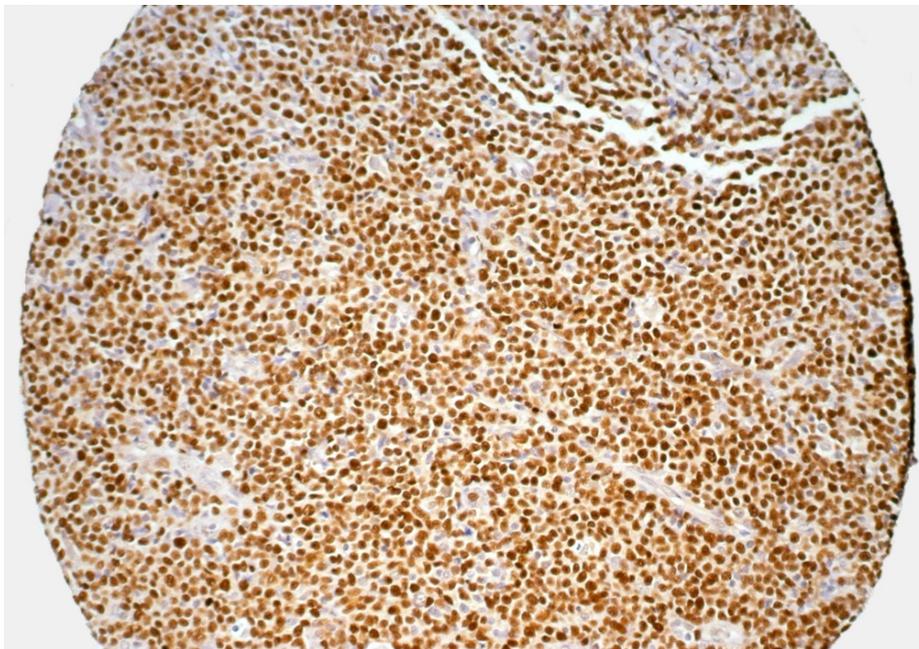
Von 210 Lymphomen des Arrays waren 39 Fälle positiv für eine Überexpression von p53, d.h. sie exprimierten in mehr als 20% der Tumorzellen p53. In 7 Fällen waren

zwischen 10-20% der Tumorzellen positiv (Überexpressionstatus fraglich). 10 von 50 (20%) nodale DLBL und 4 von 19 (21%) extranodale DLBL (einer fraglich) waren p53 positiv. Zwei nodale DLBL und ein extranodales DLBL waren fraglich in ihrem Expressionsstatus, d.h. 10-20% positive Tumorzellen. Alle FL, sowohl FL Grad1-3a, als auch FL Grad 3b waren für p53 negativ, während unter den FL 3b mit Anteilen eines DLBL Anteil 5 von 13 Fällen (38%) waren, die eine Positivität zeigten. 2 Fälle waren fraglich positiv.

20 von 74 MCL waren positiv für p53 und einer fraglich positiv, aber blastoide und klassische MCL exprimierten p53 in annähernd gleicher Häufigkeit (24% versus 35%).

Unter den 39 p53 positiven B-NHL zeigten 35 keine p21 Überexpression. Nur 2 Fälle waren p21 positiv (ein DLBL nodal: 20-30% der Tumorzellen positiv und ein MCL: 1 blastoid: 90-100% der Tumorzellen positiv). Darüber hinaus wurde in 4 Fällen eine erhöhte Expression von p21 ohne p53 Positivität festgestellt (zwei positive nodale DLBL: davon zwei Fälle mit 20-30% der Tumorzellen positiv und zwei fragliche Fälle: ein DLBL mit 10-20% und ein MCL mit 10-20% der Tumorzellen positiv für p21)

Abb: 5



Stanze eines DLBL mit hoher p53 Expression

Tabelle 3:

Korrelation zwischen p53 und p21 Expression am Tissue Microarray

	DLBL nodal	DLBL extranodal	FL Grad1-3a	FL Grad3b	FL Grad3b+DLBL	MCL
p53+/p21-	10 (20%)	4 (21%)	0	0	5 (38%)	19 (26%)
p53+/p21+	1 (2%)	0	0	0	0	1 (1%)
p53-/p21+	3 (6%)	0	0	0	0	0
p53-/p21-	38 (76%)	15 (79%)	51 (100%)	3 (100%)	8 (62%)	54 (73%)

3.5.2.1. Korrelation der immunhistochemischen Färbeergebnisse von p53 mit der Deletionsanalyse für 17p13 durch klassische Zytogenetik und Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Mit den Ergebnissen der Deletionsanalyse durch FISH oder klassische Zytogenetik verglichen wurden 22 der 23 p53 positiven oder fraglich positiven FL und DLBL (von einem Fall waren keine Daten vorhanden), in denen mehr als 10% der Tumorzellen p53 exprimierten (vgl. hierzu Tabelle 4). Von den 11 positiven und p21 negativen nodalen DLBL lagen in 10 Fällen zytogenetische Daten vor. 6 Fälle waren 17p13 deletiert, wovon 4 Fälle sowohl durch FISH als auch durch klassische Zytogenetik erfaßt wurden und in 2 weiteren Fällen die Deletion nur mit FISH nachgewiesen werden konnte. Ein nodales DLBL mit dem Phänotyp p53+/p21+ war nicht deletiert. Bei den extranodalen DLBL konnte nur in einem von 4 Fällen eine Deletion für 17p13 nachgewiesen werden. Ähnliches war auch in der Gruppe der p53+/p21- FL3b mit einem DLBL Anteil (5 Fälle und 2 fragliche Fälle) zu beobachten, von denen in 3 Fällen, die p53 in mehr als 20% der Tumorzellen exprimierten, sowohl durch FISH als auch durch klassische zytogenetische Untersuchungen eine Deletion nachgewiesen werden konnte. In einem weiteren Fall wurde eine Trisomie 17 via FISH nachgewiesen. Interessanterweise zeigten alle untersuchten fraglich positiven Fälle (p53 in 10-20% der Tumorzellen) keine Deletion oder andere mit FISH oder klassischer Zytogenetik erfaßbare genomische Alteration für 17p13.

Tabelle 4:**Vergleich der p53 Expression mit den Ergebnissen von zytogenetischen Deletionsanalysen**

Fallnummer	Diagnose	p53	p21	17p Deletion in CGH	del17p13 in FISH
1.	FL3b+DLBL	10-20%	-	n	n
2.	FL3b+DLBL	10-20%	-	n	n
3.	Nodal DLBL	10-20%	-	n	n
4.	Extranodal DLBL	10-20%	-	n	n
5.	FL3b+DLBL	+(20-30%)	-	del	del
6.	FL3b+DLBL	+(70-80%)	-	del	del
7.	FL3b+DLBL	+(70-80%)	-	del	del
8.	FL3b+DLBL	+(20-30%)	-	n	Trisomie
9.	Nodal DLBL	+(40-50%)	-	del	del
10.	Nodal DLBL	+(70-80%)	-	del	del
11.	Nodal DLBL	+(90-100%)	-	del	del
12.	Nodal DLBL	+(90-100%)	-	del	del
13.	Nodal DLBL	+(90-100%)	-	del	n
14.	Nodal DLBL	+(90-100%)	-	del	n
15.	Nodal DLBL	+(60-70%)	-	n	n
16.	Nodal DLBL	+(20-30%)	+(20-30%)	n	nd
17.	Nodal DLBL	+(40-50%)	-	n	nd
18.	Nodal DLBL	+(90-100%)	-	n	nd
19.	Extranodal DLBL	+(30-40%)	-	n	del
20.	Extranodal DLBL	+(90-100%)	-	n	n
21.	Extranodal DLBL	+(90-100%)	-	n	n
22.	Extranodal DLBL	+(50-60%)	-	n	n

3.5.3. P27 Expression und Korrelation mit Morphologie und Immunphänotyp für Ki67, p53 und p21

Alle 69 folliculären Lymphome (Grad1-3b) exprimierten in ihren Zentrozyten p27, in einem weiteren Fall waren auch die Zentroblasten positiv (FL Grad 2 mit diffusem Wachstumstyp).

8 von 74 MCL waren positiv für p27, wobei 7 Fälle p27 schwächer exprimierten als die T-Lymphozyten des Begleitinfiltrates. Nur in einem Fall wurde eine starke nukleäre Färbintensität beobachtet. Von 54 klassischen MCL waren 5 positiv für

p27 (9%). Die Tumorzellen exprimierten p27 in den Kernen zwischen 50 und 100% bei einem Median für Ki67 von 10%. 49 Fälle zeigten trotz niedrigem Proliferationsindex (Median 15%) keine Expression von p27.

Alle p27 positiven klassischen MCL waren p53 negativ.

In der Gruppe der blastoiden MCL zeigten 3 Fälle trotz einer hohen Ki67 Expression (zwischen 20 und 50%; Median: 35%) eine p27 Positivität. Davon waren 2 Fälle auch für p53 positiv (ein weiterer fraglich zwischen 10-30%) und für p21 negativ. Die übrigen p27 negativen blastoiden MCL hatten einen Proliferationsindex zwischen 20-90% (Median: 60%).

Von 19 p53+/p21- MCL exprimierten nur 2 p27 (10%) und von 54 p53-/p21- MCL waren 6 positiv für p27 (11%).

Anders verhielt es sich in der Gruppe der DLBL, hier fanden sich 16 p27 positive Lymphome. Das entspricht einem Anteil von 32%.

Alle positiven DLBL waren nodalen Ursprungs. Alle extranodalen DLBL waren für p27 negativ. Interessanterweise fanden sich unter den 7 immunoblastischen DLBL 6 positive Fälle (starke Färbeintensität in 20-90% der Tumorzellen: 3 Fälle mit 70-90%, 2 Fälle mit 40-60% und ein Fall mit 20-30% positive Tumorzellen).

Ähnlich den MCL zeigten nur 4 nodale DLBL eine starke Färbeintensität, die der von nicht neoplastischen T-lymphozyten gleichzusetzen war. In den übrigen 12 Fällen hoben sich allerdings die positiven Tumorzellen klar von der Färbung des Hintergrundes ab. Zwischen 30-90% der Tumorzellen färbten sich mit dem p27 Antikörper an, was einem Median von 60% entspricht. Der Median der Ki67 Expression dieser p27 positiven Fälle lag bei 75% (50-100%), wohingegen der Ki67-Median der p27 negativen DLBL bei 80% lag.

2 von 16 p27 positiven Fällen waren p53+/p21-, einer war p53+/p21+, während der Rest kein p53 exprimierte. Auch von den 9 p53+/p21- nodalen DLBL zeigten 2 Fälle (22%) eine p27 Expression, jedoch waren von den 40 p53 negativen nodalen DLBL 13 Fälle (33%) p27 positiv.

Tabelle 6:

p27 Expression von MCL und DLBL: Korrelation mit p53/p21/Ki-67

	p27 in %	p27 Intensität	Ki67 in %	p53	p21
MCL, klassisch					
	90-100	+++	10	-	-
	60-70	++	5	-	-
	40-50	++	20	-	-
	40-50	++	10	-	-
	40-50	++	10	-	-
MCL, blastoid					
	70-80	++	50	+ (90-100%)	-
	60-70	++	50	+ (90-100%)	-
	40-50	++	20	-	-
DLBL, nodal					
	70-80	+++	60	-	-
	60-70	+++	100	+ (40-50%)	-
	30-40	+++	60	-	+ (20-30%)
	20-30	+++	90	-	-
	80-90	++	60	+ (40-50%)	-
	80-90	++	50	-	-
	60-70	++	80	-	-
	50-60	++	70	-	-
	50-60	++	60	+ (20-30%)	+ (20-30%)
	50-60	++	60	-	-
	40-50	++	90	-	-
	40-50	++	60	-	+ (20-30%)
	30-40	++	90	-	-
	70-80	+	100	-	-
	70-80	+	90	-	-
	40-50	+	90	-	+ (20-30%)

4. Diskussion

4.1. Anwendungsmöglichkeiten und Grenzen der neuen Tissue Microarray Technik (TMA)

Das Wissen über pathogenetische Vorgängen in Tumoren hat sich in den letzten Jahren und Jahrzehnten deutlich vergrößert, nicht zuletzt durch neue molekulargenetische Methoden, die die schnelle Analyse von Tausenden von menschlichen Genen ermöglicht. Jedoch ist nicht nur das Verständnis von Genen und deren Aberrationen von großer Bedeutung, sondern auch die Auswirkungen dieser Genveränderungen auf die Herstellung von Proteinen. Der Nachweis einer veränderten Proteinexpression kann durch die Technik des Gewebe Mikroarrays deutlich vereinfacht werden (Kononen et al. 1998). Bis zu 1000 Gewebestanden können in einen Paraffinblock eingebracht und unter gleichen Färbebedingungen untersucht werden. (Kononen et al. 1998, Mucci et al. 2000, Camp et al. 2000, Hoos et al. 2001)

Einer der größten Probleme in der Anwendung des Gewebe Mikroarrays auf dem Gebiet der Lymphome ist die Heterogenität des Tumors. Zum einen, können die eigentlichen Tumorzellen, wie im Falle des Hodgkin Lymphoms oder des T-zellreichen B-Zell Lymphoms, nur einen kleinen Anteil des Tumors bilden, während der Hauptanteil aus entzündlichem Begleitinfiltat besteht.

Zum anderen wachsen nicht alle Lymphome diffus, sondern können auch Strukturen des physiologischen Follikels nachahmen, wie beispielsweise im folliculären Lymphom oder z.B. die Infiltration der Mantelzone im Mantelzell-Lymphom.

Deshalb ist es nicht gewährleistet, daß die eigentlichen Tumorzellen mit der Stanznadel erfaßt werden. Darüber hinaus sind nicht alle Antikörper im Tumor homogen verteilt. Beispielsweise wird der prognostisch wichtige Proliferationsmarker Ki67 in Lymphomen fokal unterschiedlich exprimiert (hot spot). Dadurch ist es möglich, daß die Ki67 Expression im gestanzten Lymphom nicht die des gesamten Tumors widerspiegelt.

Um die Anwendbarkeit dieser Technik auf dem Gebiet der Lymphome zu untersuchen, wurde ein Gewebearray mit 240 bereits vollständig charakterisierten

und klassifizierten Fällen von follikulären Lymphomen, Mantelzell-Lymphomen und diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen (nodal und extranodal) erstellt und die daran erzielten immunhistochemischen Färbeergebnisse mit denen des herkömmlichen Schnittpräparates verglichen.

4.2. Ursachen des Verlustes von Tumorgewebe bei der Erstellung eines TMA

Für die DLBL und FL Serie wurde zuerst am HE Schnitt ein repräsentatives Areal ausgewählt, während die Lymphome der MCL Serie blind gestanzt wurden. Diese Unterscheidung ermöglichte es zu untersuchen, in wie weit die vorangegangene Auswahl die Qualität des gewonnenen Materials verbesserte.

20% der MCL Fälle mußten aus der Wertung genommen werden, da sich in der Stanze kein Tumorgewebe befand. Allerdings war das auch in 7% der DLBL und FL Serie der Fall. Es zeigte sich, daß die zeitaufwendige Vorauswahl der Stanzregion am HE Schnitt zwar die Zahl an nicht tumortragenden Stanzen verringerte, aber nicht ganz verhindern konnte. Besonders bei partiell mit Lymphom infiltrierten Lymphknoten ändert sich in den tieferen Schichten die Tumordichte. Durch den Gewebeverlust beim Anschneiden des Blockes, können die tieferliegenden Schichten dann tumorfrei sein und deshalb mit der Stanznadel dann nicht erfaßt werden.

In 7 von 210 Fällen gingen mehr als 3 Stanzen während der Aufarbeitung verloren, d.h. sie lösten sich beim Schneiden oder während des Aufziehens auf Objektträger im Wasserbad aus ihrer Paraffinmatrix oder sie lösten sich während den Arbeitsgängen der immunhistochemischen Färbung (Kochen in Puffern, Färben im Automaten) vom Objektträger. Besonders anfällig dafür waren Lymphome mit hohem Bindegewebsanteil oder Beckenkammbiopsien, die sich für diese Art der Bearbeitung nicht eigneten.

4.3. Vergleich der immunhistochemischen Färbungen am TMA mit dem herkömmlichen Schnittpräparat

Für die vergleichende Analyse von Arraystanzen und herkömmlichem Schnitt wurden zwei Gruppen von Antikörpern unterschieden. Die erste Gruppe beinhaltet Marker, die homogen im Lymphom exprimiert werden, wie CD20, CD3, CD5, CD10, CD23,

BCL-2 und IgD. Beim Vergleich dieser Marker mit dem herkömmlichen Schnitt war die Übereinstimmung sehr hoch. Es gab keine Diskrepanzen bei CD20, CD3, CD5 und BCL-2. Nur wenige Fälle korrelierten nicht für CD23, CD10 und IgD. CD23 wird zwar homogen im Tumor exprimiert, jedoch färben sich auch die im folliculären Lymphom vorkommenden folliculären dendritische Zellen und deren Fragmente mit diesem Antikörper stark an. Das führte in einigen Fällen zu Schwierigkeiten bei der Abgrenzung zwischen positiven folliculären dendritischen Zellen oder Zellanteilen und ansonsten negativen Lymphomzellen. Diese Unterscheidung wird dann besonders schwierig, wenn wie hier beim Gewebe Microarray die zu beurteilende Fläche klein ist, und sich die fragmentierten, positiven Fortsätze der folliculären dendritischen Zellen diffus auf den Tumor verteilen und ihn somit positiv erscheinen lassen. Diese Abgrenzung ist in 9 Fällen von folliculären Lymphomen nicht gelungen. CD10 stimmte in 4 DLBL Fällen nicht mit dem Schnittpräparat überein. Aus nicht bekannten Gründen ist die CD10 Färbeintensität an der Stanze höher als am Schnittpräparat. Zwar zeigte sich am Schnittpräparat eine leicht positive Färbung. Sie reichte jedoch nicht aus, um das Lymphom als CD10 positiv zu bewerten. Die Färbung am Array war jedoch stark genug für eine positive Reaktion.

Auch bei IgD war die stärkere Hintergrundfärbung am Tissue Microarray Grund für die positive Bewertung, die sich am Schnittpräparat aber nicht zeigte. Als mögliche Ursache wäre eine vermehrte Andauung des Tumorgewebes durch die kleinere Gewebemenge und erhöhte Oberfläche einer Stanze bei der Antigenaufbereitung durch Kochen in Säuren (CD10: Zitronensäure bei pH 7; IgD: Zitronensäure bei pH 5,5) denkbar. Diese erhöhte Gewebeschädigung führte zu einer stärkeren Bindung dieser Antikörper im Gewebe und damit zu einer intensiveren unspezifischen Färbung. Jedoch werden auch weitere immunhistochemische Färbungen, wie beispielsweise die Färbung mit BCL-2 mit Zitronensäure vorbehandelt, wo eine erhöhte Hintergrundfärbung allerdings nicht zu beobachten war. Damit scheinen einige Antikörper leichter unspezifisch zu binden als andere, vor allem wenn sie, wie im Fall von IgD polyklonalen Ursprungs sind.

Die zweite Gruppe setzt sich aus Markern zusammen, die nicht homogen im Tumor exprimiert werden, wie p53, p21, p27, Ki67 und die Marker der sekretorischen Differenzierung (κ , λ und IgM). P53-, p21-, p27-Antikörper färben Antigene im Kern der Lymphomzellen. Sie werden nicht von jeder Tumorzelle

exprimiert, sondern nur von einem bestimmten Prozentsatz. Ki67, auch ein im Kern exprimiertes Antigen, kommt nicht gleichmäßig auf den gesamten Tumor verteilt vor, sondern tritt regional gehäuft auf (hot spot).

IgM und die Leichtketten kappa und lambda sind Oberflächenantigene. Sie werden jedoch bei sekretorisch differenzierten Lymphomen in einzelnen verstreut liegenden Tumorzellen im Zytoplasma, d.h. unter anderem auch in der perinukleären Zisterne exprimiert. Diese monotypische sekretorische Differenzierung für IgM und/oder kappa/lambda wurde in 91% der Fälle richtig gesehen. In 9% jedoch wurde die sekretorische Differenzierung des Tumors am Tissue array nicht erkannt. Sekretorisch differenzierte Lymphome exprimieren die Leichtkette kappa/lambda oder das komplette Immunglobulin vom am häufigsten vorkommenden Typ IgM nicht in jeder Zelle, sondern nur in wenigen zufällig auf den Tumor verteilt liegenden. Deshalb ist es zum einen ein zufälliges Ereignis, ob eine kappa oder lambda exprimierende Zelle in einem sekretorisch differenzierten Lymphom überhaupt erfaßt wird. Zum anderen besteht die Schwierigkeit in der Auswertung des monotypischen zytoplasmatischen Immunglobulins darin, daß drei verschiedene Färbungen und damit drei verschiedene Arrayschnitte miteinander verglichen werden müssen. Sowohl am herkömmlichen Schnittpräparat, als auch am Array ist die Morphologie auf den zu vergleichenden Schnitten nicht exakt identisch. Da aber das für die Auswertung zur Verfügung stehende Areal am Array sehr klein ist, ist man gezwungen die Auswertung auf eine begrenzte Zahl von Tumorzellen zu beziehen. Das wird insbesondere dann schwierig, wenn das auszuwertende Merkmal, wie im Falle der zytoplasmatischen Differenzierung, nicht homogen in allen Tumorzellen gleichmäßig vorhanden ist und entsprechende Areale zusätzlich unterschiedlich fixiert sind.

Auch p53 ist ein Marker, der nicht im gesamten Tumor gleichmäßig exprimiert wird. In 8% der verglichenen Fälle wurden die strengen Auswertekriterien die zu Beginn der Studie gewählt wurden, nicht erfüllt. Das Prozentergebnis des Arrays durfte nicht mehr als 10% vom Ergebnis des herkömmlichen Schnitts abweichen, sonst wurde der Fall als nicht übereinstimmend gewertet. Die Kriterien für die Erfassung der p53 Expression variieren stark in der Literatur. Einige Autoren werten p53 nur als positiv oder negativ mit unterschiedlichen Grenzwerten (Greiner et al., 1996 wertete p53 als positiv, wenn mehr als 5% der Zellen positiv waren und bei Quintanilla-Martinez et al.

1998 war p53 positiv, wenn mehr als 20% der Tumorzellen p53 exprimieren), während andere Autoren die Angabe der positiven Tumorzellen in Prozent bevorzugen (Villuendas et al. 1997).

Wäre p53 anstatt in 10 % Schritten nur positiv oder negativ verglichen worden, (positiv $\geq 20\%$; negativ $< 20\%$), so wäre das Ergebnis in 97% der Fälle reproduzierbar gewesen. Nur in 3% wurde also das für den gesamten Tumor repräsentative Areal verfehlt (=sampling error).

Bei den MCL verhält es sich sehr ähnlich. 7 Fälle stimmten nicht mit den Daten am Schnitt überein, wobei 4 zu hoch eingestuft wurden und 3 zu niedrig (Abweichung $>10\%$ Regel). Davon wären 6 Fälle (5 klassische, 1 blastoides MCL) allerdings richtig als positiv oder negativ klassifiziert worden. Ein Fall jedoch wäre am Array nicht als positiv erkannt worden (1 blastoides MCL).

Jedoch wurde auch bei Einhaltung strenger Auswertekriterien eine hohe Übereinstimmung von 92% erzielt.

Einen Sonderfall stellte die Erfassung von Ki67 dar. Der höchste Prozentsatz an Ki67 Expression im Tumor wurde als Proliferationsindex verwendet. Auf gleiche Weise wurden auch die Stenzen des Arrays ausgewertet. Dabei stellte sich aber heraus, daß dadurch Ki67 in nur in insgesamt 71% aller Fälle mit der Auswertung am Schnitt übereinstimmte, jedoch die durchschnittliche Ki67 zu 90% erfaßt wurde. Die Fläche der einzelnen Stanze ist mit nur 0,28 mm² sehr klein. Mit 5 Stenzen kann die maximale Expression von Ki67 nur mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit getroffen werden. Diese Trefferwahrscheinlichkeit ist direkt von der Größe des Areals mit der maximalen Ki67 Expression im Tumor abhängig. Je kleiner das Areal ist, desto niedriger die Trefferwahrscheinlichkeit und umgekehrt (vgl. Abb. 3 in Material und Methoden)

Erstreckt sich die maximale Expression von Ki67 beispielsweise auf 1/5 der Tumorfläche, so kann diese mit 5 Stenzen nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 68% getroffen werden. Die restlichen 32% liegen entweder im Durchschnitt der Tumorexpression oder darunter (vgl. Abb. 3 in Material und Methoden).

Dieser Zusammenhang spiegelt sich auch in den Ergebnissen wider.

In der Gruppe der Mantelzell-Lymphome ergab sich eine Übereinstimmung von 83% mit dem Hotspot. Die klassischen MCL weisen im Gegensatz zu den DLBL einen niedrigeren Proliferationsindex mit geringerer Schwankungsbreite auf. Auch ist der

Tumor in seiner Morphologie etwas gleichmäßiger strukturiert, was das bessere Vergleichsergebnis erklären könnte.

Unsere Ergebnisse belegen deutlich, daß die Ergebnisse, die mit dem Gewebemicroarray für die Analyse von homogen exprimierten Markern exzellent anwendbar sind und sowohl verlässliche als auch reproduzierbare Ergebnisse liefern. Auch für die Quantifizierung nicht homogen exprimierter Antigene wie p27 und p21, sowie die monotypische sekretorische Differenzierung ist die Methode gut geeignet. Je nach gefordertem Kriterium liefert der TMA auch für p53 und die durchschnittliche Ki67 Expression verlässliche Zahlen. Für die Ermittlung der maximalen Ki67 Expression erscheint diese Methode nur bedingt geeignet.

4.4. Vergleich der Antikörper CD5, CD10 und BCL-2 für Frischmaterial mit den entsprechenden Paraffinantikörpern.

Für zahlreiche Antigene, die zunächst nur am Frischmaterial nachgewiesen werden konnten, sind neuerdings auch Antikörper für Paraffinschnitte erhältlich. Antigene von Tumoren, die in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet wurden, sind durch Antikörper ungleich schwerer nachzuweisen. Formalin bildet mit Proteinen Aldehydvernetzungen, die die Tertiärstruktur von Proteinen verändern, die Sekundärstruktur bleibt jedoch erhalten (Werner et al. 2000). Dadurch wird unter Umständen das Binden von Antikörpern verhindert. Die nachzuweisenden Antigene sind dadurch maskiert. Deshalb muß das Paraffingewebe zur Aufbereitung in Puffern oder Enzymen gekocht werden, damit die nachzuweisenden Antigene wieder demaskiert werden und die Antikörper wieder an die entsprechende Epitope binden können (Rüdiger et al 1998). Aber unterscheiden sich die Antikörper für Frischmaterial und Paraffinmaterial in ihrem Färbeverhalten bei NHL voneinander?

Um dieser Fragestellung nachzugehen haben wir die Ergebnisse zwischen Frischmaterialantikörpern (für CD10, CD5 und BCL-2) und Antikörpern für das gleiche Antigen in Paraffinmaterial am TMA verglichen. Stimmt die beiden Ergebnisse nicht miteinander überein, so wurde der Paraffinmarker am herkömmlichen Schnitt nochmals wiederholt. Für CD5 und BCL-2 wurden im Frischmaterial mehr Fälle als positiv bewertet, als mit dem Marker für Paraffin (CD5:

1 Fall , BCL-2: 3 Fälle). Unterschiedliche Ursachen können dafür in Betracht kommen. Zum einen haben sowohl die Fixierung und Aufbereitung, zum anderen auch die Demaskierung der Epitope, sowie die Sensitivität des Nachweissystems einen bedeutenden Einfluß auf das Färbeergebnis (Werner et al. 2000). Denkbar wäre, daß die entsprechenden Tumoren nicht ausreichend oder zu lange in Formalin fixiert worden waren, jedoch zeigten sich in der Färbung am gesamten Lymphknoten keine regionalen Färbeunterschiede (z.B. eine intensivere subkapsuläre Färbung) und darüber hinaus wurden alle Stenzen aus subkapsulären oder im HE Schnitt als gut fixierte Bereiche gekennzeichneten Arealen entnommen, was eine Verfälschung der Färbeergebnisse durch unzureichende Fixierung minimierte. Naheliegender ist es jedoch, da der CD5-Antikörper für Paraffinmaterial einem anderen Klon als dessen Frischmaterialkorrelat angehört, daß er aus unterschiedlichen Gründen an das entsprechende Protein nicht binden konnte und es sich deshalb dem immunhistochemischen Nachweis entzog (z.B. wurde das entsprechende Antigen durch die Vorbehandlung nicht demaskiert, oder aber der Antikörper für Paraffinmaterial bindet an ein anderes Epitop, das in einem Komplex mit einem anderen Molekül maskiert war oder durch die Fixierung oder Vorbehandlung verändert oder geschädigt wurde). Der BCL-2 Antikörper entstammt für Frischmaterial als auch für Paraffinmaterial dem gleichen Klon (vgl. Material und Methoden). Möglicherweise wurde das Antigen nicht ausreichend demaskiert oder wurde während der Antigenaufbereitung (antigen retrieval) geschädigt und somit dem Nachweis entzogen. Der Antikörper büßt somit nach unseren Daten im Paraffinmaterial einen Teil seiner Sensitivität ein.

Das CD10 Antigen wurde hingegen häufiger am Paraffinmaterial als am Frischmaterial nachgewiesen. Auch wenn sich die Färbung am Tissue Microarray intensiver darstellt als am herkömmlichen Schnitt, so zeigte sich auch in der Nachschnittüberprüfung eine Intensität, die immer noch deutlich über der der allgemeinen Hintergrundfärbung lag. Diese Expression war zweifelsfrei auf die Zellmembran beschränkt und fand sich nicht unspezifisch interstitiell. Der Paraffinmarker scheint demzufolge sensitiver für das CD10 Protein zu sein.

Die meisten Autoren, die sich mit dem Färbeverhalten von CD10 für Paraffinmaterial beschäftigten, zogen zum Vergleich durchflußzytometrische Daten heran (Kaufmann et al. 1999, Chen et al. 2000 und Bavikatty et al. 2000) und erzielten sehr hohe Übereinstimmungen (97 bzw. 98% bei Kaufmann bzw. Bavikatty).

McIntosh et al. jedoch untersuchten bereits für CD10 (Durchflußzytometrie oder Immunhistochemie am Frischmaterial) charakterisierte Fälle von juveniler ALL mit dem für Paraffin geeigneten Antikörper NCL-CD10-270 (dieser Antikörper wurde auch in unserer Studie verwendet). Dabei stellte sich heraus, daß 4 von 9 Fälle, die ursprünglich als CD10 negativ diagnostiziert wurden mit NCL-CD10-270 reagierten und deshalb eine höhere Sensitivität für diesen Antikörper vermutet wurde. Jedoch wurde in dieser Studie nicht unterschieden, ob die oben beschriebenen Fälle zuvor mit Hilfe der Durchflußzytometrie oder dem Frischmaterial Antikörper für CD10 als negativ eingestuft wurden (McIntosh et al. 1999).

Kurtin et al. 1999 hingegen verglichen für unterschiedliche Entitäten von „low-grade“ B-NHL den Frischmaterialantikörper für CD10 zusammen mit den Durchflußzytometrieergebnissen mit dem Paraffinantikörper NCL-CD10-270 von Novocastra. Dabei wurden 3 folliculäre Lymphome gefunden (von 59 Fällen: 5%), die am Frischmaterial und in der durchflußzytometrischen Untersuchung negativ waren, sich aber mit dem Paraffinantikörper anfärben ließen. Alle Fälle zeigten eine zytoplasmatische CD10 Expression, die durch Durchflußzytometrie nicht erfaßt werden konnte, da diese Methode nur Antigene, die nur auf die Tumoroberfläche exprimiert werden nachweisen kann. Warum sich das CD10 Antigen in diesen Fällen dem Nachweis durch den Frischmaterialantikörper entzog, wurde nicht diskutiert. Jedoch führten Kurtin et al. dieses Färbeverhalten auf eine höhere Sensitivität von CD10 am Paraffinmaterial zurück. Ein Fall war sowohl am Frischmaterial und in der Durchflußzytometrie positiv, nicht aber mit dem Paraffinantikörper. Diese Ergebnisse spiegeln exakt unsere Erfahrungen mit dem Vergleich dieser beiden Antikörpertypen an hochmalignen B-NHL wieder (von Kurtin et al. 1999 nicht untersucht). Der CD10 Antikörper für Paraffinmaterial erfaßt demzufolge CD10 nicht nur bei „low-grade“ B-NHL sensitiver, als sein Frischmaterialkorrelat.

4.5. Immunphänotypisierung von 210 NHL vom B-Zell Typ

Anhand des Vergleichs von Tissue Microarray-Ergebnissen mit herkömmlichen Schnittpräparatergebnissen wurde bereits gezeigt, daß der Tissue Microarray eine sehr gute Methode darstellt, Lymphome immunhistochemisch zu untersuchen.

Von allen 210 NHL vom B-Zell Typ wurde eine Immunphänotypisierung mit Charakterisierungsmarkern wie CD20, CD3, CD5, CD23 und Antikörpern der

Zellzyklusregulation wie p27 und p21, Antikörper für Proliferation (Ki67), Apoptoseregulation u.a. (p53 und BCL-2) und Differenzierungsstadium (sekretorische Differenzierung) vorgenommen. Dabei zeigte sich, daß alle untersuchten Lymphome die Charakterisierungsmarker entsprechend ihrer Entität exprimierten. Alle B-NHL exprimierten CD20 und keines CD3. Alle MCL waren für CD5 positiv und CD23 negativ. Alle FL (FL Grad1-3a und Grad3b) exprimierten CD10. Diese Marker sind allerdings für die Zuordnung zu einer Entität nicht zwingend erforderlich. In der Literatur wurden sowohl CD5 negative MCL (Kaptain et al. 1998) als auch CD10 negative FL (Kurtin et al. 1999) beschrieben.

Innerhalb der Gruppe der DLBL bestanden die größten Unterschiede. Insbesondere lagen deutliche immunophänotypische Unterschiede zwischen den nodalen und den extranodalen DLBL vor. In der Gruppe der nodalen DLBL exprimierten 10% CD5, jedoch kein extranodales DLBL. Auch zeigten 24% der nodalen DLBL Fälle eine Expression für IgD, jedoch keine extranodalen. Ebenso war eine Expression von p27 (32%) nur auf die Gruppe der nodalen DLBL beschränkt. CD23 wurde gleichfalls nicht exprimiert. Kroft et al. 1998 zeigte, daß sowohl sämtliche niedrigmalignen MALT Lymphome, als auch alle extranodal hochmalignen DLBL des Magens CD23 negativ waren. Diese Ergebnisse legen nahe, daß nodale und extranodale DLBL immunophänotypisch zwei unterschiedliche Entitäten sind.

Die einzelnen Subgruppen der nodalen DLBL nach der Kiel Klassifikation unterschieden sich kaum voneinander. Jedoch waren 7 von 8 immunoblastischen DLBL für p27 positiv (statistisch signifikant: $p < 0,001$ Vierfeldertest) im Gegensatz zu 9 von 42 nodalen zentroblastischen DLBL. Ein gleichhoher Prozentsatz wird auch in der neuen WHO Klassifikation (Jaffe et al. 2001) für DLBL beschrieben, wobei aber nicht zwischen nodal und extranodal unterschieden wird. Von Sanchez-Beato et al. 1999 wurde ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer p27- und einer CyclinD3-Überexpression gefunden. Stark CyclinD3 exprimierende hochmaligne Lymphome zeigten auch eine hohe Expression für p27.

Darüber hinaus zeigten 3 der 5 multilobulierten zentroblastischen Lymphome (nach Kiel) eine Überexpression für p53 (statistisch signifikant: $p = 0,04$ Vierfeldertest) im Vergleich zu den restlichen nodalen DLBL.

In der Gruppe der FL3b mit DLBL Komponente fanden sich keine CD5 oder CD23 positiven Fälle. Darüberhinaus waren nur 47% der Fälle CD10 positiv und 54% der

Fälle exprimierten p53. Dieser Phänotyp zeigt große Parallelen zum Phänotyp der DLBL und weniger dem der FL. Jedoch wurde ähnlich den Ergebnissen der FL in einem hohen Prozentsatz BCL-2 (98%) exprimiert. Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse von Ott et al. (Ott et al. 2002) legen u.a. aufgrund des seltenen Auftretens der für FL typischen Translokation t(14;18) in der Gruppe der FL3b mit DLBL Anteil eine de novo Entstehung nahe und nicht eine Entdifferenzierung eines vormals bestehenden FL. Der hier gezeigte Immunophänotyp dieser Subgruppe ist hiermit sehr gut vereinbar und legt die Vermutung nahe, daß die BCL-2 Expression in dieser Entität über einen anderen Mechanismus als die t(14;18) aktiviert wird.

Trotz der inhomogenen Tumormorphologie der FL konnten die immunhistochemischen Charakteristika dieses Lymphomtyps ohne Schwierigkeiten ermittelt werden. Alle FL zeigten eine Reaktivität für CD10 und bis auf einen Fall auch alle mit BCL-2 (FL Grad3b). 33% der untersuchten FL Grad1-3a und 2 von 3 FL Grad3b waren für CD23 positiv. Interessanterweise wurde nur in einem Fall eine Positivität für p27 (FL Grad2 diffus) gefunden und alle Fälle waren sowohl für p53 als auch für p21 negativ.

In der Gruppe der MCL fanden sich kaum Unterschiede hinsichtlich der untersuchten immunhistochemischen Färbungen zwischen der klassischen und der blastoiden Variante. Beide Gruppen exprimierten IgD, p53, p27 und BCL-2 in nahezu gleichgroßem Maße. Es wurden keine erhöhten Expressionsraten von p27 bzw. p53 bei den blastoiden MCL gefunden, wie sie bei Quintanilla-Martinez beschrieben wurden. Jedoch bleibt zu bedenken, daß bei 3 p53 positive blastoide MCL während der Aufbereitung des Tissue Microarray 4 Stenzen verloren gingen und diese Fälle deshalb aus der Wertung genommen werden mußten. Wären diese Fälle mit in die Auswertung eingegangen, wären 50 % aller blastoiden MCL p53 positiv gewesen (10 von 20 Fällen), was einen signifikanten Unterschied zu den klassischen MCL bedeutet hätte.

Vergleicht man die in dieser Arbeit ermittelten immunophänotypischen Profile der einzelnen Lymphomentitäten, so zeigt sich eine große Übereinstimmung mit den in der Literatur befindlichen Daten (vgl. Tabelle 7). Jedoch gestaltet sich der Vergleich insbesondere für nicht homogen exprimierte Marker schwierig, da die jeweiligen Autoren unterschiedliche Positivitätskriterien gewählt haben, was einen direkten

Vergleich unmöglich macht. Deshalb sind in der folgenden Zusammenfassung nur Marker mit homogener Expression aufgeführt.

Tabelle 7:

Nodale und extranodale diffuse großzellige B-Zell Lymphome:

positiver Antikörper	Daten aus der Literatur	Daten dieser Arbeit
CD5	10% (Jaffe et al.2001)	10% nodal/ 0% extranodal
CD10	25-50% (Jaffe et al. 2001)	34% nodal/ 53% extranodal
Sekretorische Differenzierung	50-75% (Jaffe et al. 2001)	46% nodal/ 37% extranodal
p53	40% (Pezzella et al. 1993) 47%/24% (Gascoyne et al. 1997) 60% nodal (Chung-Che et al. 2000) 20% extranodal (Chung-Che et al. 2000)	20% nodal/ 21% extranodal
BCL-2	30-50% (Jaffe et al. 2001) 66% (Pezzella et al. 1993)	58% nodal/58% extranodal

Follikuläre Lymphome:

positiver Antikörper	Daten aus der Literatur	Datendieser Arbeit
CD10	92% (Kurtin et al. 1999)	100%
CD23	12% (Kurtin et al. 1999)	33% FL Grad1-3a 67% FL Grad 3b
p53	12% (Pezzella et al. 1993)	0%
BCL-2	100% (Grad1) - 75% (Grad3) (Jaffe et al.) 82% (Pezzella et al. 1993)	100% Grad 1-3a 67% Grad 3b

Mantelzell Lymphome:

positiver Antikörper	Daten aus der Literatur	Daten dieser Arbeit
CD10	0% (Kurtin et al.1999) positive Fälle existieren (Jaffe et al. 2001)	0% der blastären MCL 4% der klassischen MCL
CD5	100% (Kurtin et al. 1999) negative Fälle existieren	100%
CD23	0% (Kurtin et al. 1999) schwach positive Fälle existieren (Jaffe et al. 2001)	0%
BCL-2	100% (Jaffe et al. 2001)	100%

4.6. Vergleich der Expression von Ki67, p53, p21 und p27

Das Tumorsuppressorgen p53, das auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p13.1) lokalisiert ist, spielt eine bedeutende Rolle in der Zellzyklusregulation, der Erhaltung der genomischen Stabilität und der Regulation der Apoptose. Im Falle einer DNA Schädigung aktiviert p53 als Transkriptionsfaktor den cyclinabhängigen Kinase (CDK) Inhibitor p21, der zu einem Verbleiben der Zellen in der späten G1 Phase des Zellzyklus führt. In reaktiven Zellen gibt dieser Vorgang der Zelle ausreichend Zeit, einen DNA Schaden vor erneutem Eintritt in die Mitosephase zu reparieren, damit dieser nicht an ihre Tochterzellen weitergegeben wird. Darüberhinaus aktiviert p53 direkt die Transkription von DNA Reparaturproteinen. Kann der DNA-Defekt nicht ausreichend behoben werden, so wird via p53 die Apoptose der betreffenden Zelle eingeleitet. Ist p53 hingegen defekt, bleibt der programmierte Zelltod aus und es treten zusätzliche Mutationen durch das Fehlen von effektiven DNA Reparaturmechanismen auf. Dies führt letztlich zu einer genomischen Instabilität des Tumors.

Aus diesem Grund, ist die Inaktivierung von p53 ein wichtiger Schritt in der Lymphomentwicklung und Progression. In den meisten Fällen ist die p53 Inaktivierung in Lymphomen durch die Deletion eines Allels und zusätzliche Mutation des anderen Allels bedingt.

Diese zusätzliche Mutation führt zu einem stabilen p53-Transkriptionsprodukt, das durch immunhistochemische Färbungen nachweisbar wird, aber nicht mehr in der Lage ist, p21 zu aktivieren. Deshalb ist ein p53+/p21- Phänotyp eines Lymphoms ein indirekter Hinweis auf die Inaktivierung von p53 durch die oben beschriebenen Mechanismen (Villuendas et al. 1997). P53 Inaktivierung wurde in bis zu 30% von DLBL und MCL beschrieben (Hernandez et al. 1996, Villuendas et al. 1997). Auch in unserer Studie wurde in 20% der nodalen DLBL, 21% der extranodalen DLBL und 27% der MCL eine auf eine Mutation des Gens hinweisende Überexpression von p53 nachgewiesen. Davon hatten 9 nodale DLBL, 4 extranodale DLBL, 5 FL Grad 3b mit DLBL Anteil und 19 MCL den Phänotyp p53+/p21-. Auf zytogenetischer Ebene (klassische Zytogenetik und FISH Analyse) zeigten 6 von 10 nodalen DLBL, einer von 4 der extranodalen DLBL und 3 von 4 der FL3b mit DLBL Anteil (alle mit dem Phänotyp p53+/p21-), Deletionen des p53 Locuses (Kriterium $\geq 20\%$ als positiv; vgl. hierzu Tabelle 3 und 4).

Diese Daten unterstreichen die enge Korrelation von p53 Inaktivierung und dem Phänotyp p53+/p21-. In einigen Fällen jedoch war die Inaktivierung von p53 nicht an eine Deletion des p53 tragenden Allels gekoppelt, was auf andere Inaktivierungsmechanismen wie beispielsweise die Mutationen beider Allele schließen läßt.

Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es als durchaus sinnvoll zu erachten, die Grenze zwischen p53 positiv und p53 negativ bei 20% der positiven Tumorzellen zu setzen, da sich bei keinem der untersuchten B-NHL mit einer immunhistochemischen p53 Expression von unter 20% eine Deletion nachweisen ließ.

Ein Gegenspieler von p53 ist BCL-2. Dieses Oncogen inhibiert den programmierten Zelltod. Somit haben Tumoren, die sowohl mutiertes p53 als auch BCL-2 überexprimieren auf zwei Ebenen die Fähigkeit zur Steuerung der Apoptose verloren. Pezzella et al fanden in ihren Untersuchungen an NHL verschiedener Entitäten (DLBL, ATCL, CLL, HCL und FL; MCL wurden nicht untersucht) eine inverse Korrelation zwischen p53 und BCL-2. Jedoch kamen in ihren Daten in der Gruppe der p53 positiven DLBL in gleichen Anteilen BCL-2 positive wie BCL-2 negative Fälle vor. Auch in unserer Studie kamen in der Gruppe der p53 positiven DLBL (mit inaktiviertem p53!) BCL-2 positive und BCL-2 negative Fälle in gleichen Anteilen vor. p53 positive MCL jedoch exprimierten ausnahmslos BCL-2 (13 Fälle starke Färbeintensität und 7 Fälle schwache BCL-2 Färbeintensität). Dieses Ergebnis läßt

eine deutliche Apoptoseregulationsstörung in einer Subgruppe dieser Entität vermuten, da in 13 von 74 Fällen (18%) sowohl die Induktion der Apoptose gestört ist (durch inaktiviertes/mutiertes p53, da p53+/p21-) als auch eine starke Inhibition der Apoptose durch eine starke Expression von BCL-2 gegeben ist. In der Gruppe der DLBL waren es hingegen nur 10 von 82 (12%).

Hochmaligne Lymphome mit dem Phänotyp p53+/p21-/BCL-2+ besitzen eine noch schlechtere Prognose, als Tumoren die isoliert p53 überexprimieren (Piris et al. 1994, Piris et al. 1995).

Darüberhinaus ließ sich jedoch kein genereller Zusammenhang zwischen p53- und BCL-2 Expression herstellen. BCL-2 wurde in allen untersuchten Entitäten sowohl in Kombination mit p53 als auch ohne p53 exprimiert.

Zwei Gruppen von cyclinabhängigen Kinaseinhibitoren sind bis dato bekannt. Die CIP Familie, die von p27, p21 und p57 gebildet wird, ist in der Lage, alle cyclinabhängigen Kinasen (CDK) der Zellzyklusregulation zu hemmen, während die INK4 Familie, die aus p15, p16, p18, p19 besteht, nur CDK 4 und 6 hemmen können. P27 vermittelt somit den Zellarrest in der G1 Phase, indem es unter anderem den CyclinE/CDK2 Komplex, der für den Eintritt der Zelle in die S-Phase benötigt wird, hemmt. Deshalb wird p27 in ruhenden Zellen von nicht neoplastischem Gewebe stärker exprimiert, als in proliferierenden (Kato et al. 1994).

Gerade in MCL spielen CDKs wegen der Deregulation von CyclinD1, dem kritischen Cyclin der G1-Phase eine wichtige Rolle (Quintanilla-Martinez et al. 1998). CyclinD1 interagiert in nicht neoplastischen Zellen mit p27. Während in den meisten niedrigmalignen B-NHL eine umgekehrte Korrelation zwischen p27 und Proliferationsindex (Ki67) gefunden wurde (Sanchez-Beato et al. 1997), wurde bei den MCL keine Übereinstimmung zwischen Ki67 und p27 gezeigt (Quintanilla-Martinez et al. 1998). Die meisten klassischen MCL sind für p27 negativ. Dies ergab sich auch bei der Untersuchung der MCL mit dem Tissue Microarray, jedoch war kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit von p27 zwischen der klassischen Form und der blastoiden Variante (9% versus 15%) ersichtlich.

32% der nodalen DLBL und 20% aller DLBL (nodal, extranodal und FL3b mit DLBL Anteil) zeigten trotz eines hohen Proliferationsindex eine erhöhte Expression für p27 ($\geq 30\%$). Es bestand jedoch kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Ki67 Expression und der Expression von p27 (vgl. Tabelle 4).

In der Literatur werden in der Gruppe der hochproliferativen DLBL ebenfalls positive Fälle beschrieben (20% [4 von 20 Fällen] bei Quantanilla Martinez et al. 1998, 7% [3 von 45 Fällen] bei Sánchez-Beato et al. 1997 und 30% [14 von 46] bei Sanchez-Beato et al. 2001). Diese Überexpression kommt durch die Freisetzung von p27 aus dem p27/CDK2 Komplex zustande das dann mit Cyclin D3 eine neue Verbindung eingeht. P27 ist dort inaktiviert und stabilisiert und damit der immunhistochemischen Färbung zugänglich. (Sanchez-Beato et al. 1999). Für diese Fälle wurde in der Literatur eine ungünstige Prognose beschrieben (Saez et al. 1999 und Vrhovac et al. 1998).

Interessanterweise sind in dieser Arbeit alle p21 positiven Fälle ($\geq 20\%$) der nodalen DLBL auch für p27 positiv (3 Fälle p53-/p21+/p27+; ein Fall p53+/p21+/p27+), jedoch fehlte dieser Zusammenhang in der Gruppe der MCL. Diese Beobachtung könnte im Bereich der nodalen DLBL für eine Aktivierung von p21 und p27 durch einen gemeinsamen Mechanismus sprechen. Auch gerade deshalb, weil diese beide CDK-Inhibitoren der gleichen Subgruppe angehören.

In der Gruppe der MCL scheint p21 jedoch über andere Mechanismen hochreguliert zu werden, ohne dabei p27 zu aktivieren.

In der Korrelation von p27 und p53 zeigte sich im Gegensatz zu anderen Autoren (Sanchez-Beato et al. 2001) in den verschiedenen Entitäten kein Zusammenhang. Allerdings waren alle klassischen MCL mit einer Überexpression von p27 negativ für p53, während aber 2 der 3 p27 positiven blastoiden MCL eine Positivität für p53 aufwiesen. Diese blastoiden MCL scheinen demzufolge im Laufe ihrer Pathogenese weitere genomische Aberrationen (Mutationen und Deletionen) anderer zellzyklusregulierender Gene hinzugewonnen zu haben, was auf eine hohe genomische Instabilität dieser Subgruppe hinweist.

5. Zusammenfassung

Der Gewebe Mikroarray ist eine sehr effiziente Methode, eine große Anzahl von Lymphomen in kurzer Zeit und unter gleichen Färbebedingungen zu untersuchen. Eine vorherige Auswahl des optimalen Tumorareals am HE Schnitt erhöht die Zahl der auswertbaren Fälle deutlich (92% versus 80%).

In der vorliegenden Studie wurden hohe Übereinstimmungen im Bereich der homogen exprimierten Marker (zwischen 88% und 100%) erzielt. Auch für die nicht homogen exprimierten Marker wie p53 und p21 konnte eine hohe Korrelation (p53: 92%, p21: 90%) zwischen den Ergebnissen des Gewebemicroarrays und dem herkömmlichen Schnittpräparat gezeigt werden. Schwierigkeiten ergeben sich nur in der Erfassung von regional begrenzten Überexpressionen („hot spot“), hier am Beispiel der Maximalexpression des Proliferationsmarkers Ki67 untersucht. Es stimmten die Ergebnisse des Gewebe-Microarrays nur in 71% der DLBL-Fälle mit denen am herkömmlichen Schnittpräparat überein, jedoch wurde in 90% dieser Fälle die durchschnittliche Ki67 Expression erfaßt.

Im Vergleich von immunhistochemischen Färbungen am formalinfixierten Paraffinmaterial mit denen am kryoasservierten Frischmaterial konnte für den Antikörper CD10 eine höhere Sensitivität am Paraffinmaterial gezeigt werden. 6 Fälle waren nur am Paraffinmaterial positiv. Das Gegenteil war für BCL-2 der Fall. Hier hatte der Frischmaterialantikörper eine höhere Sensitivität. 3 Fälle waren ausschließlich am Frischmaterial positiv. Der Paraffinmarker für CD5 lieferte nahezu gleiche Ergebnisse wie sein Frischmaterialkorrelat. Nur ein Fall war am Frischmaterial positiv.

Darüber hinaus wurde für 7 ausgewählte Entitäten von NHL (DLBL nodal, DLBL extranodal, FL Grad 1-3a, FL Grad 3b, FL Grad 3b mit DLBL Anteil, klassische MCL und blastoide MCL) ein Immunophänotyp erstellt. Es zeigte sich, daß sich die nodalen DLBL von den extranodalen deutlich voneinander abgrenzten. Nodale DLBL exprimierten sowohl CD5 (10%), CD23 (12%) als auch p27 (32% der Fälle), während die untersuchten extranodalen DLBL diese Marker nicht exprimierten. Auch die Gruppe der FL Grad3b mit DLBL Anteil grenzte sich immunophänotypisch von der Gruppe der FL Grad1-3a und FL Grad 3b ab. FL Grad1-3a als auch FL Grad 3b

exprimierten beide zu 100% CD10, während bei den FL Grad3b mit DLBL-Anteil dieser Marker nur in 46% der Fälle positiv war. Auch wurde CD23 in der Gruppe der FL Grad3b mit DLBL-Anteil nicht exprimiert, im Gegensatz zu der Gruppe der FL Grad 1-3a (33%) bzw. Grad 3b (67%). P53 hingegen war in 38% der FL Grad3b mit DLBL-Anteil positiv, jedoch in keinem FL Grad1-3a und FL Grad3b.

Von den NHL, die in 10 bis 20% der Tumorzellen p53 exprimierten, wurde in keinem Fall eine Deletion für den p53 Locus auf 17p13 mittels klassischer Zytogenetik oder Fluoreszenz in situ Hybridisierung gefunden. P53 war ebenfalls bei einer Expression von mehr als 20% der Tumorzellen nicht deletiert, wenn p21 in gleich hohem Prozentsatz mit exprimiert wurde. Damit konnte ein mit einer Deletion für p53 korrelierender „cut-off“ von mehr als 20% p53 positiver Tumorzellen bei niedriger p21 Expression festgelegt werden.

Hinsichtlich der Korrelation von p27 mit Ki67 oder p53 ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge.

6. Literaturverzeichnis:

1. Alizadeh AA, Eisen M, Davis R et al, Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling, *Nature*, Vol 403, 3 Feb 2000, p 503-11
2. Anon. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 1997; 89:3909-3918
3. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project: *J Clin Oncol* (1998) 16:2780-2795).
4. Auer IA, Cascoyne RD, Connors JM, Cotter FE, Greiner TC, Sanger WG, Horsman DE (1997) t(11;18)(q21;q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. *Ann Oncol* 8: 979-985
5. Bavikatty NR, Ross CW, Finn WG, Schnitzer B, Singleton TP. Anti-CD10 immunoperoxidase staining of paraffin-embedded acute leukemias: comparison with flow cytometric immunophenotyping. *Hum Pathol* 2000; 31(9):1051-4
6. Camp RL, Charette LA, Rimm DL: Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest* 2000; 80:1943-1949
7. Cerroni L, Zochling N, Putz B, Kerl H (1997). Infection by *Borrelia burgdorferi* and cutaneous B-cell lymphoma. *J Cutan Pathol* 24: 457-461
8. Chen CC, Raikow RB, Sonmez-Alpan E, Swerdlow SH. Classification of small B-cell lymphoid neoplasms using a paraffin section immunohistochemical panel. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000;8(1):1-11

9. Chung-Che Chang et al ; Expression of c-Myc and p53 correlates with clinical outcome in diffuse large B-cell lymphomas, *Am J Clin Pathol* 2000;113:512-518
10. Cioffier et al CHOP chemotherapy plus Rituximab in elderly patients with DLBL; *NEJM*, Jan 24 2002, Vol 346, p 235-42
11. Cordone I, Masi S, Mauro FR et al. P53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood* 1998;91:4342-4349
12. Cotran R, Kumar V, Collins T et al. *Robbins pathologic basis of disease*. 6th edition, W.B. Saunders company 1999.
13. Cuneo A, Bignoni R, Rigolin GM, Roberti MG, Bardi A, Piva N, Milani R, Bullrich F et al., (1999). Cytogenetic profile of lymphoma of follicle mantle lineage: correlation with clinicobiologic features. *Blood* 93: 1372-1380
14. Fallini B, Pileri S, Zinzani PL; Carbone A, Zagonel V, Wolf-Peeters C, Verhoef G, Menestrina F, Todeschini G, Paulli M, Lazzarino M et al. (1999). ALK + lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood* 93: 2697-2706.
15. Gascoyne RD et al; Prognostic significance of Bcl-2 Protein expression and bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive NHL (1997). *Blood* 90(1): 244-51
16. Gascoyne RD, Aoun P, Wu D, Chhanabhai M, Skinnider BF, Greiner TC, Morris SW, Connors JM, Vose JM, Weisenburger DD (1999). Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 93: 3913-3921
17. Greiner TC, Moynihan M., Chan W. et al. P53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis (1996). *Blood* 87:4302-4310

18. Hamblin TJ et al, CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease (2002). *Blood* 99(3):1023-1029
19. Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, Stuschke M, Roggendorf M, Schwartz RA, Seeber S. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 2: pathogenesis, Castleman's disease, and pleural effusion lymphoma. *Lancet Infect Dis* 2002 Jun; 2(6):344-52.
20. Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay MF, Briere J, Lavignac C, Fillet G, Salles G, Marolleau JP, Diebold J, Reyas F, Gaulard P. Prognostic significance of bcl-2 expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) (1996). *Blood* 87(1) :265-72
21. Herold G et al. *Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung* 1999, Köln.
22. Hernandez L, Fest T, Cazorla M et al: P53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 1996;87:3351-3359
23. Hill ME et al., Prognostic significance of BCL-2 expression and BCL-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation study; *Blood* 1996 ; 88:1046-1051
24. Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DHY, Kuo D, Brennan MF, Lewis JJ, Cordon-Cardo C: Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol* 2001,158:1245-1251

25. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW: Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon 2001
26. Kato J, Matsuoka M, Polyak K, Massague J, Sherr CJ: Cyclic AMP-induced G1 Phase arrest mediated by an inhibitor (p27KIP1) of cyclindependent kinase 4 activation. Cell 1994, 79:487-496
27. Kaufmann O, Flath B, Spath-Schwalbe E, Possinger D, Dietel M. Immunohistochemical detection of CD10 with monoclonal antibody 56C6 on paraffin sections. Am J Clin Pathol 1999;111(1):117-22
28. Kaptain S, Zuckerberg LR, Ferry JA, Harris NL (1998): BCL-1 cyclin D1 + CD5- mantle cell lymphoma. Mod Path 11:133a.
29. Knowles DM, Immunophenotypic and immunogenotypic approaches useful in distinguishing benign and malignant lymphoid proliferations. Semin Oncol 1993;20(6):583-610
30. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P ; Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP: Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nature Med 1998;4:844-847
31. Kroft SH, His ED, Ross CW, Schnitzer B, Singelton TP et al; Evaluation of CD23 expression in paraffin-embedded gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue: Mod Pathol 1998 Oct;11(10):957-70
32. Kurtin PJ et al, Demonstration of distinct antigenic profiles of small B-cell lymphomas by paraffin section immunohistochemistry; Am J Clin Pathol 1999;112:319-329

33. Li JY, Gaillard F, Moreau A, Harousseau JL, Laboisie C, Milpied N, Bataille R, Avet-Loiseau H. Detection of translocation t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 154: 1449-1452
34. Mateo MS, Saez AI, Sanchez-Beato M, Garcia P, Sanchez-Verde L, Martinez JC, Orradre JL, Piris MA: Expression of p21^{WAF1/CIP1} in fetal and adult tissues: simultaneous analysis with Ki67 and p53. *J Clin Pathol* 1997;50:645-653
35. McIntosh GG, Lodge AJ, Watson P, Hall AG, Wood K, Anderson JJ, Angus B, Horne CH, Milton ID. NCL-CD10-270: a new monoclonal antibody recognizing CD10 in paraffin-embedded tissue. *Am J Pathol* 1999;154(1):77-82
36. Mucci NR, Akdas G, Manely S, Rubin MA: Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: Evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression. *Hum Pathol* 2000;31:406-415
37. Ott G, Katzenberger T, Greiner A, Kalla J, Rosenwald A, Heinrich U, Ott MM, Müller-Hermelink HK: The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not in high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-) type. *Cancer Res* 1997;57:3944-3948
38. Ott G, Biologische Grundlagen einer Klassifikation follikulärer und großzelliger B-Zell Non-Hodgkin Lymphome, Habilitationsschrift; Julius-Maximilians-Universität Würzburg 1999
39. Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rüdiger T, Wilhelm M, Kalla J, Rosenwald A, Müller JG, Ott MM, Müller-Hermelink H.K. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood* 2002;99:3806-3812
40. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J, Global cancer statistics, *CA Cancer J Clin* 1999,49:33-64

41. Pezzella F, Morrison H, Jones M, Gatter KC, Lane D, Harris AL, Mason DY. Immunohistochemical detection of p53 and bcl2 proteins in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 1993;22:39-44
42. Piris MA, Villuendas R, Martinez JC, Sanchez-Beato M, Orradre JL, Mateo MS, Martinez P. P53 expression in non-Hodgkin's lymphomas: marker of p53 inactivation?. *LeukLymphoma* 1995;17:53-42
43. Piris MA, Pezzella F, Martinez-Montero JC, Orradre J, Villuendas R, Sanchez-Beato M, Cuenca R, Cruz MA, Martinez B, Pezzella F. P53 and bcl-2 expression in high-grade B-cell lymphomas: correlation with survival time. *Br J Cancer* 1994;69:337-41
44. Pozzato G, Mazzaro C, Crovatto M, Modolo ML, Ceselli S, Mazzi G, Sulfaro S, Franzin F, Tulissi P, Moretti M (1994). Low-grade malignant lymphoma, hepatitis C virus infection, and mixed cryoglobulinemia. *Blood* 84: 3047-3053.
45. Prevot S, Hamilton-Dutoit S, Audouin J, Walter P, Pallesen G, Diebold J (1992). Analysis of African Burkitt's and high-grade B cell non-Burkitt's lymphoma for Epstein-Barr virus genomes using in situ hybridization. *Br J Haematol* 80: 27-32.
46. Project, T.N.-H.s.L.P.C. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer* 49, 2112-35 (1982).
47. Quintanilla-Martinez L, Thieblemont C, Fend F, Kumar S, Pinyol M, Campo E, Jaffe ES, Raffeld M: Mantle cell lymphomas lack expression of p27^{KIP1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Am J Pathol* 1998;153:175-182
48. Rosenberg CL, Wong E, Petty EM, Bie AE, Tsujimoto Y, Harris NL, Arnold A (1991). PRAD1, a candidate BCL1 oncogene, mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 88; 9638-9642

49. Rosenwald A, Ott G, Stilgenbauer S, Kalla J, Brecht M, Katzenberger T, Greiner A, Exclusive detection of the t(11;18)(q21;q21) in extranodal marginal zone B cell lymphomas (MZBL) of MALT type in contrast to other MZBL and extranodal large B cell lymphomas (1999). *Am J Pathol* 155: 1817-1821
50. Rosenwald A, Wright G, Chan W, et al.: The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma, *N Engl J Med* 2002 Jun 20;346(25):1937-47
51. Rüdiger T, Ott G, Ott MM et al: Differential diagnosis between classic Hodgkin`s lymphoma, T-cell rich B-cell lymphoma and paragranuloma by paraffin immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 1998;22:1184-1191
52. Saez AI, Sanchez E, Sanchez-Beato M, Cruz MA, Chacon I, Munoz E, Camacho FI, Marinez-Montero JC, Mollejo M, Garcia JF, Piris M: P27^{KIP1} is abnormally expressed in diffuse large B-cell lymphomas, and is associated with an adverse clinical outcome. *Br J Cancer* 1999;80:1427-1434
53. Sanchez-Beato M, Saez AI, Martinez-Montero JC, Mateo MS, Sanchez-Verde L, Villuendas R, Troncione G, Piris MA: Cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{KIP1} in lymphoid tissue. *Am J Pathol* 1997;151:151-160
54. Sanchez-Beato M, Camacho FI, Martinez-Montero JC, Saez AI, Villuendas R, Sanchez-Verde L, Garcia JF, Piris MA: Anamalous high p27^{KIP1} expression in a subset of aggressive B-cell lymphomas is associated with cyclin D3 overexpression. p27^{KIP1} -cyclin D3 colocalization in tumor cells. *Blood* 1999;12:765-772
55. Sanchez-Beato M, Saez AI, Mavas IC, Algara P, Mateo MS, Villuendas R, Camacho F, Sanchez-Aguilera A, Sanchez E, Piris M: Overall survival in aggressive B-cell lymphomas is dependent on the accumulation of alterations in p53, p16 and p27. *Am J Pathol* 2001;159:205-213

56. Takimoto Y, Takafuta T, Imanaka F, Kuramoto A, Sasaki N, Nanba K (1996), Histological progression of follicular lymphoma associated with p53 mutation and rearrangement of the C-MYC gene. *Hiroshima J Med Sci* 45: 69-73
57. Tilly H, Rossi A, Stamatoullas A, Lenormand BB, Bigorgne C, Kunlin A, Monconduit M, Bastard C (1994). Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma. *Blood* 84:1043-1049.
58. Vaandrager JW, Schuurin E, Zwikstra E, De Boer CJ, Kleiverda KK; Van Krieken JH, Kluin-Nelemans HC, van Ommen GJ, Raap AK, Kluin PM (1996). Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence in situ hybridization. *Blood* 88: 1177- 1182
59. Vandenberghe E, De Wolf-Peeters C, van den Oord J, Wlodarska I, Delabie J, Stul M, Thomas J, Michaux JL, Mecucci C, Cassiman JJ, et al. (1991) Translocation (11;14): a cytogenetic anomaly associated with B-cell lymphomas of non-follicle centre cell lineage. *J Pathol* 163: 13-18
60. Villuendas R, Rezella F, Gatter K, Algara P, Sanchez-Beato M, Martinez P, Martinez JC, Munoz K, Garcia P, Sanchez L, Docialkowsky S, Campo E, Orradre JL, Piris MA: P21^{WAF1/CIP1} and MDM2 expression in Non-Hodgkin`s lymphoma and their relationship to p53 status: a p53+, MDM2-, p21-immunophenotype associated with missense p53 mutations. *J Pathol* 1997;181:51-61
61. Vrhovac R, Delmer A, Tang R, Marie JP, Zittoun R, Ajchenbaum Cymbalista F: Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27^{KIP1} in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood* 1998;91:4694-4700
62. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H: Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 24(7): 1016-1019, 2000.

63. Williams ME, Westermann CD, Swerdlow SH (1990). Genotypic characterization of centrocytic lymphoma: frequent rearrangement of chromosome 11 bcl-1 locus. *Blood* 76:1387-1391
64. Wilson WH, Teruya-Feldstein J, Fest T, Harris C, Steinberg SM, Jaffe ES, Raffeld M (1997). Relationship of p53, bcl-2 and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 89: 601-609
65. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Galon MR, Isaacson PG (1991). *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 338:1175-1176.

Danksagung:

Abschließend möchte ich Herrn Prof. Dr. med. H.-K. Müller-Hermelink für die Überlassung dieses interessanten Themas danken.

Großer Dank gebührt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. G. Ott für seine stete Bereitschaft zur Diskussion über die morphologischen und immunhistochemischen Aspekte dieses Themas, sowie seine geduldige Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit. Ebenfalls danken möchte ich Herrn Dr. med. A. Zettl für seine Hilfe bei allen technischen und organisatorischen Fragen.

Tabellarischer Lebenslauf:

Name:	Meister
Vorname:	Sylvia
Geburtsdatum:	11.01.1976
Geburtsort:	Ingolstadt
Staatsbürgerschaft:	deutsch
Familienstand:	ledig
Bildungsweg:	1982 - 1986 Grundschule Haunwöhr in Ingolstadt 1986 - 1988 Hauptschule an der Maximiliansstrasse in Ingolstadt 1988 - 1992 Gnadenthal-Mädchenrealschule in Ingolstadt.. Abschluß: Mittlere Reife 1992 - 1996 Apian-Gymnasium in Ingolstadt. Abschluß: Allgemeine Hochschulreife 1996 - 2002 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg 31.10.2002 Abschluß: Ärztliche Prüfung 08.11.2002 Erteilung der Erlaubnis für die Tätigkeit als Arzt im Praktikum
Beruflicher Werdegang:	seit 01.01.2003 Ärztin im Praktikum am Institut für Pathologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Preise:

Sonderpreis im Regionalwettbewerb 1996 bei Jugend forscht im Fachgebiet Chemie. Thema der Arbeit: Eisengehalt in Nahrungsmitteln.

Veröffentlichungen:

S. Meister, A. Zettl, T. Katzenberger, M.M. Ott, H.K. Müller-Hermelink, G. Ott. Lymphoma tissue microarray – a reproducible, fast, and costsaving method for immunohistochemical studies. Abstract in Pathology Research and Practice 197(2001)5 p 375 #353

A. Zettl, S. Meister, T. Katzenberger, J. Kalla, M.M. Ott, H.K. Müller-Hermelink, G. Ott. Immunohistochemical and molecular characterization of B-cell lymphoma using tissue microarray technology. Histopathology im Druck.

A handwritten signature in black ink, reading "Sylvia Meister". The signature is written in a cursive, flowing style.