

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

**Risikostratifikation grosszelliger B-Zell Non-Hodgkin
Lymphome anhand immunhistochemischer Parameter**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Andreas Lohr
aus Erfurt

Würzburg, März 2007

Referent: Prof. Dr. med. G. Ott
Korreferent: Prof. Dr. med. H.-K. Müller-Hermelink
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2007

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom	1
1.2	Das Risikoprofil des DLBCL	3
1.3	Die molekulare Reklassifikation des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms .	4
1.4	Das Proteinexpressionsprofil von DLBCL	5
1.5	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	6
2	Material und Methoden	7
2.1	Fallselektion	7
2.2	Klinische Daten	8
2.3	Histologische Untersuchungen.....	12
2.4	Immunhistochemie	12
2.5	Statistische Auswertungen	13
3	Ergebnisse	14
3.1	Primärlokalisationen der untersuchten Tumoren und zytomorphologische Klassifikation	14
3.2	Immunphänotypische Charakterisierung.....	15
3.3	Heterogenität der Expression immunhistochemischer Marker	16
3.4	Definition eines Keimzentrums-assoziierten und eines Nicht-Keimzentrums- assoziierten Immunphänotyps	21
3.5	Korrelation morphologischer Diagnosen mit dem Immunphänotyp.....	21
3.6	Korrelationen mit klinischen Parametern.....	23
3.7	Abhängigkeit immunhistochemischer Parameter innerhalb prognostisch relevanter Subgruppen.....	28
3.8	Entwicklung eines kombinierten immunhistochemischen Risiko-Scores (CIOPS).....	31
4	Diskussion	35
4.1	Ansätze zur Unterscheidung klinischer Risikogruppen diffuser großzelliger B- Zell-Lymphome	35
4.2	Genexpressionsprofile in der Risikoabschätzung diffuser großzelliger B-Zell- Lymphome	35

4.3	Die Suche nach Genexpressionsanalyse-assoziierten prognostischen Parametern	36
4.4	Ergebnisse der vorliegenden Studie	37
4.5	Risikostratifikation von Patienten mit großzelligen B-Zell-Lymphomen anhand des Immunphänotyps	39
4.6	Der kombinierte immunhistochemische Prädiktor-Score	41
4.7	Ausblick	42
5	Zusammenfassung	43
6	Literaturverzeichnis	45

1 Einleitung

1.1 Das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom

Das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) ist der häufigste Typ eines malignen Non-Hodgkin-Lymphoms mit einem Anteil von etwa 30 bis 40 % aller Non-Hodgkin-Lymphome. Die Kategorie des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms wurde durch die REAL-Klassifikation maligner Lymphome definiert und in die WHO-Klassifikation übernommen (Harris et al. 1994, Gatter et al. 2001, DLBCL-Kapitel WHO). Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL) stellen eine morphologisch, immunologisch, genetisch und klinisch heterogene Gruppe maligner lymphoider Tumoren dar. Sie können *de novo* entstehen, oder aber aus einem vorangegangenen indolenten Non-Hodgkin-Lymphom wie z.B. einer chronischen lymphatischen Leukämie, einem Marginalzonen-B-Zell-Lymphom oder einem follikulären Lymphom hervorgehen.

DLBCL sind morphologisch durch „große“ Tumorzellen gekennzeichnet (mit einem mittleren Durchmesser von $\geq 20 \mu\text{m}$) mit dem morphologischen Aspekt von Blasten und einem überwiegend diffusen, teilweise auch nodulären Wachstumsmuster. Nach der WHO-Klassifikation maligner Non-Hodgkin-Lymphome werden zentroblastische (Abb. 1), immunoblastische (Abb. 2), anaplastische, plasmoblastische und T-Zell/ Histiocyten-reiche diffuse großzellige B-Zell-Lymphome unterschieden. Hinzu kommen noch morphologisch und klinisch unterscheidbare Subtypen des DLBCL wie das großzellige mediastinale B-Zell-Lymphom, das intravaskuläre diffuse großzellige B-Zell-Lymphom und das primäre Effusions-Lymphom. Diesen letzteren drei Tumortypen sind Besonderheiten in der klinischen Präsentation, dem Entstehungsort und/ oder bestimmte prädisponierende Vorerkrankungen zu eigen.

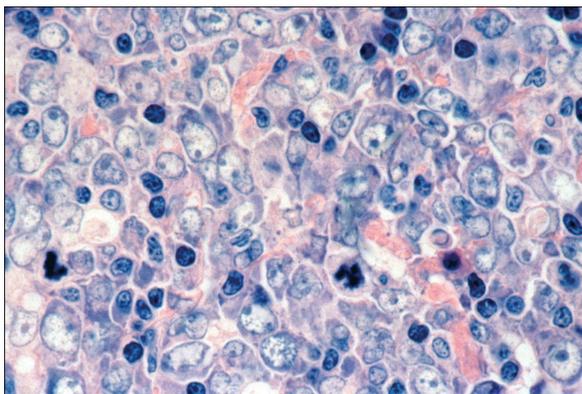


Abbildung 1: Zentroblastisches DLBCL

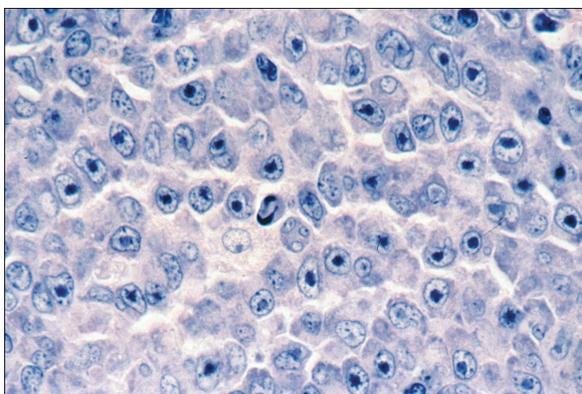


Abbildung 2: Immunoblastisches DLBCL

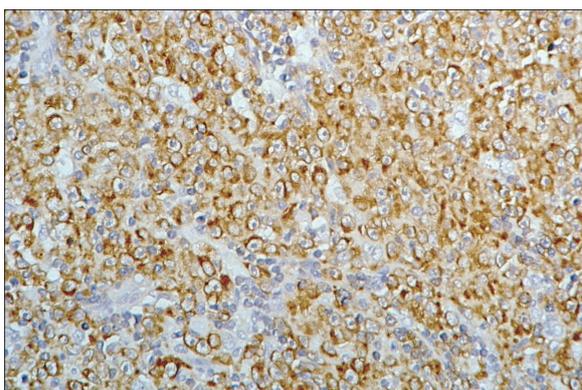


Abbildung 3: BCL-2- Expression in einem DLBCL vom immunoblastischen Typ

1.2 *Das Risikoprofil des DLBCL*

Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome gehören den aggressiven B-Zell-Lymphomen an und können mit der Anwendung moderner „Multiagent“-Chemotherapie in etwa 30-50 % der Fälle dauerhaft geheilt werden. Für den individuellen Patienten ist aber - ungeachtet der morphologischen Variante oder der klinischen Subgruppe - eine Vorhersage über den klinischen Verlauf schwierig; es ist vor allem diese auffällige Unterschiedlichkeit im klinischen Verlauf der Tumorerkrankung, die zu der Annahme führte, dass die Kategorie des „diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms“ in der Tat unterschiedliche Krankheitsentitäten beinhaltet und dass die Erkennung bestimmter Risikoparameter für einen Patienten - bzw. die tumorspezifische Behandlung der Erkrankung - unverzichtbar wäre. Entsprechende Untersuchungen haben versucht, bestimmte morphologische Kriterien, wie die Unterteilung immunoblastischer und zentroblastischer Varianten (Engelhardt et al. 1997), die genetische Konstitution der Tumoren (Schlegelberger et al. 1999) oder bestimmte biologische Eigenschaften der Tumorzellen, wie den Proliferationsindex (Grogan et al. 1988, Silvestrini et al. 1993, Wilson et al. 1997) oder die Expression von BCL-2 (Hill et al. 1996, Kramer et al. 1996, Hermine et al. 1996, Gascoyne et al. 1997, Kramer et al. 1998, Iqbal et al. 2006) als Risikoparameter heranzuziehen. Es gibt allerdings keinen Konsens hinsichtlich der Nützlichkeit, z.B. zytologische Varianten des DLBCL zu unterscheiden. So hatten beispielsweise Diebold et al. (2002) entgegen der Einschätzung in früheren Arbeiten (Engelhardt et al. 1997, Baars et al. 1999) in einer großen Studie über 444 diffuse großzellige B-Zell-Lymphome keine signifikanten Unterschiede im Überleben zwischen den drei größeren Gruppen von DLBCL (zentroblastisch, immunoblastisch und anaplastisch) gefunden. Auch hinsichtlich der Wertigkeit des Proliferationsindex der Tumorzellen bestehen Unterschiede. In der Mehrzahl der Arbeiten und mit unterschiedlichen Methoden des Nachweises proliferativer Aktivität in den Tumorzellen im diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom wird aber davon ausgegangen, dass eine erhöhte proliferative Aktivität mit einem schlechteren Ansprechen auf die

Chemotherapie assoziiert ist. Die überwiegende Zahl der Autoren hat in ihren Untersuchungen erkannt, dass die zytoplasmatische Expression des antiapoptotisch wirksamen BCL-2-Proteins einen negativen prognostischen Marker darstellt. Auch zahlreiche andere biologische Parameter der Tumorzellen, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll (wie z.B. die Rolle der t(14;18) in diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen), wurden kontrovers diskutiert.

1.3 Die molekulare Reklassifikation des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms

In der Februarausgabe des Wissenschaftsmagazins „Nature“ im Jahr 2000 publizierten Alizadeh und seine Kollegen ihre Ergebnisse über die Anwendung der cDNA-Microarray-Technik in einer Serie von 40 DLBCL (Alizadeh et al. 2000). Bei diesen Untersuchungen werden in der Array-Technik die Expressionsstärke von Tausenden von Genen durch die Analyse der aus den Tumoren extrahierten mRNAs untersucht. Die Autoren fanden zwei grundsätzlich unterscheidbare Subgruppen von diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen aufgrund ihrer unterschiedlichen Gen-Expressionsprofile. Sie beschrieben eine Keimzentrums-ähnliche (GCB-cell-like) DLBCL-Gruppe und eine aktivierte B-Zell-ähnliche (ABC-like) Gruppe von DLBCL, die sich in ihrem Ansprechen auf übliche Chemotherapieschemata deutlich unterschieden: Die GCB-ähnliche DLBCL-Subgruppe zeigte einen deutlich besseren klinischen Verlauf als die Subgruppe mit einem ABC-ähnlichen Genexpressionsprofil. Die Ergebnisse dieser Studie konnten von Rosenwald et al. (2002) in einer großen Serie von 274 DLBCL bestätigt werden. Die Autoren des „Lymphoma/ Leukemia Molecular Profiling Projects“ (LLMPP) konnten zeigen, dass die Prognose bzw. das klinische Risiko durch vier hauptsächliche Genexpressionssignaturen bestimmt wird: die Keimzentrums-B-Zell-Signatur, die Proliferations-Signatur, die sogenannte Lymphknotensignatur, die auf der Genexpressionssignatur reaktiver Stroma- und Immunzellen beruht, und die MHC Klasse II -Signatur. Anhand des Genexpressionsprofils konnten vier

prognostisch unterschiedliche Tumorgruppen identifiziert werden, die ein z.T. dramatisch unterschiedliches Fünfjahres- Überleben (von 73 % bis 15 % der Patienten) aufwiesen. Zu ähnlichen Ergebnissen hinsichtlich der Wertigkeit der Genexpressionsanalyse in der Abschätzung des klinischen Risikos bei DLBCL kam die Gruppe um Shipp et al. (2002).

1.4 Das Proteinexpressionsprofil von DLBCL

Die Konstruktion von Genexpressionsprofilen durch die cDNA-Microarray-Technologie hat einen entscheidenden Nachteil, der darin besteht, dass qualitativ hochwertige RNA zur Verfügung stehen muss. Daher wurden frühzeitig Versuche unternommen, die aus den Genexpressions-Untersuchungen stammenden Risikoprofile auf individuelle Gene oder kleinere Gengruppen zu übertragen. So stellten Lossos und Kollegen 2004 ein multivariates Überlebensmodell vor, das auf der Expression von nur sechs Genen in der quantitativen „real-time“-Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR) beruhte. Auch die Expression bestimmter Antigene in der Immunhistochemie, die für bestimmte Transkriptionsfaktoren oder auch für die histogenetische Herkunft der Lymphome charakteristisch waren, wurden zu Aussagen über die Prognose in diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen herangezogen (Uherova et al. 2001, Lossos et al. 2001, Barrans et al. 2002). Gerade der letztere Ansatz, also die Analyse von unterschiedlichen Proteinexpressionsmustern am Paraffinmaterial ist neu, und so wurden in der Literatur - je nach der unterschiedlichen Zielsetzung der Untersuchungen - unterschiedliche Untersuchungsergebnisse erhalten (Barrans et al. 2002, Xu et al. 2001, Colomo et al. 2003, Hans et al. 2004).

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wertigkeit der Erfassung der Expression bestimmter biologischer Parameter am Paraffinmaterial in 99 Fällen diffuser großzelliger B-Zell-Lymphome untersucht werden, die morphologisch, nach dem Immunphänotyp und nach ihrer genetischen Konstitution charakterisiert worden waren.

2 Material und Methoden

2.1 Fallselektion

Für den Einschluss in die vorliegende Studie war das Vorhandensein ausreichenden diagnostischen Materials in Form eines Paraffinblockes und von zytogenetischen Untersuchungsdaten gefordert worden. Daher wurden primär nur Fälle eines *de novo* entstandenen DLBCL in die Untersuchung eingeschlossen und Fälle eines sekundär hochmalignen B-Zell-Lymphoms primär ausgeschlossen. Insgesamt erfüllten 114 großzellige B-Zell-Lymphome diese Kriterien. In 96 dieser Tumoren war die Diagnose eines diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms gestellt worden. In 18 Lymphomen zeigte sich zusätzlich zu den Infiltraten eines DLBCL noch eine weitere Komponente eines folliculären Non-Hodgkin-Lymphoms Grad 3B (FL3B+DLBCL). Aufgrund der auffälligen morphologischen, immunphänotypischen, und genetischen Ähnlichkeiten dieser Fälle mit diffusen großzelligen B-Lymphomen (Ott et al. 2002, Katzenberger et al. 2004) wurden diese Fälle ebenfalls in die Studie mit eingeschlossen. Aus entsprechenden Gründen waren auch Daten von vier ausschließlich folliculär wachsenden Lymphomen Grad 3B (FL3B) eingeschlossen worden (Histologisches Bild siehe Abbildung 4). Insgesamt standen also Daten von 118 Patienten mit aggressiven großzelligen B-Zell-Lymphomen, die zwischen 1990 und 2001 diagnostiziert worden waren, zur Verfügung.



Abbildung 4: Follikuläres Wachstumsmuster in einem nodalen DLBCL Grad 3B

2.2 *Klinische Daten*

Klinische Daten, die von den behandelnden klinischen Kollegen freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden, standen von 99 dieser Fälle zur Verfügung. Die große Mehrheit der untersuchten Lymphome war primär nodalen Ursprungs. Insgesamt 26 Tumore entstanden primär extranodal, die Mehrheit von ihnen (n=16) im Magen. Die Einstufung in Erkrankungsstadien erfolgte nach der Ann-Arbor-Klassifikation. Der Internationale Prognostische Index (IPI, nach International Non-Hodgkin`s Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993) setzt sich additiv aus den Faktoren reduziertes Allgemeinbefinden (Karnofsky-Index < 80 %, entsprechend „nicht ambulant“), fortgeschrittenes Tumorstadium (Ann-Arbor III-IV), extranodalem Befall in 2 oder mehr Lokalisationen, Alter des Patienten (≤ 60 Jahre oder > 60 Jahre) und einer LDH- Erhöhung über 240 U/ l zusammen, so dass hier eine Punktzahl von 0-5 erreicht werden kann. In Tabelle 1 sind die klinischen Basisdaten der Patienten zusammengefasst.

Klinischer Parameter	Häufigkeit / Dauer
Geschlecht (männlich/ weiblich)	54 / 45
Nodale/ extranodale Manifestation	73 / 26
Alter in Jahren (Median/ Variationsbreite)	64 (8-88)
Beobachtungszeitraum in Monaten (Median/ Var.)	33 (1-126)
Alter ≤ 60 Jahre / > 60 Jahre	43 / 56
Stadium (nach Ann Arbor): I / II / III / IV	22 / 24 / 32 / 21
Anzahl extranodaler Manifestationen: 0 - 1 / ≥ 2	75 / 24
LDH:	
Im Normbereich	36
Erhöht (> 240 U/l)	54
Keine Angabe*	9
Klinischer Status: Ambulant / nicht ambulant	82 / 17
Internationaler Prognostischer Index (IPI):	
Niedrig (0-1)	34
Mittel (2-3)	44
Hoch (4-5)	15
Nicht bestimmbar*	6
Knochenmarksinfiltration (ja / nein)	10 / 89
B- Symptomatik (ja / nein)	37 / 62

Tabelle 1: Klinische Charakteristika der 99 großzelligen DLBCL

** in 9 Fällen war die LDH nicht ermittelbar, bei 3 dieser Patienten resultierte aus den anderen Parametern ein IPI von 2-3, so dass diese Patienten in die mittlere IPI-Gruppe einbezogen wurden, bei 6 weiteren Patienten konnte der IPI nicht bestimmt werden.*

In den klinischen Charakteristika unterschieden sich die Gruppe der Lymphome mit follikulärem respektive follikulär-diffusem Wachstumsmuster nicht von den Lymphomen mit ausschließlich diffusem Wachstumsmuster, ausgenommen in der Verteilung des Stadiums bei Diagnosestellung: hier war in der Gruppe der FL3B/ FL3B+DLBCL mit einem Stadium III oder IV in 80 % der Fälle im Vergleich zu 49 % der Fälle in der Gruppe der DLBCL prozentual häufiger ein fortgeschritteneres Erkrankungsstadium bestehend ($p < 0,03$). Eine Übersicht der klinischen Charakteristika der FL 3B/ FL3B+DLBCL im Vergleich mit den DLBCL zeigt Tabelle 2.

Klinischer Parameter	FL 3B/ FL3B + DLBCL (n=15)	DLBCL (n=84)
Geschlecht: männlich / weiblich	6 / 9 (40 % / 60 %)	48 / 36 (57 % / 43 %)
Alter in Jahren (Median / Variationsbreite)	62 / 33-79	64 / 8-88
Beobachtungszeitraum in Monaten (Median / Variationsbreite)	34 / 8-106	32 / 1-127
Alter: ≤ 60 Jahre / > 60 Jahre	6 / 9 (40 % / 60 %)	37 / 47 (44 % / 56 %)
Stadium (nach Ann Arbor): I / II / III / IV	2 / 1 / 8 / 4 (13 % / 7 % / 53 % / 27 %)	20 / 23 / 24 / 17 (24 % / 27 % / 29 % / 20 %)
Anzahl extranodaler Manifestationen: 0 - 1 / ≥ 2	13 / 2 (87 % / 13 %)	62 / 22 (74 % / 26 %)
LDH: Im Normbereich Erhöht (> 240 U/l) Keine Angabe	5 (33 %) 8 (53 %) 2 (13 %)	31 (37 %) 46 (55 %) 7 (8 %)
Klinischer Status: Ambulant / nicht ambulant (entspr. Karnofsky-Index < 80%)	13 / 2 (87 % / 13 %)	69 / 15 (82 % / 18 %)
Internat. Prognost. Index (IPI): Niedrig (0-1) Mittel (2-3) Hoch (4-5) Nicht bestimmbar*	3 (20 %) 9 (60 %) 1 (7 %) 2 (13 %)	31 (37 %) 32 (38 %) 14 (17 %) 7 (8 %)
Knochenmarksinfiltration: ja / nein	2 / 13 (13 % / 87 %)	8 / 76 (10 % / 90 %)
B- Symptomatik: ja / nein	5 / 10 (33 % / 67 %)	32 / 52 (38 % / 62 %)

Tabelle 2: Vergleich der klinischen Charakteristika FL3B/ FL3+DLBCL und DLBCL

* in 9 Fällen war die LDH nicht ermittelbar, bei 3 dieser Patienten resultierte aus den anderen Parametern ein IPI von 2-3, so dass diese Patienten in die mittlere IPI-Gruppe einbezogen wurden, bei 6 weiteren Patienten konnte der IPI nicht bestimmt werden.

2.3 *Histologische Untersuchungen*

Alle in die vorliegende Untersuchung eingegangenen Fälle wurden nach den Kriterien der WHO-Klassifikation (Gatter et al. 2001 in WHO) in Hämatoxylin- und Eosin- (H&E) bzw. Giemsa-gefärbten Präparaten klassifiziert. Die Subklassifikation der morphologischen Varianten erfolgte nach den Kriterien der Kiel-Klassifikation (Lennert und Feller 1992) mit der Diagnose zentroblastisch-monomorpher, zentroblastisch-multilobulierter, zentroblastisch-polymorpher und immunoblastischer Lymphome. Die Diagnose eines FL3B+DLBCL erforderte eine folliculäre Wachstumskomponente von zumindest 25 % des infiltrierten Areal.

2.4 *Immunhistochemie*

Für die diagnostischen Untersuchungen wurden Immunphänotypisierungen an Schnittpräparaten paraffineingebetteten Gewebes durch die Anwendung konventioneller B- und T-Zellmarker (in der Regel CD20 bzw. CD79a und CD3 oder CD5) durchgeführt. Nachdem es sich in den vorliegenden Tumoren um zum Teil bereits ältere Fälle handelte, waren ein Teil der immunhistochemischen Untersuchungen an Kryoschnitten mit Antikörpern gegen CD3, CD5, CD22 und CD 23 sowie die Immunglobulin-Leichtketten durchgeführt worden. Die Expression von CD10 war durch die Färbung mit dem NCL-CD10-270 Antikörper (Novocastra) oder des VIL A-1 Markers (Immunotec, Frankreich) durchgeführt worden. Für die Färbung von BCL-6 wurde der PG-B6p-AK (DAKO) verwendet. Der Antikörper gegen IRF-4 (Mum1p) stammte ebenfalls von der Firma DAKO. Der Proliferationsindex (PI) wurde durch die Anwendung des MIB-1-AK (DAKO) bestimmt. Hierzu wurden Areale mit der höchsten Reaktivität für diesen Antikörper herangezogen. Die Auswertung der Färbeintensitäten für BCL-6, IRF-4 und den Proliferationsindex (MIB-1/ Ki67) wurden jeweils in Schritten von 10% niedergelegt. Die Expression von p53 wurde ebenfalls an Paraffinschnitten mit dem DO-7-Antikörper (DAKO) durchgeführt. Als positiv wurde dabei eine starke nukleäre Expression in mehr als 20% der Tumorzellen gewertet. Eine sekretorische (plasmozytoide) Differenzierung wurde dann angenommen, wenn in der Darstellung mit

Antikörpern gegen die Immunglobulin-Leichtketten (mit und ohne gleichzeitige Darstellung für IgM (DAKO)) eine unzweifelhafte monotypische zytoplasmatische Reaktivität nachzuweisen war (Clg +). Die Reaktivität für BCL-2 wurde nach der Expressionsstärke und nach der Zahl der dieses Antigen exprimierenden Tumorzellen bestimmt. Als eine hohe BCL-2-Reaktivität wurden lediglich die Fälle gewertet, in denen mehr als 50 % der Tumorzellen eine starke zytoplasmatische Reaktivität aufwiesen (Abbildung 3). Eine schwache Positivität für BCL-2 wurde vermerkt, wenn entweder weniger als 50 % der Zellen stark positiv waren oder wenn die Färbeintensität schwach bzw. inkonsistent war, auch wenn insgesamt mehr als 50 % der Tumorzellen angefärbt waren.

Alle immunhistochemischen Reaktionen am Paraffinmaterial wurden durch Anwendung der Peroxidase-Anti-Peroxidase- (PAP)- Methode nach „Antigen-Retrieval“- Behandlung durchgeführt (Rüdiger et al. 2002).

2.5 Statistische Auswertungen

Die Unterschiede in den Häufigkeiten für einzelne Parameter wurden mit dem χ^2 -Test (C. Pearson 1900) verglichen. Das Gesamtüberleben wurde vom Diagnosedatum bis zum Tod, unabhängig von der Todesursache, oder bis zur letzten Untersuchung bestimmt. Die Verteilungen des Gesamtüberlebens wurden mit dem Log-Rank-Test (Peto et al. 1973) bestimmt und nach der Methode von Kaplan und Meier (1958) dargestellt. Die multivariaten Überlebenszeitanalysen erfolgten nach Mantel (1967) und wurden ebenfalls nach der Methode von Kaplan und Meier dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Primärlokalisationen der untersuchten Tumoren und zytomorphologische Klassifikation

Bei den in der vorliegenden Serie untersuchten 99 Tumoren handelte es sich um 61 großzellige B-Zell-Lymphome, die primär nodal manifestiert waren und um vier DLBCL in der Tonsille und sechs DLBCL der Milz. Bei zwei Patienten lag ausschließlich eine Knochenmarksinfiltration mit leukämischer Ausschwemmung vor. 26 großzellige B-Zell-Lymphome entstanden primär extranodal. Am häufigsten war der Magen der Entstehungsort (16 Fälle), zusätzlich lagen fünf Tumoren in der Schilddrüse vor, zwei Lymphome im Dünndarm und jeweils ein Tumor im Dickdarm, der Mamma und im Bereich des Sinus maxillaris.

Die untersuchten Lymphome zeigten in der großen Mehrzahl der Fälle (82 %) ein diffuses Wachstumsmuster. Vier nodale Tumoren zeigten ein ausschließlich follikuläres Wachstumsmuster (follikuläres Lymphom Grad 3B), und bei elf Tumoren lag eine Kombination aus einem follikulären Lymphom Grad 3B und einer Komponente eines diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms (FL3B+DLBCL) vor. Von den letzteren Tumoren waren neun primär nodalen Ursprungs und jeweils ein Lymphom entstand in der Tonsille und der Milz. Alle primär extranodalen Lymphome wurden als diffuse großzellige B-Zell-Lymphome klassifiziert. Nach den Kriterien der Kiel-Klassifikation handelte es sich bei den nodalen und die Milz bzw. die Tonsille infiltrierenden Lymphknoten um 14 zentroblastische Lymphome vom monomorphen Subtyp, 5 zentroblastisch-multilobulierte Lymphome, 30 zentroblastisch-polymorphe Lymphome und um 9 immunoblastische Lymphome. Die überwiegende Mehrheit der primär extranodalen DLBCL wurden als zentroblastische Lymphome klassifiziert (88 %). 3 primär extranodale Lymphome zeigten eine „Burkitt-ähnliche“ Morphologie.

3.2 Immunphänotypische Charakterisierung

Eine Expression des Keimzentrumszell-assoziierten Markers CD10 war in 35 von 98 evaluierbaren Fällen nachzuweisen (36 %). In der überwiegenden Zahl der Fälle lag eine Reaktivität auf allen Infiltratzellen oder aber keine Reaktivität für diesen Antikörper vor. Im Gegensatz hierzu zeigten sowohl BCL-6 wie auch MUM-1p eine ausgeprägte Heterogenität in ihrem Expressionsmuster mit einer Markierung von 0-100 % der Zellen eines jeweiligen Tumors. In der vorliegenden Studie war eine Expression von BCL-6 in ≥ 70 % der Kerne, wie sie üblicherweise auch in reaktiven Keimzentren vorliegt, in 40 (43 %) Tumoren nachzuweisen, während 27 (29 %) eine Reaktivität von 20-60 % aufwiesen. Keine Reaktivität für BCL-6 (nach der Definition weniger als 20 %) lag ebenfalls in 27 Tumoren (29 %) vor. Eine Reaktivität für MUM-1p in ≥ 50 % der Kerne lag in insgesamt 34 Fällen vor (35 %). Eine plasmazytoide Differenzierung (C1g +) konnte in 48 von 97 Fällen (49 %) nachgewiesen werden. Sieben DLBCL waren positiv für das CD5-Antigen. Eine Reaktivität für BCL-2 war in insgesamt 65 Tumoren (68 %) nachzuweisen. 41 dieser Fälle zeigten eine kräftige zytoplasmatische Reaktivität („BCL-2 high“) und 24 wurden als „BCL-2 low“ klassifiziert. Das Ki67-Antigen (MIB-1-Antikörper) war in 31 Tumoren (32 %) in ≥ 80 % der Kerne exprimiert. Die Übersicht der Häufigkeiten ist in Tabelle 3 dargestellt.

Marker	positiv (prozentualer Anteil)	negativ (prozentualer Anteil)
CD10	35 (36 %)	63 (64 %)
BCL-6	40 \geq 70 % (43 %) 27 20-60 % (29 %)	27 < 20 % (29 %)
MUM-1p	34 \geq 50 % (35 %)	62 < 50 % (65 %)
Clg	48 (49 %)	49 (51 %)
CD5	9 (7 %)	90 (93 %)
BCL-2	41 high (43 %) 24 low (25 %)	30 (32 %)
Ki67	31 \geq 80 % (32 %)	65 < 80 % (68 %)

Tabelle 3: Häufigkeiten immunphänotypischer Charakteristika in DLBCL

(an n=99 fehlende Fälle waren nicht evaluierbar)

3.3 Heterogenität der Expression immunhistochemischer Marker

Bereits aus den oben angegebenen Daten geht hervor, dass die Expression der immunphänotypischen Marker (Antigene) in der vorliegenden Serie im Vergleich zu einer relativ homogenen Reaktivität dieser Marker in reaktivem lymphatischen Gewebe in den verschiedenen Differenzierungsstufen sehr heterogen war. So liegt beispielsweise im normalen Keimzentrum eine Positivität für CD10 und eine Negativität für BCL-2 vor; in der vorliegenden Serie war eine BCL-2-Reaktivität zwar bei CD10-negativen Tumoren deutlich häufiger anzutreffen (Tabelle 4-3, 78 %), die Hälfte der CD10-positiven Lymphome (18 von 35 (51 %)) erwies sich allerdings ebenfalls als positiv für BCL-2. Ein anderes Beispiel ist die Koexpression von CD10 und MUM-1p in - offenbar Keimzentrums-assoziierten - Tumoren: MUM-1p (in wenigstens 50 %

der Zellen) war auch in 5 CD10-positiven Tumoren (14 %) überexprimiert, während im reaktiven Keimzentrum in aller Regel nur ganz vereinzelt MUM-1p-positive Prä-Plasmazellen nachzuweisen sind.

Insgesamt zeigte sich eine starke positive Korrelation zwischen einer Reaktivität für CD10 und BCL-6 ($p < 0,001$), während CD10 mit MUM-1p negativ korreliert war und ebenfalls negativ mit einer plasmazytoiden Differenzierung korreliert war. Auch die Expression von BCL-6 war negativ mit einer MUM-1p-Expression und einer plasmazytoiden Differenzierung korreliert. Im Gegensatz hierzu zeigte sich für die Reaktivität für MUM-1p und eine plasmazytoide Differenzierung eine positive Korrelation ($p = 0,003$). Hohe proliferative Indices ($\geq 80\%$) lagen häufiger in BCL-6- und CD10-positiven Tumoren vor. Im Gegensatz hierzu lagen niedrigere proliferative Indices ($< 80\%$) häufiger in Fällen mit einer plasmazytoiden Differenzierung vor. Tumoren mit einer hohen Reaktivität für BCL-2 zeigten eine Tendenz einer negativen Korrelation zu einer CD10-Expression ($p = 0,007$). Tumoren mit einer niedrigen Proliferationsrate zeigten eine hohe Reaktivität für BCL-2 ($p < 0,001$). Eine Übersicht der Korrelationen zeigt die Tabelle 4.

	BCL-6 positiv	BCL-6 negativ	%
CD10 positiv	33	1	97 %/ 3 %
CD10 negativ	32	27	54 %/ 46 %
	51 %/ 49 %	4 %/ 96 %	p< 0,001
	MUM1p ≥ 50 %	MUM1p < 50 %	%
CD10 positiv	5	30	14 %/ 86 %
CD10 negativ	29	32	48 %/ 52 %
	14 %/ 85 %	48 %/ 52 %	p=0,001
	BCL-2 positiv	BCL-2 negativ	%
CD10 positiv	18	17	51 %/ 49 %
CD10 negativ	47	13	78 %/ 22 %
	28 %/ 72 %	57 %/ 43 %	p=0,007
	Ki67≥ 80 %	Ki67< 80 %	%
CD10 positiv	27	8	77 %/ 23 %
CD10 negativ	38	22	63 %/ 37 %
	42 %/ 58 %	27 %/ 73 %	p=0,16
	Clg positiv	Clg negativ	%
CD10 positiv	11	24	31 %/ 69 %
CD10 negativ	37	24	61 %/ 39 %
	23 %/ 77 %	50 %/ 50 %	p=0,006

	MUM1p ≥ 50 %	MUM1p < 50 %	%
BCL-6 positiv	16	49	25 %/ 75 %
BCL-6 negativ	16	12	57 %/ 43 %
	50 %/ 50 %	80 %/ 20 %	p=0,002
	BCL-2 positiv	BCL-2 negativ	%
BCL-6 positiv	40	25	62 %/ 38 %
BCL-6 negativ	23	5	82 %/ 18 %
	63 %/ 37 %	83 %/ 17 %	p=0,05
	Clg positiv	Clg negativ	%
BCL-6 positiv	26	40	39 %/ 61 %
BCL-6 negativ	20	8	71 %/ 29 %
	57 %/ 43 %	83 %/ 17 %	p=0,004
	Ki67 ≥ 80 %	Ki67 < 80 %	%
BCL-6 positiv	47	19	71 %/ 29 %
BCL-6 negativ	17	11	61 %/ 39 %
	73 %/ 27 %	63 %/ 37 %	p=0,32
	Clg positiv	Clg negativ	%
MUM1p ≥ 50 %	24	10	71 %/ 29 %
MUM1p < 50 %	24	38	39 %/ 61 %
	50 %/ 50 %	21 %/ 79 %	p=0,003

	Ki67\geq 80 %	Ki67< 80 %	%
MUM1p \geq 50 %	20	13	61 %/ 39 %
MUM1p < 50 %	45	17	73 %/ 27 %
	31 %/ 49 %	43 %/ 57 %	p=0,23
	Clg positiv	Clg negativ	%
Ki67\geq 80 %	27	38	42 %/ 58 %
Ki67< 80 %	20	11	65 %/ 35 %
	57 %/ 43 %	78 %/ 22 %	p=0,04
	Ki67\geq 80 %	Ki67< 80 %	%
BCL-2 positiv	36	28	56 %/ 44 %
BCL-2 negativ	29	1	97 %/ 3 %
	55 %/ 45 %	97 %/ 3 %	p< 0,001
	MUM1p \geq 50 %	MUM1p < 50 %	%
BCL-2 positiv	31	34	48 %/ 52 %
BCL-2 negativ	3	27	10 %/ 90 %
	91 %/ 9 %	56 %/ 44 %	p< 0,001
	Clg positiv	Clg negativ	%
BCL-2 positiv	40	25	62 %/ 38 %
BCL-2 negativ	7	23	23 %/ 77 %
	85 %/ 15 %	52 %/ 48 %	p< 0,001

Tabelle 4: Korrelation immunhistochemischer Marker

(an n=99 fehlende Fälle waren nicht evaluierbar)

3.4 Definition eines Keimzentrums-assoziierten und eines Nicht-Keimzentrums-assoziierten Immunphänotyps

Aufgrund der oben dargestellten Daten und Berichte aus der Literatur (Alizadeh et al. 2000, Rosenwald et al. 2002, Ree et al. 2001, Barrans et al. 2002) gingen wir davon aus, dass eine Reaktivität für CD10 und BCL-6 einen deutlichen Hinweis für eine Keimzentrums-B-Zell-ähnliche Differenzierung eines großzelligen B-Zell-Lymphoms darstellt. Im Gegensatz hierzu ist eine Reaktivität für MUM-1p oder der Nachweis einer plasmazytoiden Differenzierung eher ein Hinweis auf eine Nicht-Keimzentrums-Zell-assoziierte (postfollikuläre) Differenzierung. In der weiteren Analyse der Daten wurde ein Segregationsmodell verwendet, das dem von Hans et al. (2004) sehr ähnlich war: Alle Tumoren mit einer Reaktivität für CD10 wurden dem Keimzentrums-B-Zell-Typ des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms (germinal centre B-cell-like) zugeordnet. War CD10 negativ, war die Zuordnung zum GCB-Typ bzw. zum aktivierten B-Zell-ähnlichen (activated-B-cell-like)-Typ des DLBCL abhängig von der Reaktivität sowohl für BCL-6 wie auch für MUM-1p. Eine BCL-6-Negativität (< 20 %) bedingte automatisch eine Zuordnung zum Non-GCB-Typ, während bei einer Positivität für BCL-6 (≥ 20 %) eine Zuordnung zum GCB-Typ erfolgte, wenn MUM-1p in weniger als 50 % der Zellen (ko-)exprimiert war und zum Non-GCB-Typ, wenn MUM-1p in ≥ 50 % der Tumorzellen exprimiert war.

Folgte man diesen Kriterien, war in der vorliegenden Serie ein Keimzentrums-ähnlicher Phänotyp in 58 Fällen nachweisbar (59 %) und ein Nicht-Keimzentrums-Typ in 40 Fällen (41 %).

3.5 Korrelation morphologischer Diagnosen mit dem Immunphänotyp

Die Tabelle 5 zeigt einen Überblick über die Assoziation der Morphologie bzw. des Wuchstyps mit dem Immunphänotyp. Alle fünf untersuchten zentroblastischen Lymphome vom multilobulierten Subtyp, alle vier follikulären Lymphome Grad 3B und 11 von 14 monomorphen zentroblastischen Lymphomen zeigten nach den oben genannten Kriterien einen Keimzentrums-

ähnlichen (GC-ähnlichen) Phänotyp, während zentroblastische Lymphome vom polymorphen Subtyp, immunoblastische Lymphome, folliculäre Lymphome Grad 3B in Kombination mit einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom und primär extranodale großzellige B-Zell-Lymphome eine etwa gleichartige Verteilung zwischen GCB- und non-GCB-Typen aufwiesen. Extranodale DLBCL zeigten häufiger (in 50 % der Fälle) einen nicht-Keimzentrumsähnlichen Phänotyp als nodale Lymphome (27 von 72). Dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant ($p < 0,45$).

Immunphänotyp →	Non-GCB	GCB
Morphologie ↓		
FL3B	0 (0 %)	4 (100 %)
FL 3B + DLBCL	4 (36 %)	7 (64 %)
CB monomorph	3 (21 %)	11 (79 %)
CB multilobuliert	0 (0 %)	5 (100 %)
CB polymorph	15 (52 %)	14 (49 %, n=1 nicht klassifiziert)
IB	5 (56 %)	4 (44 %)
<i>Nodale DLBCL gesamt</i>	27 (38 %)	45 (62 %)
<i>Extranodale DLBCL</i>	13 (50 %)	13 (50 %)

Tabelle 5: Assoziation des Immunphänotyps mit der Morphologie

3.6 Korrelationen mit klinischen Parametern

Klinische Daten einschließlich Daten zum Follow-up konnten von allen 99 Patienten erhalten werden. Von diesen 99 Patienten litten 73 an primär nodalen Tumoren (einschließlich Tonsille und Milz) und 26 Patienten wiesen primär extranodale Tumoren auf. Ein Vergleich des Gesamtüberlebens dieser beiden Patientengruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,15$), auch ein Vergleich der Patienten mit nodalen und extranodalen Tumoren mit ausschließlich diffusem Wachstumsmuster konnte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,09$) aufzeigen. Der Vergleich der 84 Patienten mit einem Lymphom mit ausschließlich diffusem Wachstumsmuster mit den 15 Patienten mit einem FL3B/ FL3B+DLBCL zeigte keinen Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit ($p=0,35$).

In den primären Korrelationen zeigte sich ein klinisch signifikant erhöhtes Risiko für mehrere klinische Parameter, nämlich erhöhte LDH-Werte ($p < 0,001$), nicht-ambulanter Status ($p < 0,01$), B-Symptome ($p < 0,01$) und eine Tendenz zu einer schlechteren Prognose für Patienten mit einer Infiltration des Knochenmarkes ($p=0,05$), einem Alter über 60 Jahren ($p=0,06$) und einem extranodalen Befall in ≥ 2 Lokalisationen ($p=0,06$). Auch die Stratifikation der Patienten nach dem internationalen prognostischen Index (IPI) erwies sich als ein deutlicher prognostischer Marker ($p < 0,001$, Abbildung 5).

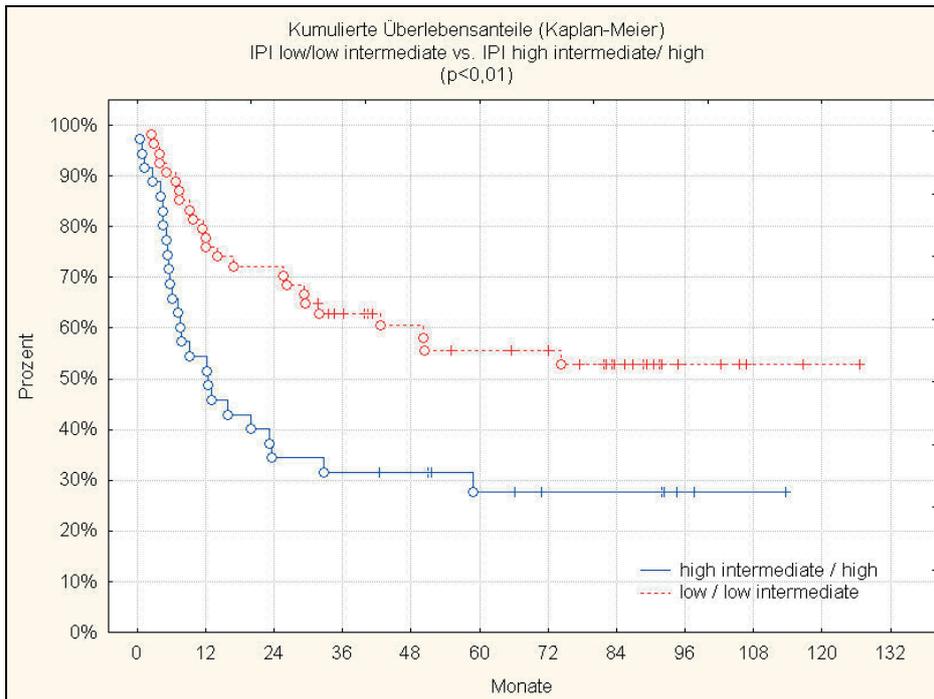


Abbildung 5: Kumulierte Überlebensanteile IPI low/ low intermediate versus high intermediate/ high (entsprechend IPI 0-2 versus IPI 3-5)

In der univariaten Analyse zeigten folgende Parameter eine ungünstige Prognose an, bzw. erwiesen sich als negative prognostische Marker (siehe Abbildung 6 bis Abbildung 11):

Expression von BCL-2 (unabhängig von der Färbintensität, $p < 0,001$), Negativität für CD10 ($p < 0,01$) bzw. BCL-6 ($p = 0,05$), Reaktivität für MUM-1p in ≥ 50 % der Kerne ($p = 0,01$) und ein Ki67-Index von unter 80 % ($p = 0,01$). Im Gegensatz zu diesen Parametern zeigte sich keine Korrelation einer plasmazytoiden Differenzierung mit der Prognose, ebensowenig eine CD5-Expression.

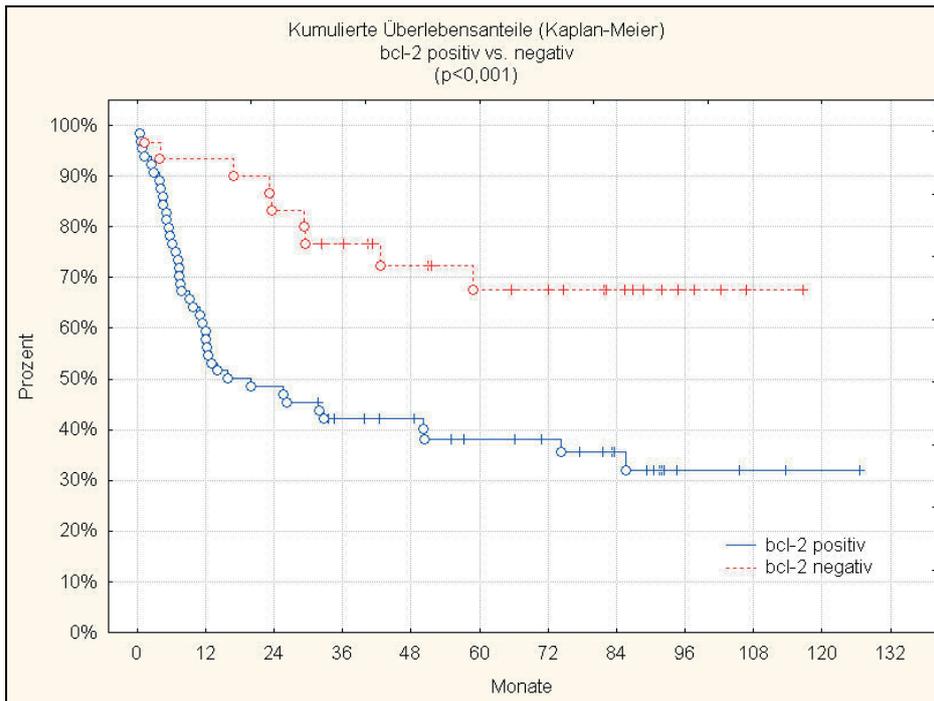


Abbildung 6: Kumulierte Überlebensanteile BCL-2 negativ versus BCL-2 positiv

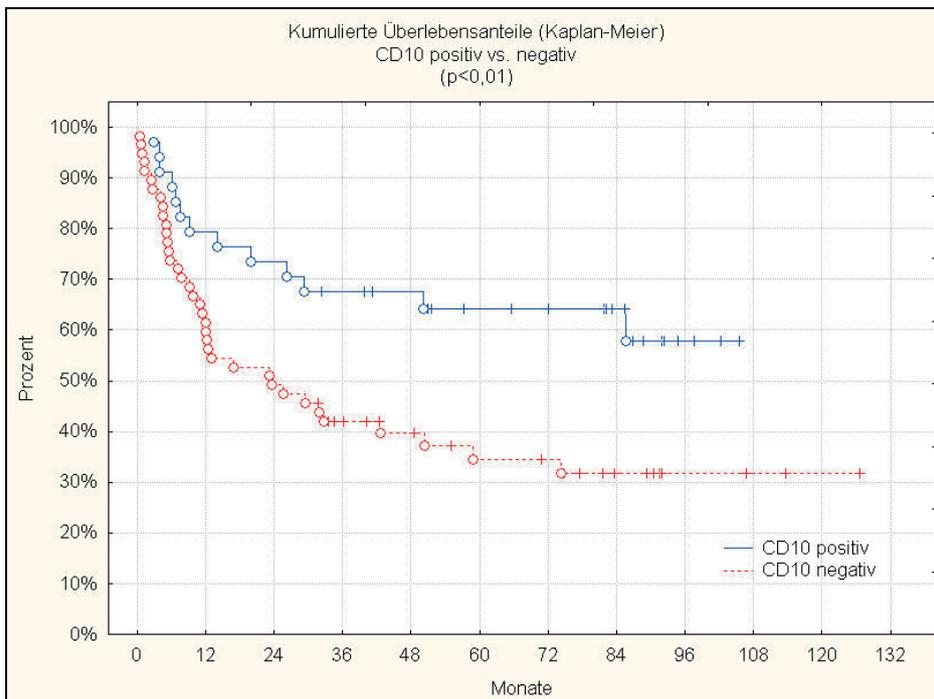


Abbildung 7: Kumulierte Überlebensanteile CD10 negativ versus CD10 positiv

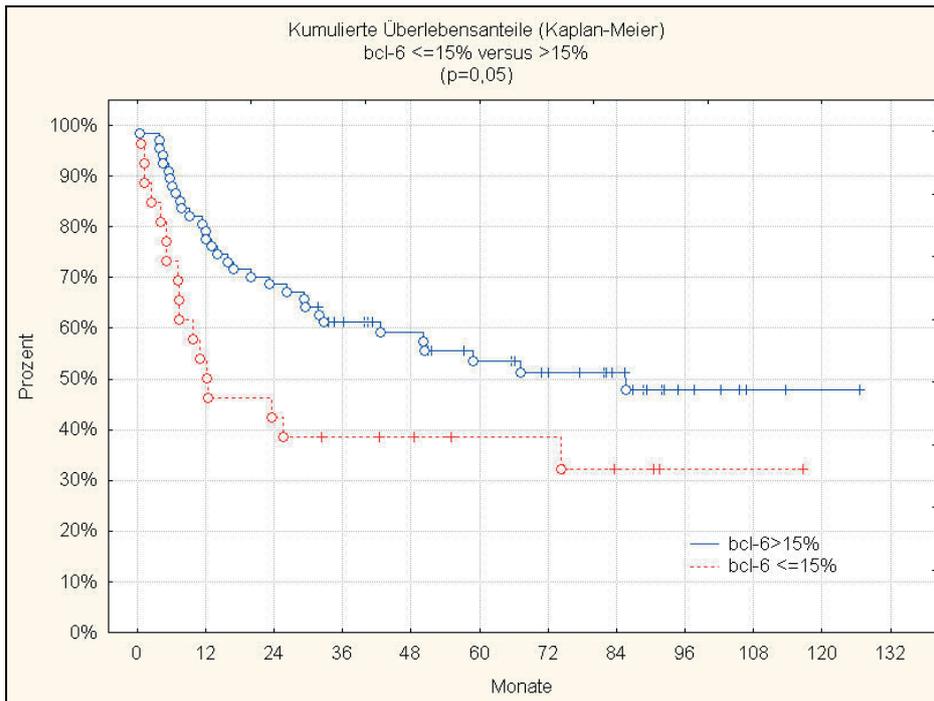


Abbildung 8: Kumulierte Überlebensanteile BCL-6 $\leq 20\%$ versus $> 20\%$

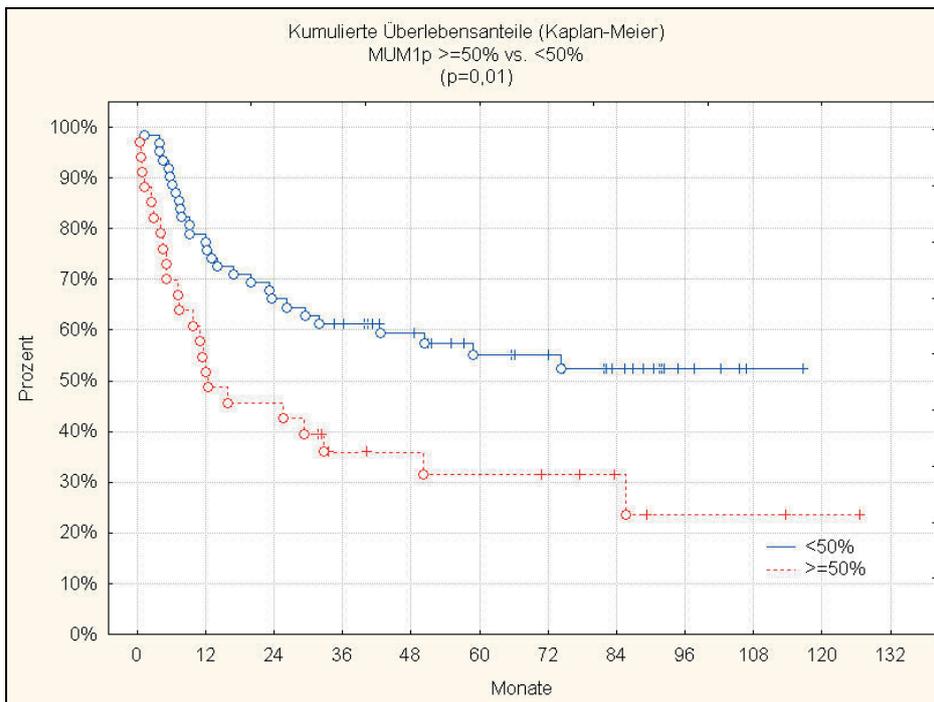


Abbildung 9: Kumulierte Überlebensanteile MUM1p $< 50\%$ versus MUM1p $\geq 50\%$

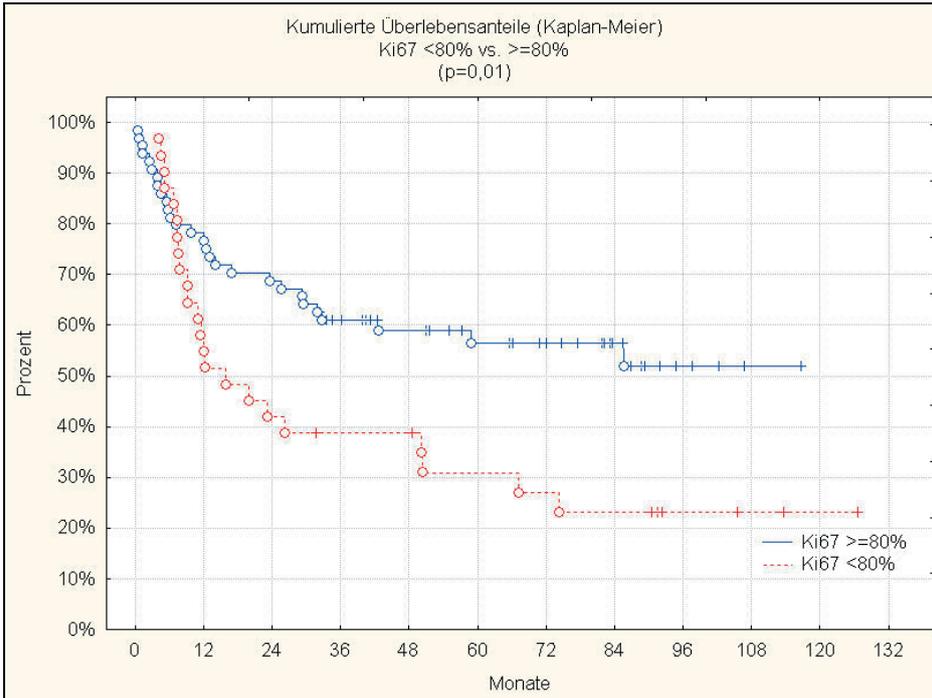


Abbildung 10: Kumulierte Überlebensanteile Ki67< 80 % versus Ki67≥ 80 %

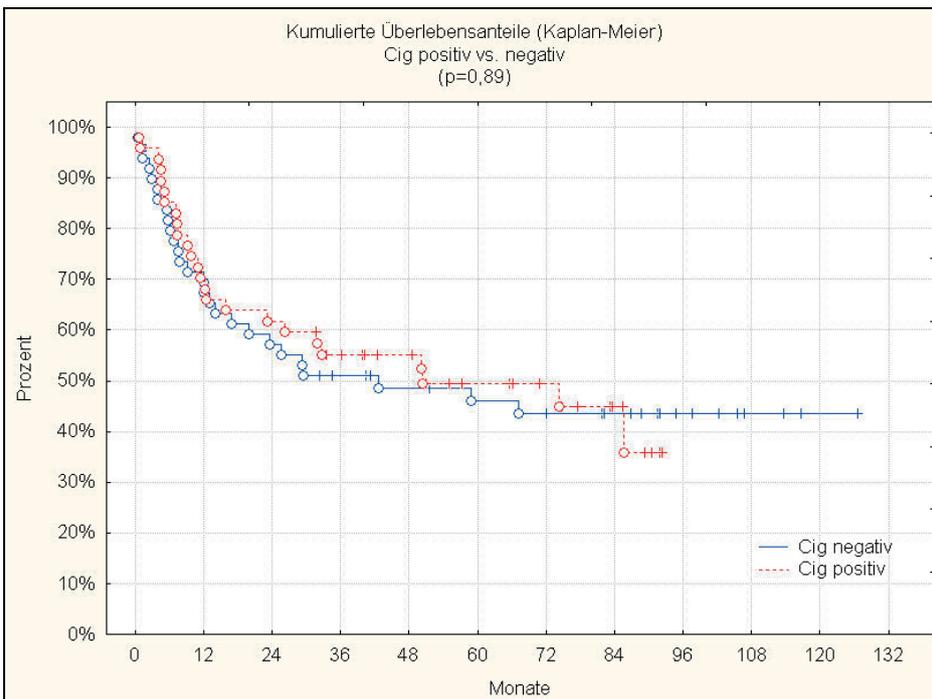


Abbildung 11: Kumulierte Überlebensanteile Cig negativ versus Cig positiv

Die Stratifikation der Tumoren in einen Keimzentrums-assoziierten (GCB) und einem nicht Keimzentrums-assoziierten (Non-GCB)-Typ nach den modifizierten Kriterien nach Hans et al. (2004) resultierte in einer relativ schwachen Korrelation zum Überleben (Abbildung 12).

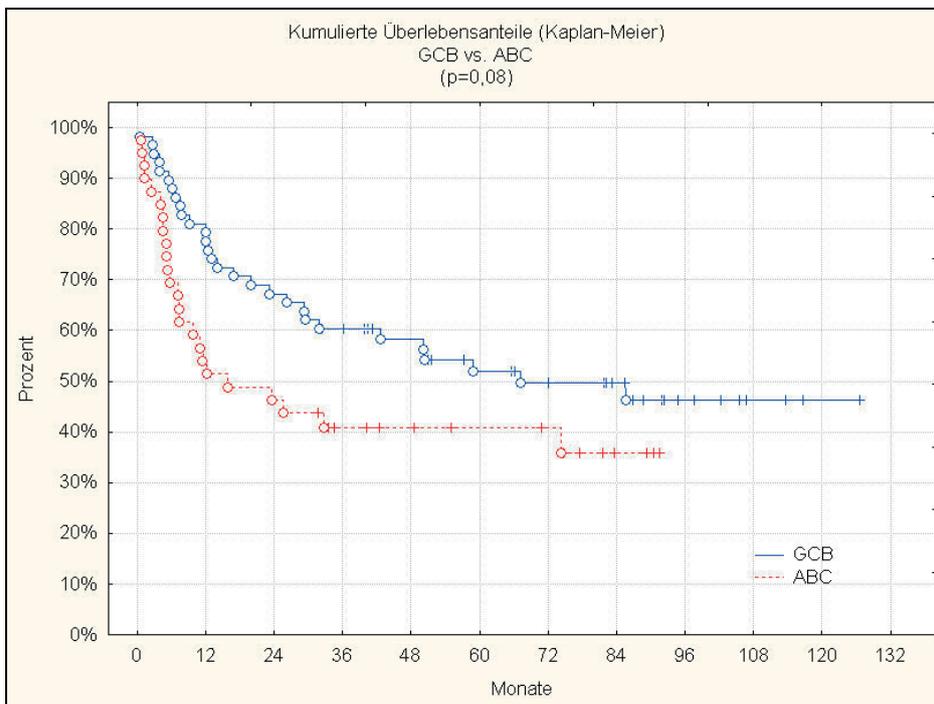


Abbildung 12: Kumulierte Überlebensanteile GCB versus non-GCB (ABC)

3.7 Abhängigkeit immunhistochemischer Parameter innerhalb prognostisch relevanter Subgruppen

Aufgrund der signifikanten Überlappung prognostisch eher günstiger und ungünstiger immunhistochemischer Parameter in den individuellen Tumorfällen wurde im folgenden versucht, die relative Bedeutung einer gegebenen Variable in einem anderen gegebenen, prognostisch relevanten Parameter zu untersuchen. Dabei zeigte sich bei einer derartigen kombinierten Analyse zweier Parameter eine relativ deutliche Abhängigkeit in bestimmten gegebenen Subgruppen von der Expression weiterer Marker. In der Tumorguppe mit einer (potentiell günstigeren) Ki67-Reaktivität von $\geq 80\%$ zeigten diejenigen

Patienten, deren Tumoren eine BCL-2-Expression ($p < 0,01$, Abbildung 13), eine Reaktivität von MUM-1p $\geq 50\%$ ($p=0,03$) bzw. eine Reaktivität von BCL-6 unter 20 % ($p=0,07$, nicht signifikant) oder eine CD10-Negativität ($p=0,01$) aufwiesen, eine deutlich oder zumindest tendentiell ungünstigere Prognose. In der Gruppe der CD10-positiven Tumoren zeigten eine BCL-2-Expression ($p < 0,01$) und ein Ki67-Index von unter 80 % ($p=0,03$, Abbildung 14) eine schlechtere Prognose an. Vergleichbare Verläufe zeigten sich in der Gruppe der BCL-6-positiven großzelligen B-Zell-Lymphome mit schlechterer Prognose der Patienten, die eine BCL-2- Expression ($p < 0,01$) oder einen Ki67-Index von unter 80 % zeigten ($p=0,01$). Unter den Tumoren mit einer MUM-1p-Expression in weniger als 50 % der Zellen stellten sich eine Positivität für BCL-2, ein niedriger Ki67-Index ($p=0,03$, Abbildung 15) und eine Negativität für CD10 ($p=0,04$) negative prognostische Indikatoren dar. Die Prognose BCL-2-negativer Tumoren wurde durch eine Negativität für CD10 und eine Reaktivität für MUM-1p negativ beeinflusst.

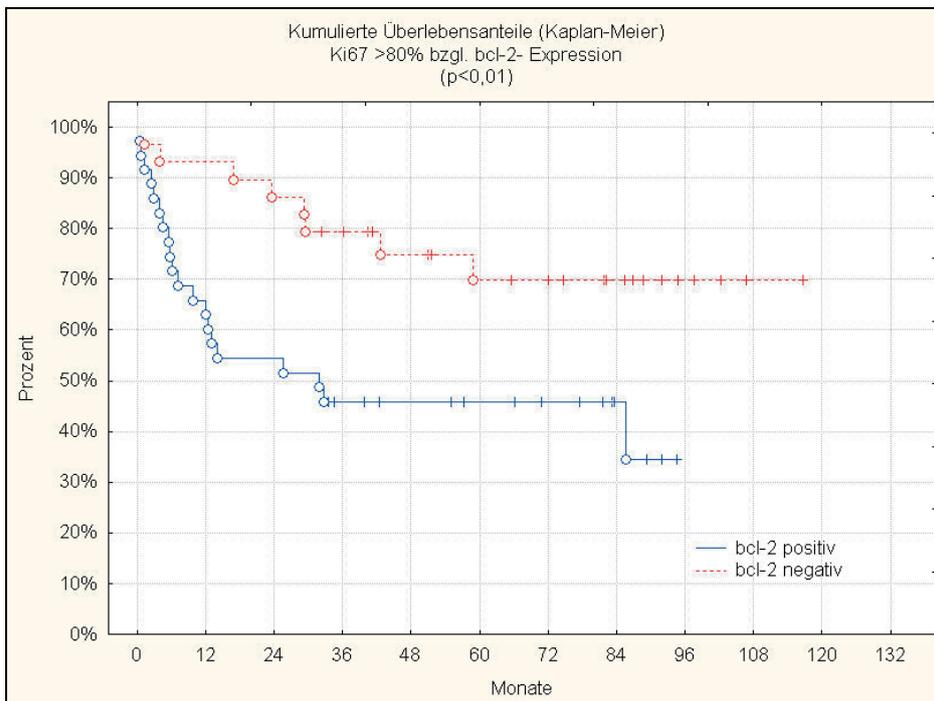


Abbildung 13: Kumulierte Überlebensanteile für Ki67 > 80 % bezüglich der BCL-2- Expression

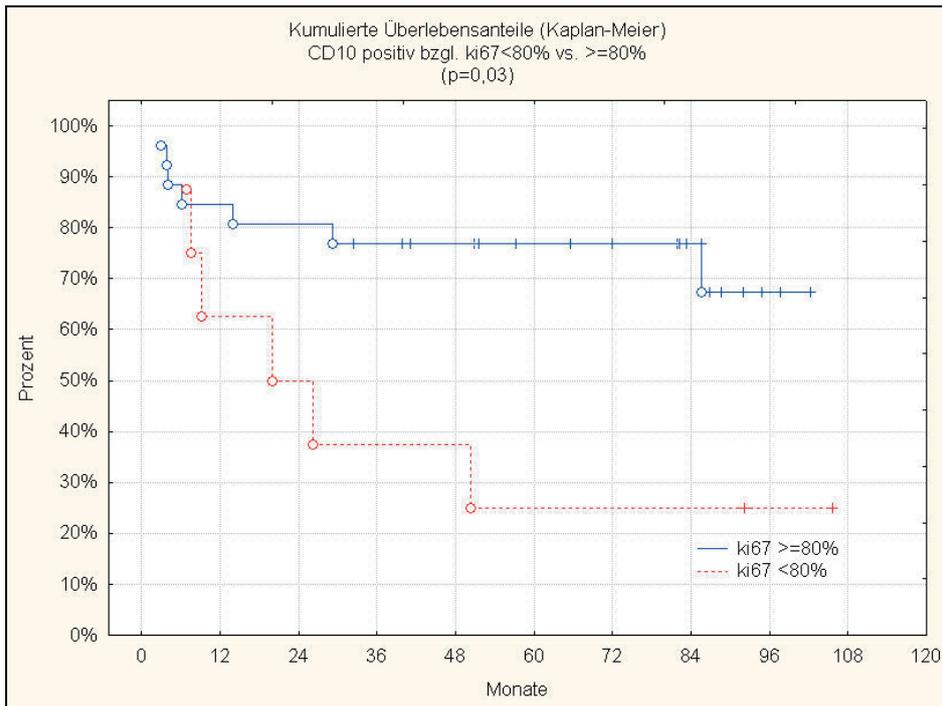


Abbildung 14: Kumulierte Überlebensanteile für CD10 positiv bezüglich des Proliferationsindex

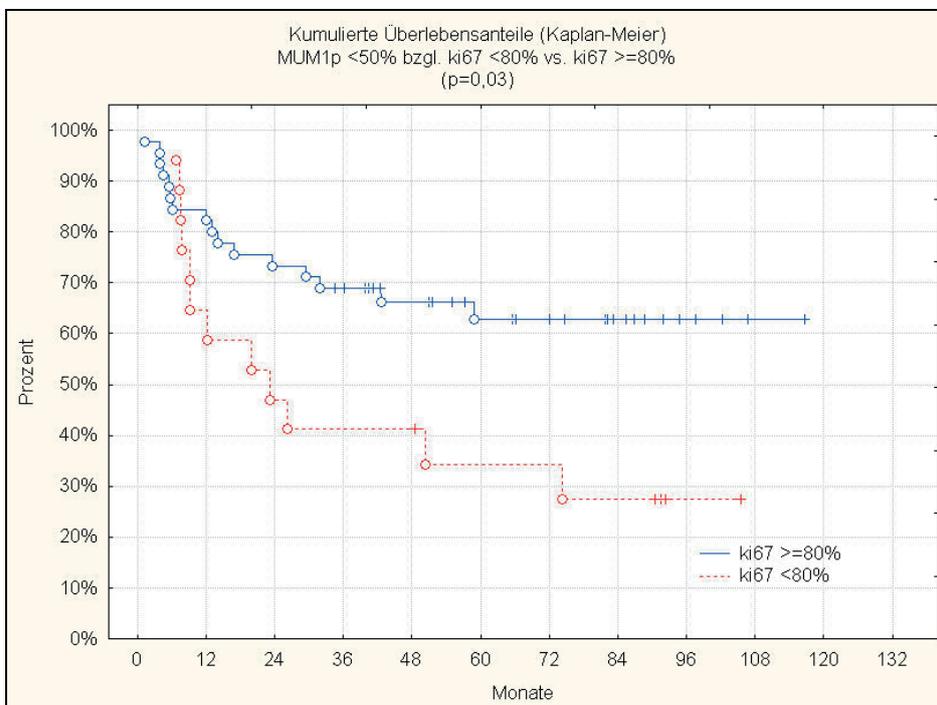


Abbildung 15: Kumulierte Überlebensanteile der MUM1p < 50 % bezüglich des Proliferationsindex

3.8 Entwicklung eines kombinierten immunhistochemischen Risiko-Scores (CIOPS)

Aufgrund der oben beschriebenen Überlegungen wurde ein Modell einer sequentiellen Addition negativer prognostischer Indikatoren in einem gegebenen lymphoiden Tumor entwickelt. In diesem System wurde bei Anwesenheit einer negativen Variable (also CD10-Negativität, BCL-6 < 20 %, Positivität für BCL-2, MUM-1-Expression in ≥ 50 % und Ki67-Index < 80 %) ein negativer Faktor gewertet, und die Summe der negativen Faktoren wurde als Risiko-Score angegeben, der von 0 bis 5 reichte.

Die Überprüfung der prognostischen Bedeutung dieses Risiko-Scores war in 94 Patienten im Log-Rank-Test möglich. Die Abbildungen 16 und 17 verdeutlichen den dramatischen Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit in drei prognostischen Gruppen mit einem Risiko-Score von 0, 1-4 und 5. In der Patientengruppe ohne Risikofaktoren (Score 0) überlebten alle Patienten (bis auf eine 80 Jahre alte Frau, die nach Diagnosestellung eine weitere Behandlung ablehnte). Im Gegensatz hierzu starben alle 5 Patienten in der Hochrisikogruppe (Score 5) innerhalb eines Jahres. Die in der Abbildung gezeigten Kurven beziehen sich auf alle 94 Patienten: Nahezu identische Kurvenverläufe lagen vor, wenn nur nodale Tumoren (inklusive tonsilläre und splenische Lymphome) oder nur Fälle mit einem diffusen Wachstumsmuster untersucht wurden. Die multivariate Analyse des kombinierten immunhistochemischen Risiko-Scores zeigte bemerkenswerterweise auch eine Unabhängigkeit vom Internationalen Prognostischen Index ($p < 0,05$).

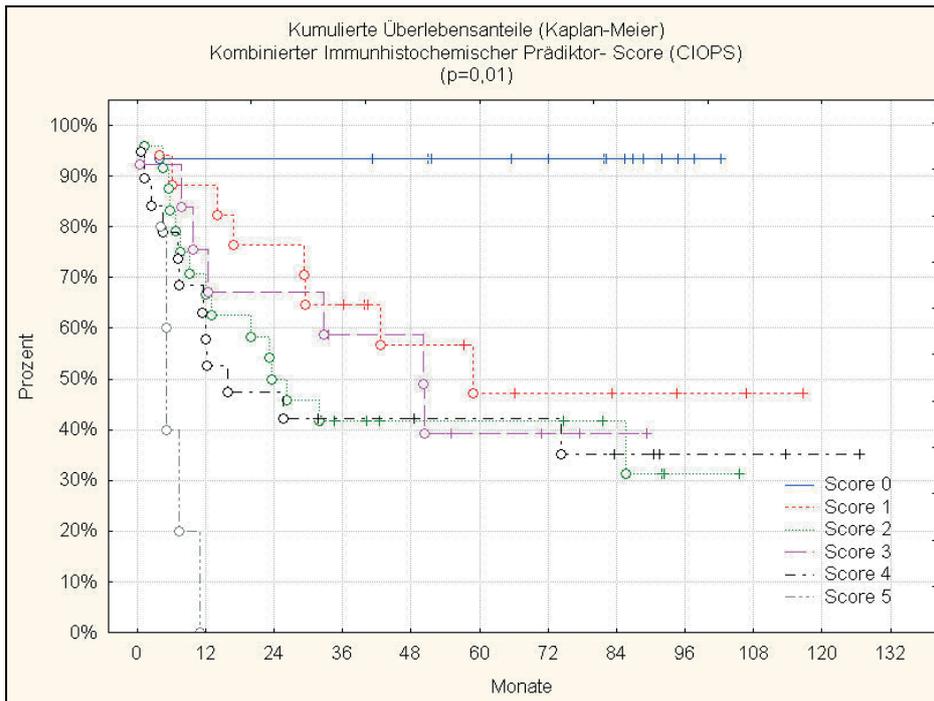


Abbildung 16: Kumulierte Überlebensanteile im kombinierten immunhistochemischen Prädiktor- Score (CIOPS)

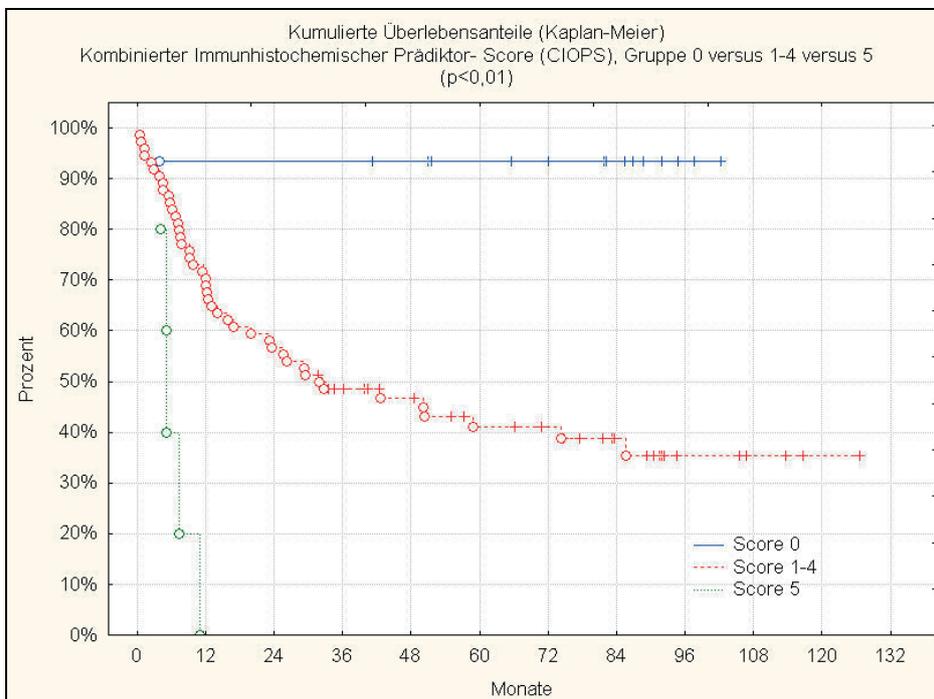


Abbildung 17: Kumulierte Überlebensanteile im immunhistochemischen Prädiktor-Score, gruppiert nach Score 0 versus Score 1- 4 versus Score 5

Innerhalb der mittleren Risikogruppe (Scores 1-4) erwiesen sich der IPI ($p=0,01$, Abbildung 18), ein erhöhter LDH-Wert ($p=0,02$, Abbildung 19) und B-Symptome als geeignet, um in dieser mittleren Risikogruppe noch eine weitere Stratifizierung durchzuführen, im Gegensatz zu anderen morphologischen oder immunhistochemischen Markern.

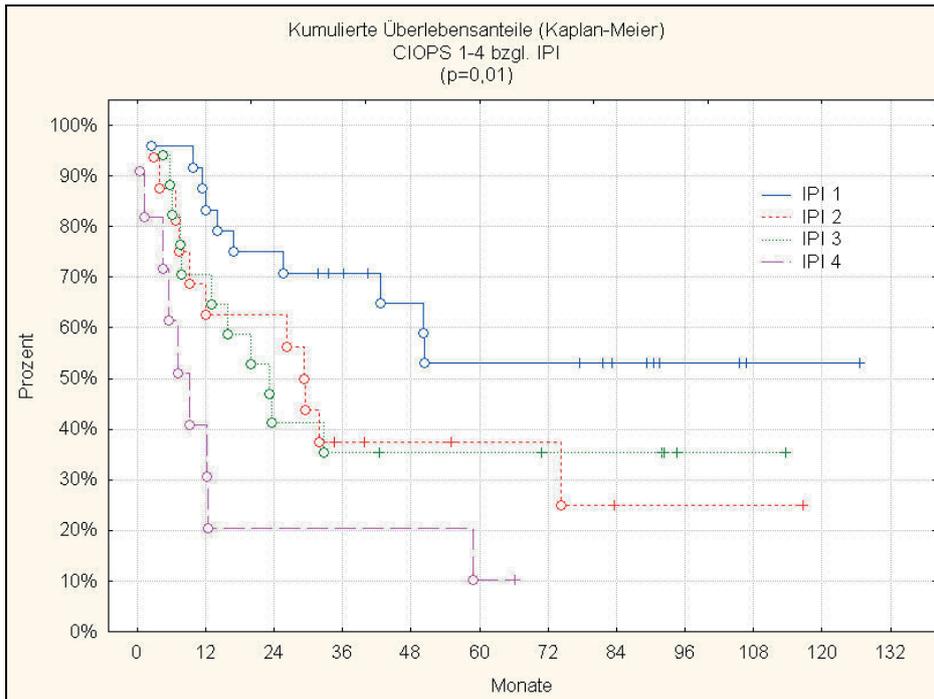


Abbildung 18: Kumulierte Überlebensanteile der Fälle mit mittlerem CIOP-Score bezüglich des Internationalen Prognostischen Index

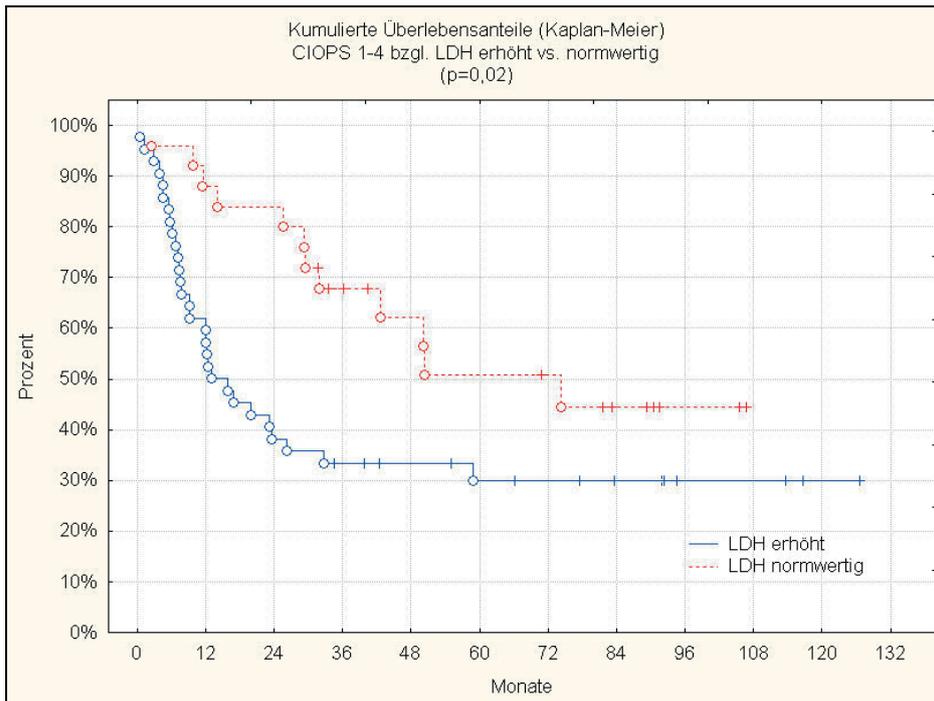


Abbildung 19: Kumulierte Überlebensanteile der Fälle mit mittlerem CIOP-Score bezüglich der LDH

4 Diskussion

4.1 *Ansätze zur Unterscheidung klinischer Risikogruppen diffuser großzelliger B-Zell-Lymphome*

Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome stellen eine heterogene Gruppe maligner Lymphome dar, die sich in ihrer Morphologie, ihrem Immunphänotyp, ihren genetischen Charakteristika und dem klinischen Verlauf unterscheiden. Bereits die Autoren der REAL-Klassifikation (Harris et al. 1994) hatten explizit festgestellt, dass die diagnostische Gruppe der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome keine Entität im biologischen Sinne darstellen würde, sondern eine Gruppe heterogener Tumoren. Dementsprechend waren in der Vergangenheit viele Bemühungen unternommen worden, um klinische Risikogruppen zu unterscheiden, z.B. über den morphologischen Ansatz (Engelhardt et al. 1997, Diebold et al. 2002), die Analyse der Proteinexpression von Proliferations- oder Apoptose-assoziierten Antigenen (Grogan et al. 1988, Silvestrini et al. 1993, Ansell et al. 1999, Hill et al. 1996, Kramer et al. 1996, Hermine et al. 1996, Gascoyne et al. 1997, Kramer et al. 1998, Filipits et al. 2002, Kuttler et al. 2002) oder die genetische Konstitution dieser Tumoren (Offit et al. 1994, Jerkeman et al. 1999, Schlegelberger et al. 1999).

4.2 *Genexpressionsprofile in der Risikoabschätzung diffuser großzelliger B-Zell-Lymphome*

Mit Hilfe von cDNA-Microarray-Untersuchungen ist es in den letzten Jahren gelungen, zwei DLBCL-Subgruppen zu identifizieren, die sich nicht nur in ihrem Genexpressionsprofil, sondern - davon abhängig - auch in ihrem biologischen und klinischen Verhalten deutlich unterscheiden (Alizadeh et al. 2000, Rosenwald et al. 2002). Der Keimzentrums-B-Zell-Typ des DLBCL (Germinal-Center-B-cell-like - GCB-like - DLBCL) zeigt in seiner Genexpression auffallende Ähnlichkeiten mit normalen Keimzentrums-B-Zellen, während bei dem aktivierten B-Zell-Typ des DLBCL (Activated-B-cell-like - ABC - DLBCL)

ein ähnliches Expressionsprofil wie von aktivierten peripheren B-Lymphozyten vorliegt. Als Ursprungszelle des ABC-ähnlichen DLBCL ist eine Post-Keimzentrums B-Zelle anzunehmen. Ein dritter Typ des DLBCL (unklassifiziert oder Typ III) zeigt ein von beiden Typen unabhängiges Genexpressionsmuster. Patienten mit einem großzelligen diffusen B-Zell-Lymphom vom GCB-ähnlichen oder ABC-ähnlichen Subtyp zeigten in retrospektiven klinischen Studien eine deutlich unterschiedliche Prognose, mit einer Fünfjahres-Überlebensrate von 60 % für GCB-DLBCL und etwa 35 % für ABC-DLBCL. Durch die Identifikation weiterer prognoseassoziiierter Genexpressionssignaturen (Proliferation, Expression von MHC-Klasse 2- Molekülen und „Host Response“ konnte ein Genexpressions-basiertes Überlebensmodell erstellt werden, das Patienten mit einer günstigeren oder ungünstigeren Prognose (unabhängig von der Klassifikation in GCB- und ABC-Typen) identifiziert. Neben ihren unterschiedlichen Genexpressionsprofilen und klinischen Verläufen unterscheiden sich die beiden DLBCL-Subgruppen auch in ihren genetischen Alterationen. In DLBCL vom Keimzentrums-B-Zell-Typ liegen häufiger eine t(14;18)-Translokation sowie genetische Zugewinne im kurzen Arm des Chromosoms 2 und im langen Arm des Chromosoms 12 vor. Als typische chromosomale Imbalancen bei ABC-DLBCL-Patienten fanden sich neben einer konstitutiven Aktivierung des NF-kappa B-Signalweges häufig Zugewinne in den langen Armen der Chromosomen 3 und 18 (Rosenwald et al. 2002, Bea et al. 2005).

4.3 Die Suche nach Genexpressionsanalyse-assoziierten prognostischen Parametern

Aufgrund des gezeigten starken Einflusses eines unterschiedlichen Genexpressionsmusters auf das klinische Verhalten der Tumoren wurde versucht, die technisch aufwendige Genexpressionsanalyse in der Risikoabschätzung durch eine Bestimmung von kleineren Gruppen von Genen oder gar durch die Untersuchung von Einzelgenen zu ersetzen. So zeigten beispielsweise Barrans et al. (2002) bei Expressionsanalysen im Northern-Blot

eine deutliche Abhängigkeit der Prognose von einer Expression von BCL-6 auf. Lossos et al. (2004) untersuchten 36 Gene, die in Expressionsstudien mit Microarrays als prognoserelevant erkannt worden waren, bei 66 Patienten mit einer quantitativen Real-time Polymerase-Kettenreaktion und konnten ein multivariates Modell mit nur sechs prognoserelevanten Genen etablieren und validieren.

In immunhistochemischen Untersuchungen verschiedener Gruppen zeigte sich ein eher heterogenes Bild. Während z.B. Colomo et al. (2003) und Xu et al. (2001) den prognostischen Wert eines Keimzentrums-ähnlichen Immunphänotyps nicht zeigen konnten, fanden Oshima et al. (2001) und Hans et al. (2004) eine positive Korrelation eines GC-Immunphänotyps mit der Prognose. In der Untersuchung von Hans et al. (2004) an Tissue-Microarrays (TMAs) konnte in einer Untersuchung von 142 Fällen, zu denen auch Expressionsdaten aus dem cDNA-Microarray (Lymphochip) vorlagen, eine Expression von CD10 sowie BCL-6 als positive prognostische Faktoren erkannt werden, während eine Reaktivität für MUM-1p oder Cyklin D2 ein schlechteres Überleben anzeigte. In einem Modell unter Verwendung von CD10, BCL-6 und MUM-1p und der Definition einer GCB-Gruppe bzw. einer Non-GCB-Gruppe zeigte sich ein deutlich unterschiedliches Fünfjahresüberleben mit deutlich besserer Prognose der GCB-Gruppe (76 % versus 34 %). In dieser Untersuchung zeigte sich zusätzlich, dass unter Verwendung der entsprechenden Marker und im Vergleich mit der cDNA-Microarray-Klassifikation als dem „Goldstandard“ die Sensitivität des TMA-Ansatzes bei 71 % für die GCB-Gruppe und 88 % für die Nicht-GCB-Gruppe lag.

4.4 Ergebnisse der vorliegenden Studie

In der vorliegenden Serie bestätigte die kombinierte Analyse von Antigenen, die entweder mit einer Keimzentrumszell-Differenzierung (CD10 und BCL-6), oder mit einer postfollikulären Differenzierung assoziiert wurden (MUM-1p, plasmazytoide Differenzierung) die Heterogenität der Antigen-Expression in den Tumorzellen großzelliger B-Zell-Lymphome. Dies steht in deutlichem

Gegensatz zu der koordinierten Expression entsprechender Antigene in unterschiedlichen Kompartimenten reaktiven lymphatischen Gewebes (Dogan et al. 2000, Falini und Mason 2002, Falini et al. 2000). Die statistische Analyse zeigte jedoch eine starke positive Korrelation der Expression von CD10 und BCL-6 einerseits und von MUM-1 und einer plasmazytoiden Differenzierung andererseits. Auch die bestehenden negativen Korrelationen zwischen der Markerexpression in den beiden unterschiedlichen Gruppen zeigten ihren möglichen Wert in der Identifikation GC-assoziierter und post-GC-assoziierter Differenzierungswege. In der univariaten Analyse identifizierte die Expression sowohl von CD10 wie auch von BCL-6 prognostisch relevante, günstige Subgruppen, während Tumoren mit einer signifikanten MUM-1-Reaktivität eine deutlich schlechtere Prognose aufwiesen. Zwei andere Marker in der vorliegenden Studie - nicht assoziiert mit einer Keimzentrumsdifferenzierung oder einer Post-Keimzentrumsdifferenzierung - zeigten ebenfalls einen Wert zur Identifikation von Risikogruppen (BCL-2 und Ki67). Die negative prognostische Bedeutung von BCL-2 bei DLBCL ist mittlerweile gut etabliert (Hill et al. 1996, Kramer et al. 1996, Hermine et al. 1996, Gascoyne et al. 1997, Kramer et al. 1998). Für den Proliferationsindex ist die Situation noch unklar. Grogan et al. (1988) und Silivstrini et al. (1993) zeigten, dass Tumoren mit einem hohen Ki67-Index oder hoher Zellproliferation eine schlechte Prognose aufwiesen und auch in der Analyse der Genexpression mit dem Lymphochip von Rosenwald und Kollegen wurde die ProliferationsSignatur als ein ungünstiger prognostischer Parameter erkannt. Auf der anderen Seite zeigte die Arbeit von Wilson und Kollegen (1997), dass Patienten mit Tumoren mit niedrigerem Proliferationsindex (Ki67 weniger als 80 %) eine ungünstigere Prognose aufwiesen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sind in Einklang mit letzterer Arbeit und legen nahe, dass eine niedrigere Proliferationsrate der neoplastischen Zellen in einer niedrigeren Sensitivität gegenüber einer Kombinations-Polychemotherapie resultiert. Interessant ist zudem, dass in der Arbeit von Wilson et al. (1997) auch eine signifikant negative Korrelation des Ki67-Index mit einer starken BCL-2-Expression nachgewiesen worden war. Im Gegensatz zu den Befunden von Colomo et al. (2002) waren in der

vorliegenden Studie CD10- oder BCL-6-positive Tumoren durch höhere Ki67-Indizes gekennzeichnet.

4.5 Risikostratifikation von Patienten mit großzelligen B-Zell-Lymphomen anhand des Immunphänotyps

In der vorliegenden Serie erbrachte die Risikostratifikation von Patienten anhand des Hans-Klassifikators nur eine schwache Korrelation ($p=0,08$) bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit, im Gegensatz zur ursprünglichen Arbeit von Hans und Kollegen am LLMPP-Kollektiv (2004) und in Übereinstimmung zu den Daten von Barrans et al. (2002), die eine prognostische Signifikanz für die Risikostratifikation von DLBCL in GC- und post-GC-Typen am Paraffinmaterial nicht zeigen konnten.

In einer neueren Studie untersuchten Berglund und Kollegen (2005) prognostische Parameter bei 161 Patienten mit diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen mittels immunhistochemischer Färbungen am konventionellen Schnittpräparat. In dieser Studie zeigten Patienten, deren Tumoren CD10 oder BCL-6 exprimierten, ein besseres Gesamtüberleben, während eine Positivität für BCL-2 ein adverser prognostischer Faktor war. Eine Reaktivität für IRF-4 war nicht mit dem Überleben assoziiert. Auch die Stratifikation nach Hans et al. 2004 erbrachte eine signifikant günstigere Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit einem GC-Phänotyp gegenüber einem Non-GC-Phänotyp. Interessanterweise zeigten Patienten mit einem GC-Phänotyp und einer zusätzlichen Reaktivität für IRF-4 keinen unterschiedlichen Verlauf im Vergleich zu IRF-4-negativen Fällen; eine Expression von BCL-6 in der Non-GC-Gruppe identifizierte allerdings Patienten mit einer signifikant besseren Überlebenswahrscheinlichkeit. Eine Expression von BCL-2 zeigte sich als negativer prognostischer Marker lediglich in der GC-Gruppe, jedoch nicht in der Non-GC-Gruppe. Auch die gleichzeitige Analyse von immunhistochemischen Parametern und IPI-Gruppen war hier von Bedeutung, insbesondere in der Abgrenzung einer sehr günstig verlaufenden Subgruppe von Patienten mit

einem IPI von 0-2, einem GC-Phänotyp und negativer BCL-2-Färbung. Zinzani und Kollegen (2005) stratifizierten ihre Patienten nach einem modifizierten Modell in eine Gruppe von GC-Patienten mit oder ohne zusätzliche Expression von CD10 und IRF-4 zusätzlich zu BCL-6 und BCL-2-Negativität, eine BCL-2-positive Non-GC-Gruppe mit einer Reaktivität von CD30 oder CD138 und in eine intermediäre Gruppe mit einer heterogenen Expression der Keimzentrumssignatur und positiver Reaktivität für BCL-2. Die Analyse dieser unterschiedlichen Gruppen ergab 3 distinkte Gruppen mit unterschiedlichem Gesamtüberleben mit der besten Prognose für die GC-Gruppe, der schlechtesten Prognose für die Non-GC-Gruppe und einem intermediären Verlauf in der gemischten Gruppe. Einen ähnlichen Ansatz einer kombinierten Markeranalyse verfolgten auch Muris und Kollegen (2006). Das Patientenkollektiv umfasste 71 nodale DLBCL und es wurde die prognostische Bedeutung einer Expression von GCB/ Non-GCB-Markern, nämlich CD10, BCL-6 und MUM-1, sowie von Apoptose-hemmenden Proteinen (BCL-2, XIAP und FLIP) untersucht. In dieser Serie zeigten BCL-2, CD10 und MUM-1 eine signifikante Bedeutung in der Überlebensanalyse. Eine Bedeutung einer BCL-6-Expression für das Überleben lag in dieser Serie bemerkenswerterweise nicht vor. Die Autoren konnten aber eine prognostische Relevanz für den GCB-Algorithmus von Hans et al. (2004) nachweisen, allerdings auch eine Relevanz für den GCB-Algorithmus, wenn nur CD10 und MUM-1 berücksichtigt wurden. In einem neuen Algorithmus wurde die Expression von BCL-2, CD10 und MUM-1 berücksichtigt: die Gruppe I enthielt alle BCL-2-negativen Fälle und BCL-2/ CD10-positive Fälle sowie BCL-2-positive, CD10-negative und MUM-1-negative Fälle. Alle anderen Fälle (BCL-2-positiv, CD10-negativ und MUM-1-positiv) wurden der Gruppe II zugeordnet und es ergab sich eine sehr deutliche Unterschiedlichkeit in der Prognose mit signifikant verschiedener Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen den beiden Gruppen.

4.6 *Der kombinierte immunhistochemische Prädiktor-Score*

Aufgrund der Überlegungen, dass in der Analyse mit Genexpressions-Plattformen die simultane Expression von zahlreichen (bis zu tausenden) Genen gleichzeitig erfasst wird und aus der beobachteten Abhängigkeit der beschriebenen Marker untereinander, ergab sich die Fragestellung, auch in Analogie zu den oben beschriebenen drei neueren Veröffentlichungen, die gemeinsame oder ausschließliche Reaktivität der univariat signifikant gefundenen immunhistochemischen Marker zu testen. Nach diesem Modell wurde den Fällen ein individueller Risiko-Score von 0 bis 5, basierend auf der Expression von CD10, BCL-6, MUM-1 sowie BCL-2 und der Höhe der Ki67-Reaktivität, zugeteilt. Für eine Expression eines prognostisch negativen Markers wurde ein Punkt vergeben, so dass Tumoren mit einem potentiell niedrigeren Risiko einen niedrigeren Index, solche mit erwartetem hohem Risiko einen höheren Risiko-Score aufwiesen. Die Analyse der unterschiedlichen Patienten-Kohorten in einem Kaplan-Meier-Modell ergab drei ausgeprägt unterschiedliche Patientengruppen mit einer Niedrigrisikogruppe von 15 Patienten, einer Hochrisikogruppe von 5 Patienten mit einem sehr schlechten klinischen Verlauf und einer intermediären Gruppe (mit einem Score von 1 bis 4). Obwohl nur 20 % der Patienten in der vorliegenden Serie einer der definierten Niedrig- oder Hochrisikogruppen dieses Modell zugeordnet werden konnten, legt die ausgeprägte Unterschiedlichkeit in den Mortalitätsraten in diesen beiden Gruppen (7 % versus 100 %) doch deutlich ihren möglichen Wert in der Analyse prospektiver Studien nahe. Nach diesen präliminären Daten zeigte die multivariate Analyse des kombinierten immunhistochemischen Scores eine Unabhängigkeit von den Parametern des IPI.

Der hier gezeigte Ansatz stellt also eine Erweiterung der oben beschriebenen Ansätze zu einer Analyse klinischen Risikos in kombinierten Algorithmen dar. Eine Verifizierung der gezeigten Ergebnisse durch eine Analyse einer homogen behandelten Gruppe von Studienpatienten erscheint allerdings angezeigt.

4.7 Ausblick

Obwohl in der vorliegenden Arbeit und in den zitierten Studien eine prognostische Relevanz bestimmter individueller Marker oder Markerkonstellationen gezeigt werden konnte, muss die Interpretation der vorgelegten Ergebnisse und insbesondere ihre Anwendung im Rahmen von zukünftigen Studien kritisch gesehen werden. Die prognostische Relevanz bestimmter Marker oder Markerkonstellationen kann sich nämlich dramatisch ändern, wenn die äußeren Bedingungen für entsprechende Studien variiert werden. So zeigte sich beispielsweise in einer Studie der französischen GELA, dass die negative prognostische Bedeutung einer BCL-2-Expression bei zusätzlicher Anwendung eines Anti-CD20-Antikörpers (Rituximab) in der Therapie die prognostische Bedeutung von BCL-2 deutlich abschwächt, bzw. aufhebt (Mounier et al. 2003). Die prognostische Unterschiedlichkeit des GCB-versus Non-GCB-Phänotyps am Paraffinmaterial gilt nicht für rezidierte oder therapierefraktäre diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (Moskowitz et al. 2005). Schließlich konnte von Winter und Kollegen kürzlich gezeigt werden, dass die prognostische Signifikanz einer BCL-6 Proteinexpression bei DLBCL bei einer Rituximab-CHOP-Therapie verschwindet. Die Autoren beschrieben nämlich, dass sowohl das ereignisfreie wie auch das Gesamtüberleben von BCL-6-negativen Patienten unter R-CHOP-Therapie deutlich besser als im Vergleich zu einer alleinigen CHOP-Therapie war; für die BCL-6-negativen Tumoren ergab sich hingegen kein Unterschied in den beiden Therapiearmen.

Die Ergebnisse dieser Studien legen also sehr deutlich nahe, dass eine Evaluation von prognostischen Indikatoren oder Modellen im Zusammenhang einer jeden neuen therapeutischen Strategie neu erfolgen muss.

5 Zusammenfassung

Die diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome (DLBCL) stellen den häufigsten Typ aller Non-Hodgkin-Lymphome dar, sind aber morphologisch, immunologisch, genetisch und klinisch eine sehr heterogene Gruppe.

Aufgrund dieser Heterogenität von DLBCL wurde in mehreren Studien untersucht, ob eine molekulare Heterogenität der Tumoren vorläge, bzw. versucht, eine molekulare Reklassifikation zu erreichen. Resultat dieser Bemühungen war eine Unterscheidung bzw. Definition einer Keimzentrums-ähnlichen (GCB-cell-like) Gruppe und einer aktivierten B-Zellen-ähnlichen (ABC-like) Gruppe, die sich in ihrem Ansprechen auf übliche Therapieschemata, mit einer deutlich besseren Prognose für die GCB-like-Gruppe, unterschieden. Die hierbei angewendete Microarray-Technologie hat den entscheidenden Nachteil, dass hierfür qualitativ hochwertige RNA zur Verfügung stehen muss. Neu ist der Ansatz, unterschiedliche Proteinexpressionsmuster am Paraffinmaterial zur Unterscheidung prognostisch relevanter Gruppen heranzuziehen. Die hierbei erzielten Daten sind allerdings in Ihren Aussagen hinsichtlich der prognostischen Wertigkeiten widersprüchlich.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst verschiedene biologische Parameter am Paraffinmaterial hinsichtlich ihrer prognostischen Wertigkeit in der Risikostratifikation von DLBCL untersucht. In einem ersten Schritt wurden klinische Daten von 99 *de novo* entstandenen großzelligen B-Zell-Lymphomen erhoben, bei denen es sich um 84 DLBCL und um elf DLBCL mit einer weiteren Komponente eines follikulären Lymphoms Grad 3B bzw. auch um vier Fälle mit ausschließlich follikulärem Wachstumsmuster handelte. Die Klassifikation der Fälle nach dem Internationalen Prognostischen Index (IPI) sowie der einzelnen klinischen Parameter des IPI zeigte eine deutliche prognostische Relevanz.

In einem zweiten Schritt wurden immunhistochemische Färbungen mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt und auf ihre prognostische Bedeutung überprüft. Als negative prognostische Parameter erwiesen sich die Negativität

für CD10 sowie BCL-6, also Antigene, die mit einer Keimzentrumszell-Differenzierung assoziiert werden, sowie eine Überexpression von MUM-1, das mit einer postfollikulären Differenzierung assoziiert wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass einer Expression von BCL-2 und einem Ki67-Index von unter 80 % eine negative prognostische Bedeutung zukommt. Die Stratifikation der Fälle in einen GCB- und einen ABC- Typ anhand des Hans-Klassifikators zeigte nur eine schwache Korrelation zur Überlebenswahrscheinlichkeit.

In einem dritten Schritt wurde gezeigt, dass die kombinierte Analyse jeweils zweier Parameter eine relative Abhängigkeit ihrer Expression von der Expression weiterer Marker erkennen ließ. Aus diesem Grunde wurde ein Modell einer sequentiellen Addition negativer prognostischer Indikatoren entwickelt, in der bei Anwesenheit einer negativen Variable (CD10-Negativität, BCL-6 < 20%, BCL-2 positiv, MUM-1 \geq 50% und Ki67 < 80%) ein negativer Faktor gewertet und die Summe dieser als Risiko-Score angegeben wurde.

Die Stratifikation der Patienten anhand dieses „kombinierten immunhistochemischen Risiko-Scores“ zeigte drei prognostisch deutlich unterschiedliche Gruppen: In der Gruppe von Patienten ohne Risikofaktoren verstarb lediglich eine Patientin (die eine Behandlung abgelehnt hatte); in der Hochrisikogruppe (Score 5) verstarben alle Patienten innerhalb eines Jahres. Die multivariate Analyse des Scores ergab dabei eine Unabhängigkeit von den Parametern des IPI. In der intermediären Gruppe mit einem Risiko-Score von 1-4 zeigten sich der IPI sowie eine LDH-Erhöhung und das Vorhandensein einer B-Symptomatik als geeignete Parameter, um hier eine weitere Stratifizierung durchzuführen.

Die vorliegende Arbeit stellt somit eine Erweiterung der publizierten Ansätze einer Erfassung prognostischer Indikatoren in kombinierten Algorithmen dar. Eine Verifizierung der gezeigten Ergebnisse in einer homogen behandelten Patientengruppe innerhalb einer klinischen Studie muss Ziel weiterer Untersuchungen sein.

6 Literaturverzeichnis

Alizadeh AA, Elsen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*; 403:503-511(2000)

Ansell SM, Kurtin PJ, Stenson M, Habermann TM, et al. Evaluation of the proliferative index as a prognostic factor in diffuse large cell lymphoma: correlation with the International Index. *Leuk Lymphoma*; 34(5-6):529-37 (1999)

Baars JW, de Long D, Willemse EM, Gras L, Dalesio O, et al. Diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphomas: the clinical relevance of histological subclassification. *Br J Cancer*; 79(11-12):1770-6 (1999)

Barrans SL, Carter I, Owen RG, et al. Germinal center phenotype and BCL-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*; 99:1136-1143 (2002)

Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, Burek C, Ott G, Greiner TC, Muller-Hermelink HK, Rosenwald A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*; 106(9):3183-90 (2005)

Berglund M, Thunberg U, Amini RM, Book M, Roos G, et al. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Mod Pathol*; 18(8):1113-20 (2005)

Colomo L, López-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martínez A, Bosch F, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*; 101:78-84 (2003)

Diebold J, Anderson JR, Armitage JO, Connors JM, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic analysis of 444 cases classified according to the updated Kiel- classification. *Leuk Lymphoma*; 43(1):97-104 (2002)

Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson PG. CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*; 24:846-852 (2000)

Engelhard M, Brittinger G, Huhn D, et al. Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood*; 89:2291-7 (1997)

Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, et al. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, and activated T cells. *Blood*; 95:2084-2092 (2000)

Falini B, Mason DY. Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukaemia: clinical value of their detection by immunohistochemistry. *Blood*; 99:409-26 (2002)

Filipits M, Jaeger U, Pohl G, Stranzl T, Simonitsch I, Kaider A, et al. Cyclin D3 is a predictive and prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*; 8(3):729-33 (2002)

Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, et al. Prognostic significance of BCL-2 protein expression and BCL-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*; 90:244-51 (1997)

Gatter KC, Warnke RA. Diffuse large B-cell lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. WHO classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), IARC Press; 171-174 (2001)

Grogan TM, Lippman SM, Spier CM, et al. Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphomas as determined by the monoclonal antibody Ki67. *Blood*; 71:1157-60 (1988)

Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Muller-Hermelink HK, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*; 103:275-82 (2004)

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group [see comments]. *Blood*; 84:1361-92 (1994)

Hermine O, Haioun C, Lepage E, et al. Prognostic significance of BCL-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood*; 87:265-72 (1996)

Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, 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*; 88:1046-51 (1996)

Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, et al. BCL-2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*; 24(6):961-968 (2006)

Jerkeman M, Johansson B, Akerman M, Cavallin-Stahl E, Kristoffersson U, Mitelman F. Prognostic implications of cytogenetic aberrations in diffuse large B-cell lymphomas. *Eur J Haematol*; 62(3):184-90 (1999)

Kaplan GL, Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*; 53:457-481(1958)

Katzenberger T, Ott G, Klein T, Kalla J, Muller-Hermelink HK, Ott M. Cytogenetic alterations affecting BCL-6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a diffuse large B-cell component. *Am J Pathol*; 165(2):481-90 (2004)

Kramer MH, et al. Clinical significance of BCL-2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol*; 14:2131-8 (1996)

Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, et al. Clinical relevance of BCL-2, BCL-6 and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*; 92:3152-3162 (1998)

Kuttler F, Valnet-Rabier MB, Angonin R, Ferrand C, Deconinck E, et al. Relationship between expression of genes involved in cell cycle control and apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma: a preferential survivin-cyclin B link. *Leukemia*; 16(4):726-35 (2002)

Lennert K, Feller AC. Non-Hodgkin's lymphomas: principles and application of the Kiel classification. *Verh Dtsch Ges Pathol*; 76:1-13 (1992)

Lossos IS, Czerwinsky DK, Alizadeh AA, Wechser MA, Tibshirani R, Botstein D, et al. Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med*; 350:1828-37 (2004)

Lossos IS, Jones CD, Warnke R, et al. Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*; 98:945-951 (2001)

Mantel N, Greenhouse SW. Equivalence of maximum likelihood and the method of moments in probit analysis. *Biometrics*; 23(1):154-7 (1967)

Moskowitz CH, Zelenetz AD, Kewalramani T, Hamlin P, et al. Cell of origin, germinal center versus nongerminal center, determined by immunohistochemistry on tissue microarray, does not correlate with outcome in patients with relapsed and refractory DLBCL. *Blood*; 106(10):3383-5 (2005)

Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, Emilie JF, Lederlin P, Berger F, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes BCL-2 mediated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood*; 101:4279-84 (2003)

Muris JJ, Meijer CJ, Vos W, van Krieken JH, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol* 2006; 208:714-723 (2006)

Offit, K, Lo Coco F, Louie DC, Parsa NZ, et al. Rearrangement of the BCL-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma [see comments]. N Engl J Med; 331:74-80 (1994)

Ohshima K, Kawasaki C, Muta H, et al. CD10 and Bcl10 expression in diffuse large B-cell lymphoma. CD10 is a marker of improved prognosis., Histopathol; 39:156-162 (2001)

Ott G. Biologische Grundlagen einer Klassifikation folliculärer und großzelliger B-Zell Non-Hodgkin Lymphome. Habilitationsschrift. Medizinische Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (1999)

Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rudiger T, Wilhelm M, Kalla J, Rosenwald A, Muller JG, Ott MM, Muller-Hermelink HK. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. Blood; 99(10):3806-12 (2002)

Pearson K. Chi-square test of goodness of fit. Encyclopedia of Childhood and Adolescence (1900)

Peto R, Pike MC. Conservatism of the approximation $\sigma^2 = E$ in the log-rank test for survival data or tumour incidence data. Biometrics; 29(3):579-84 (1973)

Project. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med; 329:987-994 (1993)

Ree HJ, Yang WI, Kim CW, et al. Coexpression of BCL-6 and CD10 in diffuse large B-cell lymphomas: significance of BCL-6 expression patterns in identifying germinal center B-cell lymphoma. *Hum Pathol*; 32:954-962 (2001)

Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*; 346:1937-1947 (2002)

Rudiger T, Hofler H, Kreipe HH, Nizze H, Muller-Hermelink HK, et al. Quality assurance in immunohistochemistry: results of an interlaboratory trial involving 172 pathologists. *Am J Surg Pathol*; 26(7):873-82 (2002)

Schlegelberger B, Zwingers T, Harder L, et al. Clinicopathogenetic significance of chromosomal abnormalities in patients with blastic peripheral B-cell lymphoma, Kiel-Wien-Lymphoma Study Group. *Blood*; 94:3114-3120 (1999)

Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nature Med*; 8:68-74 (2002)

Silvestrini R, Costa A, Boracchi P, Giardini R, Rilke F. Cell proliferation as a long-term prognostic factor in diffuse large-cell lymphomas. *Int J Cancer*; 54:231-6 (1993)

Uherova P, Ross CW, Schnitzer B, Singleton TP, Finn WG. The clinical significance of CD10 antigen expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*; 115:582-584 (2001)

Wilson WH, Teruya-Feldstein J, Fest T, et al. Relationship of p53, BCL-2 and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*; 89:601-9 (1997)

Winter JN, Weller EA, Horning SJ, Krajewska M, Variakojis D, et al. Prognostic significance of BCL-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. *Blood*; 107(11):4207-13 (2006)

Xu Y, McKenna RW, Molberg KH, Kroft SH. Clinicopathological analysis of CD10+ and CD10- diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*; 116:183-190 (2001)

Zinzani PL, Dirnhofer S, Sabattini E, Alinari L, Piccaluga PP, et al. Identification of outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma. Immunohistochemical profiling of homogeneously treated de novo tumors with nodal presentation on tissue micro-arrays. *Haematologica*; 90:341-347 (2005)

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. German Ott für die Stellung des Themas, die umfassende Betreuung über die gesamte Arbeit, die Überlassung der immunhistochemischen und zytogenetischen Daten sowie der histologischen Bilder und vor allem für die unermüdliche Geduld und freundschaftliche Hilfe bei allen auftretenden Problemen und Fragen.

Herrn Prof. Dr. Hans-Konrad Müller-Hermelink danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut durchzuführen und für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Ganz herzlich danke ich Frau Heike Brückner für die wertvolle technische Unterstützung, Herrn Dr. Tiemo Katzenberger für die Hilfe bei der Datenbankerstellung und Einarbeitung in das Thema, Herrn Prof. Dr. Thomas Rüdiger für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung, Herrn Dr. Jörg Kalla für die freundliche Beantwortung meiner Fragen und natürlich allen anderen, die immer zu Hilfestellungen bereit waren.

Ganz herzlich danke ich vor allem meiner Familie, meinen Geschwistern und meinen lieben Eltern.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Andreas Lohr
Geburtsdatum: 11.08.1973
Geburtsort: Aachen
Vater: Rüdiger Lohr, Arzt
Mutter: Dr. med. Dorothea Lohr, Ärztin
Geschwister: Kerstin Lohr, Ingenieurin und
Verena Lohr, Studentin
Konfession: evangelisch
Familienstand: Lebensgemeinschaft mit Alexandra Hepp,
Kinderkrankenschwester,
ein Sohn: Jakob, geb. 21.11.2001

Schulbildung

1980 - 1986 Grundschule und Orientierungsstufe in Gifhorn
1986 - 1993 Otto-Hahn-Gymnasium in Gifhorn

Zivildienst

1993 - 1994 Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz, Gifhorn

Hochschulstudium

10.1994 - 03.1996 Studium der Mathematik, Physik und Geschichte
für das Höhere Lehramt, Universität Braunschweig
04.1996 - 03.1998 Vorklinisches Studium an der Universität Marburg
04.1998 - 09.1998 Klinisches Studium an der Universität Marburg
10.1998 - 09.2001 Klinisches Studium an der Universität Würzburg

10.2001 - 09.2002 Praktisches Jahr:

Innere Medizin: Missionsärztliche Klinik, Würzburg

Chirurgie: Missionsärztliche Klinik, Würzburg und
Spital Menziken, Kanton Aargau, Schweiz

Pädiatrie: Klinikum Coburg

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 13.11.2002

Berufliche Tätigkeit

Seit 01.2003 Zunächst Arzt im Praktikum, seit 07.2004 Assistenzarzt an
der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des HELIOS-Klinikums Erfurt,
Chefarzt: Prof. Dr. med. A. Sauerbrey

Veröffentlichungen

Katzenberger T, Lohr A, Ott MM, Kalla J, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK,
Ott G. Genetic and biological features define two types of follicular Non-Hodgkin
grade 3 lymphoma. Verh Dtsch Ges Pathol; 84:153-61 (2000)

Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rudiger T, Wilhelm M, Kalla J,
Rosenwald A, Muller JG, Ott MM, Muller-Hermelink HK. Cytomorphologic,
immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types
of follicular lymphoma grade 3. Blood; 99(10):3806-12 (2002)

Katzenberger T, Lohr A, Schwarz S, Dreyling M, Schoof J, Nickenig C,
Stilgenbauer S, Kalla J, Ott MM, Muller-Hermelink HK, Ott G. Genetic analysis
of de novo CD5+ diffuse large B-cell lymphomas suggests an origin from a
somatically mutated CD5+ progenitor B-cell. Blood; 101(2):699-702 (2003)

Erfurt, den 25.03.2007

Andreas Lohr



