

Medizinische Fakultät
der
Universität Essen

Aus dem

Zentrum für Pathologie und Rechtsmedizin

Institut für Pathologie

und dem

Institut für Pathologie und dem Deutschen Mesotheliomregister an den
Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Bergmannsheil, Klinikum der Ruhr-Universität Bochum

Differentialdiagnose bösartiger Pleuratumoren

- Immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungsbefunde -

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften in der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Essen

vorgelegt von

Thorsten Wiethage

aus Münster / Westf.

2000

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Grosse-Wilde
1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. K. W. Schmid
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. K.-M. Müller, Bochum

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Juli 2001

Publizierte Ergebnisse der vorliegenden Dissertation

- (1) Krismann M., Wiethege Th., Müller K.-M. (1999): Calretinin and p53 as markers for differentiation between reactive and neoplastic pleural lesions? *Virchows Arch.* 435, 287 [Abstract].
- (2) Krismann M., Johnen G., Jaworska M., Wiethege Th., Müller K.-M. (1999): Verluste chromosomalen Materials überwiegen bei malignen Mesotheliomen - Untersuchungen mit der komparativen genomischen Hybridisierung. *Pneumologie* 53, 561 [Abstract].
- (3) Krismann M., Johnen G., Jaworska M., Wiethege Th., Müller K.-M. (1999): Patterns of chromosomal imbalances in malignant mesotheliomas. *Pathol. Res. Pract.* 195, 336 [Abstract].
- (4) Krismann M., Jaworska M., Wiethege Th., Müller K.-M., Johnen G. (2000): Chromosomale Anomalien bei malignen Mesotheliomen. *Atemw. Lungenkrkh.* 26, 425-427.
- (5) Shivapurkar N., Wiethege Th., Wistuba I. I., Salomon E., Milchgrub S., Müller K.-M., Churg A., Pass H., Gazdar A. F. (1999): Presence of simian virus 40 sequences in malignant mesotheliomas and mesothelial cell proliferations. *J. Cell. Biochem.* 76, 181-188.
- (6) Shivapurkar N., Wiethege Th., Wistuba I. I., Milchgrub S., Müller K.-M., Gazdar A. F. (2000): Presence of simian virus 40 sequences in malignant pleural, peritoneal and noninvasive mesotheliomas. *Int. J. Cancer* 85, 743-745.
- (7) Wiethege Th., Voss B., Müller K.-M. (1995): P53 accumulation and proliferating-cell nuclear antigen expression in human lung cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 121, 371-377.
- (8) Wiethege Th., Philips S., Müller K.-M. (1996): Calretinin als differentialdiagnostischer Marker für Mesotheliome und pulmonale Adenokarzinome. *Atemw. Lungenkrkh.* 22, 580 [Abstract].
- (9) Wiethege Th., Philips S., Müller K.-M. (1997): Calretinin as a marker for differential diagnosis between mesotheliomas and adenocarcinomas. *Pathol. Res. Pract.* 193, 96 [Abstract].
- (10) Wiethege Th., Philips S., Müller K.-M. (1997): Calretinin als Marker zur Differentialdiagnose von Mesotheliomen und Adenokarzinomen. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 81, 417.
- (11) Wiethege Th., Philips S., Müller K.-M. (1997): Calretinin in Mesotheliomen und pulmonalen Adenokarzinomen - Ein differentialdiagnostischer Marker -. *Atemw. Lungenkrkh.* 23, 410-411.
- (12) Wiethege Th., Müller K.-M. (1998): Calretinin as marker for mesotheliomas. *Archives D' Anatomie et de Cytologie Pathologiques - Clinical and Experimental Pathology* 46, 594 [Abstract].
- (13) Wiethege Th., Müller K.-M. (1998): P53 immunostaining in malignant mesotheliomas. *Pathol Res. Pract.* 194, 232 [Abstract].
- (14) Wiethege Th., Krismann M., Müller K.-M. (1999): Value of different antibodies to calretinin as a marker for mesotheliomas. *Pathol. Res. Pract.* 195, 298 [Abstract].

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Einleitung.....	7
1.2. Pleuramesotheliome	8
1.2.1. Ätiologie.....	8
1.2.2. Epidemiologie	11
1.2.3. Makroskopische Befunde.....	13
1.2.4. Mikroskopische Befunde	17
1.2.5. Elektronenmikroskopische Befunde	21
1.2.6. Zytologische Befunde	22
1.2.7. Klinische Befunde & Therapie.....	23
1.2.8. Prognose	24
1.2.9. Hyaline Pleuraplaques.....	25
1.2.10. Versicherungsmedizinische Aspekte	26
1.3. Pleurakarzinosen	27
1.4. Differentialdiagnose maligner Pleuratumoren.....	29
1.4.1. Calretinin	30
1.4.2. <i>p53</i> -Tumorsuppressorgen.....	32
1.4.3. Simian Virus 40.....	33
1.4.4. Komparative genomische Hybridisierung	33
1.5. Fragestellungen	34
2. Material & Methoden	35
2.1. Material	35
2.2. Methoden.....	35
2.2.1. Nachweis der Calretinin-Expression	35
2.2.2. Nachweis der P53-Akkumulation.....	37

2.2.3.	SV 40-Gensequenznachweis	38
2.2.4.	Komparative genomische Hybridisierung	39
3.	Ergebnisse	41
3.1.	Calretinin	41
3.2.	p53-Tumorsuppressorgen.....	52
3.3.	SV 40-Gensequenznachweis	57
3.4.	Komparative genomische Hybridisierung.....	60
4.	Diskussion	62
4.1.	Calretinin	62
4.1.1.	Calretinin und Mesotheliome	63
4.1.2.	Calretinin in primären und sekundären Pleuratumoren	64
4.2.	p53-Tumorsuppressorgen.....	66
4.3.	SV 40-Gensequenznachweis	72
4.4.	Komparative genomische Hybridisierung.....	77
5.	Schlussfolgerungen	82
6.	Zusammenfassung	84
7.	Literatur	85

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure(n)
BKV	Berufskrankheitenverordnung
Bp	Basenpaar(e)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CEA	<i>Carcinoembryogenic Antigen</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CK	Zytokeratin
CYFRA	Zytokratin-Fragment
HE	Hämatoxilin-Eosin (Färbung)
HEA	<i>Human Epithelial Antigen</i>
HVBG	Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften
ICD-O	<i>International Classification of Diseases – Oncology</i>
IMIG	<i>International Mesothelioma Interest Group</i>
RB	Retinoblastoma
SV 40	<i>Simian Virus 40</i>
TAg / tAg	Großes / kleines T-Antigen des <i>Simian Virus 40</i>
TTF1	Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1

1. Einleitung

Maligne Mesotheliome stellen mit einer Inzidenz von 1 - 3 je 1 Million Einwohner in der sogenannten Normalbevölkerung vergleichsweise seltene, primäre maligne Tumoren der serösen Häute dar. Sie werden als primäre Neubildungen im Bereich der Pleura, des Peritoneums, des Perikards und sehr selten auch der *Tunica vaginalis testis* beobachtet. Als eigene Entität sind Mesotheliome relativ jung. Erst in den 20er und 30er Jahren des 20. Jahrhunderts konnte durch Nachweis der Pluripotenz von Mesothelzellen mit möglicher epitheloider und sarkomatoider Differenzierungsrichtung die Existenz primärer Tumoren der serösen Häute des Lungen-Rippenfells bewiesen werden (Übersicht → [60]). Die pleurale Manifestation ist die bei weitem häufigste (Verhältnis Pleura : Peritoneum etwa 10 : 1). Das Perikard ist als primärer Ausgangspunkt des Tumors nur in etwa 2 % aller Fälle und die *Tunica vaginalis testis* nur in wenigen Einzelfällen betroffen.

Die differentialdiagnostische Abgrenzung primärer bösartiger Tumoren der Pleura von Pleurametastasen – in der Mehrzahl Pleurakarzinosen – primär andernorts entstandener Tumoren kann nicht nur in Hinsicht auf Klinik und Therapie der Erkrankung, sondern auch unter versicherungsmedizinischen Gesichtspunkten von hoher Bedeutung sein. Primäre maligne Pleuratumoren stellen lediglich etwa 1 - 3 % aller malignen pleural manifestierten Tumoren dar [24]. Bei weitem häufiger sind metastatische Pleurakarzinosen, überwiegend von Adenokarzinomen der Lungen oder anderer Organe.

Aus klinischer Sicht kommt der pathologisch-anatomischen Begutachtung von Tumorverdächtigen Proben aus der Pleurahöhle eine entscheidende Bedeutung zu. Der Pathologe ist gefordert, aus Ergusspunktaten oder an oft nur wenigen Millimeter großen Biopsien eine eindeutige Diagnose hinsichtlich der Tumorsicherung zu stellen und ggf. Hinweise auf die Lokalisation des primären Ausgangspunktes des Tumors zu geben. Besonders an kleinen Gewebeproben oder zytologischen Präparaten von Pleurapunktaten kann die differentialdiagnostische Abgrenzung in Einzelfällen dabei problematisch sein. Im Fachgebiet der Pathologie wurden daher in den letzten Jahren vielfach auf der Basis immunhistochemischer und molekularbiologischer Techniken verschiedene Ansätze entwickelt, die auch in Problemfällen eine sichere Differentialdiagnose erlauben sollen.

Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden an einem umfangreichen Untersuchungskollektiv des Deutschen Mesotheliomregisters – dem Institut für Pathologie an den Berufsgenossenschaftlichen

Kliniken Bergmannsheil in Bochum angegliedert – verschiedene dieser immunhistochemischen und molekularbiologischen Ansätze in Bezug auf ihre Wertigkeit für die differentialdiagnostische Abgrenzung geprüft. Da quantitativ die primär pleurale Manifestation der Tumoren die bei weitem häufigste darstellt, lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der differentialdiagnostischen Abgrenzung von Pleuramesotheliomen zu Pleurakarzinosen primär andernorts lokalisierter bösartiger Tumoren.

1.2. Pleuramesotheliome

1.2.1. Ätiologie

Asbest

Bösartige Tumoren der serösen Häute werden signifikant gehäuft nach einer vergleichsweise erhöhten, meist beruflich bedingten und in der Regel viele Jahre zurückliegenden inhalativen Exposition gegenüber Asbestfeinstäuben – meist Blauasbest (Krokydolith) oder Weißasbest (Chrysotil) – diagnostiziert. Pleuramesotheliome werden daher auch als *Signaltumor* für eine stattgehabte erhöhte Asbestbelastung angesehen [103]. Intrapleural abgelagerte Asbestfasern können eine chronische Irritation der Mesothelzellen bzw. submesothelialen pluripotenten Reservezellen verursachen und so die Initiation des Tumors offensichtlich wesentlich beeinflussen [→ Abbildung 1].

Der Zusammenhang zwischen der Entwicklung maligner Pleuramesotheliome und einer früheren inhalativen Asbestfeinstaubexposition wurde bereits in den 30er – 50er Jahren des 20. Jahrhunderts wiederholt diskutiert, erst 1960 aber überzeugend durch WAGNER ET AL. [99] an 33 Fällen zweifelsfrei dokumentiert (Übersicht [60]). Nach den im Deutschen Mesotheliomregister erhobenen Befunden können – teilweise auch nur nach umfangreichen Ermittlungen der technischen Aufsichtsdienste der zuständigen Unfallversicherungsträger – bei rund 90 % der Patienten mit gesicherten Pleuramesotheliomen erhöhte Asbestfeinstaubbelastungen eruiert werden (Literatur → [51]). Nur bei einem geringen Teil der Patienten mit einem Pleuramesotheliom kann eine vorausgegangene Asbestexposition nicht belegt werden. Der sichere Ausschluss einer erhöhten, z. B. im privaten Umfeld oder am Arbeitsplatz, zu diskutierenden Asbestfeinstaubexposition ist – wenn überhaupt – dann nur in wenigen Einzelfällen möglich.

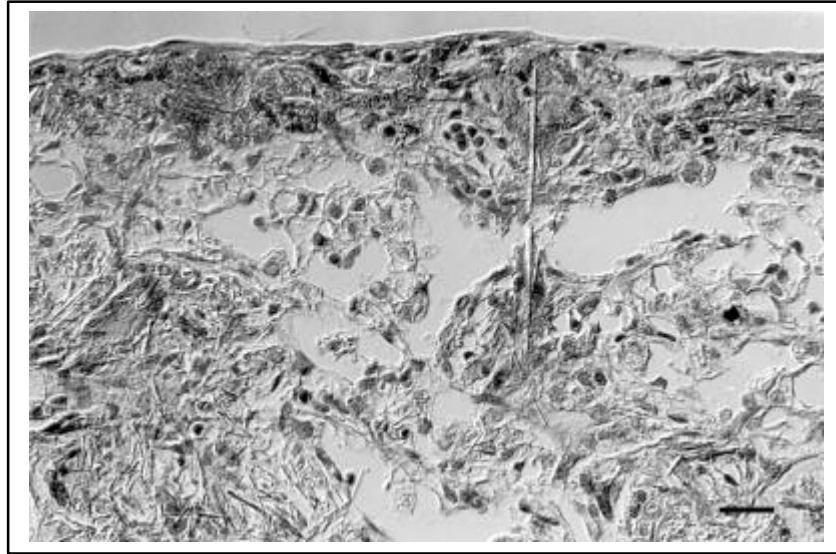


Abbildung 1

Chronische Irritation der Mesothelzellen bzw. submesothelialen pluripotenten Reservezellen durch inkorporierte Asbestfasern. Tierexperimentelle Befunde am Rattenmodell. (Maßstab 20 µm)

Neben einer Exposition gegenüber Asbestfeinstäuben werden – meist begründet auf kasuistische Einzelfallberichte – eine Vielzahl anderer Kausalfaktoren für die Entstehung dieser Tumoren hypothetisch diskutiert [→ Abbildung 2].

Erionit

Die Sicherung eines relevanten kausalen Zusammenhangs konnte bislang neben dem Asbest aber nur für eine inhalative, meist urbane Exposition gegenüber Feinstäuben von Erionit geführt werden [5]. Erionit ist ein besonders in bestimmten Regionen der Türkei natürlich vorkommendes nicht Asbest-artiges Zeolith mit einer Asbest-ähnlichen geometrischen faserförmigen Struktur. Als Folge der endemischen urbanen Belastung mit einer möglichen Exposition schon ab dem frühen Kindesalter kann es bei exponierten Personen bereits im 3. und 4. Lebensjahrzehnt zu einer Tumormanifestation kommen.

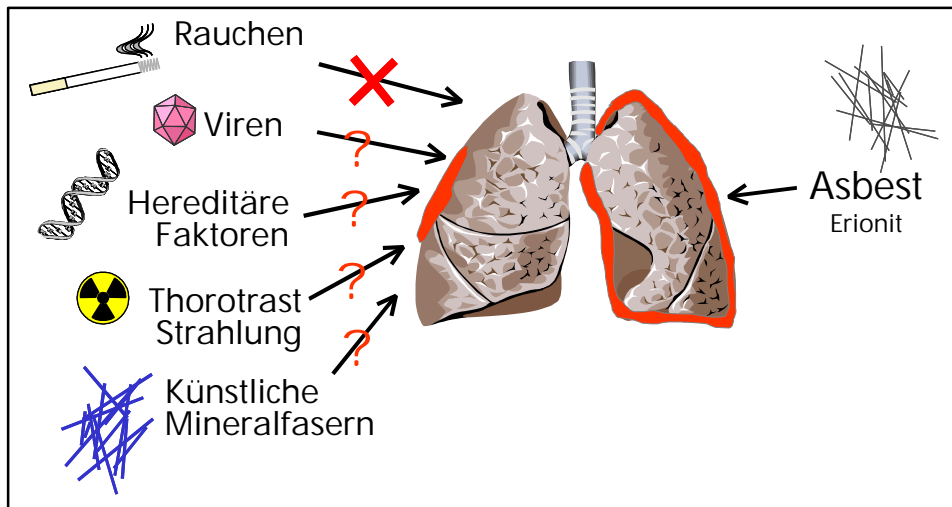


Abbildung 2

Neben Asbest diskutierte Kausalfaktoren für die Realisation von Pleuramesotheliomen

Künstliche Mineralfasern

Eine Exposition gegenüber künstlichen Mineralfasern, insbesondere Stein-, Glas- und Schlackenwollen, die seit einigen Jahren u. a. als Asbestersatzstoffe Anwendung finden, wird als Kausalfaktor bei der Entstehung von Mesotheliomen diskutiert. Bislang konnte aber für den Menschen ein erhöhtes kanzerogenes Potential für die Entstehung von Mesotheliomen nicht überzeugend gesichert werden [10].

Simian Virus 40

Von besonderem Interesse ist die derzeit intensiv geführte Diskussion um eine mögliche kausale oder kokausale Bedeutung einer Infektion des Menschen mit dem *Simian Virus 40* (SV 40) für die Realisation von Pleuramesotheliomen. Erstmals 1994 wurde von CARBONE et al. auf einen möglichen Zusammenhang zwischen einer chronisch schwelenden viralen Infektion mit SV 40 und der Entwicklung von Mesotheliomen hingewiesen [16]. SV 40 gehört zur Gattung der Polyomaviren in der Familie der *Papovaviridae*. Zu der Gattung zählen auch die BK- und JC-Viren. Eine weitere Gattung der Familie der *Papovaviridae* stellen die Papillomaviren dar. SV 40 wurde 1960 zunächst als Verunreinigung von Poliomyelitisimpfstoffen entdeckt. Man geht heute davon aus, dass zwischen 1957 und 1965 unbeabsichtigt mehr als 100 Millionen Menschen im Rahmen von Impfungen mit kontaminierten Impfstoffen, die aus Nierenzellen des Rhesus Affen isoliert worden waren, infiziert wurden. Im Genom des Virus werden sogenannte *frühe* und *späte* Gensegmente unterschieden. Das *frühe* Segment

kodiert zwei Proteine, die als kleines t-Antigen (*tAg*) und großes T-Antigen (*TAg*) bezeichnet werden. *TAg* kann an wachstumshemmende und tumorsupprimierende Proteine, wie die Tumorsuppressorgenprodukte P53 und RB binden und so eine (maligne) Transformation der infizierten Zellen begünstigen. Von einzelnen Arbeitsgruppen konnten *SV 40* DNA-Sequenzbestandteile auch in Ependyomen, Osteosarkomen sowie in zirkulierenden Blutzellen und in der Samenflüssigkeit gesunder Patienten und in postmortal entnommenem normalem Hypophysengewebe nachgewiesen werden (Übersicht → [15]).

Weitere Kausalfaktoren

Für einen wiederholt diskutierten direkten Zusammenhang zwischen einer Exposition gegenüber Tabakrauchinhaltsstoffen und der Entwicklung von Mesotheliomen ergeben sich keine überzeugenden Hinweise [67]. Auch für weitere, basierend auf wenigen Fallberichten diskutierte Kausalfaktoren (Strahlung, Thorotrast, genetische *familiäre* Prädisposition), konnten kausale Beziehungen bisher nicht beweisend belegt werden, da im Einzelfall bei den betroffenen Patienten vielfach auch eine Exposition gegenüber Asbestfeinstäuben zur Diskussion steht.

1.2.2. Epidemiologie

Inzidenz

Die Inzidenz für Pleuramesotheliome in der sogenannten Normalbevölkerung wird mit 1 - 3 Fällen pro 1 Million Einwohner angegeben. Bei den seltenen Fällen von *Asbest-unabhängigen* Mesotheliomen ist ein nahezu ausgewogenes Verhältnis der Geschlechter und ein Altersgipfel um das 60. Lebensjahr dokumentiert [12]. Insgesamt ist die Inzidenz aber entscheidend abhängig vom Ausmaß der Exposition gegenüber Asbestfeinstäuben. So wird bei Männern in Industrienationen – auf Grund einer im Vergleich zu Frauen häufigeren Beschäftigung in sogenannten Asbest-exponierten Berufen – eine Inzidenz von 15 - 20 Fällen pro 1 Million Einwohner beobachtet.

Mortalität

Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes starben in der Bundesrepublik Deutschland 1998 insgesamt 818 Personen (556 Männer, 262 Frauen) an den Folgen eines bösartigen Mesothelioms. Dies entspricht einer Mortalitätsrate je 100.000 Verstorbene von etwa 1,1 für Männer und 0,3 für Frauen. Diese *offiziellen* Zahlen müssen differenziert betrachtet werden, da die Diagnosen in vielen Fällen nicht durch pathologisch-anatomische Untersuchungen

gesichert sind, sondern sich an dem klinischen Krankheitsbild und auch einer ggf. in Diskussion stehenden Asbestexposition orientieren.

Deutsches Mesotheliomregister

In der Bundesrepublik Deutschland ist eine umfassende Registrierung neuer Krebserkrankungsfälle z. B. auf Grund eines fehlenden zentralen Krebsregister nicht zu gewährleisten. Auch die im Deutschen Mesotheliomregister in Bochum registrierten Fälle gesicherter Mesotheliome erreichen nach vorsichtigen Schätzungen nur einen Anteil von 70 – 80 % der jährlich neu auftretenden Erkrankungen. Zwischen 1987 und 1999 wurden hier insgesamt 3.942 Fälle von Mesotheliomen registriert und ausgewertet. Bei einer in den vergangenen Jahren kontinuierlich steigenden Zahl können derzeit jährlich etwa 500 Neuerkrankungen erfasst werden [→ Abbildung 3].

Berufskrankheit – BK 4105

Bei der überwiegenden Zahl der im Deutschen Mesotheliomregister in Bochum registrierten Fälle steht vor dem Hintergrund einer stattgehabten erhöhten beruflichen Asbestfeinstaubexposition eine Berufskrankheit nach Nr. 4105 der Anlage zur Berufskrankheitenverordnung (BKV) zur Diskussion (→ Versicherungsmedizinische Aspekte, S. 26). Von den Unfallversicherungsträgern wurden in diesem Zusammenhang zwischen 1977 und 1999 insgesamt 6.024 Mesotheliome als Berufskrankheit anerkannt und entschädigt. Auch hier ist in den letzten Jahren eine kontinuierliche Steigerung der Fallzahlen zu beobachten [→ Abbildung 3].

Latenzzeit

Bei einer durchschnittlichen Latenzzeit von rund 30 Jahren zwischen der Exposition gegenüber Asbestfeinstäuben und der klinischen Tumormanifestation sowie einem Gipfel des Asbestverbrauchs in Deutschland zwischen 1965 und 1980 wird von Seiten der gesetzlichen Unfallversicherungsträger für die kommenden Jahre mit einer weiteren Zunahme an Neuerkrankungen gerechnet. Ein Gipfel von etwa 1.000 Neuerkrankungen pro Jahr wird etwa für 2015 erwartet [23].

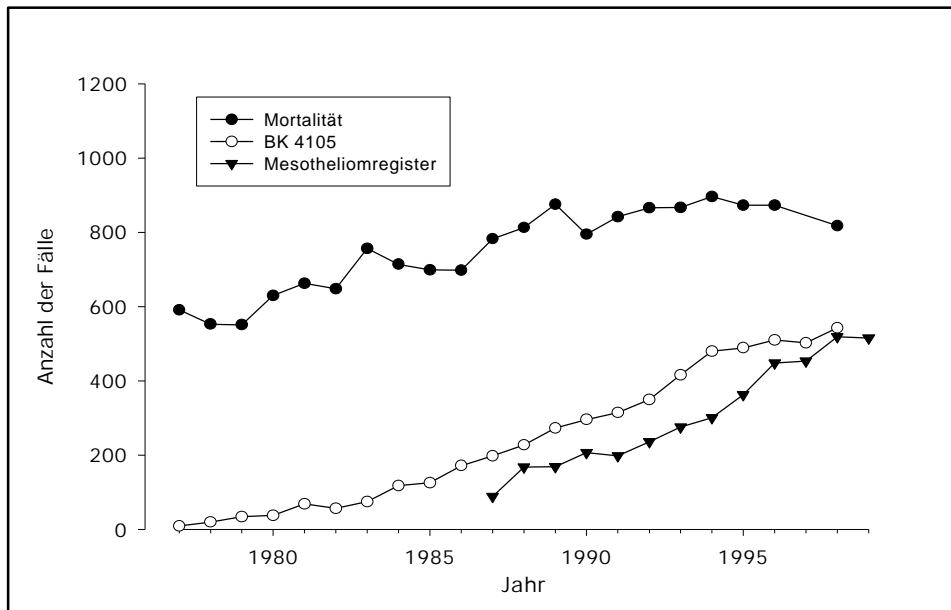


Abbildung 3

Entwicklung der Mortalität [●] nach Angaben des Statistischen Bundesamtes, des Berufskrankheitengeschehens [○] für die Berufskrankheit nach Nr. 4105 der Anlage zur BKV und der im Deutschen Mesotheliomregister registrierten Fälle gesicherter Mesotheliome [▼].

1.2.3. Makroskopische Befunde

Makroskopisch bilden maligne Pleuramesotheliome in fortgeschrittenen Tumorstadien meist mantelförmig den Brustkorb auskleidende und die Lungen komprimierende, wenige Millimeter bis mehrere Zentimeter breite Tumormassen. Überwiegend epitheloid differenzierte Tumoren haben eine grau-weiße, eher markige und bei starker Hyaluronsäureexpression fadenziehende Schnittfläche, sarkomatoid differenzierte Tumoren sind sehnig-derb, grau-weiß und schwartenähnlich. Die Tumorkonsistenz ist überwiegend fest [→ Abbildung 4] [68, 70]. Auf der Basis tierexperimenteller Befunde muss die Gesamtfläche der *Pleura visceralis* und *parietalis* beim Menschen mit einer Fläche von rund 4000 - 6000 cm² (= 0,4 - 0,6 m²) kalkuliert werden [63]. Am Hilus gehen *Pleura parietalis* und *Pleura visceralis* ineinander über. Die Frage des primären Ausgangspunktes des Tumors spielt unter klinischen Gesichtspunkten mit operativ therapeutischen Maßnahmen eine besondere Rolle.

Pleuramesotheliome entwickeln sich bevorzugt in basalen und dorso-lateralen Abschnitten der Brusthöhle, können aber auch im mediastinalen Pleurabereich und dem Zwerchfell auf-

treten. Nach thorakoskopischen Befunden sind Frühveränderungen mit miliaren, grauweißen Knötchen bevorzugt im Bereich der *Pleura parietalis* nachweisbar. Nach pathologisch-anatomischen Befunden sind aber bei manifesten pleuralen Tumoren schon in Frühphasen an Operationspräparaten nahezu regelmäßig Tumorherde auch im Bereich der *Pleura visceralis* nachzuweisen. Die Frage eines isolierten Befalls der *Pleura parietalis* – dann allenfalls nur in sehr frühen Entwicklungsphasen des Mesothelioms – ist bisher pathologisch-anatomisch nicht überzeugend gesichert.

Multiple kleine Tumorknötchen konfluieren zu größeren Tumormassen. Charakteristisch ist die pleurale Ausbreitung entlang der Interlobärspalten. Meist bleibt die Grenze zum Lungengewebe auch in fortgeschrittenen Stadien relativ scharf. Besonders bei sarkomatoiden Pleuramesotheliomen beobachtet man aber auch eine Infiltration des subpleuralen Lungengewebes. Charakteristisch sind Tumorpropagationen durch die Brustwand im Bereich diagnostischer Stichkanäle oder operativ gesetzter Defekte, z. B. nach Thorakoskopien oder ausgedehnteren thoraxchirurgischen Eingriffen.

Ein infiltratives Wachstum in Weichteilstrukturen der Brustwand und in das Lungengewebe erfolgt in der Regel erst in weit vorgeschrittenen Entwicklungsphasen. Der einseitige Tumorbefall der Pleura ist am häufigsten. Nur selten treten beidseitig ausgedehnte Pleuramesotheliome auf. Bei detaillierterer Aufarbeitung von Sektionspräparaten werden allerdings in rund 50 % der Fälle frühe Entwicklungsphasen der Tumoren auch auf der Gegenseite dokumentiert [11].

Das internationale *Staging* System für diffuse maligne Pleuramesotheliome der *International Mesothelioma Interest Group* (IMIG) ist in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst [87].

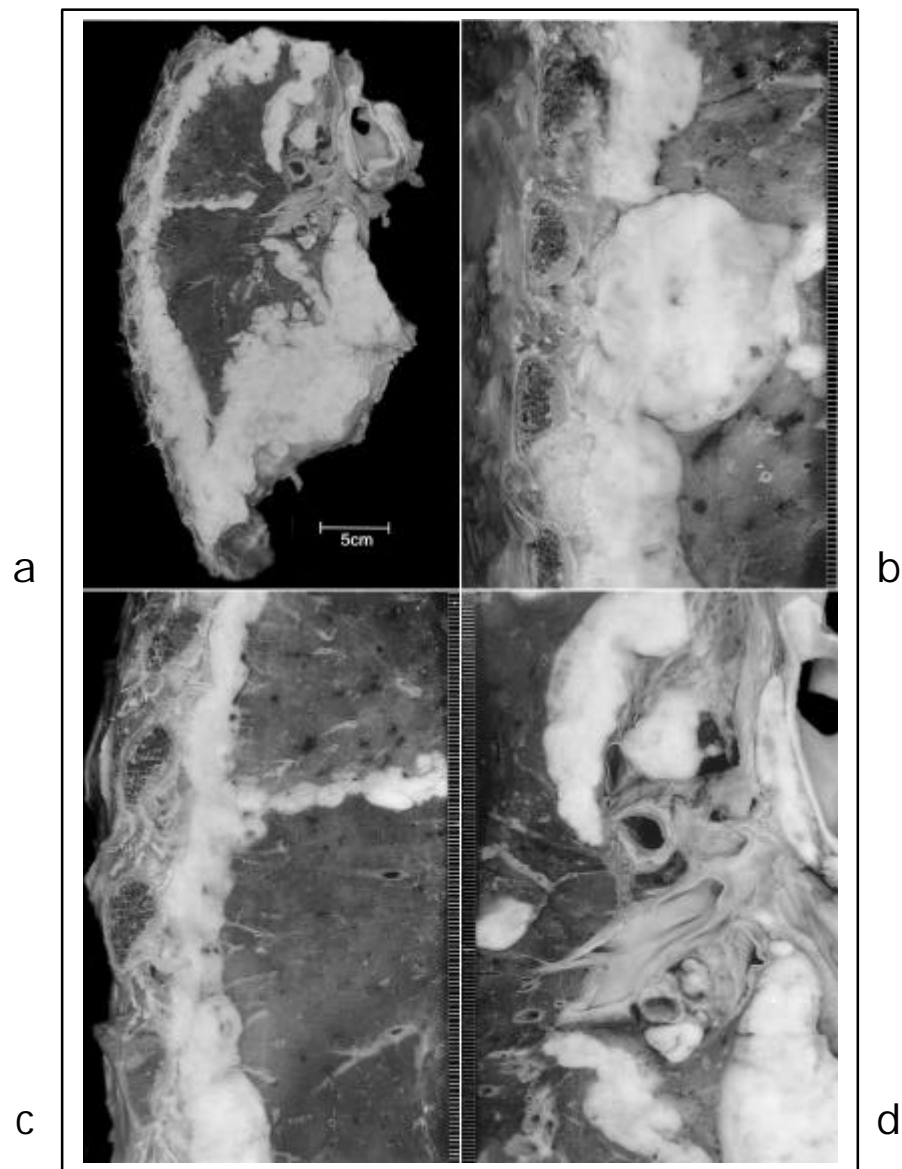


Abbildung 4

Makroskopische Aufnahmen vom Endstadium eines vorwiegend sarkomatoid differenzierten Pleuramesothelioms in frontaler Schnitfführung der rechten Brustkorbregion (62jähriger Patient mit beruflicher Asbestexposition; Lungenstaubanalyse mit maximal 60 Asbestkörpern / cm^3 Lungengewebe).

a Mantelförmiger, bevorzugt im basalen und mediastinalen Bereich entwickelter Tumor.

b Umschriebene knotige Tumorentwicklung . „Problembefund“ bei der Abgrenzung zu einem primären peripheren bösartigen Lungentumor mit sekundärer pseudomesotheliomatoider Tumorausbreitung.

c Scharfe Grenze des grau-weißen Tumorgewebes zu den äußeren Weichteilstrukturen mit Rippen und innerer Oberfläche der Lunge.

d Ausschnittsvergrößerung der parahilären Region mit Lymphknotenmetastasen.

Tabelle 1

TNM-Klassifikation nach dem Internationalen *Staging* System für diffuse maligne Pleuramesotheliome der *International Mesothelioma Interest Group* (I-MIG) (nach [87]).

T – Tumorausbreitung					
	• Ipsilaterale partielle einschließlich mediastinale und diaphragmale Pleura	• Verstreute Tumorherde im Bereich der viszeralen Pleura	• Beteiligung der diaphragmalen Muskulatur <u>oder</u> konfluente Tumorherde im Bereich der viszeralen Pleura bzw. Einbruch d. Tumors von der viszeralen Pleura in das subpleurale Lungenparenchym	• Beteiligung der Fascia endothoracica <u>oder</u> Einbruch in das mediastinale Fettgewebe <u>oder</u> einzelne resektable Tumorherde im Bereich der Brustwand <u>oder</u> nicht-transmurale Beteiligung des Perikards	• Diffuser Einbruch bzw. multifokale Tumormassen mit/ohne Destruktion von Rippen <u>oder</u> direkte transdiaphragmale bzw. peritoneale Ausbreitung <u>oder</u> direkte Ausbreitung des Tumors in ein oder mehrere mediastinale Organe <u>oder</u> direkte Ausbreitung des Tumors in die Wirbelsäule <u>oder</u> Ausbreitung durch die innere Oberfläche des Perikards mit/ohne perikardialen Erguss oder Beteiligung des Perikards
T1a	+				
T1b	+	+			
T2	+	+	+		
T3	+	(+)	(+)	+	
T4	+	(+)	(+)	(+)	+
N – Lymphknoten					
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden				
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen				
N1	Metastase(n) in den ipsilateralen peribronchialen und/oder hilären Lymphknoten				
N2	Metastase(n) in den subkarinalen und/oder den ipsilateralen mediastinalen einschließlich der ipsilateralen inneren mammilären Lymphknoten				
N3	Metastase(n) in den kontralateralen mediastinalen, kontralateralen inneren mammilären, ipsilateralen oder kontralateralen supraklavikulären Lymphknoten				
M – Metastasen					
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden				
M0	Keine Fernmetastasen				
M1	Fernmetastasen vorhanden				

Tabelle 2

Klinische Stadien nach dem Internationale *Staging* System für diffuse maligne Pleuramesotheliome der *International Mesothelioma Interest Group* (IMIG) (nach [87]).

Stadium	TNM	
I	la	T1a N0 M0
	lb	T1b N0 M0
II		T2 N0 M0
III		jeder T3 M0 jeder N1 M0 jeder N2 M0
IV		jeder T4 jeder N3 jeder M1

1.2.4. Mikroskopische Befunde

Histologisch werden nach der 3. revidierten Fassung der WHO-Klassifikation von 1999 drei führende Wachstumstypen unterschieden: epitheloide (ICD-O 9052/3), sarkomatoide (ICD-O 9051/3) und biphasische Typen (ICD-O 9053/3) [→ Tabelle 3] [97]. Die Klassifikation basiert auf phänotypisch fassbaren Differenzierungsrichtungen der neoplastischen Mesothelzellen (→ Abbildung 5). In der Regel lässt sich eine führende Differenzierung angeben. Bei umfassender Aufarbeitung von Operations- oder Sektionspräparaten sind aber in verschiedenen Tumorabschnitten fast immer auch vom führenden Wachstumsmuster abweichende Differenzierungsformen vorhanden. 90 % der Mesotheliome haben mehr oder weniger ausgeprägte epitheloide Differenzierungsvarianten.

Epitheloide Mesotheliome zeigen tubuläre, tubulopapilläre und solide Wachstumsmuster mit wechselnd ausgeprägtem, teils myxoidem Stroma. Im Zentrum von rosettenförmigen Zellgruppen finden sich häufig Kollagenablagerungen [→ Abbildung 5 a - d].

Bei sarkomatoiden Mesotheliomen stehen spindelige, atypische Zellformen mit einer meist kräftig entwickelten Faserproduktion im Vordergrund. Selten sind kleinherdige Areale mit muskulärer, knorpelähnlicher oder knöcherner Differenzierung vorhanden [→ Abbildung 5 e - h]. Die differentialdiagnostische Abgrenzung des desmoplastischen

Mesothelioms als Subtyp des sarkomatoiden Mesothelioms gegenüber reaktiv-entzündlichen Pleuraveränderungen kann im Einzelfall gerade an kleinen Gewebeproben erhebliche Schwierigkeiten bereiten [22, 55].

Die Variante eines biphasischen Mesothelioms wird nach der WHO-Klassifikation angegeben, wenn in einem Tumor sowohl epitheloide als auch sarkomatoide Differenzierungen mit einem Anteil von jeweils mindestens 10 % vorliegen [97].

Beispiele für histomorphologische Wachstumsmuster maligner Pleuramesotheliome sind in Abbildung 5 zusammengestellt.

Tabelle 3

Führende histomorphologische Wachstumsmuster maligner Pleuramesotheliome.

Führende Differenzierung	Subdifferenzierung
Epitheloid	Tubulopapillär Adenomatoid Desmoplastisch
Sarkomatoid	Fibrosarkomatös Chondrosarkomatös Desmoplastisch
Biphasisch	

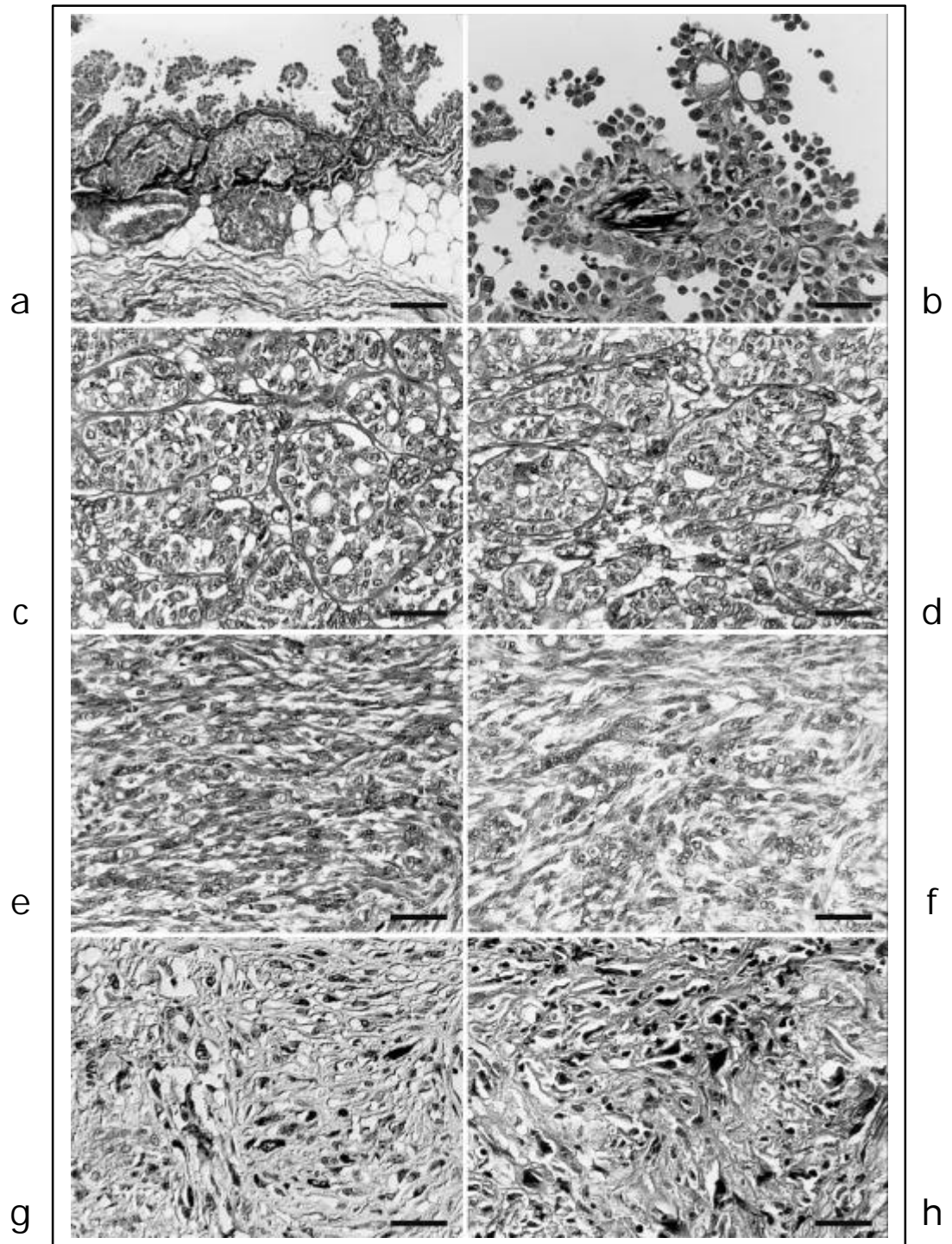


Abbildung 5

Histomorphologische Wachstumsmuster maligner Pleuramesotheliome.

a & b Hochdifferenziertes, epitheloide Mesotheliom der *Pleura parietalis* teils in frühen Entwicklungsphasen (Frühmesotheliom), teils aber auch bereits mit Infiltration von subpleuralem Fettgewebe.

c - f Ausschnitte von 4 Arealen desselben Mesothelioms. Epitheloide, teils adenoide (c & d) und nahezu rein sarkomatoide (e & f) Differenzierungen.

g & h Pleomorphes, niedrig differenziertes sarkomatoides Mesotheliom mit hochgradigen Zell- und Kernatypien. (Maßstab: a = 160 µm; b - g = 50 µm; h = 30 µm)

Neben den drei Hauptgruppen werden in der WHO-Klassifikation eine Vielzahl weiterer seltener Varianten von Mesotheliomen mit heteromorphen (chondroid, osteoblastisch, rhabdomyoblastisch, neurogen sarkomatös), adenomatoiden, lymphohistiozytischen, myxoiden, multizystischen, klarzelligen, kleinzelligen oder anaplastischen Strukturen berücksichtigt.

Eine besondere weitere Variante stellt das sogenannte Mesodermom dar. Der Begriff *Mesodermom* wurde 1981 von DONNA & BETTA erstmals in die Literatur eingeführt, in den folgenden Jahren aber zunächst nicht aufgegriffen [30]. Mesodermome leiten sich vom undifferenzierten pluripotenten Mesoderm ab. Tumoren, die sich aus dem Mesoderm ableiten, weisen ein breites Spektrum an Differenzierungsrichtungen auf. So werden myoblastische, angioblastische, lymphoblastische, chondroblastische, osteoblastische, fibroblastische und epitheliale Differenzierungen bei primären Neoplasien der Pleura verständlich. Im Deutschen Mesotheliomregister wurden in den letzten Jahren nur 10 Mesotheliome unter dem besonderen Kombinationsbild eines Mesodermoms dokumentiert. Nach den hier bisher erhobenen Befunden ist diese heterogene Tumorvariante durch eine hohe Zahl ebenso heterogener genetischer Anomalien gekennzeichnet [50].

1.2.5. Elektronenmikroskopische Befunde

Ultrastrukturell können entsprechend den lichtmikroskopischen Befunden einerseits epitheloid und andererseits sarkomatoide Zellcharakteristika dargestellt werden. Auf der Oberfläche epitheloid differenzierter Tumorzellen zeigen sich teilweise zahlreiche lange Mikrovilli, die von verschiedenen Autoren für die histogenetische Ableitung der Tumorzellen herangezogen werden [21].

Elektronenmikroskopisch haben die atypischen Tumorzellen bei frühen Entwicklungsphasen – sogenannten Frühmesotheliomen – noch Ähnlichkeit mit regelrecht differenzierten Mesothelzellen. Die atypischen Zellen sind durch variable Zellgrößen und Zellformen, abnorme Entwicklung von Mikrovilli an den Zelloberflächen, Invaginationen der Zellmembran und variable Ausprägungen pseudopodienartiger Zellfortsätze im Bereich der interzellulären Kontaktzonen charakterisiert [→ Abbildung 6].

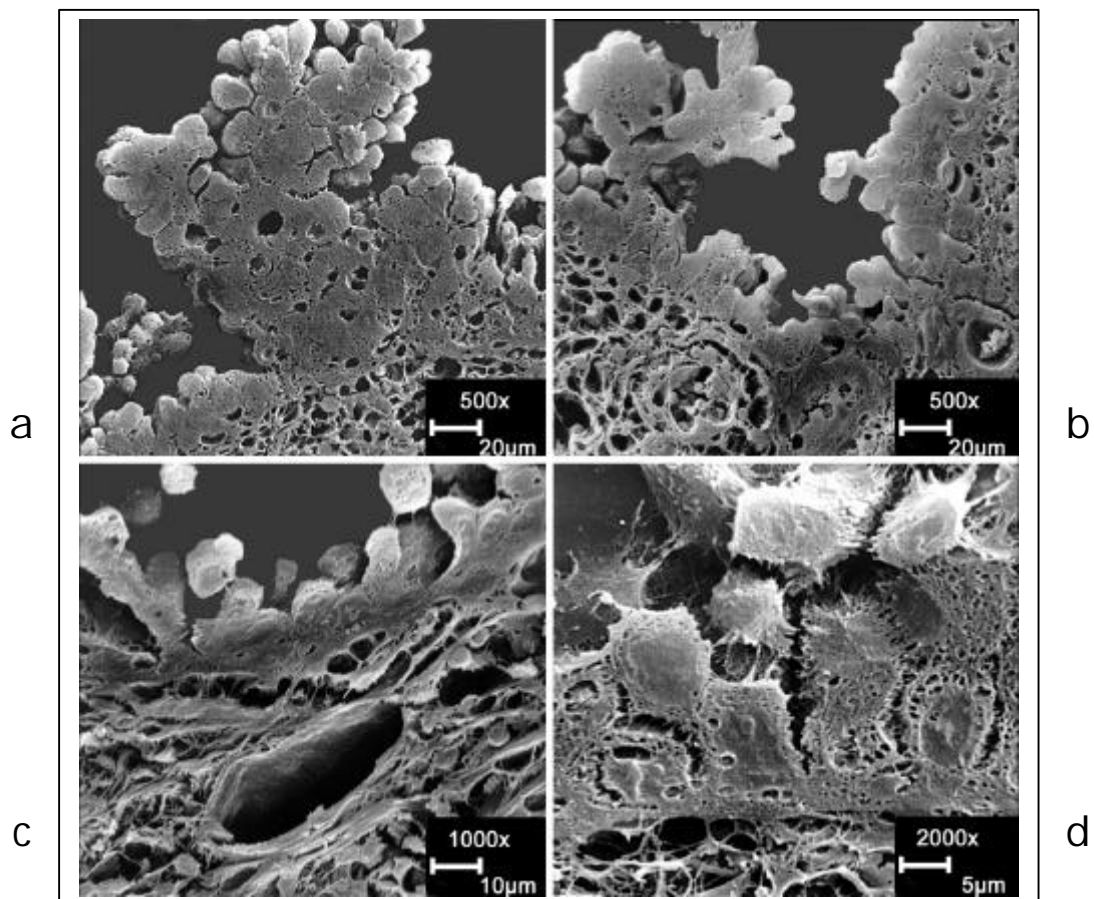


Abbildung 6

Atypische Mesothelzellen bei einem Frühmesotheliom. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen.

1.2.6. Zytologische Befunde

Im Pleuraerguss nachweisbare atypische Mesothelzellen sind in der Regel durch eine Einzelzellvergrößerung gekennzeichnet. Charakteristisch für das Vorliegen eines Mesothelioms sind große, ein- bis mehrkernige Zellen zusammen mit vielen kleineren Mesothelzellen [→ Abbildung 7]. Häufig weist das Zytoplasma der Tumorzellen besonders in der Randzone eine hohe Dichte auf. In der PAS-Färbung findet man eine grobschollige, ungleichmäßige Granulation. Typisch ist eine teilweise schaumig degenerative perinukleäre Vakuolisierung. Im Erguss werden auch bei biphasischen Mesotheliomen meist nur atypische epitheloide Zellen nachgewiesen.

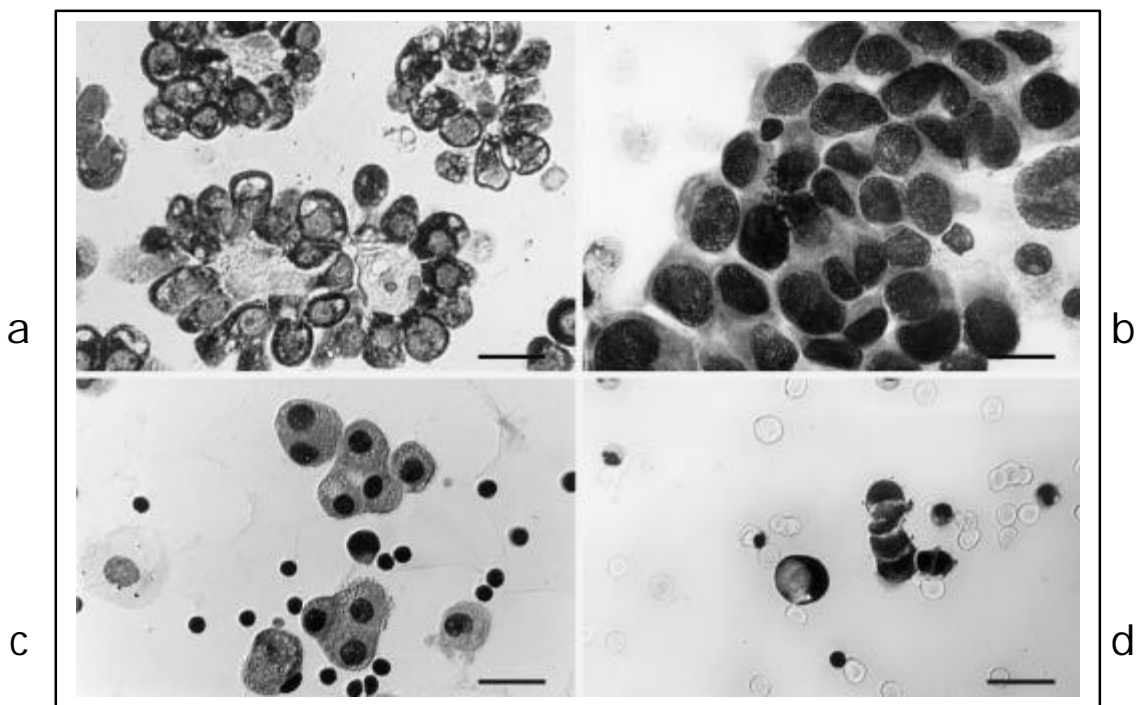


Abbildung 7

Zytologische Befunde in Pleurapunktaten mit Tumorzellen.

a & b Epitheloid differenziertes Mesotheliom.

c Pleurakarzinose bei Adenokarzinom mit unklarem Primärtumor.

d Pleurakarzinose eines primären bösartigen kleinzelligen Lungentumors. (Maßstab 25 µm)

1.2.7. Klinische Befunde & Therapie

Als klinisch-radiologisch fassbare Frühsymptome werden rezidivierend auftretende Pleuraergüsse als Folge der Tumor-bedingten Reizung der Mesothelzellen mit erhöhter Expression von Hyaluronsäure-reicher Flüssigkeit (*Exsudat*) und Pleuraverbreiterungen dokumentiert. Weiterhin treten Dyspnoe und Husten auf. Eine Infiltration der *Fascia endothoracica* und der Brustwand ist mit einer Reizung der Interkostalnerven und oft erheblichen thorakalen Schmerzen für den Patienten verbunden. In 98% der Fälle erfolgt die klinische Diagnose erst in den fortgeschrittenen Stadien II und III (→ Tabelle 2), in denen der Tumor schon Lungen, Zwerchfell oder Anteile der Brustwand infiltriert hat (Übersicht → [88]).

Chemo- und Strahlentherapie sowie Talkumpleurodesen sind, besonders in fortgeschrittenen Tumorstadien, nur palliativ wirksam. In Frühstadien ist die Therapie der Wahl eine Pleurektomie bzw. Pleuropneumektomie. Auch wenn hierdurch in der Regel eine kurable Therapie nicht erreicht wird, so ist nach einer Pleurektomie bei Frühstadien (Stadium I) vielfach doch eine deutlich längere mittlere Überlebenszeit der Patienten zu beobachten [88].

Interferoninstillation, Hyperthermie- und Gentherapie stellen eine Auswahl neuer Behandlungsansätze dar. Die Wertigkeit dieser Ansätze vor dem Hintergrund eines kurablen Therapieanspruchs wird derzeit unter Studienbedingungen untersucht. Entscheidend für einen erfolgreichen Ansatz ist im individuellen Einzelfall die Tumordiagnose in einem frühen Stadium. Spezifische sogenannte Tumormarker, die im Rahmen von *Screening*-Untersuchungen, z. B. bei Hochrisikogruppen zum Einsatz kommen könnten, sind – wie auch für viele andere Organtumoren – z. z. nicht verfügbar. Diskutiert wird derzeit die Wertigkeit, die dem Nachweis des löslichen Zytokeratin-Fragments von CK 19 (CYFRA 21-1) im Pleuraerguss für die Differentialdiagnose maligner Pleuramesotheliome zu reaktiven Serosaläsionen zukommt. Vorsorgeuntersuchungen beruflich erhöht Asbestfeinstaub exponierter Personengruppen müssen sich bislang aber vornehmlich auf radiologisch fassbare Pleuraveränderungen als Frühsymptome konzentrieren (Übersicht → [47]).

Metastasierung

Häufig sind Lymphknotenmetastasen im Bereich der regionären, hilären und mediastinalen Lymphknoten. Nach den im Deutschen Mesotheliomregister erhobenen Befunden wird im Rahmen der Obduktionen in etwa 40 % der Fälle ein Tumorbefall des Peritoneums beobachtet. Seltener kommt es zu einer hämatogenen Metastasierung in Leber oder die kontralaterale Lunge und Pleura. Daneben finden sich Metastasen in den Nebennieren, den Nieren und im Skelett [→ Abbildung 8]. Nur bei einem Drittel der an Pleuramesotheliomen verstor-

benen Patienten sind zum Zeitpunkt des Todes im Rahmen der Obduktion keine Fernmetastasen nachweisbar.

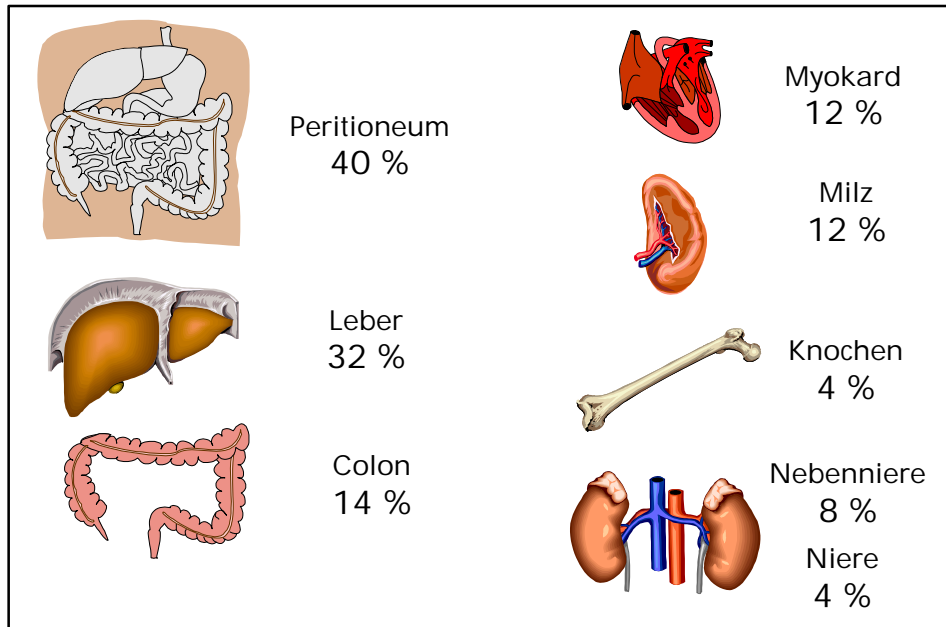


Abbildung 8

Metastasierung bösartiger Pleuramesotheliome. Obduktionsbefunde im Deutschen Mesotheliomregister (n = 50).

1.2.8. Prognose

Obwohl Pleuramesotheliome ein im Vergleich zu den bösartigen Lungentumoren langsames Tumorwachstum aufweisen, beträgt die mittlere Überlebenszeit nach Stellung der Diagnose nur 9 Monate. Nur rund 35 % der Patienten leben noch ein Jahr nach Diagnosestellung. Rund 10 % der Betroffenen überleben zwei Jahre, etwa 5 % fünf Jahre [1]. Nach den im Deutschen Mesotheliomregister an einem Kollektiv von 387 Pleuramesotheliomen erhobenen Befunden beträgt die Zeit zwischen der Manifestation erster Symptome und dem Tod im Mittel 13,2 (\pm 17,1) Monate. Für epitheloid differenzierte Pleuramesotheliome wird eine geringfügig bessere Prognose als für biphasisch und sarkomatoid differenzierte Tumoren beobachtet [72].

1.2.9. Hyaline Pleuraplaques

Hyaline Pleuraplaques sind weiße, flache oder tafelförmig erhabene, meist scharf begrenzte, zuweilen verkalkte, häufig rippenparallele oder auch symmetrische Fibrosen, die in etwa 70 % mit einer vermehrten Asbestfeinstaubbelastung korreliert sind [→ Abbildung 9] [38]. Hyaline Pleuraplaques treten vorzugsweise, aber nicht ausschließlich im Bereich der *Pleura parietalis* auf. Daneben finden sie sich auf dem Zwerchfell bevorzugt im *Centrum tendineum* oder seltener in der *Pleura visceralis*. Hyaline Pleuraplaques werden bei Patienten mit Mesotheliomen im Operations- und Obduktionsgut in mehr als 50 % der Fälle nachgewiesen. Eine in Diskussion stehende Einordnung hyaliner Pleuraplaques im Sinne obligater Präneoplasien für maligne Pleuramesotheliome konnte bislang nicht belegt werden [20], auch wenn das Risiko für die Entwicklung von Pleuramesotheliomen bei Patienten mit Plaques erhöht ist [6].

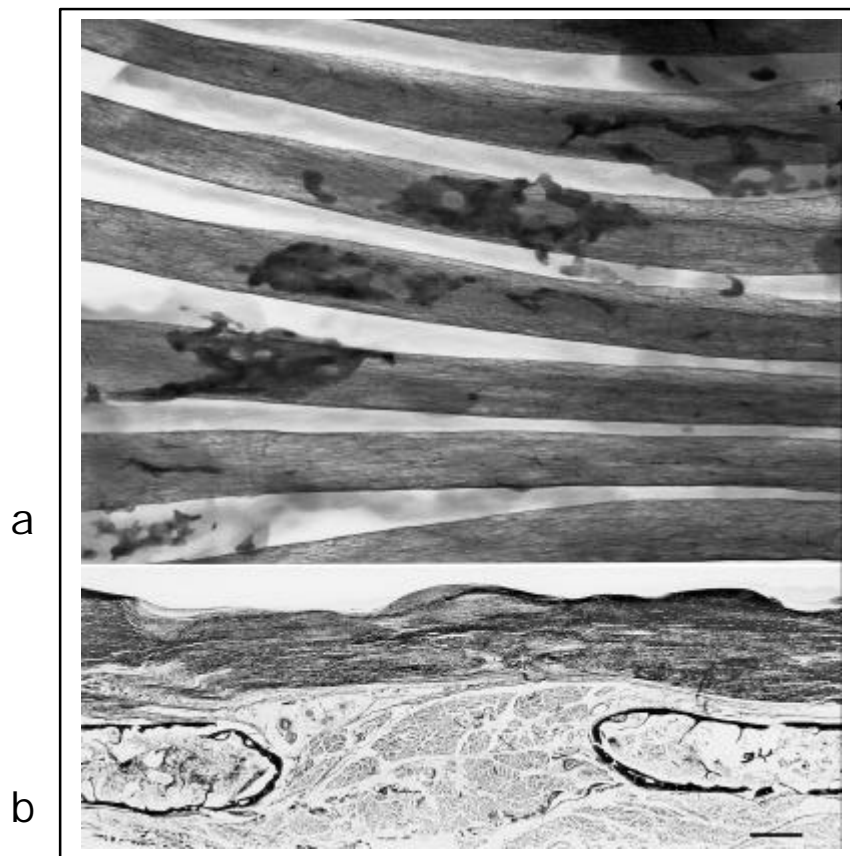


Abbildung 9

Röntgenbild (a) des präparierten Hemithorax und korrespondierendes mikroskopisches Übersichtsbild (b) mit partiell verkalkten hyalinen Pleuraplaques der *Pleura parietalis*.

1.2.10. Versicherungsmedizinische Aspekte

Seit dem Inkrafttreten der *Verordnung zur Änderung der Siebenten Berufskrankheiten-Verordnung* vom 8. Dezember 1976 wird das *durch Asbest verursachte Mesotheliom des Rippenfells und des Bauchfells* als Berufskrankheit nach Nr. 4105 der Anlage zur BKV geführt. Mit der *zweiten Verordnung über die Änderung der Berufskrankheiten-Verordnung* vom 18. Dezember 1992 – in Kraft getreten am 1. Januar 1993 – sind dann auch Mesotheliome des Perikards unter der Listennummer 4105 geführt. Mesotheliome der *Tunica vaginalis testis* sind bislang – in erster Linie auf Grund ihrer Seltenheit – nicht im Verordnungstext erfasst. Hier muss derzeit eine Einzelfallentscheidung erfolgen. Nach den im Deutschen Mesotheliomregister erhobenen und in der Literatur publizierten Befunden kann aber auch bei Patienten mit primären Mesotheliomen der *Tunica vaginalis testis* in mehr als 70 % der informativen Fälle eine vergleichsweise erhöhte Exposition gegenüber Asbestfeinstäuben in der Vorgeschichte eruiert werden [83].

Auf Grund der bewiesenen engen Korrelation zwischen einer erhöhten, in der Regel beruflich bedingten Asbestfeinstaubexposition und der Entwicklung von Mesotheliomen rechtfertigt jede (Verdachts-) Diagnose eines Mesothelioms die Anzeige des begründeten Verdachts auf das Vorliegen einer Berufskrankheit nach Nr. 4105 der Anlage zur BKV bei dem zuständigen gesetzlichen Unfallversicherungsträger oder dem staatlichen Gewerbearzt. Zwischen 1977 und 1999 wurde den Unfallversicherungsträgern in 9.449 Fällen der Verdacht auf das Vorliegen einer Berufskrankheit nach Nr. 4105 der Anlage zur BKV angezeigt. In 6.024 Fällen wurden in diesem Zeitraum erstmals Entschädigungsleistungen gewährt [→ Abbildung 3]. Voraussetzung für die Anerkennung einer entsprechenden Berufskrankheit ist neben der Sicherung des Krankheitsbildes und der beruflichen Exposition im Vollbeweis die Knüpfung eines ursächlichen Zusammenhangs mit hinreichender Wahrscheinlichkeit. In Bezug auf die BK 4105 beliefen sich die Leistungen der gewerblichen Berufsgenossenschaften allein in 1999 für Renten an Erkrankte oder Hinterbliebene sowie die medizinische Heilbehandlung auf 88,10 Millionen Euro. Die Gesamtkosten für eine anerkannte Berufskrankheit nach Nr. 4105 werden von den gewerblichen Berufsgenossenschaften mit rund 220.000 Euro angegeben. In Bezug auf die langfristigen Gesamtkosten eines Leistungsfalles nimmt die BK 4105 damit Rang 1 unter allen entschädigten Berufskrankheiten ein. Der größte Anteil dieser Leistungen – rund 70 % – wird in Form von Renten an Hinterbliebene gezahlt [14].

1.3. Pleurakarzinosen

Sekundäre metastatische Neubildungen stellen etwa 97 – 99 % der im Bereich der Pleura manifestierten bösartigen Tumoren dar. Die frühzeitige Mitbeteiligung der Pleura bei primären pulmonalen oder extrapulmonalen Tumoren erklärt sich besonders durch die reichhaltige Versorgung der Pleura mit Lymph- und Blutgefäßen. In etwa 40 % der fortgeschrittenen Stadien eines primären bösartigen Lungentumors wird eine Mitbeteiligung der Pleura beobachtet. Dies gilt insbesondere für Adenokarzinome und kleinzellige Karzinome. Neben primären bösartigen Lungentumoren, die bei Männern den Hauptteil der in die Pleura metastasierten Tumoren darstellen, werden besonders Absiedlungen bösartiger Primärtumoren von Mamma, Ovar, Uterus, Magen-Darm-Trakt, Pankreas, Nieren und Leber dokumentiert. Hämatogene, vorwiegend in der Lungenperipherie angeordnete Metastasen von Nierenkarzinomen, Rektumkarzinomen, Osteo- und Weichteilsarkomen sowie Melanomen führen häufig zu einer frühzeitigen Mitbeteiligung der *Pleura visceralis* [69]. In fortgeschrittenen Metastasierungsphasen können makroskopisch pseudomesotheliomartig wachsende sekundäre Pleuratumoren vielfach nur schwer von Pleuramesotheliomen abgegrenzt werden [→ Abbildung 10].

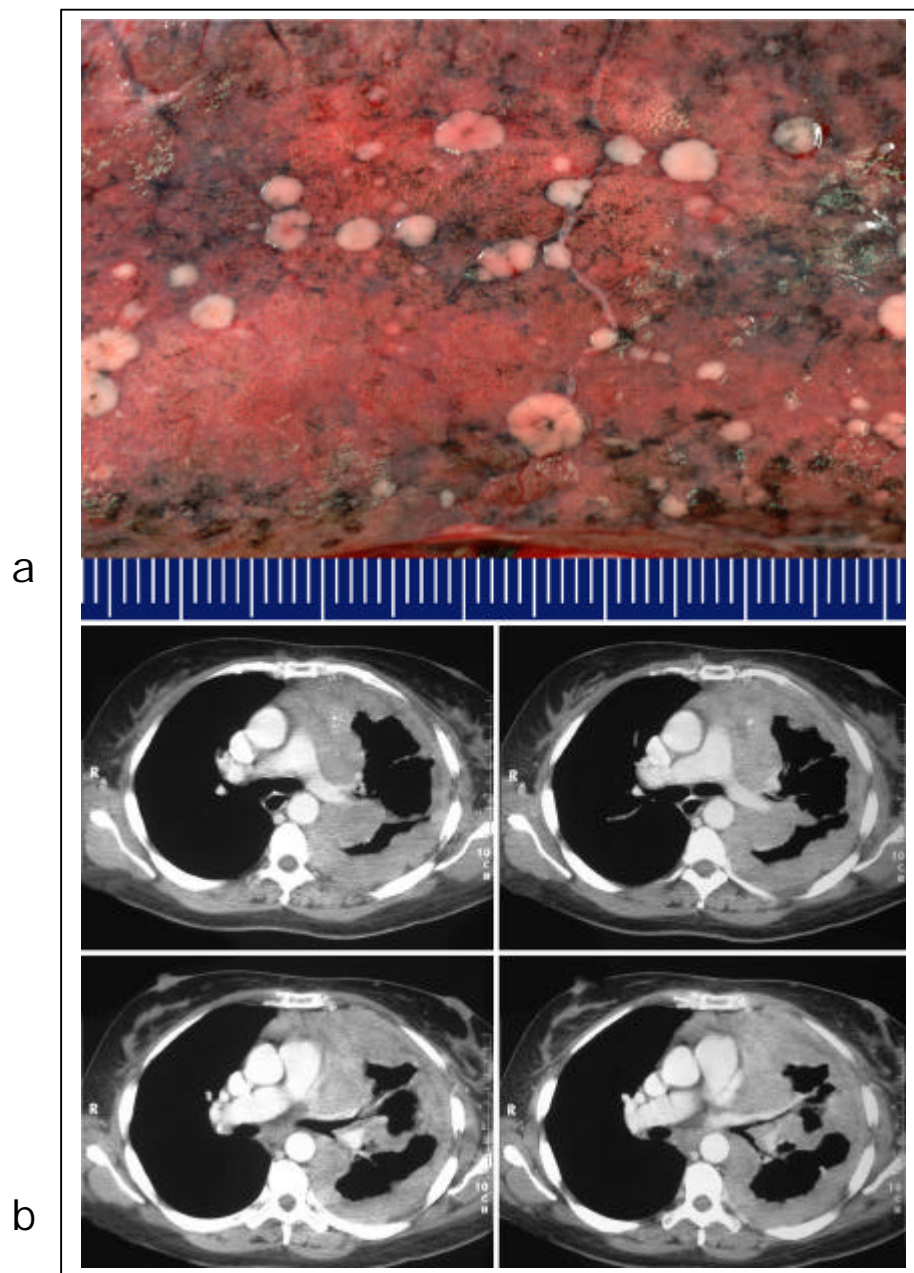


Abbildung 10

Pseudomesotheliomatös wachsende Tumoren im Bereich der Pleura.

a Pleurakarzinose eines primären Mammakarzinoms im Bereich der rechten *Pleura visceralis*.

b Computertomogramm des Thorax mit dem Bild eines pseudomesotheliomatös wachsenden, die gesamte linke Lunge fesselnden und in die Interlobärspalten einwachsenden malignen Thymoms.

1.4. Differentialdiagnose maligner Pleuratumoren

Ohne Kenntnis des klinischen Befundes kann die differentialdiagnostische Abgrenzung zwischen einem primären und einem sekundären bösartigen Pleuratumor besonders in relativ kleinen Biopsiepräparaten allein nach den histomorphologischen Befunden schwierig sein. Selbst bei Kenntnis der klinisch-radiologischen Befunde bleibt in Einzelfällen die Abgrenzung von Pleurakarzinosen primärer peripherer Adenokarzinome der Lungen zu epitheloid differenzierten Pleuramesotheliomen problematisch. Auch die sichere Abgrenzung reaktiver, meist entzündlich bedingter Mesothelzellproliferate gegenüber frühen Entwicklungsphasen von Pleuramesotheliomen – sogenannte Frühmesotheliome – erfordert im Einzelfall große Erfahrung und den Einsatz von Zusatzuntersuchungen.

Vor dem Hintergrund der vielfach anstehenden und bedeutsamen versicherungsmedizinischen Fragestellungen und im Bewusstsein der häufig problematischen Differentialdiagnose hat das Europäische Mesotheliom-Panel für die Bewertung primärer und sekundärer Pleuratumoren basierend auf morphologischen Befunden ein international akzeptiertes Wertungsschema mit 5 Gruppen entwickelt [→ Tabelle 4] [42].

Tabelle 4

Wertungsschema des Europäischen Mesotheliom-Panel für die pathologisch-anatomische Mesotheliom-Klassifikation (nach [42]).

Mesotheliom A	Sicheres Mesotheliom Kein Zweifel an der pathologisch-anatomischen Diagnose.
Mesotheliom B	Wahrscheinliches Mesotheliom Die Einschränkung kann in der mangelhaften Gewebegröße, der schlechten Qualität der Probe oder der mangelhaften Differenzierung des Tumors begründet sein, oder das Fehlen bestimmter histologischer Details kann zu leichten Zweifeln Anlass geben.
Mesotheliom C	Mögliches Mesotheliom Die Diagnose kann nicht abgelehnt werden, es fehlen aber ausreichende Hinweise für eine positive Diagnose.
Mesotheliom D	Wahrscheinlich kein Mesotheliom Die Diagnose ist zwar unwahrscheinlich, kann aber letztendlich nicht mit Sicherheit widerlegt werden.
Mesotheliom E	Sicher kein Mesotheliom Die konkrete Diagnose eines anderen primären Tumors sollte angegeben werden.

In den letzten Jahren haben sich verschiedenartige histochemische und immunhistochemische Zusatzuntersuchungen bei der differentialdiagnostischen Abgrenzung als hilfreich erwie-

sen (Übersichten → [2, 11, 13, 27, 35, 75]). Ein hochspezifischer, im internationalen Expertengremium akzeptierter histochemischer, immunhistochemischer oder genetischer Marker ist dabei für Mesotheliome bislang nicht verfügbar. Als wertvolle histochemische Reaktionen haben sich die PAS-Reaktion mit und ohne Diastasevorbehandlung, der Nachweis hyaluronsäurehaltiger Vakuolen sowie die immunhistochemischen Reaktionen zum Nachweis der Expression von Zytokeratinen, Vimentin, *Carcinoembryonic Antigen* (CEA), *Human Epithelial Antigen* (HEA), BMA120 und CD15 erwiesen. Im Einzelfall können bei konkretem Verdacht auf das Vorliegen einer Pleurakarzinose außerdem zusätzliche, teilweise *organspezifische* Antikörper zum Einsatz kommen. Hierzu zählen z. B. Antikörper gegen das Prostata-spezifische Antigen, gegen Hormonrezeptoren (Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor), Melanommarker (HMB45, Melan A), Sarkommarker (Aktin, Desmin, Myogenin, CD 99, S-100) oder gegen Lymphome.

Neben dem breiten Spektrum immunhistochemischer Marker bieten sich durch die rasche Entwicklung molekularbiologischer Techniken in den letzten Jahren zusätzlich auch molekularpathologische Untersuchungsverfahren für die Differentialdiagnose maligner Pleuratumoren an [48].

Die Erfahrung des Untersuchers bleibt letztendlich das entscheidende Kriterium bei der Auswahl dieser Zusatzuntersuchungen und bei der abschließenden Bewertung aller verfügbaren Befunde.

Zu den wichtigsten derzeit diskutierten, potentiell relevanten sogenannten Markern für die differentialdiagnostische Abgrenzung von Pleuramesotheliomen zu reaktiven Pleuraläsionen einerseits und neoplastischen Pleurakarzinosen andererseits gehören Antikörper gegen das Calcium-bindende Protein Calretinin und das Tumorsuppressorgenprodukt P53 sowie molekularpathologische Verfahren zum Nachweis einer *SV 40*-Infektion und zur Bestimmung von Veränderungen im Genom unter Einsatz der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH).

1.4.1. Calretinin

Calretinin ist ein 29 kDa Protein, das zur *EF-Hand*-Familie der Calcium-bindenden Proteine gehört. Prototypen dieser Familie sind Troponin C und Calmodulin. Calretinin besitzt sechs Calcium-bindende Domänen (*EF-Hand*-Strecken). Die Aminosäuresequenz des Proteins ist im interspezies-Vergleich während der Evolution besonders konserviert. Das Calretinogen ist auf dem langen Arm von Chromosom 16 lokalisiert (16q22-23). Als Resultat eines unter-

schiedlichen *Splicing*-Vorgangs existieren zwei bekannte Calretinin-Isoformen: Calretinin-22k und Calretinin-20k (Übersicht → [19]).

Vorkommen

Unter physiologischen Bedingungen wird Calretinin speziell in Subpopulationen von Nervenzellen im zentralen und peripheren Nervensystem, besonders in der Retina und in Neuronen, die zu sensorischen Bahnen gehören, exprimiert. Daneben konnte eine Expression auch in extraneuralen Zellen, z.B. in den Leydig-Zwischenzellen im Rattenhoden, nachgewiesen werden. In Abhängigkeit von der Zellzyklusphase wird – speziell in der G1-Phase und während der Mitose – eine variierende Calretinin-Immunreaktivität beobachtet. Calretinin kann sowohl im Zytoplasma – nach der Prophase und bis zur Telophase – als auch in der Mitosespindel – ab der Prometaphase in allen erfolgreichen Mitosephasen – lokalisiert sein. Calretinin ist hier mit den Kinetochor- und den Pol-Mikrotubuli assoziiert [36].

Funktion

Die Funktionen von Calretinin im peripheren und zentralen Nervensystem, in hormonbildenden Zellen und während der Embryonalentwicklung sind abschließend nicht geklärt. Verschiedene Funktionen werden diskutiert (Übersicht → [19]):

- Funktion bei der Trennung der Chromosomen während der Mitose.
- Als Ca^{2+} -Puffer soll Calretinin die Zelle vor Kurzzeitfluktuationen in der intrazellulären Calcium-Konzentration schützen. Calretinin soll eine Rolle beim Schutz der Zellen vor einer Ca^{2+} - Überlastung und den damit verbundenen zytotoxischen Effekten spielen.
- Funktion bei der Testosteronproduktion und der Leydig-Zellreifung.
- Im Intestinaltrakt soll die Koexpression von Calretinin mit drei vasodilatatorischen Proteinen (Substanz P, vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und *calcitonin-gene-related-peptide*) die Aufnahme von metabolisierten Nahrungsprodukten der Villi durch die Durchblutung beeinflussen.
- Weitere Funktionen sollen Calretinin bei der kindlichen Hörprägung und bei der Entwicklung des visuellen Systems zukommen.

Calretinin und Mesotheliome

Erstmals 1996 wurde von der Schweizer Arbeitsgruppe um M. R. CELIO und V. GOTZOS auf die Eignung von Calretinin bei der differentialdiagnostischen Abgrenzung insbesondere von epitheloid differenzierten Mesotheliomen zu Adenokarzinomen hingewiesen [37]. Die Befun-

de wurden seinerzeit nur an einer vergleichsweise kleinen Fallzahl von 23 Mesotheliomen abgesichert. Da die von der Schweizer Arbeitsgruppe als relativ hoch beschriebene Spezifität und Sensitivität von anderen Arbeitsgruppen teilweise nicht bestätigt werden konnten, wurde die Wertigkeit der Befunde in den letzten Jahren kontrovers insbesondere zwischen europäischen und amerikanischen Pathologen diskutiert [4, 29, 37, 53, 75-78, 86, 86] .

1.4.2. *p53*-Tumorsuppressorgen

Mutationen des *p53*-Gens sind heute die am häufigsten dokumentierten genetischen Alterationen in humanen Tumoren [57, 79]. Das *p53*-Gen ist ein Tumorsuppressorgen, das für ein nukleäres Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von 53.000 Dalton kodiert.

Funktion

Unter physiologischen Bedingungen wirkt das Protein als ein negativer Regulator für Zellwachstum und Zellteilung [28]. P53 kommt eine zentrale Rolle bei der Erhaltung der Genomstabilität, der DNA-Reparatur und -Replikation sowie der Transaktivierung und Regulation anderer für die Zellteilung wichtiger Gene zu [41].

Mutationen können dem *p53*-Gen einen onkogenen Charakter verleihen und die Zellteilung stimulieren. Zum einen kann so die Tumorentstehung induziert werden, zum anderen wird durch die Ausschaltung der Tumorsuppressorfunktion ein Wachstum geschädigter oder entarteter Zellen begünstigt.

P53 und Mesotheliome

Im Vergleich zu anderen Organtumoren liegen nur wenige Untersuchungen zur Funktion von P53 bei der Realisation und Progression von Mesotheliomen vor. Diese Tatsache scheint in der Seltenheit der Tumoren und den bislang nur kleinen untersuchten Kollektiven begründet. Mutationen des *p53*-Gens konnten in den untersuchten, in der Regel primär im Bereich der Pleura manifestierten Mesotheliomen, wenn überhaupt, dann nur in einem sehr geringen Prozentsatz nachgewiesen werden [61, 64, 73]. Auf der Basis immunhistochemischer Untersuchungen wird dagegen eine P53-Akkumulation auch in einem nicht geringen Prozentsatz der analysierten Mesotheliome beschrieben. Bei kritischer Würdigung der Wertigkeit der Befunde, die oftmals nur auf der Basis geringer Fallzahlen ermittelt wurden, konnte hier eine P53-Akkumulation in 25 - 70 % der analysierten Tumoren dokumentiert werden [43, 59, 89]. Die Ursache für den immunhistochemisch fassbaren Nachweis der P53-Akkumulation

bei gleichzeitig fehlendem Nachweis von Genmutationen ist Gegenstand der Diskussion [→ Simian Virus 40, S. 33].

Ebenso diskutiert wird die Wertigkeit, die einem immunhistochemisch fassbaren P53-Nachweis in atypischen Mesothelzellen bei der differentialdiagnostischen Abgrenzung von reaktiven zu neoplastischen Läsionen im Bereich der Pleura zukommt [31, 33, 55, 58, 85, 100].

1.4.3. Simian Virus 40

Die erstmals 1994 von CARBONE et al. diskutierte mögliche kausale Beziehung zwischen einer chronisch schwelenden viralen Infektion mit *SV 40* und der Entwicklung von Mesotheliomen beim Menschen ist Gegenstand einer derzeit intensiv geführten Diskussion [→ Pleuramesotheliome - Ätiologie, S. 10] [16]. Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnten die von CARBONE et al. beschriebenen Befunde eines Nachweises von *SV 40*-Gensequenzen in Pleuramesotheliomen nachvollzogen werden. Die Angaben über die relative Häufigkeit *SV 40*-DNA-positiver Mesotheliome schwanken hier zwischen 50 - 80 %. Andere Arbeitsgruppen konnten die Befunde dagegen nicht bestätigen (Übersicht s. [15]). Die mit dem Nachweis von *SV 40*-Gensequenzen abgeleitete kausale Pathogenese bei der Realisation von Mesotheliomen ist abschließend nicht geklärt. Diskutiert wird eine Inhibierung der P53-Tumorsuppressorfunktion durch Bindung des *SV 40 TAg* an P53 [→ *p53*, S. 32] und eine damit verbundene Instabilität des Genoms, insbesondere nach Schädigung durch Karzinogene wie Asbest. Unklar ist auch die Bedeutung, die dem *SV 40*-Gensequenznachweis bei der Differentialdiagnose pleural lokalisierter bösartiger Tumoren zukommt. Von einzelnen Autoren wird der Nachweis entsprechender Sequenzen auch in bösartigen Lungentumoren und nicht-neoplastischen Geweben beschrieben [34], andere Autoren negieren dagegen einen entsprechenden Nachweis in bösartigen Lungentumoren [90, 91].

1.4.4. Komparative genomische Hybridisierung

Die komparative genomische Hybridisierung (CGH) ist eine molekularzytogenetische Methode, die es erlaubt, einen Überblick über die genetischen Veränderungen eines Tumors auf chromosomaler und subchromosomaler Ebene zu erlangen. Dabei werden detektierbare Veränderungen entweder als DNA-Zugewinn oder -Verlust klassifiziert [81].

Erste Arbeiten über zytogenetische Befunde bei 2 malignen Mesotheliomen stammen aus dem Jahr 1978 [56]. Erst 10 Jahre später wurden an größeren Kollektiven von 15 - 30 Fällen weitere zytogenetische Untersuchungen durchgeführt [54, 96]. Zumeist wurden komplexe

genetische Alterationen beschrieben. Bereits seinerzeit wurde die Bedeutung der Beteiligung verschiedener Onkogene bei der Pathogenese maligner Mesotheliome diskutiert [84]. Wiederholt wurde auf Verluste von genetischem Material auf Chromosom 1 hingewiesen. Auch auf den Chromosomen 9 und 22 konnten wiederholt von verschiedenen Arbeitsgruppen teils mit klassischer Zytogenetik, teils auch mit modernen molekularbiologischen Methoden unter Einschluss der CGH, Verluste nachgewiesen werden (Übersicht → [50]). Offen ist die Frage nach dem möglichen Vorliegen eines für Mesotheliome charakteristischen, für die Differentialdiagnose anwendbaren Defektmusters.

1.5. Fragestellungen

Vor dem Hintergrund der offenen Fragen zur Wertigkeit des Nachweises von Calretinin, P53, und *SV 40* sowie Befunden der komparativen genomischen Hybridisierung wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit am umfangreichen Untersuchungsgut des Deutschen Mesotheliomregisters folgende Fragen geprüft:

- (1) Welche Bedeutung kommt dem immunhistochemischen Nachweis von Calretinin bei der Differentialdiagnose von Pleuramesotheliomen, insbesondere bei der Abgrenzung zu Pleurakarzinosen primär andernorts lokalisierter Tumoren zu?
- (2) Kann der immunhistochemische Nachweis der P53-Akkumulation bei der Differentialdiagnose von Pleuramesotheliomen – insbesondere bei der Abgrenzung zu reaktiven Pleuraläsionen und Pleurakarzinosen primär andernorts lokalisierter Tumoren – wesentliche Befunde erbringen?
- (3) Mit welcher relativen Häufigkeit können Gensequenzen des Simian Virus 40 in Gewebeproben von Mesotheliomen im Deutschen Mesotheliomregister nachgewiesen werden? Ergeben sich aus den Befunden Hinweise für die Differentialdiagnose oder formale Pathogenese maligner Pleuratumoren?
- (4) Welche zusätzlichen Informationen – insbesondere auch in Bezug auf die phänotypisch fassbare variable Tumorbilogie – bietet der Einsatz der komparativen genomischen Hybridisierung für die Differentialdiagnose primärer und sekundärer bösartiger Tumoren im Bereich der Pleura?

2. Material & Methoden

2.1. Material

Für die Untersuchungen standen Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben aus dem Archiv des Deutschen Mesotheliomregisters am Institut für Pathologie an den Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Bergmannsheil in Bochum zur Verfügung. Zwischen 1987 und 1999 wurden hier 3.942 Mesotheliome der Kategorie A oder B nach dem Europäischen Mesotheliom-Panel gesichert [→ Tabelle 4, S. 29]. Die Untersuchungen zum immunhistochemischen Nachweis der Calretinin-Expression und P53-Akkumulation sowie zum Nachweis von *SV 40*-Gensequenzen wurden an archiviertem Biopsie-, Operations- und Autopsiegut vornehmlich aus den Jahren 1993 bis 1999 durchgeführt. Für die Untersuchungen unter Einsatz der komparativen genomischen Hybridisierung wurden überwiegend bioptisch oder operativ entnommene und anschließend Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben aus den Jahren 1999 und 2000 herangezogen, die unter weitestgehend standardisierten Bedingungen für in der Regel 24 bis 48 Stunden in 4 %igem gepuffertem Formalin fixiert werden konnten.

2.2. Methoden

2.2.1. Nachweis der Calretinin-Expression

Antikörper und Antiseren

Der Nachweis der Expression von Calretinin in den untersuchten Gewebeproben erfolgte immunhistochemisch unter Einsatz verschiedener kommerziell erhältlicher Antikörper und Antiseren gegen Calretinin. Insgesamt wurden 5 kommerziell erhältliche Antikörper ausgetestet [→ Tabelle 5]. Geeignete Verdünnungen der Antikörper und Antiseren wurden in Vorversuchen ermittelt.

Tabelle 5

Zusammenstellung der eingesetzten Antikörper und Antisera gegen Calretinin.

Antikörperbezeichnung	Hersteller	Verdünnung	Vorbehandlung
Calretinin _{SWant} Polyklonal Kaninchen anti rekombinantes humanes Calretinin Code 7696, 7698, 7699	SWant, Bellinzona (CH)	1 : 3.000	Keine
Calretinin _{SWant 2} Monoklonal Maus anti rekombinantes humanes Calretinin Klon 6B3	SWant, Bellinzona (CH)	1 : 3.000	Mikrowelle Citrat-Puffer
Calretinin _{Chem} Polyklonal Kaninchen anti rekombinantes Meerschweinchen Calretinin Klon AB149	Chemicon, Temecula (USA)	1: 600	Proteinase K
Calretinin _{Chem 2} Monoklonal Maus anti rekombinantes Ratten Calretinin Klon MAB 1568; Lot 17120001	Chemicon, Temecula (USA)	1 : 120	Mikrowelle EDTA
Calretinin _{Zymed} Polyklonal Kaninchen anti rekombinantes humanes Calretinin Code 18-0211 Lot 80140154	Zymed, San Francisco (USA)	1 : 150	Mikrowelle Citrat-Puffer

Immunhistochemie

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden unter Einsatz der APAAP-Methode halbautomatisiert mit dem ChemMate 500 Färbeautomaten der Fa. DAKO, Hamburg, nach folgendem Kurzprotokoll durchgeführt (alle Chemikalien, Puffer und Materialien von DAKO, Hamburg) [74]:

- Aufziehen von 3-4 µm dicken Schnittpräparaten auf Kapillarspaltobjektträger. Trocknung der Präparate über Nacht bei 58 °C im Wärmeschrank.
- Entparaffinierung der Präparate in Xylol und Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe; Spülung in Tris-Puffer (pH 7,6). Ggf. Vorbehandlung durch Proteinase K-

Andauung (0,4 mg/ml, 10 min., 22 °C) oder Mikrowellenvorbehandlung (10 mM Citrat-Puffer, pH 6,0 oder 0,1 mM EDTA, pH 8,0) [→ Tabelle 5].

- Inkubation der Präparate mit dem primären Antikörper bzw. Antiserum für 25 min. bei Raumtemperatur in der jeweiligen Gebrauchsverdünnung, angesetzt mit Hilfe eines *Diluents*. Spülung in Puffer. Bei Einsatz polyklonaler Antiseren anschließend „Mausifizierung“, d.h. Inkubation mit einem Maus anti Kaninchen Serum (1:6000 in *Diluent*) für 25 min. bei Raumtemperatur. Spülung in Puffer.
- Inkubation für 25 min. bei Raumtemperatur mit einem Brückenantikörper (LINK, Kaninchen anti Maus Immunglobuline aller Isotypen). Spülung in Puffer.
- Inkubation für weitere 25 min. bei Raumtemperatur mit einem APAAP-Komplex (monoklonale Maus IgG₁ Antikörper, spezifisch an alkalische Phosphatase aus Kälberdarmmukosa gebunden). Spülung mit Puffer.
- Verstärkung der Reaktion durch Wiederholung der LINK- und APAAP-Komplex-Inkubation für jeweils 10 min. bei Raumtemperatur.
- Blockung der endogenen alkalischen Phosphatase für 4 x 5 min. durch Levamisol. Farbentwicklung maximal 10 min. mit Neofuchsin als Chromogen.
- Gegenfärbung in Mayers-Hämatoxylin für 1 min. Bläuung in Aqua dest.
- Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe. Eindecken mit Eukitt.

Die Auswertung der Präparate erfolgte lichtmikroskopisch mit einem Axiolab Mikroskop der Fa. Zeiss. Die Bilddokumentation erfolgte digital unter Einsatz des Dokumentationssystems DISKUS der Fa. Hilgers, Königswinter, an einem Zeiss Axioskop.

2.2.2. Nachweis der P53-Akkumulation

Der Nachweis der P53-Akkumulation in den untersuchten Gewebeproben erfolgte immunhistochemisch unter Einsatz verschiedener kommerziell erhältlicher Antikörper und Antiseren gegen P53. Insgesamt wurden 6 kommerziell erhältliche Antikörper getestet [→ Tabelle 6]. Die Durchführung der immunhistochemischen Färbung erfolgte wie oben dargestellt [→ 2.2.1 Nachweis der Calretinin-Expression, S. 36]. Geeignete Verdünnungen der Antikörper und Antiseren wurden in Vorversuchen ermittelt.

Tabelle 6

Zusammenstellung der eingesetzten Antikörper und Antisera gegen P53.

Antikörperbezeichnung	Hersteller	Verdünnung	Vorbehandlung
Pab 1801 Monoklonal Maus IgG ₁ Epitop AS 32-79	BD Pharmingen, Heidelberg	1 : 100	Mikrowelle Citrat-Puffer
Pab 240 Monoklonal Maus IgG ₁ Epitop AS 213-217	BD Pharmingen, Heidelberg	1 : 50	Mikrowelle Citrat-Puffer
Pab 246 Monoklonal Maus IgG ₁ Epitop AS 88-109	BD Pharmingen, Heidelberg	1 : 20	Mikrowelle Citrat-Puffer
DO 1 Monoklonal Maus IgG _{2a} Epitop AS 1-45	Dako, Hamburg	1 : 100	Mikrowelle Citrat-Puffer
DO 7 Monoklonal Maus IgG _{2b} Epitop AS 17-29	Dako, Hamburg	1 : 100	Mikrowelle Citrat-Puffer
CM 1 Polyklonal Kaninchen anti rekombinantes humanes P53	Novocastra, New Castle upon Tyne (UK)	1 : 2.500	Mikrowelle Citrat-Puffer

2.2.3. SV 40-Gensequenznachweis

Für die Untersuchungen wurden in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben herangezogen. An Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Präparaten erfolgte nach lichtmikroskopischer pathologisch-anatomischer Begutachtung zunächst eine Kennzeichnung relevanter Tumorareale. In Abhängigkeit von der Größe dieser Areale wurden an korrespondierenden gefärbten Serienschnitten Tumorareale unter mikroskopischer Kontrolle mikrodissiziert [40] oder bei größeren Arealen mit einem Einwegskalpell vom Objektträger abgekratzt. Tumorfremde Areale derselben Präparate wurden als interne Kontrolle präpariert. Für die DNA-Isolation standen mindestens 500 - 1.000 Zellen zur Verfügung.

DNA-Isolation

Die DNA-Isolation erfolgte nach Entparaffinierung der dissezierten Zellen in Xylol (2 x 5 min.) über eine Proteinase K-Andauung (2 µg/µl, 55 °C, 18 Stunden). Für die Aufreinigung wurde ein kommerzielles Säulen-Matrix-System eingesetzt (Qiagen DNA Mini Kit, Hilden). Die von

den Säulen eluierte DNA wurde mit Ethanol gefällt, in 10 µl A. bidest. aufgenommen, die Konzentration photometrisch bestimmt und die DNA-Lösung auf eine Konzentration von 125 ng/µl eingestellt.

PCR

Für die Amplifikation des für das *SV 40-Genom* spezifischen Genfragments wurden die Primer SV.For3 (TGA GGC TAC TGC TGA CTC TCA ACA) und SV.Rev (GCA TGA CTC AAA AAA CTT AGC AAT TCT G) verwendet. Die Primer amplifizieren ein für das *SV 40 TAg* spezifisches, 105 Bp großes Genfragment (*GenBank Accession* V01380 NID g62000; 4476-4453 4372-4399) [16]. Die Reaktion erfolgte in einem 20 µl Ansatz unter Einsatz von 250 ng isolierter DNA (2 µl), jeweils 12,5 pmol Primer (je 2 µl 6,25 pmol/µl) und 10 µl *HotStar-Taq Master Mix* (Qiagen, Hilden) nach einer 15 minütigen Denaturierung bei 95 °C für 45 Zyklen in einem MWG Primus Thermozykler (45 Sek., 95 °C – 1 min., 52 °C – 1 min., 72 °C; abschließend 10 min. 72 °C).

Die PCR-Produkte wurden auf einem 3 %igen Agarosegel (Nusieve 3:1) aufgetrennt. Für die Visualisierung und Dokumentation auf einem UV-Tisch wurden Gel und Laufpuffer 0,05 % (W/V) Ethidiumbromid zugesetzt. In repräsentativen Fällen wurde zur Verifizierung des PCR-Produkts die amplifizierte DNA aus dem Gel eluiert und direkt nach der Sanger-Dideoxy-Methode sequenziert. Die Sequenzierungen wurden in Kooperation im Labor von A. F. Gazdar, *Hamon Center for Therapeutic Oncology Research, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas*, durchgeführt.

2.2.4. Komparative genomische Hybridisierung

Für die CGH-Analysen wurde genomische DNA der zu untersuchenden Tumorproben aus 20 Serienschnitten von 10 µm Dicke aufgearbeitet [→ *SV 40-Gensequenznachweis*, S. 38). Die einzelnen umfangreichen Arbeitsschritte für die Durchführung der komparativen genomischen Hybridisierung sind im Detail bei KRISMANN et al. beschrieben [49]. Referenz-DNA wurde aus peripherem humanem Blut von freiwilligen Spendern isoliert (QIAmp Blood Kit, Qiagen, Hilden). Die Hybridisierung erfolgte für 3 Tage bei 37 °C auf kommerziell erhältlichen Metaphasechromosomen (Vysis, Stuttgart).

Die Bildaufnahmen erfolgten an einem Epifluoreszenzmikroskop (ZEISS Axiophot) mit einem manuellen Filtersatz für die drei verwendeten Fluorochrome (DAPI, FITC, TRITC) und einer gekühlten CCD-Kamera (SensiCam, Fa. PCO). Die CGH-Bildverarbeitung und Analyse

wurden mit dem Programmsystem QUIPS (Vysis, Stuttgart; Version 1998) auf einem Macintosh G3 PowerPC (Apple) vorgenommen. Pro Fall wurden je nach Qualität der Metaphasepräparationen 10 - 15 Metaphasen jeweils mit jedem der drei Fluorochrome aufgenommen. Eine Karyotypisierung der 46 Chromosomen wurde fluoreszenzmikroskopisch und Computer-gestützt über das blaue DAPI-Bild ermöglicht. Das grüne FITC-Bild repräsentiert die Tumor-DNA und das rote TRITC-Bild stellt die Normalgewebs-DNA optisch dar.

Für die Erstellung von Summenkaryogrammen wurde Computer-gestützt eine Übereinanderprojektion der Karyogramme von einzelnen Metaphasen vorgenommen. Die grafische Darstellung für jedes Chromosom erfolgte in einem Ideogramm. Zur Lokalisation genetischer Anomalien wurde die eindimensionale Kurve des Ratio-Intensitätsprofils für jedes Chromosom an der senkrechten Mittelachse orientiert. Diese symbolisiert eine Gleichverteilung von Tumor- und Normalgewebs-DNA auf dem jeweiligen Chromosomenabschnitt. Ein Abweichen des Profils nach rechts entspricht einem DNA-Zugewinn, ein Ausschlag nach links einem DNA-Verlust. Die beiden parallel zur Mittellinie ausgerichteten Achsen symbolisieren ein Verhältnis der Fluoreszenzintensität von FITC zu TRITC von 0,80 bzw. 1,20. Nur Veränderungen außerhalb dieser Grenzen wurden bei der Analyse als signifikante chromosomale Anomalien gewertet und grafisch in Form von Balken an den Chromosomen-Ideogrammen dargestellt. Grüne Balken repräsentieren dabei DNA- Zugewinne in der Tumor-DNA, rote Balken DNA-Verluste.

In Kontrollreaktionen wurden Proben invers markiert und analysiert. Außerdem wurde Tumor DNA mit bekannten Defekten wiederholt analysiert.

3. Ergebnisse

3.1. Calretinin

Für die Untersuchungen zur Bedeutung des immunhistochemischen Nachweises von Calretinin bei der Differentialdiagnose von Pleuramesotheliomen, insbesondere bei der Abgrenzung zu Pleurakarzinosen primär andernorts lokalisierter Tumoren wurden insgesamt 1005 Gewebeproben aus dem Archiv des Deutschen Mesotheliomregisters herangezogen. Die Auswahl der Proben erfolgte rein zufällig. Es handelte sich um 756 bioptisch gewonnene Proben und 249 Proben aus dem Operations- und Autopsiegut.

Primärdiagnose

Die primären pathologisch-anatomischen Diagnosen wurden unter Berücksichtigung Hämatoxilin-Eosin und Elastica-von-Gieson gefärbter Schnittpräparate und unter Berücksichtigung der verfügbaren Angaben zum klinischen Krankheitsbild und ggf. der im Rahmen der Operationen oder Autopsien erhobenen Befunde gestellt. Ergänzend wurden histochemische Untersuchungen zum möglichen Nachweis von PAS-positiven Schleimvakuolen nach Diastase-Vorbehandlung sowie immunhistochemische Untersuchungen unter Einsatz eines bei der Differentialdiagnose von bösartigen Pleuratumoren im Deutschen Mesotheliomregister bewährten Antikörperpanels durchgeführt [→ Tabelle 7] [11, 82].

Insgesamt konnten 730 Pleuramesotheliome der Kategorien A oder B nach dem Europäischen Mesotheliom-Panel gesichert werden. An 260 Präparaten wurde die Diagnose einer Pleurakarzinose und an 15 Proben die Diagnose einer Pleurasarkomatose gestellt. Eine differenzierte Diagnose-Übersicht gibt Tabelle 8.

Tabelle 7

Antikörperpanel bei der Differentialdiagnose bösartiger Pleuratumoren.

[+++ = regelmäßig positiv; ++ = häufig positiv; + = gelegentlich positiv; (+) = gelegentlich fokal positiv, - = in der Regel negativ]

Antikörper	Pleuramesotheliome		Pleurakarzinosen	Pleura-sarkomatosen
	Epitheloid	Sarkomatoid		
MNF116 Zytokeratine	+++	++	++	+
AE1/AE3 Zytokeratine	++	++	++	+
BMA120	++	(+)	-	-
V9 Vimentin	++	+++	+	+++
BerEP4 HEA	(+)	-	+++	+
CD 15	-	-	+	-
CEA	-	-	++	-
TTF1	-	-	++ (Lunge)	-
Aktin	(+)	(+)	-	+
Desmin	(+)	(+)	-	+
Myogenin	-	-	-	+
CD 99	-	-	-	+
S-100	-	-	-	+

Tabelle 8

Zusammenstellung der pathologisch-anatomischen Diagnosen der für die Untersuchungen herangezogenen Gewebeproben.

Diagnose	Anzahl	%
Pleuramesotheliome gesamt	730	72,6
Epitheloid	396	39,4
Biphasisch	260	25,9
Sarkomatoid	74	7,4
Pleurakarzinosen gesamt	260	25,9
Adenokarzinome	226	22,5
davon gesicherte primäre Lungentumoren	68	6,8
Plattenepithelkarzinome	21	2,1
Kleinzellige Karzinome	13	1,3
Pleurasarkomatosen	15	1,5
Gesamt	1005	100

Evaluierung der verfügbaren Calretinin-Antikörper

In einer Voruntersuchung wurde zunächst an Gewebeproben von 45 gesicherten Mesotheliomen und 10 gesicherten Pleurakarzinosen von Adenokarzinomen die Immunreaktivität aller für die Untersuchungen zur Verfügung stehenden Antikörper und Antiseren gegen Calretinin getestet [→ Tabelle 5, S. 36]. Die Bewertung der Immunreaktion erfolgte in den Kategorien A = sicher positiv, B = wahrscheinlich positiv, C = nicht bewertbar, D = wahrscheinlich negativ und E = sicher negativ. Die Einordnung in die Kategorien A oder B setzte den Nachweis einer positiven Immunreaktion in mindestens 5 % der atypischen Zellen voraus. Die einschränkende Bewertung in den Kategorien B und D kann in der Qualität der Gewebeproben oder der Immunreaktion begründet sein. Tumoren in den Kategorien A und B wurden im Rahmen der Auswertung als *positiv*, Tumoren in den Kategorien D und E als *negativ* gewertet.

Mit dem polyklonalen Antiserum Calretinin_{SWant} zeigten 89 % der untersuchten Mesotheliome – bei Fehlen einer nennenswerten unspezifischen Hintergrundfärbung – eine positive, teils zytoplasmatisch, teils nukleär betonte positive Immunreaktion [→ Abbildung 11a & e]. Vergleichbare Befunde wurden bei Einsatz des monoklonalen Antikörpers Calretinin_{SWant 2} erzielt.

Bei Einsatz des Antiserums Calretinin_{Chem} zeigten zahlreiche der untersuchten Präparate eine nicht zu akzeptierende unspezifische Hintergrundfärbung. Nur bei 56 % der Mesotheliome konnte eine schwach-positive, teilweise diffuse Immunreaktion der Tumorzellen dokumentiert werden [→ Abbildung 11f].

Die Immunreaktion des Antiserums Calretinin_{ZyMed} war qualitativ und quantitativ vergleichbar dem der Reaktion mit dem Antiserum Calretinin_{SWant}. Calretinin_{ZyMed} wurde dabei jedoch in 40fach höherer Konzentration eingesetzt [→ Abbildung 11b].

Der monoklonale Antikörper Calretinin_{Chem 2} imponierte durch eine sehr saubere, visuell überzeugende Immunreaktion [→ Abbildung 11 c & d]. Im Vergleich zum Calretinin_{SWant} zeigte der monoklonale Antikörper aber eine geringere Sensitivität bei der Darstellung epitheloider Mesotheliome. Nur 78 % der untersuchten Mesotheliome zeigten hier eine positive Immunreaktion.

Bei zwei Calretinin-positiven Adenokarzinomen zeigten – im Gegensatz zu den untersuchten Mesotheliomen, bei denen in der Regel in mehr als 50 % der Tumorzellen eine positive Immunreaktion dokumentiert werden konnte – weniger als 10 % der Tumorzellen eine positive Immunreaktion. Daneben kam es hier im Sinne einer positiven Kontrolle zur Darstellung

gereizter Mesothelzellen [→ Abbildung 14 b]. Auch wenn bedingt durch eine unspezifische Hintergrundfärbung die Beurteilung der Immunreaktion bei dem Antiserum Calretinin_{Chem} erschwert war, zeigten die untersuchten Antiseren und der Antikörper keine nennenswerten Unterschiede in Bezug auf eine Darstellung positiver Tumorzellen bei Adenokarzinomen.

In den Voruntersuchungen zur Evaluierung der verfügbaren Antikörper und Antiseren gegen Calretinin wurden zusammenfassend die vergleichsweise überzeugendsten Befunde bei der Immunfärbung von Mesotheliomen mit dem polyklonalen Antiserum Calretinin_{SWant} erzielt.

Für die weitergehenden Untersuchungen zur Sensitivität und Spezifität des immunhistochemischen Nachweises von Calretinin bei der Differentialdiagnose von Pleuramesotheliomen, insbesondere bei der Abgrenzung zu Pleurakarzinosen primär andernorts lokalisierter Tumoren, wurde nachfolgend an weiteren 685 Pleuramesotheliomen, 250 Pleurakarzinosen und 15 Pleurasarkomatosen das Antiserum Calretinin_{SWant} eingesetzt. Eine Übersicht der zusammenfassend mit dem Antiserum Calretinin_{SWant} erhobenen Befunde gibt Tabelle 9.

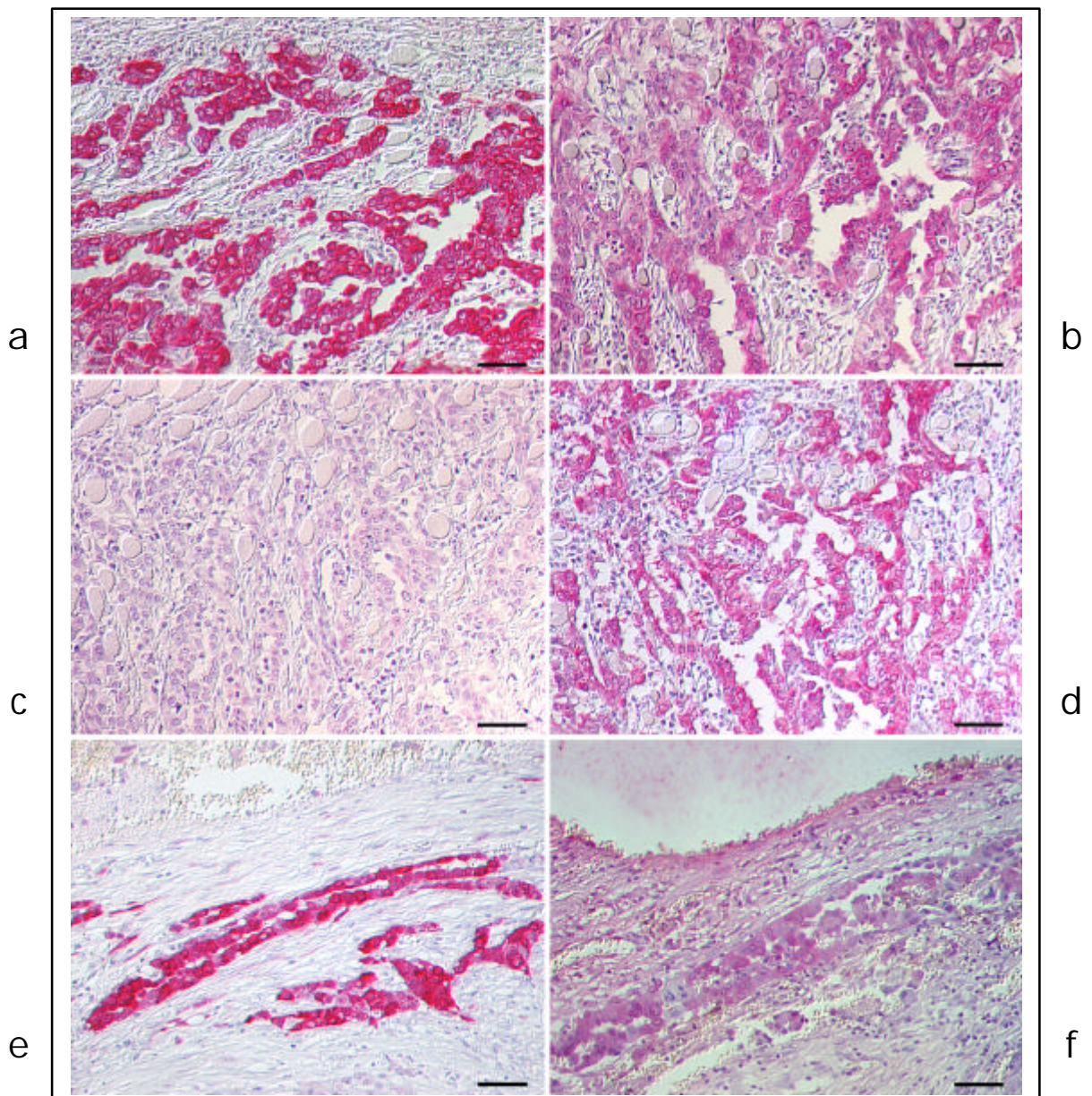


Abbildung 11

Evaluierung der verfügbaren Antikörper und Antiseren gegen Calretinin an Pleuramesotheliomen.

a Calretinin_{SWant}: Überzeugend positive, betont zyttoplasmatisch lokalisierte Immunreaktion.

b Calretinin_{Zymed}: Positive, vorwiegend zyttoplasmatisch lokalisierte Immunreaktion in den Tumorzellen.

c Calretinin_{Chem 2}: Vollständig negative Immunreaktion der Tumorzellen

d Calretinin_{Chem 2}: Vorwiegend zyttoplasmatisch lokalisierte positive Immunreaktion in den Tumorzellen.

e Calretinin_{SWant}: Zyttoplasmatisch lokalisierte positive Immunreaktion der Tumorzellen ohne unspezifische Reaktion der Stromaanteile.

f Calretinin_{Chem}: Schwach positive Immunreaktion der Tumorzellen bei gleichzeitig unspezifisch positiver Immunreaktion in Stromaanteilen.

(Maßstab a - f = 50 µm)

Tabelle 9

Zusammenstellung der immunhistochemischen Befunde bei Einsatz des Antiserums Calretinin_{SWant}.

Diagnose	Positiv		Negativ		Unklar		Gesamt	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Pleuramesotheliome gesamt	642	88,0	71	9,7	17	2,3	730	100
Epitheloid	369	93,2	15	3,8	12	3,0	396	100
Biphasisch	245	94,2	12	4,6	3	1,2	260	100
Sarkomatoid	28	37,8	44	59,5	2	2,7	74	100
Pleurakarzinosen gesamt	18	6,9	219	84,2	23	8,9	260	100
Adenokarzinome	14	6,2	192	85,0	20	8,8	226	100
davon gesichert der Lungen	5	7,3	55	80,9	8	11,8	68	100
Plattenepithelkarzinome	4	19,1	15	71,4	2	9,5	21	100
Kleinzellige Karzinome	0	0	12	92,3	1	7,7	13	100
Pleurasarkomatosen	0	0	14	93,3	1	6,7	15	100
Gesamt	660	65,7	304	30,2	41	4,1	1005	100

Calretinin-Immunreaktion

Bei der lichtmikroskopischen Begutachtung Calretinin-positiver Präparate konnte zwischen einer zytoplasmatischen und einer nukleär betonten positiven Immunreaktion unterschieden werden. Letztere trat entweder als Färbung der Nukleoli oder als positive Reaktion im Karyoplasma auf. Die positive Immunreaktion im Zytoplasma war körnig, diffus und weitgehend homogen verteilt. Viele Präparate zeigten sowohl eine zytoplasmatische als auch eine nukleäre Immunreaktion. War Calretinin-positives Karyoplasma vorhanden, so war dieses in der Regel stärker angefärbt als das der Zelle zugehörige Zytoplasma. In den meisten Zellen waren die Nukleoli dieser Zellen ebenfalls positiv dargestellt.

Epitheloide Pleuramesotheliome

Bei der Mehrzahl der untersuchten epitheloid differenzierten Pleuramesotheliome zeigten mehr als 50 % der atypischen Zellen eine teils nukleär, teils zytoplasmatisch betonte Immun-

reaktion [→ Abbildung 12 a & b]. Nur in einzelnen Fällen war eine entsprechende Immunreaktion in weniger als 20 % der epitheloiden Zellen zu dokumentieren. Eine immunhistochemisch fassbare Calretinin-Expression war nicht auf invasiv wachsende Mesotheliome beschränkt. Auch in nicht invasiven frühen Phasen der Tumorentwicklung – sogenannten Frühmesotheliomen – war die Calretinin-Expression nachweisbar [→ Abbildung 13]. Für die Diagnose und Abgrenzung epitheloid differenzierter Pleuramesotheliome zu Pleurakarzinosen primär andernorts lokalisierter Adenokarzinome erreichte das Antiserum Calretinin_{SWant} eine Sensitivität von 0,96 und eine Spezifität von 0,93.

Sarkomatoide Pleuramesotheliome

Von den untersuchten 74 Pleuramesotheliomen mit führender sarkomatoider Differenzierung zeigten nur 28 (37,8 %) eine überzeugend positive, auch hier teils nukleär, teils zytoplasmatisch betonte Immunreaktion [→ Abbildung 12 c & d]. In der Regel konnte eine positive Immunreaktion in weniger als 10 % der atypischen Zellen dokumentiert werden. Für die Diagnose und Abgrenzung zu Pleurasarkomatosen erreichte das Antiserum Calretinin_{SWant} eine Sensitivität von 0,38 und eine Spezifität von 1.

Biphasische Pleuramesotheliome

Bei den untersuchten biphasischen Pleuramesotheliomen konnte eine positive Immunreaktion überwiegend in den epitheloiden Tumorabschnitten belegt werden. Nur in einzelnen Fällen erwiesen sich auch sarkomatoide Tumorareale als Calretinin-positiv. Für die Diagnose und Abgrenzung zu Pleurakarzinosen von Adenokarzinomen und Pleurasarkomatosen erreichte das Antiserum Calretinin_{SWant} eine Sensitivität von 0,95 und eine Spezifität von 0,94.

Adenokarzinome

Die untersuchten Pleurakarzinosen von Adenokarzinomen reagierten mit dem Antiserum Calretinin_{SWant} überwiegend (85,0 %) negativ. Nur in wenigen Fällen (6,2 %) lag eine zweifelsfrei positive Reaktion der Tumorzellen vor. Diese Reaktion trat in den Präparaten nur in enger räumlicher Beziehung zu Tumornekrosen und Entzündungsreaktionen auf. In allen positiven Präparaten zeigten weniger als 10 % der atypischen Zellen eine positive Immunreaktion – in den meisten Präparaten reagierten sogar weniger als 5 % der Tumorzellen positiv. In Präparaten mit Calretinin-negativen Pleurakarzinosen primär andernorts lokalisierter, adenoid differenzierter Tumoren konnte vereinzelt eine positive Reaktion in Alveolar-makrophagen im subpleuralen Lungengewebe beobachtet werden. Unabhängig davon zeig-

te sich in nahezu allen Präparaten eine spezifische Anfärbung gereizter Mesothelzellen in räumlicher Beziehung zum Tumor [→ Abbildung 14 b, d, f, h].

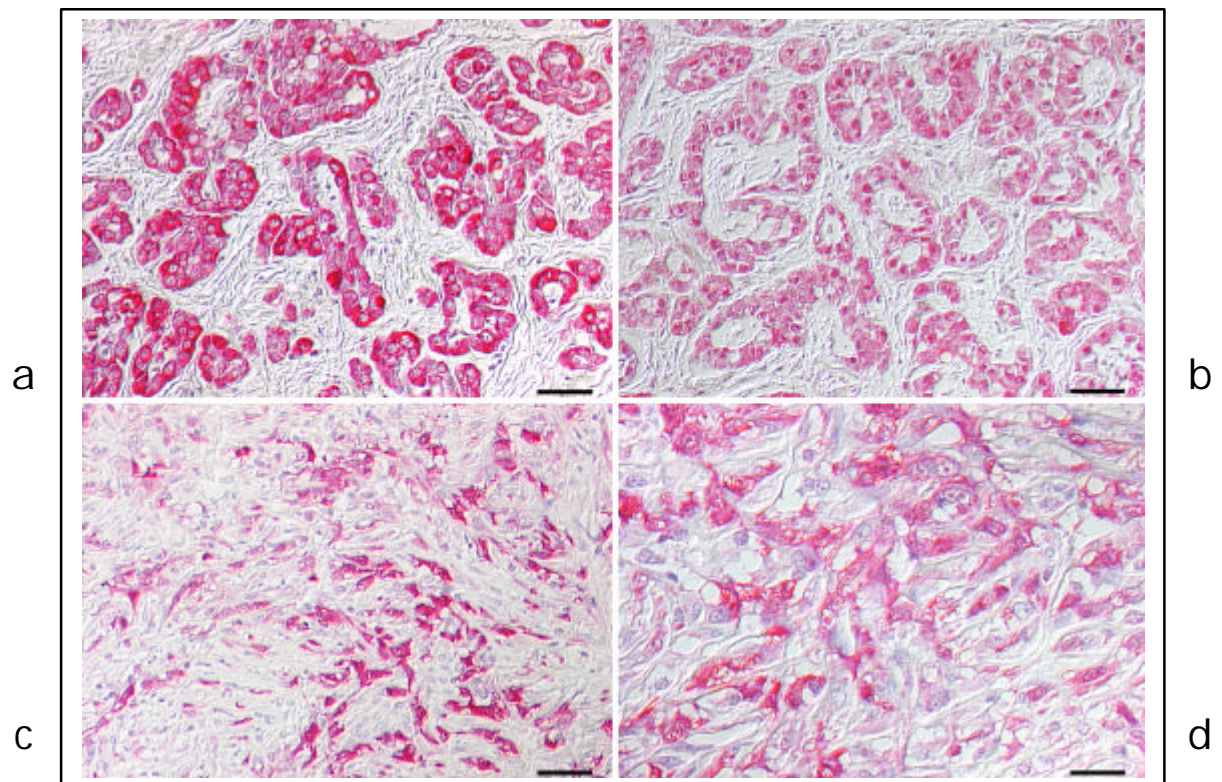


Abbildung 12

Immunhistochemischer Nachweis der Calretinin-Expression in Pleuramesotheliomen.

a & b Epitheloid-adenoid differenziertes Pleuramesotheliom mit fokal betont zytoplasmatischer (a), fokal dann aber betont nukleär und schwach zytoplasmatisch positiver Immunreaktion (b).

c & d Sarkomatoid differenziertes Pleuramesotheliom mit überwiegend positiver Immunreaktion im Zytoplasma der pleomorphen Tumorzellen.

(Maßstab: a - c = 50 µm; d = 25 µm; Antiserum Calretinin_{SWant})

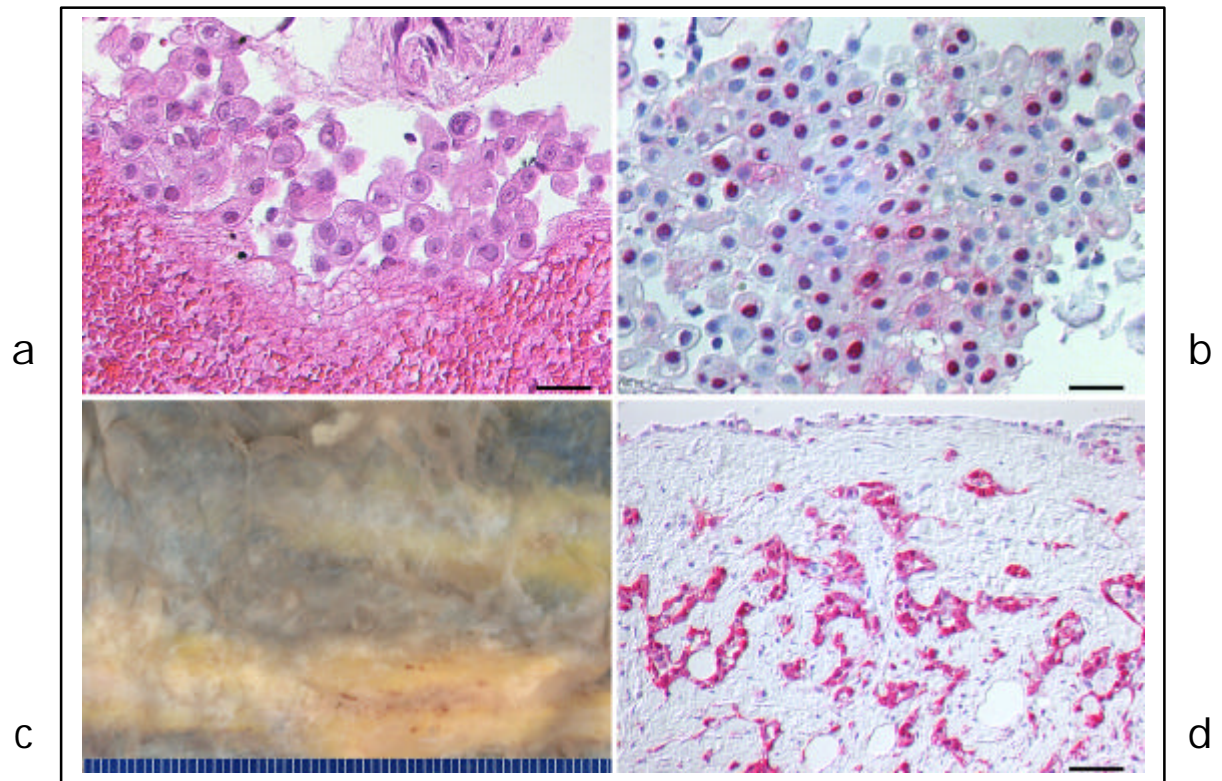


Abbildung 13

Nachweis der Calretinin-Expression mit dem Antiserum Calretinin_{SWant} in verschiedenen Entwicklungsphasen des Pleuramesothelioms eines Patienten.

a & b Atypische Mesothelzellen in einer Pleurabiopsie 3 Monate vor Diagnose-sicherung eines Pleuramesothelioms (a = HE-Färbung). Betont nukleäre Immunreaktion mit dem Antiserum gegen Calretinin (b)(10/1999).

c Pleura visceralis mit frühen Entwicklungsphasen eines Pleuramesothelioms (Makrofoto; 02/2000).

d Invasiv wachsende Tumorteile. Nukleär betonte, teils aber auch zytoplasmatisch positive Immunreaktion (02/2000).

(Maßstab a, b = 25 µm, d = 50 µm)

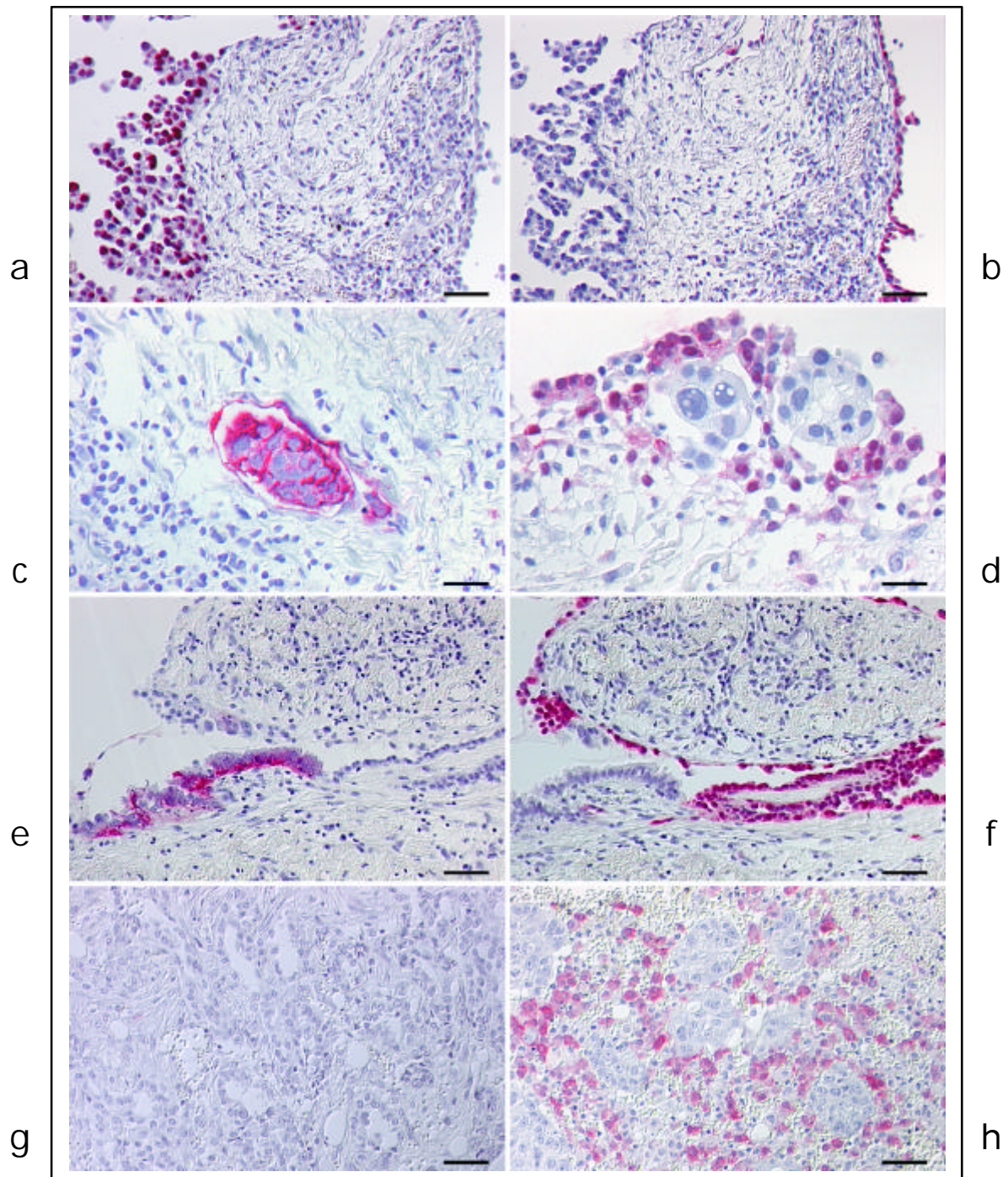


Abbildung 14

Immunhistochemischer Nachweis der Calretinin-Expression bei der Differentialdiagnose primärer und sekundärer Pleuratumoren.

a & b Pleurakarzinose eines primär pulmonalen Adenokarzinoms. Positive Immunreaktion der parapleuralen pulmonalen Tumorzellen bei Einsatz eines Antiköpers gegen das TTF1-Antigen (a). Mit dem Antiserum Calretinin_{SWant} nur positive Reaktion gereizter Mesothelzellen (b).

c - f Pleurakarzinose primärer Adenokarzinome der Ovarien. Positive Immunreaktion der Tumorzellen bei Einsatz eines Antiköpers gegen das CA125- (c) bzw. HEA-Antigen (e). Positive Reaktion gereizter Mesothelzellen bei Einsatz des Antiserums Calretinin_{SWant} (d & f).

(Fortsetzung → nächste Seite)

(Fortsetzung der Legende zu Abbildung 14)

g Pleurakarzinose eines primär pulmonalen Adenokarzinoms. Keine Reaktion der Tumorzellen bei Einsatz des Antiserums Calretinin_{SWant}.

h Pleurakarzinose eines Adenokarzinoms bei unklarem Primärtumor. Positive Immunreaktion gereizter Mesothelzellen bei gleichzeitig negativer Reaktion der Tumorzellen bei Einsatz des Antiserums Calretinin_{SWant}.

(Maßstab: a, b, e - h = 50 µm; c, d = 25 µm)

Plattenepithelkarzinome – Kleinzellige Karzinome

In knapp 20 % der zur Untersuchung gelangten 21 Plattenepithelkarzinome konnten Calretinin-positive Tumorzellen dokumentiert werden. Die Immunreaktion war hier im Vergleich zu den positiven Pleuramesotheliomen und den fokal positiven Adenokarzinomen sehr schwach und ausschließlich zytoplasmatisch ausgeprägt und betraf maximal 10 % der atypischen Zellen. Die positiven plattenepithelial differenzierten Tumoren zeigten eine überwiegend hohe Tumordifferenzierung mit Ansätzen zur Verhornung.

In den untersuchten 13 Pleurakarzinosen von kleinzelligen Lungentumoren konnte eine positive Immunreaktion atypischer Zellen nicht belegt werden. Vergleichbar mit den an der Gruppe der Adenokarzinome erhobenen Befunden zeigte sich auch hier eine positive Immunreaktion im Bereich gereizter Mesothelzellen.

Pleurasarkomatosen

Die untersuchten Präparate von Pleurasarkomatosen zeigten im Bereich des Tumors keine spezifische Immunreaktion bei Einsatz des Antiserums Calretinin_{SWant}.

Zusammenfassend zeigte das polyklonale Antiserum Calretinin_{SWant} bei Diagnose und Abgrenzung bösartiger Pleuramesotheliome zu Pleurakarzinosen primär andernorts lokalisierter bösartiger epithelialer Tumoren und zu Pleurasarkomatosen eine vergleichsweise hohe Sensitivität (0,97) und Spezifität (0,77), die jeweils einen Wert von 1 erreichen, wenn der Anteil der für die Bewertung des Präparates als *positiv* notwendigen Tumorzellen (*cut off*-Wert) auf mindestens 20 % gesetzt wird und die differentialdiagnostische Abgrenzung epitheloider oder biphasischer Pleuramesotheliome zur Diskussion steht. Der prädiktive Wert einer Calretinin-positiven Immunreaktion liegt bei 0,90, der einer negativen Reaktion bei 0,94.

3.2. *p53*-Tumorsuppressorgen

Evaluierung der verfügbaren P53-Antikörper

In einer Voruntersuchung wurde zunächst an Gewebeproben von 10 primären Adenokarzinomen der Lungen die Immunreaktivität aller für die Untersuchungen zur Verfügung stehenden Antikörper und Antiseren gegen P53 getestet [→ Tabelle 6, S. 38]. Die Bewertung der Immunreaktion erfolgte entsprechend dem für Calretinin dargestellten Bewertungsschema [→ S. 43]. Abweichend hiervon wurden mindestens 1.000 Tumorzellen ausgezählt. Außerdem wurde auf den Nachweis einer positiven Immunreaktion in mindestens 5 % der atypischen Zellen (*cut off*-Wert) verzichtet. Die Wahl von Gewebeproben bösartiger Lungentumoren für die Antikörper-Evaluierung erfolgte auf Grund von Untersuchungen zur Akkumulation von P53 in Lungentumoren, bei denen sich verschiedene der zur Evaluierung anstehenden Antikörper und Antiseren als grundsätzlich geeignet für den Nachweis der Akkumulation des Tumorsuppressorgenproduktes erwiesen haben [102]. Die überzeugendste Immunreaktion wurde mit dem polyklonalen Antiserum CM1 und den monoklonalen Antikörpern DO1 und DO7 erzielt. Mit dem polyklonalen Antiserum CM1 zeigten 6 der untersuchten 10 Karzinome eine überzeugend positive, nukleär lokalisierte Immunreaktion. Bei Einsatz der Antikörper DO1 und DO7 konnte eine entsprechende Reaktion in jeweils 5 Karzinomen belegt werden. Mit den monoklonalen Antikörpern Pab 1801 zeigten 2 Karzinome eine positive nukleäre Immunreaktion. Bei Einsatz der Antikörper Pab 240 und Pab 246 konnte eine visuell überzeugende Reaktion in den untersuchten Gewebeproben nicht dokumentiert werden. Alle Karzinome, die bei Einsatz eines der monoklonalen Antikörper eine positive Immunreaktion aufwiesen, reagierten auch mit dem polyklonalen Antiserum CM1 positiv. Die weiteren Untersuchungen wurden daher ausschließlich unter Einsatz des Antiserums CM1 durchgeführt.

Untersuchungsgut

Für die Untersuchungen zur Bedeutung des immunhistochemischen Nachweises von P53 bei der Differentialdiagnose von Pleuramesotheliomen – insbesondere bei der Abgrenzung zu reaktiven Pleuraläsionen und Pleurakarzinosen primär andernorts lokalisierter Tumoren – wurden insgesamt 172 Gewebeproben aus dem Archiv des Deutschen Mesotheliomregisters herangezogen. Es handelte sich um Gewebeproben von

- 64 gesicherten Pleuramesotheliomen aus den Jahren 1993 - 1994 und 1997 - 1998,
- 69 primären pulmonalen Adenokarzinomen aus den Jahren 1997 – 1998 sowie um
- 36 Präparaten mit dem Bild einer reaktiven Pleuritis aus den Jahren 1997 - 1999 ohne Hinweise für das Vorliegen eines bösartigen Tumors.

Die Auswahl der Proben erfolgte rein zufällig auf der Basis der pathologisch-anatomischen Diagnosen. Es handelte sich zu weitgehend gleichen Anteilen sowohl um bioptisch gewonnene Proben als auch um Proben aus dem Operations- und Autopsiegut.

P53-Akkumulation in Pleuramesotheliomen

Insgesamt zeigten 33 (51,6 %) der untersuchten Pleuramesotheliome eine als positiv zu wertende nukleäre Immunreaktion als Hinweis auf eine P53-Akkumulation. Unter Berücksichtigung der führenden Differenzierung zeigte die Gruppe sarkomatoider Pleuramesotheliome einen geringeren Anteil P53-positiver Tumoren als die Gruppen mit führender epitheloider oder biphasischer Differenzierung [→ Tabelle 10].

Tabelle 10

Zusammenstellung der immunhistochemischen Befunde zum Nachweis der P53-Akkumulation in Pleuramesotheliomen.

Führende Differenzierungen	Positiv		Negativ		Gesamt	
	n	%	n	%	N	%
Biphasisch	20	54,1	17	45,9	37	100
Epitheloid	11	55,0	9	45,0	20	100
Sarkomatoid	2	28,6	5	71,4	7	100
Gesamt	33	51,6	31	48,4	64	100

Bei den als positiv gewerteten Mesotheliomen war in vielen Fällen ein nur sehr geringer Anteil nukleär positiver Tumorzellen auffällig. In 45 % der positiven Tumorproben zeigten bei Auswertung von mindestens 1.000 Tumorzellen nur weniger als 1 % der atypischen Zellen eine positive nukleäre Immunreaktion [→ Abbildung 15 a]. Nur in rund 27 % der Proben stellten sich mehr als 10 % der atypischen Zellen positiv dar [→ Tabelle 11]. Die nukleär positiven Tumorzellen waren überwiegend homogen disseminiert in den untersuchten Tumorarealen verteilt [→ Abbildung 15 b]. In Gewebeproben mit einem hohen Anteil P53-positiver Zellen konnten aber auch fokale kohärente, P53-positive Tumorzellverbände dokumentiert werden [→ Abbildung 15 c].

Als auffällig erwies sich außerdem, dass von insgesamt 18 Fällen aus den Jahren 1993 - 1994 nur in einer Tumorprobe ein positiver P53-Befund – hier mit weniger als 1 % positiver atypischer Zellen – dokumentiert werden konnte. Die übrigen 17 Fälle erwiesen sich

in der Immunreaktion mit dem Antiserum CM1 als negativ. In Tumorproben von Pleuramesotheliomen aus den Jahren 1997 - 1999 konnte dagegen – bei 14 P53-negativen Fällen – in 32 Fällen eine P53-Akkumulation belegt werden.

Tabelle 11

Zusammenstellung der immunhistochemischen Befunde zum Nachweis der P53-Akkumulation in P53-positiven Pleuramesotheliomen unter Berücksichtigung des Anteils positiver Tumorzellen.

Führende Differenzierungen	Anteil P53-positiver Tumorzellen						Gesamt	
	< 1 %		1 – 10 %		> 10 %		n	%
	N	%	n	%	n	%		
Biphasisch	9	45,0	6	30,0	5	25,0	20	100
Epitheloid	4	36,4	3	27,2	4	36,4	11	100
Sarkomatoid	1	50	0	0,0	1	50,0	2	100
Gesamt	14	42,4	9	27,3	10	30,3	33	100

P53-Akkumulation in primären pulmonalen Adenokarzinomen

In 29 der untersuchten 69 primären pulmonalen Adenokarzinome konnte immunhistochemisch unter Einsatz des polyklonalen Antiserums CM1 eine überzeugend nukleäre P53-Akkumulation dokumentiert werden [→ Tabelle 12]. In allen Gewebeproben zeigten deutlich mehr als 20 % der atypischen Zellen eine nukleäre Reaktion. Überwiegend war eine positive Immunreaktion in kohärenten Tumorzellverbänden zu belegen [→ Abbildung 15 d].

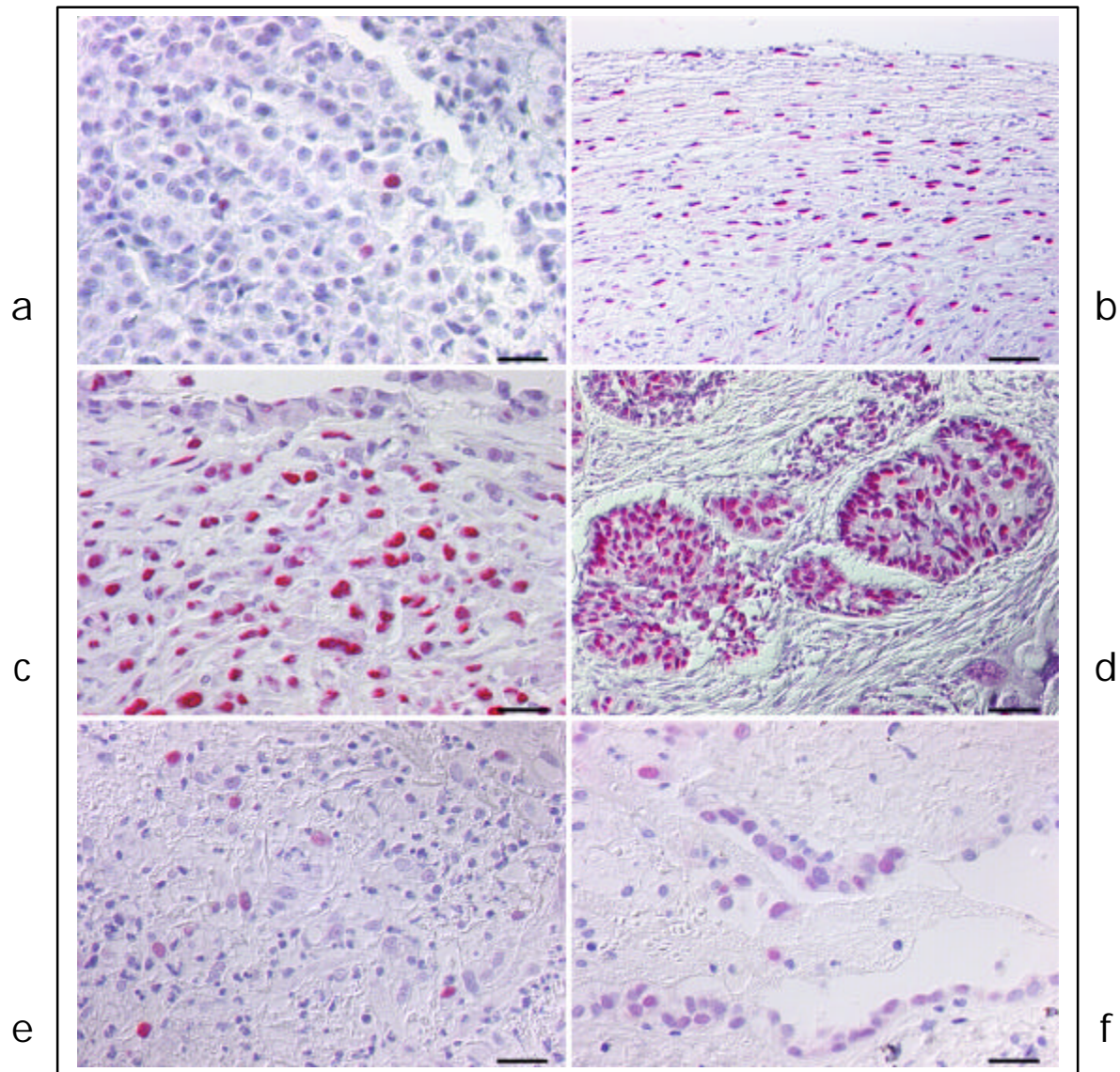


Abbildung 15

Immunhistochemische Darstellung der nukleären P53-Akkumulation in Mesotheliomen (a - c), einem Adenokarzinom (d) und benignen Pleuraläsionen (e & f).

a Epitheloid differenziertes Pleuramesotheliom mit weniger als 1 % P53-positiven Tumorzellen. Homogen disseminierte Verteilung P53-positiver Zellen.

b & c Sarkomatoid und biphasisch differenzierte Pleuramesotheliome mit rund 30 % (b) bis 40 % (c) P53-positiver Tumorzellen. Fokal kohärent positive Tumorzellverbände (c).

d Primär pulmonales Adenokarzinom. Deutlich mehr als 20 % der atypischen Zellen zeigen eine nukleäre P53-Akkumulation. Überwiegend kohärent P53-positive Tumorzellverbände.

e & f P53-Akkumulation in benignen Pleuraläsionen bei Pleuritis. Weniger als 5 % der Mesothelzellen zeigen eine nukleäre Reaktion. Fokal angedeutet perlschnurartig angeordnet schwach positive Zellgruppen (f).

(Maßstab: a, c, e, f = 25 µm; b, d = 50 µm)

P53-Akkumulation in benignen Pleuraläsionen bei unspezifischer Pleuritis

Immunhistochemisch war mit dem polyklonalen Antiserum CM1 eine nukleäre P53-Akkumulation in Mesothelzellen von 16 der untersuchten 36 benignen Pleuraläsionen bei einer Pleuritis zu belegen [→ Tabelle 12]. In allen positiven Proben lag der relative Anteil P53-positiver Mesothelzellen unter 5 %. Die Verteilung positiver Mesothelzellen in den ausgewerteten Gewebsarealen war im Bereich der Pleura weitgehend homogen. In Gewebeproben mit P53-positiven Mesothelzellen im Bereich der gereizten, proliferierenden Serosadeckzellen konnten fokal aber auch Gruppen von perlschnurartig angeordnet positiven Zellgruppen beobachtet werden [→ Abbildung 15 e-f].

Tabelle 12

Zusammenstellung der immunhistochemischen Befunde zum Nachweis der P53-Akkumulation in primären pulmonalen Adenokarzinomen und benignen Pleuraläsionen unter dem Bild einer Pleuritis.

Diagnose	Positiv		Negativ		Gesamt	
	n	%	n	%	n	%
Adenokarzinome	29	42,0	40	58,0	69	100
Pleuritis	16	44,4	20	55,6	36	100

3.3. SV 40-Gensequenznachweis

Mesotheliome

Der Nachweis eines für das *SV 40 TAg*-spezifischen, 105 Bp großen Genfragmentes war in 38 (53 %) der untersuchten 72 Pleuramesotheliome möglich. Signifikante Unterschiede in Bezug auf die phänotypische, lichtmikroskopisch fassbare Differenzierung der untersuchten Tumoren ergaben sich nicht [→ Tabelle 13]. Abbildung 16 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung repräsentativer PCR-Produkte nach Amplifikation von DNA aus den Tumorgebilden (M) und korrespondierenden tumorfreen Gewebsarealen (N) mit spezifischen Primern für ein Fragment des *SV 40 TAg*-Gens (Fälle 1-5).

In 12 Fällen standen neben Anteilen des invasiv wachsenden Tumors auch Gewebeproben von Arealen mit nicht invasiv wachsenden frühen Tumorentwicklungsphasen zur Verfügung. In 4 Proben konnte der *SV 40 TAg*-Sequenznachweis dabei auch in nicht invasiven Tumorabschnitten geführt werden [→ Abbildung 16 (Fall 6)]. Es handelte sich ausschließlich um Präparate bei denen ein entsprechender Nachweis auch in den korrespondierenden invasiv wachsenden Tumoranteilen möglich war.

An 5 zufällig ausgewählten PCR-positiven Proben konnte durch direkte Sequenzierung der PCR-Produkte und Vergleich mit der in der *GenBank* für *SV 40* hinterlegten Sequenz die Spezifität des amplifizierten Fragments bestätigt werden.

Tabelle 13

Zusammenstellung der molekularpathologischen Befunde zur Amplifikation von *SV 40*-Genfragmenten bei Pleuramesotheliomen.

Führende Differenzierung	Positiv		Negativ		Gesamt	
	n	%	n	%	n	%
Biphasisch	19	51	18	49	37	100
Epitheloid	14	56	11	44	25	100
Sarkomatoid	5	50	5	50	10	100
Gesamt	38	53	34	47	72	100

Reaktive Mesothelzellproliferate

An 10 Gewebeproben von Patienten ohne Hinweis auf einen Tumor wurde durch Mikrodissektion DNA aus dem Bereich reaktiver Mesothelzellproliferate isoliert und auf die Präsenz von *SV 40 TAg*-Sequenzen hin untersucht. Ein entsprechender Nachweis in den Regionen der noch als reaktiv zu interpretierenden Mesothelzellproliferate konnte in einer Probe geführt werden [→ Tabelle 14].

Adenokarzinome

In den 10 untersuchten Tumorproben von Pleurakarzinosen primär pulmonal lokalisierter Adenokarzinome war unter Einsatz der PCR der Nachweis von *SV 40 TAg*-Gensequenzen nicht möglich [→ Abbildung 16 (Fälle 7-9)] [→ Tabelle 14].

Kontrollgewebe

Von 10 Patienten mit gesicherten biphasischen Pleuramesotheliomen und positivem *SV 40 TAg*-Nachweis in den Tumoren wurde Kontrollgewebe – entweder Stromazellen oder tumorfreies Lungengewebe – auf eine *SV 40 TAg*-Präsenz hin untersucht. Nur in einem Fall eines ausgedehnten, invasiv wachsenden Mesothelioms war wiederholt nach DNA-Isolation aus einem lichtmikroskopisch tumorfreien Gewebesareal und PCR-Amplifikation gelelektrophoretisch eine als positiv zu wertenden Bande darstellbar [→ Tabelle 14].

Tabelle 14

Zusammenstellung der molekularpathologischen Befunde zur Amplifikation von *SV 40*-Genfragmenten in reaktiven Mesothelzellproliferaten, pulmonalen Adenokarzinomen und Kontrollgeweben.

Diagnose	Positiv	Negativ	Gesamt
Reaktive Mesothelzellproliferate	1	9	10
Pulmonale Adenokarzinome	0	10	10
Kontrollgewebe	1	9	10
Gesamt	2	28	30

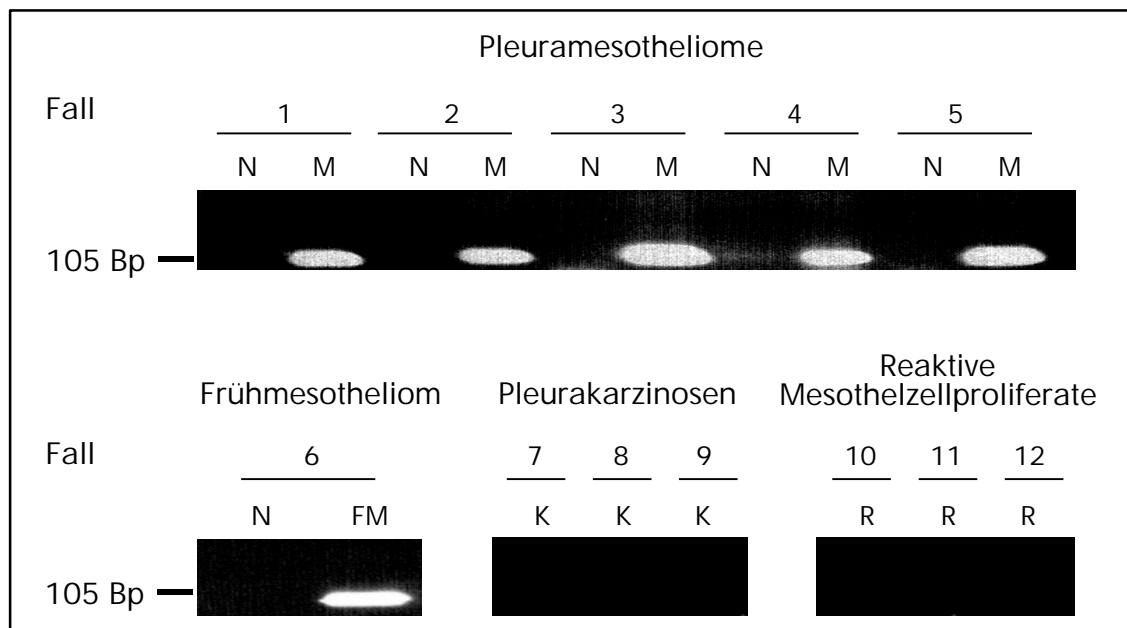


Abbildung 16

Zusammenstellung repräsentativer Gelelektrophoresen zum Nachweis eines spezifischen Genfragmentes für das *SV 40 TAG* in Gewebeproben von invasiven Pleuramesotheliomen (M, Fälle 1-5), von einem Frühmesotheliom (FM, Fall 6), korrespondierendem tumorfreiem Normalgewebe (N, Fälle 1-6), Pleurakarzinosen (K, Fälle 7-9) und reaktiven Mesothelzellproliferaten (R, Fälle 10-12).

3.4. Komparative genomische Hybridisierung

Für die Untersuchungen unter Einsatz der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) wurden Gewebeproben von 7 gesicherten Pleuramesotheliomen mit führender epitheloider Differenzierung herangezogen. Es handelte sich um 2 bioptisch und 5 im Rahmen von Operationen entnommene Gewebeproben bösartiger Tumoren.

Die wesentlichen CGH-Befunde sind in Tabelle 15 zusammenfassend dargestellt.

Das Beispiel eines repräsentativen Summenkaryogramms zeigt Abbildung 17.

Tabelle 15

Zusammenstellung der CGH-Befunde von epitheloiden Pleuramesotheliomen.

Fall	DNA-Verluste		DNA-Zugewinne		Gesamtzahl der Defekte
	Chromosomale Lokalisation	Anzahl	Chromosomale Lokalisation	Anzahl	
1	1p, 3p14-21, 9, 13, 17p, 18q22-qter, 22q	7	8q, 15q11.2-15	2	9
2	14q	1	-	0	1
3	3p14-21, 4, 11q-qter, 14, 17p, 21q11.2-21, 22q	7	1q, 3p24-25, 7	3	10
4	9p	1	-	0	1
5	-	0	-	0	0
6	4q21-27, 6q16-22, 8p, 8q13-22	4	12q23-24.3	1	5
7	1p13-21, 3p14-21, 3q22-26.3, 5q13-34, 8p22-pter, 9p12-21, 14q, 18p, 22q	9	2p11.2-12, 2q, 3q12-13.3, 8p11.2-qter, 15q22-qter	5	14
Durchschnitt		4,1		1,6	5,7

Bei den 7 Pleuramesotheliomen mit führender epitheloider Differenzierung konnten im Mittel mit der Methode der CGH 5,7 chromosomale Anomalien detektiert werden. Die Anzahl der nachweisbaren Anomalien pro Fall variierte zwischen 0 und 14 Defekten.

Die Mehrzahl der nachweisbaren Defekte war durch DNA-Verluste charakterisiert. Im Mittel konnten mit der CGH 4,1 chromosomale Loci mit Hinweisen für einen DNA-Verlust bestimmt werden (Variation 0 - 9 Verluste / Fall).

Chromosomale Loci mit Hinweisen auf DNA-Zugewinne wurden im Mittel mit einer Anzahl von 1,6 / Fall nachgewiesen (Variation 0 - 5 / Fall).

Ein für alle untersuchten epitheloiden Pleuramesotheliome reproduzierbar nachweisbarer Defekt konnte mit der CGH nicht detektiert werden. Wiederkehrend fanden sich aber Verluste von genetischem Material im Bereich der Loci 3p14-21 (3 Fälle), 9(p) (3 Fälle), 22q (3 Fälle) und 14q (2 Fälle).

Für das Vorliegen eines oder mehrerer chromosomaler Abschnitte mit wiederkehrenden DNA-Zugewinnen von verschiedenen Patienten ergaben sich aus den CGH-Untersuchungen keine Hinweise.

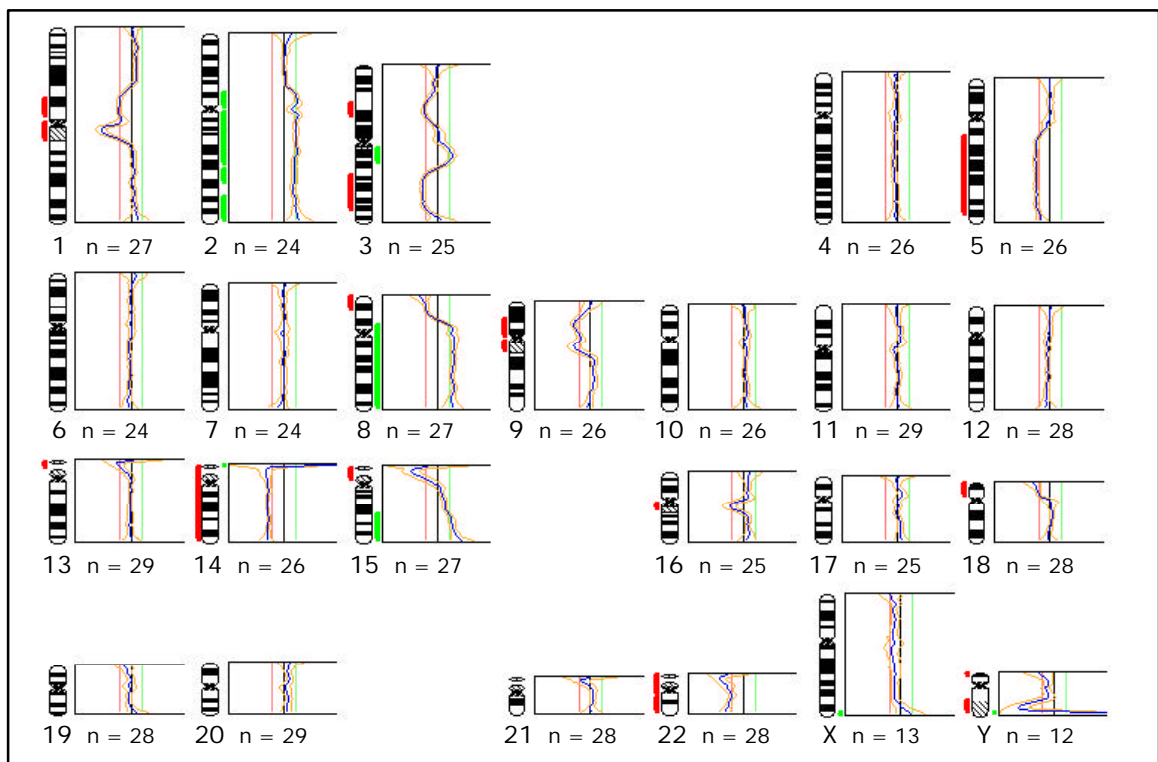


Abbildung 17

CGH-Summenkaryogramm aus 15 Metaphasen eines Pleuramesothelioms mit führender epitheloider Differenzierung.

(Fall 7, → Tabelle 15; n = Anzahl der ausgewerteten Chromosomen)

4. Diskussion

Die differentialdiagnostische Abgrenzung zwischen primären und sekundären bösartigen Pleuratumoren allein nach den histomorphologischen Befunden kann – gerade in kleinen Biopsiepräparaten – schwierig sein. Auch bei Kenntnis ergänzender klinisch-radiologischer Befunde kann im Einzelfall die Abgrenzung von Pleurakarzinosen primärer peripherer Adenokarzinome der Lungen zu epitheloid differenzierten Pleuramesotheliomen problematisch bleiben. Einzelne hochspezifische und hochsensitive licht- oder elektronenmikroskopisch fassbare morphologische, histochemische oder immunhistochemische *Marker* sind für die Differentialdiagnose bislang nicht verfügbar. Auch ergeben sich bislang keine Hinweise für entsprechend spezifische und sensitive sogenannte genetische *Marker* [→ 1.4. Differentialdiagnose maligner Pleuratumoren, S. 29]. Die Differentialdiagnose des Pathologen gründete sich daher bislang neben den histomorphologischen Befunden auf das Ergebnis eines breiten Panels sogenannter immunhistochemischer Marker, die sich als mehr oder weniger spezifisch und sensitiv für Mesotheliome oder Adenokarzinome erwiesen haben [→ Tabelle 7, S. 42].

Die Wertigkeit verschiedener neuer, potentiell relevanter Marker für die differentialdiagnostische Abgrenzung von Pleuramesotheliomen zu Pleurakarzinosen, aber auch gegenüber reaktiven Pleuraläsionen ist Gegenstand der aktuellen Diskussion. Zu den wichtigsten diskutierten Markern gehören Antikörper gegen das Calcium-bindende Protein Calretinin und das Tumorsuppressorgenprodukt P53 sowie molekularpathologische Verfahren zum Nachweis einer *SV 40*-Infektion und zur Bestimmung von Veränderungen im Genom unter Einsatz der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH).

4.1. Calretinin

Calretinin ist ein 29 kDa Protein, das, wie S-100 zur *EF-Hand*-Familie der Calcium-bindenden Proteine gehört [19]. Calretinin wird in neuralen Geweben – vor allem in der Retina und in Neuronen der sensorischen Bahnen – aber auch in bestimmten nicht-neuralen Zellen, wie zum Beispiel Adipozyten, Muskelspindelzellen, Leydig- und Sertoli-Zellen und Mesothelzellen exprimiert (Übersicht → [19]). Die genaue Funktion von Calretinin in nicht-neoplastischen und neoplastischen Geweben ist unbekannt [→ 1.4.1. Calretinin - Funktion, S. 31].

4.1.1. Calretinin und Mesotheliome

Die 1996 von der Schweizer Arbeitsgruppe um CELIO und GOTZOS publizierte Befunde, die auf eine hohe Spezifität und Sensitivität von Calretinin bei der Differentialdiagnose primärer und sekundärer Pleuratumoren hindeuten, sind bis heute Gegenstand einer intensiv geführten Diskussion verschiedener Arbeitsgruppen um die Wertigkeit dieses Markers [4, 29, 37, 37, 53, 75-78, 86, 86].

Evaluierung der verfügbaren Calretinin-Antikörper

Untersuchungen von ORDÓNEZ deuteten bereits 1998 auf eine unterschiedliche Sensitivität kommerziell erhältlicher Antiseren gegen Calretinin bei der Differentialdiagnose von Mesotheliomen hin [77]. Von den untersuchten 38 Mesotheliomen zeigten alle Tumoren eine positive Immunreaktion bei Einsatz eines polyklonalen Antiserums der Fa. Zymed. Mit einem Antiserum der Fa. Chemicon reagierten dagegen nur 28 (74 %) der untersuchten Mesotheliome positiv. Auch bei der Auswertung weiterer publizierter Daten zur Immunreaktion von Calretinin ist auffällig, dass von Arbeitsgruppen, die Calretinin als wenig geeigneten Marker für die Differentialdiagnose von Mesotheliomen beschrieben, in der Regel das von der Fa. Chemicon vertriebene polyklonale Antiserum eingesetzt wurde.

In einer Voruntersuchung wurde daher zunächst an Gewebeproben von 45 gesicherten Mesotheliomen und 10 gesicherten Pleurakarzinosen die Immunreaktivität verschiedener kommerziell verfügbarer Antikörper und Antiseren gegen Calretinin getestet [→ Tabelle 5, S. 36]. Die dabei erhobenen Befunde zeigten klar die ungleiche Sensitivität verschiedener getesteter Antiseren [→ Abbildung 11, S. 45]. Die im Vergleich überzeugendsten Befunde wurden mit dem polyklonalen Antiserum und monoklonalen Antikörper der Fa. SWant (Calretinin_{SWant} und Calretinin_{SWant 2}) und dem polyklonalen Antiserum der Fa. Zymed (Calretinin_{Zymed}) erhoben. Rund 90 % der untersuchten Pleuramesotheliome zeigten hier eine überzeugend positive Immunreaktion.

Das polyklonale Antiserum der Fa. Chemicon (Calretinin_{Chem}) erwies sich auf Grund einer unspezifischen Hintergrundfärbung und einer geringen Sensitivität, der monoklonale Antikörper der Fa. Chemicon auf Grund einer im Vergleich zu den Antiseren der Fa. SWant und Zymed geringen Sensitivität als weniger geeignet. In Bezug auf die Spezifität bei der Abgrenzung zu Adenokarzinomen zeigten die untersuchten Antiseren und der Antikörper – soweit an den untersuchten Fallzahlen zu beurteilen – keine nennenswerten Unterschiede.

Durch diese Untersuchungen zur Evaluierung verschiedener kommerziell erhältlicher Antiseren und Antikörper gegen Calretinin wird damit – auch unter Berücksichtigung der von ver-

schiedenen Arbeitsgruppen publizierten Methoden – klar belegt, dass sich die kritisch geführte Diskussion um die Wertigkeit von Calretinin bei der Differentialdiagnose pleural lokalisierter Tumoren „nur“ auf den Einsatz verschiedener Antisera und Antikörper gründet.

4.1.2. Calretinin in primären und sekundären Pleuratumoren

Unter Kosten-Nutzen-Aspekten – das Antiserum Calretinin_{ZyMed} musste im Vergleich zum Antiserum Calretinin_{SWant} in 40fach höherer Konzentration eingesetzt werden – wurden die weiteren Untersuchungen an einer großen Fallzahl von insgesamt 1005 primären und sekundären Pleuratumoren mit dem Antiserum Calretinin_{SWant} durchgeführt.

Pleuratumoren mit epitheloider Differenzierung

Für epitheloide Pleuramesotheliome erreichte das Antiserum Calretinin_{SWant} eine Sensitivität von 0,96 und bei der Abgrenzung gegenüber Pleurakarzinomen primär andernorts lokalisierter Tumoren eine Spezifität von 0,93. Für biphasische Pleuramesotheliome wurde eine Sensitivität von 0,95 und eine entsprechende Spezifität von 0,94 erzielt. Diese Daten bestätigten grundsätzlich die von einzelnen Arbeitsgruppen an kleineren Kollektiven erhobenen Befunde einer hohen Sensitivität und Spezifität des Markers Calretinin für die Differentialdiagnose von pleural lokalisierten Tumoren.

Eine positive Calretinin-Immunreaktion in Anteilen von Adenokarzinomen wurde – unabhängig von der Art der eingesetzten Antikörper – in einem Anteil von nur 5 - 10 % der untersuchten Tumoren auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Verschiedentlich wurde auf eine eher zytoplasmatisch als nukleär betonte Calretinin-Immunreaktion in Adenokarzinomen hingewiesen [27]. Diese Befunde konnten am eigenen umfangreichen Untersuchungsgut nicht bestätigt werden. In Calretinin-positiven Adenokarzinomen wurde in der Regel nur ein geringer Prozentsatz (< 10 %) positiver Tumorzellen beobachtet, der nach eigenen Befunden nur in enger räumlicher Beziehung zu Tumornekrosen und Entzündungsreaktionen zu beobachten ist. Bei der lichtmikroskopischen Auswertung entsprechender Präparate muss aber besonders berücksichtigt werden, dass auch gereizte Mesothelzellen – insbesondere in enger räumlicher Beziehung zu Tumorzellen von Pleurakarzinomen – eine überzeugend positive Calretinin-Immunreaktion zeigen, die von der positiven Immunreaktion neoplastischer Zellen differenziert werden muss [→ Abbildung 14, S. 50].

Im Gegensatz zu Pleurakarzinomen von Adenokarzinomen zeigten Absiedlungen primär andernorts lokalisierter Plattenepithelkarzinome im Bereich der Pleura in knapp 20 % der

untersuchten Gewebeproben Calretinin-positive Tumorzellen. Die Immunreaktion war im Vergleich zu Pleuramesotheliomen und Adenokarzinomen aber sehr schwach und ausschließlich zytoplasmatisch ausgeprägt. Auch hier waren maximal nur 10 % der atypischen Zellen, vorwiegend höher differenzierter, teils verhornender Zellen Calretinin-positiv. Der Aspekt Calretinin-positiver Karzinome mit plattenepithelialer Differenzierung ist bislang von anderen Arbeitsgruppen kaum untersucht worden. ORDÓNEZ bezog 1998 im Rahmen seiner Untersuchungen zur Wertigkeit der Calretinin-Immunreaktion für die Differenzierung von epitheloiden Mesotheliomen und pulmonalen Adenokarzinomen auch 28 primär pulmonal lokalisierte Plattenepithelkarzinome mit in die Studie ein [77]. Rund 40 % der Karzinome zeigten dabei eine positive Calretinin-Reaktion. Eine detaillierte morphologische Charakterisierung der positiven Befunde wurde aber leider nicht publiziert. Für eine weitergehende Bewertung ist hier die Bearbeitung größerer Fallzahlen plattenepithelialer Karzinome mit unterschiedlicher primärer Lokalisation notwendig.

Zusammenfassend ist die Calretinin-Immunreaktion – bei Verwendung geeigneter Antikörper – für die Differentialdiagnose von primären und sekundären malignen Pleuratumoren mit epitheloider Differenzierung ein sehr sensitiver und spezifischer immunhistochemischer Marker. Für keinen anderen, an einem größeren Kollektiv untersuchten immunhistochemischen Marker wird eine vergleichbar hohe Sensitivität und Spezifität beschrieben [13]. Der bei der Differentialdiagnose im Einzelfall zu berücksichtigende geringe prozentuale Anteil positiver Adeno- und Plattenepithelkarzinome stellt an repräsentativen Gewebeproben, die im Rahmen von Operationen oder Autopsien gewonnen wurden, in der Regel kein Problem dar. Hier ist meist eine ausreichend hohe Zahl an Tumorzellen zu beurteilen. Mesotheliome mit vorwiegend epitheloider Differenzierung zeigen nach den hier erhobenen Befunden dabei in der Regel im Gegensatz zu Pleurakarzinosen primär andernorts lokalisierter, epitheloid differenzierter Tumoren einen Anteil von mindestens 20 % – meist aber mehr als 50 % – positiver Tumorzellen. Besonders an kleineren Biopsien sollte aber die Calretinin-Immunreaktion um ein Panel weiterer bewährter Antikörper ergänzt werden [→ Tabelle 7, S. 42].

Pleuratumoren mit sarkomatoider Differenzierung

Für sarkomatoide Pleuramesotheliome erreicht das Antiserum Calretinin_{swant} nur eine Sensitivität von 0,38, für die Abgrenzung zu seltenen Pleurasarkomatosen primär extrapleuraler Sarkome aber eine Spezifität von 1. Die eingeschränkte Bedeutung für die Differentialdiagnose sarkomatoid differenzierter Neoplasien im Bereich der Pleura wird grundsätzlich auch durch publizierte Befunde anderer Arbeitsgruppen bestätigt. Da rein sarkomatoid differenzierte Pleuramesotheliome selten sind, liegen den bisher publizierten Befunden in der

Regel nur geringe Fallzahlen zu Grunde. Von ATTANOOOS et al. wurde ein Kollektiv von 31 sarkomatoiden Mesotheliomen publiziert [2]. Nur 12 (39 %) der Tumoren zeigten dabei eine fokal positive Calretinin-Immunreaktion. Im Gegensatz dazu wies keine der untersuchten spindelzelligen Neoplasien ohne Hinweise auf einen primären Ausgangspunkt im Bereich der serösen Häute eine immunhistochemisch nachweisbare Calretinin-Expression auf.

Zusammenfassend ist die Calretinin-Immunreaktion für die Differentialdiagnose von primären und sekundären Pleuratumoren mit sarkomatoider Differenzierung nach den hier erhobenen Befunden durchaus ein sehr spezifischer immunhistochemischer Marker, der bei positivem Reaktionsausfall die sichere Abgrenzung zu Pleurasarkomatosen erlaubt. Auf Grund der geringen Sensitivität muss aber die Calretinin-Immunreaktion um ein Panel weiterer bewährter Antikörper ergänzt werden. Neben histomorphologischen Kriterien (Übersicht → [22]) sowie dem positiven Nachweis der Expression von Zytokeratinen und Vimentin in den Tumorzellen ist dabei besonders der fehlende Nachweis der Expression von Aktin, Desmin, Myogenin, CD 99 und S-100 richtungsweisend für die Diagnose eines sarkomatoiden Mesothelioms [→ Tabelle 7, S. 42]. Keiner dieser Antikörper erreicht aber für Pleurasarkomatosen eine dem Calretinin für Mesotheliome vergleichbare hohe Sensitivität und Spezifität.

4.2. *p53*-Tumorsuppressorgen

Mutationen des auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p13) lokalisierten Tumorsuppressorgens *p53* gehören heute zu den am häufigsten dokumentierten genetischen Alterationen in humanen Tumoren [57, 79]. Im Vergleich zu anderen Organtumoren liegen nur wenige Befunde zur Funktion von P53 bei der Realisation und Progression von Mesotheliomen vor. COTE et al. berichteten schon Anfang der neunziger Jahre über den Nachweis von heterozygoten Deletionen im Bereich des *p53*-Locus auf Chromosom 17 in Mesotheliomzelllinien [26]. In weiteren Untersuchungen konnte das gehäufte Auftreten heterozygoter Deletionen im *p53*-Locus in humanen Mesotheliomen und korrespondierenden Zelllinien dagegen nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zu humanen Mesotheliomen finden sich bei murinen Mesotheliomen in rund 75 % der untersuchten Tumoren entsprechende Deletionen [25, 52].

Die von anderen Autoren publizierten Angaben über die relative Häufigkeit des immunhistochemischen Nachweises von P53 in humanen Mesotheliomen schwanken zwischen rund 25 und 70 % [43, 58, 85, 89]. Bei nahezu allen bislang untersuchten Organtumoren wird die immunhistochemisch fassbare P53-Expression als Folge einer *p53*-Mutation gewertet. Ur-

sächlich für die Möglichkeit des immunhistochemischen Nachweises ist in der Regel nicht eine Überexpression, sondern eine Stabilisierung des mutierten Genproduktes über die Erhöhung der Proteinhalbwertszeit von wenigen Minuten auf mehrere Stunden. In Mesotheliomen können *p53*-Mutationen – auch bei immunhistochemisch positiven Tumoren – nur in wenigen Fällen detektiert werden [61, 64]. Der immunhistochemische P53-Nachweis in Mesotheliomen – bei gleichzeitigem Fehlen von Mutationen als Ursache für die Akkumulation des Tumorsuppressorgenprodukts – macht daher das Vorhandensein anderer für die P53-Stabilisierung verantwortlicher Mechanismen wahrscheinlich.

Evaluierung der verfügbaren P53-Antikörper

Für die hier durchgeführten Untersuchungen zum immunhistochemischen P53-Nachweis in Mesotheliomen wurde zunächst eine Evaluierung verfügbarer Antikörper und Antiseren gegen P53 vorgenommen. Die Evaluierung war aus verschiedenen Gründen notwendig:

- Kommerziell ist ein großes Spektrum gegen P53-Epitope gerichtete Antikörper und Antiseren erhältlich.
- Systematische Untersuchungen zur Wertigkeit verschiedener Antikörper und Antiseren gegen P53 sind kaum publiziert.
- Aus eigenen Untersuchungen zur P53-Akkumulation in bösartigen Lungentumoren war bekannt, dass verschiedene der kommerziell verfügbaren Antikörper auffällige qualitative und quantitative Unterschiede in Bezug auf die Darstellung des P53-Proteins in Tumoren zeigen können [→ 4.1.1. Evaluierung der verfügbaren Calretinin-Antikörper, S. 63] [102].

Vor diesem Hintergrund wurde ein breites Spektrum kommerziell erhältlicher Antikörper gegen verschiedene Epitope des Tumorsuppressorproteins getestet [→ Tabelle 6, S. 38]. Die Untersuchungen wurden an primären bösartigen nichtkleinzelligen Lungentumoren vorgenommen, da hier bei 40 - 60 % der untersuchten Tumoren ein positiver Reaktionsausfall zu erwarten ist. Mit allen getesteten Antikörpern kann nicht zwischen der mutierten und der wildtyp Form des Tumorsuppressorproteins unterschieden werden.

Als Ergebnis der Evaluierung wurden die Untersuchungen zum immunhistochemischen P53-Nachweis in Mesotheliomen mit dem polyklonalen, gegen rekombinantes humanes P53 gerichteten Kaninchenantiserum CM1 vorgenommen [62]. Das Antiserum CM1 wurde bereits bei zahlreichen internationalen Studien zum Nachweis der P53-Akkumulation in verschiedenen Organtumoren erfolgreich eingesetzt und überzeugt auch auf Grund der möglichen hohen Verdünnung von 1 : 2.500 unter Kosten-Nutzen-Aspekten [→ Tabelle 6, S. 38].

P53-Akkumulation in Mesotheliomen

Nach orientierender Begutachtung von immunhistochemisch gefärbten Präparaten der 64 zur Untersuchung gelangten Pleuramesotheliome war in zahlreichen Fällen ein nur sehr geringer Prozentsatz P53-positiver Tumorzellen auffällig. Aus diesem Grund wurde – im Gegensatz zur Auswertung der mit Calretinin gefärbten Präparate – auf die Festsetzung einer minimalen Zahl positiver Tumorzellen (*cut off*-Wert) für die Bewertung als *positives Präparat* verzichtet.

Insgesamt war in 33 (51,6 %) der untersuchten 64 Pleuramesotheliome eine als positiv zu wertende nukleäre Immunreaktion als Hinweis auf eine P53-Akkumulation zu dokumentieren. Der relative Anteil positiver sarkomatoider Pleuramesotheliome war mit rund 29 % geringer als der Anteil von rund 50 % in den Gruppen mit führender epitheloider und biphasischer Differenzierung [→ Tabelle 10, S. 53]. Eine grundsätzlich zu diskutierende signifikante Korrelation zwischen der P53-Akkumulation und der führenden Differenzierung kann hieraus nicht abgeleitet werden, da die untersuchte Fallzahl in der Gruppe sarkomatoider Mesotheliome relativ gering war. Außerdem zeigten die untersuchten Pleuramesotheliome mit biphasischer Differenzierung ein annähernd gleiches P53-Immunreaktionsmuster in epitheloiden und sarkomatoiden Tumoranteilen.

Der nahezu vollständig negative Reaktionsausfall – auch bei Einsatz Antigen-demaskierender Techniken – in Gewebeproben, die in den Jahren 1993 - 1994 fixiert und archiviert wurden, muss primär als (Fixierungs-) Artefakt interpretiert werden. Entsprechende Artefakte sind grundsätzlich bei retrospektiv angelegten immunhistochemischen und molekulargenetischen Untersuchungen zu berücksichtigen.

Auffällig und in dieser Form bislang nicht für eine P53-Akkumulation in anderen Organtumoren beschrieben ist ein vergleichsweise hoher Anteil von Mesotheliomen mit einem niedrigen relativen Anteil P53-positiver Tumorzellen. In rund 73 % der untersuchten Mesotheliome zeigten maximal 10 %, in rund 45 % der Proben nur weniger als 1 % der Tumorzellen eine nukleäre Immunreaktion.

Ursachen der P53-Akkumulation

Als Ursachen für immunhistochemisch detektierbare P53-Akkumulationen sind drei grundsätzliche Mechanismen zu berücksichtigen:

- Mutationen des *p53*-Gens mit konsekutiver erhöhter Halbwertszeit des mutierten Proteins.
- Physiologische P53-Akkumulationen als Folge einer DNA-Schädigung (z. B. durch Strahlung, Asbest).

- Interaktionen von P53 mit anderen (stabilisierenden) Proteinen (z. B. *SV 40 TAg*).

Grundsätzlich sind alle drei Mechanismen als Ursache für die immunhistochemisch nachweisbare P53-Akkumulation bei Pleuramesotheliomen einzeln oder in Kombination vorstellbar. Gegen das Vorliegen von *p53*-Mutationen bei der überwiegenden Zahl der Mesotheliome spricht die fehlende Möglichkeit des Nachweises entsprechender genetischer Alterationen in den für andere Organtumoren mutationstypischen Exons 5 - 8 des Gens mit Standardmethoden. Theoretisch denkbar ist, dass – bei nur geringem Anteil P53-positiver Zellen in zahlreichen Mesotheliomen – dennoch disseminiert vorliegende Mutationen mit Standardverfahren nicht detektierbar sind. Andererseits ist es unter Berücksichtigung unserer heutigen Kenntnis von der Tumorbiologie unwahrscheinlich, dass speziell bei Mesotheliomen – in anderen Organtumoren wird ein entsprechendes Reaktionsmuster nicht beobachtet – disseminiert unabhängige Mutationsereignisse im *p53*-Tumorsuppressorgen auftreten.

Eine *lokale* DNA-Schädigung einzelner disseminierter Tumorzellen – z. B. als Folge einer Asbestfeinstaubeinwirkung – erscheint ursächlich unwahrscheinlich, da in autonom wachsendem Tumorgewebe in der Regel Asbestfasern oder Asbestkörper nicht nachgewiesen werden können. Als Folge der erhöhten Proliferationsaktivität der Tumorzellen und einer damit notwendigen erhöhten DNA-Syntheseaktivität, steigt dagegen aber auch die Zahl der Fehlsynthese-bedingten Mutationen in diesen Zellen an. Dabei notwendig werdende DNA-Reparationsmechanismen können physiologisch mit einem P53-vermittelten Zellzyklusstop und einer immunhistochemisch nachweisbaren P53-Akkumulation verbunden sein. Vergleichbare Prozesse und dann daraus resultierende entsprechende P53-Immunreaktionsmuster wären grundsätzlich aber auch für andere Organtumoren zu diskutieren.

Als wesentliche Ursache für die nachweisbare P53-Akkumulation in nur einem geringen Prozentsatz der Mesotheliomzellen muss aber auch eine Interaktion von P53 mit anderen stabilisierenden Proteinen diskutiert werden. Als mögliche Kandidatenproteine sind (a) das MDM2-Protein und (b) das *SV 40 TAg* zu berücksichtigen. Eine erhöhte MDM2-Expression wird in etwa 30 % der untersuchten Mesotheliome beobachtet [98]. Die erhöhte Expression ist nicht auf einzelne Tumorzellen beschränkt, sondern betrifft in der Regel kohärent positive Tumorzellverbände. Vor diesem Hintergrund ist auch eine erhöhte MDM2-Expression als Ursache für ein disseminiert positives P53-Immunreaktionsmuster in Mesotheliomen unwahrscheinlich.

Auf Grund des möglichen Nachweises von Gensequenzen des *SV 40 TAg* in rund 50 % der untersuchten Pleuramesotheliome muss eine Interaktion zwischen dem exprimierten

SV 40 TAg und P53 als wahrscheinliche Ursache für die immunhistochemisch fassbare P53-Akkumulation diskutiert werden. Grundsätzlich ist eine Interaktion von *SV 40 TAg* und P53 bei Mesotheliomen belegt [17]. Auf Grund des disseminiert positiven Immunreaktionsmusters muss dabei aber auch eine disseminiert vorliegende *SV 40 TAg*-Expression in Tumorzellen unterstellt werden. Da Paraffin-gängige Antikörper gegen *SV 40 TAg* nicht kommerziell erhältlich sind, konnten entsprechende immunhistochemische Untersuchungen an den verfügbaren, nahezu ausschließlich in Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben nicht durchgeführt werden. Publierte Befunde zur *SV 40 TAg*-Expression in Cryomaterial von Pleuramesotheliomen stützen die Hypothese einer disseminierten *SV 40 TAg* nur bedingt. Während von TESTA et al. ein eher disseminiert positives *SV 40 TAg*-Immunreaktionsmuster beschrieben wurde [95], berichten CARBONE et al. über ein eher homogen positives Immunreaktionsmuster in kohärenten Tumorzellen [16]. Unklar ist, ob das von CARBONE et al. in Mikrofotogrammen dargestellte Muster charakteristisch für die untersuchten Fälle war oder lediglich auf Grund der eindrucksvoll kohärenten positiven Reaktion abgebildet wurde. Da in gut einem Drittel der hier untersuchten Pleuramesotheliome ein Anteil von mehr als 10 % P53-positiver, teils auch kohärenter Tumorzellen belegt werden konnte, sind die Befunde zur P53-Akkumulation in Mesotheliomen durchaus mit P53-*SV 40 TAg*-Interaktion erklärbar. Ein Abgleich der erhobenen Befunde zum immunhistochemischen Nachweis der P53-Akkumulation und zum Nachweis von *SV 40 TAg*-Genfragmenten zeigte für die untersuchten Proben keine klare Korrelation. Es wurden sowohl P53-positive Tumoren mit negativem *SV 40*-Status als auch P53-negative Tumoren mit positivem *SV 40*-Status nachgewiesen. Auszuschließen ist dabei nicht, dass grundsätzlich auch Interaktionen mit anderen, bislang nicht charakterisierten Proteinen oder im Einzelfall eine *p53*-Mutation für die P53-Akkumulation ursächlich sind.

P53-Akkumulation in Adenokarzinomen

Der in 42 % der untersuchten 69 primären pulmonalen Adenokarzinomen geführte Nachweis einer nukleären P53-Akkumulation deckt sich gut mit in der Literatur publizierten Daten (Übersicht → [101]). In allen positiven Gewebeproben zeigten deutlich mehr als 20 %, oftmals mehr als 50 % der atypischen Zellen eine positive Immunreaktion, in der Regel in kohärent positiven Tumorzellverbänden. Unter Berücksichtigung einer überzeugend belegten hohen *p53*-Mutationsrate in den Exons 5 - 8 des Gens muss als wichtigster Kausalfaktor für die nachweisbare P53-Akkumulation eine stabilisierende Genmutation unterstellt werden. Eine entsprechende Annahme wird für die überwiegende Zahl der untersuchten Fälle durch ver-

gleichend erhobene immunhistochemische und molekularbiologische Befunde bestätigt (Übersicht → [71, 101]).

P53-Akkumulation in benignen Pleuraläsionen bei unspezifischer Pleuritis

Immunhistochemisch war eine nukleäre P53-Akkumulation in Mesothelzellen von rund 44 % der untersuchten 36 benignen Pleuraläsionen bei einer Pleuritis zu belegen [→ Tabelle 12, S. 56; Abbildung 15 e & f, S. 55]. In allen positiven Proben lag der relative Anteil P53-positiver Mesothelzellen unter 5 %. Die Verteilung positiver Mesothelzellen in den ausgewerteten Gewebsarealen war im Bereich der Pleura weitgehend homogen. Als Ursache für die immunhistochemisch nachweisbare P53-Akkumulation sind grundsätzlich die auch bei Mesotheliomen diskutierten Mechanismen zu prüfen [→ S. 68]. Da entsprechende genetische Alterationen und *SV 40 TAG*-Sequenzen in reaktiven, benignen Pleuraläsionen nicht in dieser Frequenz nachgewiesen werden konnten, muss – neben einer möglichen *SV 40*-Infektion – die P53-Akkumulation als Folge eines im weitesten Sinne als *physiologische Tumorsuppressorfunktion* zu bezeichnenden Mechanismus diskutiert werden. Als Folge einer erhöhten Proliferationsaktivität gereizter Mesothelzellen und einer damit notwendigen erhöhten DNA-Syntheseaktivität steigt – vergleichbar der Situation in Tumorzellen – auch in diesen Zellen die Zahl der durch Fehlsynthesen bedingten Mutationen. Dabei notwendig werdende DNA-Reparationsmechanismen können – vergleichbar dem für Mesotheliome diskutierten Mechanismus – physiologisch mit einem P53-vermittelten Zellzyklusstop verbunden sein.

P53 zur Differentialdiagnose pleuraler Tumoren und benigner Läsionen

Zusammenfassend muss unter Berücksichtigung der erhobenen Befunde die Frage, ob dem immunhistochemischen Nachweis der P53-Akkumulation bei der Differentialdiagnose von Pleuramesotheliomen – insbesondere bei der Abgrenzung zu reaktiven Pleuraläsionen und Pleurakarzinosen primär andernorts lokalisierter Tumoren – eine wesentliche Bedeutung zukommt, differenziert beantwortet werden. Die Tatsache, dass eine P53-Akkumulation grundsätzlich in Pleuramesotheliomen, pulmonalen Adenokarzinomen und in benignen Pleuraläsionen nachgewiesen werden kann, macht den Nachweis zunächst zu einem besonders an kleinen Biopsien – in jeder Hinsicht nur wenig geeigneten *Marker*. Dennoch kann im Einzelfall die immunhistochemische *Zusatzuntersuchung* an repräsentativen Gewebeproben auf Grund des Immunreaktionsmusters – bei besonderer Berücksichtigung des relativen Anteils positiver Zellen – einen ergänzenden Beitrag bei der Differentialdiagnose benigner und maligner Pleuraläsionen liefern. So muss bei einem Anteil von mehr als 5 % nukleär positiver

Zellen nach den hier erhobenen Befunden das Vorliegen einer malignen Läsion unterstellt werden. Im Gegensatz dazu kann in Fällen mit einem Anteil von weniger 5 % nukleär positiver Zellen nicht zwangsläufig auf eine benigne Läsion rückgeschlossen werden.

4.3. SV 40-Gensequenznachweis

Unter Einsatz der PCR konnte in 53 % der untersuchten 72 Pleuramesotheliome der Nachweis eines für das SV 40 TAg spezifischen, 105 Bp großen Genfragmentes geführt werden. An 1 von 10 Gewebeproben der Patienten mit dem Bild reaktiver Mesothelzellproliferate konnte ebenfalls ein entsprechendes Genfragment nachgewiesen werden. In 10 Tumorproben von Pleurakarzinosen primär pulmonal lokalisierter Adenokarzinome war unter Einsatz der PCR dagegen der Nachweis entsprechender Gensequenzen nicht möglich. Nur in einer Kontrollproben des tumorfreien Lungengewebes von insgesamt 10 untersuchten Patienten mit gesicherten biphasischen Pleuramesotheliomen und positivem SV 40 TAg-Nachweis im Tumor wurde mit der PCR ein SV 40 TAg spezifisches Genfragment nachgewiesen. Der positive Nachweis in dieser Probe ist aber – auch unter Berücksichtigung der weiteren erhobenen und von anderen Arbeitsgruppen publizierten Befunde – trotz Reproduzierbarkeit des Befundes als Kontamination der lichtmikroskopisch tumorfreien Probe mit einzelnen Tumorzellen zu werten. Unter Berücksichtigung der an reaktiven Mesothelzellproliferaten erhobenen Befunden ist auch eine „Kontamination“ der Probe mit Mesothelzellproliferaten zu diskutieren.

Berichte über den Nachweis von SV 40 TAg-spezifischen Genfragmenten in Gewebeproben humaner Mesotheliome liegen seit 1994 vor [16]. Von einzelnen Arbeitsgruppen konnte die zuerst von CARBONE et al. publizierten Befunde grundsätzlich bestätigt werden (Übersicht → [15, 18]). Andere Arbeitsgruppen erhoben aber teils widersprüchliche Befunde:

- GALATEUA-SALLE et al. (1998) konnten zwar grundsätzlich in rund 48 % der untersuchten Mesotheliome SV 40 TAg-spezifische Genfragmente nachweisen, detektierten aber auch in rund 29 % der untersuchten bösartigen Lungentumoren entsprechende Gensequenzen [34].
- MULATERO et al. (1999) fanden in keiner der von Ihnen untersuchten 17 Gewebeproben von Mesotheliomen Hinweise auf eine virale SV 40-Infektion [65].
- HIRVONEN et al. (1999) und EMRI et al. (2000) konnten in keiner der untersuchten 49 Mesotheliome aus Finnland bzw. 29 Proben aus der Türkei SV 40 TAg-spezifische Genfragmente nachweisen. Die Autoren interpretierten die *negativen* Befunde als Ergebnis der nicht SV 40-kontaminierten Polioimpfstoffe in den 50er und 60er Jahren in den jeweiligen Ländern [32, 39].
- STRICKLER et al. (1996) konnten ebenfalls in keiner der von Ihnen untersuchten 50 Mesotheliome SV 40 TAg-spezifische Genfragmente nachweisen [92].

SV 40 als Humankanzerogen?

Vor dem Hintergrund der grundsätzlichen, auch politischen und versicherungsrechtlichen Problematik und Relevanz einer möglichen Initiation humaner Tumoren als Folge einer SV 40-Infektion wurde Anfang 1997 im Rahmen eines vom *National Institute of Health (NIH)*, der *Food and Drug Administration (FDA)* und dem *Center for Disease Control (CDC)* in Bethesda, Maryland, organisierten internationalen Expertentreffens ein Forderungskatalog für einen Beweis dieser Hypothese aufgestellt [18]. Danach sollten vor einer abschließenden Entscheidung darüber, ob SV 40-Infektionen beim Menschen für die Entwicklung bestimmter Tumortypen als Kanzerogen zu werten sind, folgende Voraussetzungen wissenschaftlich untersucht werden:

- (1) Reproduzierbarer Nachweis SV 40 TAg-spezifischer Genfragmente in humanen Tumoren durch verschiedene Institute in von unabhängigen und angesehenen Organisationen durchgeführten Blindstudien.
- (2) Spezifischer Nachweis von SV 40 TAg-Genfragmenten in Tumorzellen bei gleichzeitigem Fehlen in Stromazellen mit nicht-immunhistochemischen Methoden.
- (3) Nachweis einer gegenüber anderen Organtumoren vergleichsweise erhöhten SV 40-Infektionsrate in Mesotheliomen – und ggf. auch Osteosarkomen und Ependydomen – als eindeutigen Hinweis für den Kausalzusammenhang zwischen der SV 40-Infektion und der Entwicklung dieser Tumoren.

Die Forderungen (1) und (3) sind durch zahlreiche seit 1997 von verschiedenen internationalen Arbeitsgruppen publizierten Befunde weitgehend erfüllt. Eine von der *International Mesothelioma Interest Group (IMIG)* organisierte Blindstudie, an der 4 unabhängige Institute teilnahmen, konnte überzeugend reproduzierbar – an allerdings nur kleinen Fallzahlen – in 10 der 12 untersuchten Mesotheliome den Nachweis von SV 40 TAg sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene belegen [95].

Die grundsätzliche Möglichkeit des Nachweises SV 40 TAg-spezifischer Genfragmente in über 50 % der untersuchten Pleuramesotheliome wird auch durch die von uns durchgeführten Untersuchungen überzeugend bestätigt.

Auch der von verschiedenen Autoren in etwa 15 - 20 % der untersuchten Proben beschriebene Nachweis SV 40 TAg-spezifischer Genfragmente in reaktiven Mesothelzellproliferaten wird durch die eigenen Untersuchungen bestätigt [16, 34]. Hinweise auf die von GALATEUA-SALLE et al. 1998 beschriebene Präsenz SV 40 TAg-spezifischer Genfragmente in bösartigen

Lungentumoren konnten dagegen – in Übereinstimmung mit anderen Autoren – von uns nicht bestätigt werden [15, 34].

Ungeklärt war bislang die Frage des spezifischen Nachweises von *SV 40 TAg*-Genfragmenten in Tumorzellen bei gleichzeitigem Fehlen in korrespondierenden Stromazellen mit nicht-immunhistochemischen Methoden. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von A. F. GAZDAR wurden daher im Rahmen der eigenen Untersuchungen Mikrodissektionen an entsprechenden Gewebeproben durchgeführt. Dabei konnte der spezifische Nachweis von *SV 40 TAg*-Genfragmenten in Mesotheliomzellen bei gleichzeitigem Fehlen in korrespondierenden Stromazellen und im tumorfreien Lungengewebe erstmals überzeugend belegt werden [90, 91].

Kontaminationen

Wiederholt diskutierte *SV 40*-Laborkontaminationen als Ursachen für den Nachweis von *SV 40 TAg*-Genfragmenten in Mesotheliomen werden durch diese Befunde überzeugend widerlegt. Auch eine in der Literatur diskutierte Kontamination von Funktionsräumen in Kliniken, in denen Proben von Mesotheliomen gewonnen wurden, wird durch die Untersuchungen nicht bestätigt. Würde man eine entsprechende Kontamination unterstellen, so wäre ein positiver Reaktionsausfall in Mesotheliomen, Lungentumoren und tumorfreien Geweben in etwa gleichen Anteilen zu erwarten. Die für die Untersuchungen herangezogenen Proben aus dem Archiv des Deutschen Mesotheliomregisters stammen außerdem nicht nur aus einer Klinik, sondern wurden dem Archiv teilweise von Pathologen aus verschiedenen Instituten und von verschiedenen Kliniken übersandt.

Frühmesotheliome

Von besonderer Bedeutung ist auch der in den vorliegenden Untersuchungen erstmals geführte Nachweis von *SV 40 TAg*-Genfragmenten in nicht invasiven, frühen Tumorentwicklungsphasen, entsprechend sogenannten Frühmesotheliomen. Die pathologisch-anatomische Diagnose eines Frühmesothelioms in einer kleineren Biopsie kann das Vorliegen eines bei dem Patienten andernorts im Bereich der Pleura bereits invasiv wachsenden Mesothelioms nicht ausschließen. Der gleichzeitig mögliche Nachweis von *SV 40 TAg*-Genfragmenten in Mesothelzellen bei benignen Pleuraläsionen deutet aber auf eine *SV 40*-Infektion vor der malignen Transformation der Mesothelzellen hin. *SV 40*-positive Personengruppen müssten mithin ein höheres Risiko für die Entstehung von Mesotheliomen aufweisen. Hierfür ergeben sich bislang aus den wenigen verfügbaren epidemiologischen Daten zu diesem Themenkomplex keine sicheren Hinweise [93]. Es muss diskutiert werden, dass mögli-

cherweise eine für die klinische Tumormanifestation notwendige Latenzzeit bislang noch nicht erreicht wurde. Außerdem fehlen bislang international kombinierte epidemiologische, pathologisch-anatomische, staubanalytische und molekulargenetische Studien, die einen möglichen Zusammenhang für Mesotheliome systematisch untersucht haben.

Kausale Pathogenese der *SV 40*-induzierten Kanzerogenese

Die Mechanismen zur kausalen Pathogenese der möglichen durch eine *SV 40*-Infektion induzierten Kanzerogenese – speziell für Mesotheliome – beim Menschen sind im Detail ungeklärt. Der zu unterstellende (ko-)kausale Basismechanismus für die Tumorentwicklung als Folge einer *SV 40*-Infektion beim Menschen verläuft über eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenprodukten (P53 , RB) durch Bindung des *SV 40 TAg* an diese Proteine [→ 4.2. *p53*-Tumorsuppressorgen, S. 66].

Unklar ist, ob *SV 40* beim Menschen allein als Kanzerogen wirken kann oder ob das Virus als Kokanzerogen wirkt. Der bedeutendste Kausalfaktor für die Entstehung von Mesotheliomen beim Menschen stellt eine meist beruflich bedingte erhöhte Asbestfeinstaubexposition dar. Nach den im Deutschen Mesotheliomregister erhobenen Befunden ergeben sich in mehr als 90 % der gesicherten Mesotheliome durch Angaben der Patienten, Lungenstaubanalysen oder gezielte Ermittlungen der für die versicherungsmedizinischen Verfahren zuständigen Unfallversicherungsträger Hinweise auf eine stattgehabte vergleichsweise erhöhte Asbestfeinstaubexposition. Größere Kollektive nicht gegenüber Asbestfeinstaub exponierter Personen mit Mesotheliomen stehen damit für molekularpathologische Befunden kaum zur Verfügung. Aus den wenigen zu dieser Fragestellung vorliegenden molekularpathologischen Untersuchungen ergaben sich bislang keine sicheren Hinweise, die einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *SV 40 TAg*-Genfragmenten in Mesotheliomen und einer Asbestfeinstaubbelastung *in vivo* überzeugend unterstützten oder widerlegten. In den 50er und 60er Jahren mit kontaminierten Polioimpfstoffen in ihrer Kindheit oder Jugend behandelte Personen kommen allerdings erst jetzt in ein Alter, bei dem man – eine erhöhte Asbestfeinstaubexposition in den 70er Jahren sowie eine mittlere Latenzzeit von rund 30 Jahren unterstellt – die klinische Manifestation von Pleuramesotheliomen erwarten kann.

In vitro Befunde

Befunde aus *in vitro* Untersuchungen stützen die Hypothese von *SV 40* als Kokausalfaktor für die Tumorentstehung nach erhöhter Asbestfeinstaubbelastung: BOCCHETTA et al. konnten zeigen, dass die Infektion mesothelialer Zellen durch *SV 40* beim Menschen wahrscheinlich nicht auf der Basis einer für den Menschen zunächst postulierten semipermissiven Infek-

tion und Replikation abläuft [9]. Bei einem semipermissiven Vorgang infiziert *SV 40* zwar alle Zellen, eine Expression des *SV 40 TAg* – und eine damit verbundene Lyse oder Transformation – wird aber nur in einer kleinen Zellfraktion beobachtet. Mesothelzellen werden nach den Befunden von BOCCHETTA et al. im Gegensatz zu anderen humanen Zelltypen uniform infiziert, exprimieren uniform *SV 40 TAg*, werden aber nicht uniform lysiert. Bei den so *SV 40*-infizierten Mesothelzellen wird *in vitro* eine sehr hohe Transformationsrate beobachtet, die durch zusätzliche Exposition der Zellen mit Asbest (Krokydolith) weiter erhöht wird. Dieser Mechanismus steht wahrscheinlich mit der Bindung des *SV 40 TAg* an P53 in Zusammenhang. Eine Transformation kultivierter humaner Fibroblasten konnte dagegen allein durch die Infektion mit *SV 40* kaum erreicht werden. Auch die alleinige *in vitro* Exposition gegenüber Asbest führte nicht zu einer nennenswerten Transformation dieser Zellen. Bei Kombination von *SV 40*-Infektion und von Asbestexposition wurde dagegen eine deutlich erhöhte Transformationsrate auch in Fibroblastenkulturen registriert.

Zusammenfassend geben die *in vivo* an humanen Gewebeproben erhobenen Befunde – auch unter Berücksichtigung der von anderen Arbeitsgruppen publizierten Daten – Hinweise auf eine kausale oder kokausale Bedeutung von *SV 40*-Infektionen für die Realisation von Mesotheliomen beim Menschen. Die *in vitro* Befunde stützen die Hypothese einer kokausalen Wirkung von *SV 40*-Infektion und Asbestfeinstaubexposition beim Menschen. Gezielte epidemiologische, pathologisch-anatomische, staubanalytische und molekulargenetische Studien werden aber erst in den kommenden Jahren die Bedeutung einer *SV 40*-Infektion beim Menschen für die Entwicklung von Mesotheliomen klären können.

SV 40-Nachweis bei der Differentialdiagnose pleuraler Tumoren

Auf Grund der erhobenen Befunde ist der Nachweis von *SV 40 TAg*-Genfragmenten für die Differentialdiagnose von reaktiven Mesothelzellproliferaten und Pleuramesotheliomen im Einzelfall derzeit nur von akademischer Bedeutung. Bei der Differentialdiagnose von Pleuramesotheliomen und Pleurakarzinosen primär pulmonaler Karzinome kann der positive Nachweis von *SV 40 TAg*-Genfragmenten aber im Einzelfall für die Diagnose richtungsweisend sein. Voraussetzung ist in jedem Fall eine saubere Mikrodissektion der zu untersuchenden Tumorzellen von umgebenden Stromazellen und besonders von reaktiven Mesothelzellproliferaten. Da *SV 40 TAg*-Genfragmente *nur* in rund 50 - 60 % der Mesotheliome nachweisbar sind, erreicht das aufwendige Verfahren (Mikrodissektion, DNA-Isolation, PCR) eine im Vergleich zu immunhistochemischen Untersuchungen mit einem Antikörperpanel – bei vergleichbar guter Spezifität – eine deutlich geringere Sensitivität [→ 4.1. Calretinin, S. 62].

4.4. Komparative genomische Hybridisierung

Karyotypisierungen durch herkömmliche zytogenetische Methoden deuteten bereits vor der Verfügbarkeit der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) auf einige klonale chromosomale Anomalien bei malignen Mesotheliomen hin. In der Mehrzahl der untersuchten Mesotheliome konnten mit den traditionellen Methoden der Zytogenetik – auch unter Einsatz herkömmlicher molekulargenetischer Verfahren – mehr als 10 klonale chromosomale Anomalien nachgewiesen werden [94]. Chromosomale Deletionen wurden in Mesotheliomen wiederholt auf den kurzen Armen der Chromosomen 1, 3 und 9 sowie dem langen Arm von Chromosom 6 beschrieben. Als häufigste genetische Alteration wurde bei Mesotheliomen aber der Verlust einer Kopie des kompletten Chromosoms 22 beschrieben. Diese genetischen Alterationen gelten bei Mesotheliomen als sogenannte *hot spots*, also als Alterationen, die wiederholt und gehäuft bei einer Tumorentität nachweisbar sind. In der Literatur finden sich weiter Hinweise auf nicht zufällige, zytogenetisch fassbare Alterationen auf den Chromosomen 4, 6, 14, 15, 18 und 19 sowie Trisomien und Polysomien der Chromosomen 1, 5, 7, 11, 12 und 20. Die meisten der angeführten Alterationen werden in Kombination untereinander beobachtet, wobei in etwa 25 % der untersuchten Mesotheliome nahezu alle der aufgeführten Alterationen nachweisbar sind [66]. Entsprechend der auch für andere Tumoren postulierten und auch überzeugend belegten Hypothese eines *multi step*-Prozesses – also der Akkumulation verschiedener genetischer Alterationen als obligate Voraussetzung für die Tumorealisation – muss auf Grund der Vielzahl der zytogenetisch fassbaren genetischen Alterationen grundsätzlich auch für Mesotheliome ein entsprechendes Modell unterstellt werden.

Offen ist die Frage der Aufdeckung eines für Mesotheliome charakteristischen, und dann auch für die Differentialdiagnose verwendbaren Defektmusters.

Gegenüber herkömmlichen zytogenetischen Verfahren bietet die Methode der CGH die Möglichkeit einer wesentlich detaillierteren chromosomalen Lokalisation der detektierten Anomalien. Die Möglichkeit der topografischen Zuordnung chromosomaler Anomalien kann bedingt die Übertragung der betroffenen Loci zu bekannten Genen erlauben. Gleichzeitig wird durch die genauere Untersuchung der Loci auch die Möglichkeit zur Charakterisierung eines für Mesotheliome möglicherweise reproduzierbar nachweisbaren und „spezifischen“ Defektmusters eröffnet.

Bei den hier zur Untersuchung gelangten 7 Pleuramesotheliomen mit führender epitheloider Differenzierung konnten im Mittel mit der Methode der CGH 5,7 chromosomale Anomalien

detektiert werden. Die Anzahl der nachweisbaren Anomalien pro Fall variierte zwischen 0 und 14 Defekten. Diese Werte liegen im Rahmen der auch mit herkömmlichen zytogenetischen Verfahren nachweisbaren chromosomalen Anomalien.

Entsprechend den bisher publizierten zytogenetischen Befunden war die Mehrzahl der nachweisbaren Defekte durch DNA-Verluste charakterisiert. Im Mittel konnten mit der CGH 4,1 chromosomale Loci mit Hinweisen für einen DNA-Verlust bestimmt werden (Variation 0 - 9 Verluste / Fall). Chromosomale Loci mit Hinweisen auf DNA-Zugewinne wurden im Mittel mit einer Anzahl von 1,6 / Fall nachgewiesen (Variation 0 - 5 / Fall).

Isolierte oder kombinierte, für alle untersuchten epitheloiden Pleuramesotheliome reproduzierbar nachweisbare Defektmuster konnte mit der CGH nicht detektiert werden. Wiederkehrend fanden sich aber Verluste von genetischem Material im Bereich der Loci 3p14-21 (3 Fälle), 9(p) (3 Fälle), 22q (3 Fälle) und 14q (2 Fälle). Wiederkehrende DNA-Zugewinne im Bereich eines oder mehrerer chromosomaler Abschnitte in Tumoren verschiedener Patienten konnten durch die CGH-Untersuchungen nicht nachgewiesen werden.

Grundsätzlich stehen die hier mit der CGH mit Deletionen charakterisierten Loci in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur publizierten, mit herkömmlichen zytogenetischen Methoden erhobenen Befunde. Vergleicht man die hier erhobenen CGH-Befunde mit den wenigen bislang publizierten, an Mesotheliomen erhobenen CGH-Daten, so zeigt sich auch hier eine im weitesten Sinne grundsätzliche Kongruenz [→ Tabelle 16].

Aus den bislang publizierten CGH-Befunden an Mesotheliomen ergeben sich bisher keine Hinweise für die Festlegung wiederkehrender charakteristischer Defektmuster zu Gruppen von Mesotheliomen mit epitheloider, biphasischer oder sarkomatoider Differenzierung. Durch die Beschränkung der eigenen Untersuchungen auf Mesotheliome mit führender epitheloider Differenzierung ist daher prinzipiell eine Vergleichbarkeit der Befunde mit publizierten Daten gegeben.

Vier der in Tabelle 16 zusammengestellten Veröffentlichungen von KIVIPENSAS et al., BJÖRQVIST et al. und KNUUTILA et al. stammen aus dem Finnischen Haartmann-Institut für Medizinische Genetik in Helsinki. Die von den einzelnen Autoren publizierten CGH-Befunde zeigen in Bezug auf die Defektmuster nur eine teilweise Übereinstimmung. Dennoch muss bei der Interpretation der finnischen Befunde die Möglichkeit der Bearbeitung von Gewebeproben aus den gleichen Tumoren durch die verschiedenen Autoren grundsätzlich berücksichtigt werden.

Tabelle 16

Vergleich publizierter und eigener CGH-Befunde für maligne Mesotheliome.

Autoren	DNA-Verluste	DNA-Zugewinne
Kivipensas et al. (1996) [44]	1p, 8p, 14q, 22q	(15q)
Björkqvist et al. (1997) [7]	4q, 6q, 9p, 13, 14q, 22q	1q
Björkqvist et al. (1998) [8]	4q, 6q, 14q	7p, 15q
Knuutila et al. (1998) [46]	1q, 6q, 6p, 13q, 14q	-
Balsara et al. (1999) [3]	1p12-22, 13q12, 14q24-ter, 22q; LOH 15q11.11-15	5p
Krismann (2001) [48]	1p, (4p), 4q, 9p, 13q, 14q, 22q	(15q)
Eigene Befunde	3p14-21, 9(p), 14q, 22q	-

Interessant ist in diesem Zusammenhang der Ansatz von KNUUTILA et al. [46], gepoolte DNA von verschiedenen Tumoren einer Entität zu verwenden, um so nur charakteristische wiederkehrende Defekte nachzuweisen. Auch die unabhängig von der finnischen Arbeitsgruppe von BALSARA et al. [3] publizierten Befunde sind grundsätzlich mit anderen publizierten Daten kongruent. Eine Ausnahme bildet hier lediglich der Nachweis chromosomaler Deletionen im Bereich des langen Arms von Chromosom 15 (15q11.11-15). Sowohl die finnische Arbeitsgruppen als auch KRISMANN konnten in diesem Bereich DNA-Zugewinne nachweisen [→ Tabelle 16] [8, 44, 48]. Die im Rahmen der eigenen Untersuchungen erhobenen CGH-Befunde haben weder Hinweise auf einen DNA-Verlust noch auf einen DNA-Zugewinn im Bereich des Chromosoms 15 erbracht. Die in den eigenen Untersuchungen wiederkehrend an verschiedenen epitheloiden Mesotheliomen nachgewiesenen DNA-Verluste auf den Chromosomen 9(p), 14q und 22q lassen sich gut bei den publizierten CGH-Befunden einordnen. Auffällig und nur bedingt Literatur-kongruent ist der an 3 der untersuchten 7 Fälle detektierte Verlust auf Chromosom 3p14-21, der in dieser Häufung bislang nicht beschrieben wurde.

CGH Befunde bei nichtkleinzelligen bösartigen Lungentumoren

Vergleicht man die an Mesotheliomen erhobenen CGH-Defektmuster mit den an primären bösartigen nichtkleinzelligen Lungentumoren, speziell mit führender adenoider Differenzierung erhobenen Befunde, so kann unter dem Aspekt der Differentialdiagnose ein für beide Tumortypen spezifisch divergentes Defektmuster nicht herausgestellt werden [→ Tabelle 17]. Nichtkleinzellige bösartige Lungentumoren zeigen reproduzierbar DNA-Verluste auf den

chromosomalen Loci 1p, 3p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 13q, 18q und 21q und DNA-Zugewinne auf den Loci 5p, 8q, 11q13, 16p, 17q und 19q [80]. Vor dem Hintergrund der großen bereits lichtmikroskopisch phänotypisch fassbaren Heterogenität nichtkleinzelliger bösartiger Lungentumoren – mehr als 50 % dieser Karzinome weisen mehr als eine histomorphologische Differenzierung auf [97] – ist eine weitere Differenzierung der Befunde für Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome nur bedingt sinnvoll. Differenziert man die Befunde aber dennoch nach den führenden histomorphologischen Subtypen, so zeigen Adenokarzinome gehäuft Verluste auf den Chromosomen 3q, 9q, 10p und 19 und Zugewinne auf dem langen Arm von Chromosom 1. Primäre pulmonale Karzinome mit führender plattenepithelialer Differenzierung werden dagegen durch DNA-Verluste auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 und Zugewinne auf den Chromosomen 3q und 12p charakterisiert [→ Tabelle 17] [80].

Bereits der orientierende Vergleich der in den Tabellen 16 und 17 zusammengefassten Befunde verdeutlicht, dass hochspezifische und sensitive, für die Differentialdiagnose von Mesotheliomen und Pleurakarzinosen z. B. primärer bösartiger nichtkleinzelliger Lungentumoren anwendbare Defektmuster nicht festzulegen sind. Die untersuchten Mesotheliome zeigen im Vergleich zu den nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen DNA-Verluste im Bereich von Chromosom 14q und 22(q) und einen Zugewinn im Bereich 15q. Unter Berücksichtigung der hier erhobenen und publizierten Befunde eröffnet die CGH damit aber doch prinzipiell die Möglichkeit zur Aufdeckung wiederkehrender chromosomaler Defekte bei Mesotheliomen.

Tabelle 17

Zusammenstellung von CGH-Befunden bei Mesotheliomen [→ Tabelle 16] und primären bösartigen Lungentumoren [8, 80].

Tumor	DNA-Verluste	DNA-Zugewinne
Mesotheliome	1p(q), 3p, 4q, 6q, 8p, 9p, 13(q), 14q, 22(q)	1q, 5p, 7p, 15q
Nichtkleinzellige Lungenkarzinome	1p, 3p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 13q, 18q und 21q	5p, 6p, 7p, 8q, 11q13, 16p, 17q und 19q
Adenokarzinome	3q, 9q, 10p und 19	1(q)
Plattenepithelkarzinome	2	3q und 12p

Diese Defekte können bei Mesotheliomen im Bereich dieser Loci aber nur mit vergleichsweise relativ niedriger Frequenz nachgewiesen werden. Defekte an diesen Loci sind zudem mit der CGH als grundsätzlich reproduzierbar auch in Tumoren anderer Organe und deren Metastasen beschrieben [45]. Deshalb ist zz. die Methode der CGH im individuellen Einzelfall eine für die Differentialdiagnose pleural lokalisierter Tumoren wenig geeignete Methode.

Für reaktive Pleuraläsionen mit dem Bild einer Pleuritis ergeben sich bislang keine Hinweise für das Vorliegen chromosomaler, mit der CGH fassbarer Anomalien. KRISMANN et al. konnten mit der Methode der CGH allerdings in 5 (42 %) der untersuchten 12 benignen solitären fibrösen Pleuratumoren chromosomale Anomalien nachweisen [49]. Auch für die Differentialdiagnose benignen und malignen pleuraler Prozesse ist die CGH – als sehr aufwendige Methode – damit im Einzelfall eine nur bedingt geeignete Methode.

5. Schlussfolgerungen

Die Differentialdiagnose bösartiger, pleural lokalisierter Tumoren allein nach den histomorphologischen Befunden kann – gerade in kleinen Biopsiepräparaten – auch bei Kenntnis ergänzender klinisch-radiologischer Befunde im Einzelfall auch für den erfahrenen Pathologen problematisch sein. Zahlreiche Forschungsansätze haben sich daher in den zurückliegenden Jahren mit der Entwicklung morphologischer, histochemischer, immunhistochemischer und genetischer *Marker* befasst. Ein einzelner hochspezifischer und sensitiver, im internationalen Expertengremium akzeptierter Marker konnte bislang nicht überzeugend erarbeitet werden.

Auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Marker weisen in Bezug auf die Differentialdiagnose pleural lokalisierter Tumoren unterschiedliche Sensitivitäten und Spezifitäten auf.

- Die Calretinin-Immunreaktion stellt für die Differentialdiagnose von primären und sekundären Pleuratumoren mit epitheloider Differenzierung einen sehr sensitiven und spezifischen Marker dar. Für keinen anderen, an einem größeren Kollektiv untersuchten Marker konnte eine vergleichbar hohe Sensitivität und Spezifität belegt werden. Für sarkomatoide Pleuramesotheliome erreicht Calretinin – bei hoher Spezifität für die Abgrenzung gegenüber Pleurasarkomatosen – aber eine deutlich niedrigere Sensitivität. Hier muss die Calretinin-Immunreaktion, die bei der pathologisch-anatomischen Begutachtung von Gewebeproben unter der Fragestellung eines Pleuramesothelioms in jedem Fall durchgeführt werden sollte, um ein Panel weiterer bewährter Antikörper ergänzt werden.
- Die Wertigkeit des immunhistochemischen Nachweises einer Akkumulation des P53-Tumorsuppressorgenprodukts muss unter Berücksichtigung der erhobenen Befunde bei der Abgrenzung zu reaktiven Pleuraläsionen und Pleurakarzinosen primär andernorts lokalisierter Tumoren differenziert bewertet werden. Da P53 grundsätzlich in Pleuramesotheliomen, pulmonalen Adenokarzinomen und benignen Pleuraläsionen nachgewiesen werden kann, ist die P53-Akkumulation ein für die Differentialdiagnose wenig geeigneter Marker. Im Einzelfall können immunhistochemische *Zusatz*untersuchungen auf Grund des Immunreaktionsmusters aber einen ergänzenden Beitrag bei der Differentialdiagnose benignen und malignen Pleuraläsionen liefern.
- Der Nachweis von *SV 40 TAG*-Genfragmenten kann bei der Differentialdiagnose von Pleuramesotheliomen und Pleurakarzinosen primär pulmonaler Karzinome im Einzel-

fall für die Diagnose richtungsweisend sein. Für die Differentialdiagnose von reaktiven Mesothelzellproliferaten und Pleuramesotheliomen erlangt der Nachweis im Einzelfall nur akademische, aber keine diagnostische Bedeutung. Da *SV 40 TAG*-Genfragmente *nur* in rund 50 - 60 % der Mesotheliome nachweisbar sind, erreicht das aufwendige Verfahren eine im Vergleich zu immunhistochemischen Untersuchungen mit einem Antikörperpanel – bei vergleichbar guter Spezifität – eine deutlich geringere Sensitivität. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob *SV 40* bei der Realisation von Pleuramesotheliomen neben dem Asbest die Bedeutung eines wesentlichen (Ko-)Kausalfaktors zukommt. Dies kann für versicherungsmedizinische Fragen von großer Bedeutung sein.

- Das mit der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) aufgezeigte heterogene genetische Defektmuster ist gut vereinbar mit einer auch pathologisch-anatomisch fassbaren großen Heterogenität der Mesotheliome. Die mit der Methode der CGH nachweisbaren chromosomalen Defekte sind für Mesotheliome aber wenig spezifisch und auch nur bedingt sensitiv. Im individuellen Einzelfall stellt die CGH eine für die Differentialdiagnose pleural lokalisierter Tumoren wenig geeignete Methode dar. Auch für die Differentialdiagnose benignen und malignen pleuraler Prozesse ist die CGH – als sehr aufwendige Methode – im Einzelfall nur bedingt geeignet.

Zusammenfassend hat sich im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen der immunhistochemische Nachweis der Calretinin-Expression als Marker mit höchster Sensitivität und Spezifität erwiesen. Bei der pathologisch-anatomischen Begutachtung von Gewebeproben unter der Fragestellung eines Pleuramesothelioms sollte die Calretinin-Immunreaktion daher unbedingt durchgeführt werden. Letztendlich stellt für die Differentialdiagnose pleural lokalisierter Tumoren aber die Erfahrung des Untersuchers das entscheidende Kriterium bei der Auswahl geeigneter Zusatzuntersuchungen und bei der abschließenden diagnostischen Bewertung aller verfügbaren histomorphologischen, histochemischen, immunhistochemischen, staubanalytischen und letztendlich auch klinisch-radiologischen Befunde dar.

6. Zusammenfassung

Die Differentialdiagnose bösartiger, pleural lokalisierter Tumoren allein nach den histomorphologischen Befunden kann im Einzelfall auch für den erfahrenen Pathologen problematisch sein. Ein hochspezifischer und sensitiver Marker für die Diagnose bösartiger Pleuramesotheliome steht bislang nicht zur Verfügung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Wertigkeit wichtiger, derzeit als potentiell relevant diskutierter Marker für die differentialdiagnostische Abgrenzung von Pleuramesotheliomen zu reaktiven Pleuraläsionen einerseits und sekundären bösartigen Pleuratumoren andererseits untersucht. Im einzelnen wurden immunhistochemische Untersuchungen zur Expression des Calciumbindenden Proteins Calretinin und zur Akkumulation des Tumorsuppressorgenprodukts P53 sowie molekularpathologische Untersuchungen zum Nachweis einer *SV 40*-Infektion und zur Bestimmung von Veränderungen im Genom unter Einsatz der komparativen genomischen Hybridisierung an Gewebeproben von Pleuramesotheliomen, sekundären Pleuratumoren und reaktiven Pleuraläsionen durchgeführt. Die untersuchten Marker wiesen dabei in Bezug auf ihre Wertigkeit bei der Differentialdiagnose pleural lokalisierter Tumoren unterschiedliche, teilweise nur bedingt geeignete Sensitivitäten und Spezifitäten auf.

- Die Calretinin-Immunreaktion stellt für die Differentialdiagnose von primären und sekundären Pleuratumoren mit epitheloider Differenzierung einen sehr sensitiven und spezifischen Marker dar. Für keinen anderen, an einem größeren Kollektiv untersuchten Marker konnte eine vergleichbar hohe Sensitivität und Spezifität belegt werden. Für sarkomatoide Pleuramesotheliome erreicht Calretinin – bei hoher Spezifität für die Abgrenzung gegenüber Pleurasarkomatosen – aber eine niedrigere Sensitivität. Hier muss die Calretinin-Immunreaktion um ein Panel weiterer bewährter Antikörper ergänzt werden.
- Die Wertigkeit des immunhistochemischen Nachweises einer Akkumulation des P53-Tumorsuppressorgenprodukts muss bei der Abgrenzung zu reaktiven Pleuraläsionen und Pleurakarzinosen differenziert bewertet werden. Die Möglichkeit des Nachweises in Pleuramesotheliomen, pulmonalen Adenokarzinomen und in benignen Pleuraläsionen macht die P53-Akkumulation zu einem nur wenig geeigneten *Marker*. Im Einzelfall kann der Nachweis auf Grund des Reaktionsmusters aber einen ergänzenden Beitrag bei der Differentialdiagnose benignen und malignen Pleuraläsionen liefern.
- Der Nachweis von *SV 40 TAG*-Genfragmenten kann bei der Differentialdiagnose von Pleuramesotheliomen und Pleurakarzinosen bösartiger Lungentumoren im Einzelfall richtungsweisend sein. Für die Differentialdiagnose von reaktiven Pleuraläsionen und Pleuramesotheliomen erlangt der Nachweis keine diagnostische Bedeutung. Im Vergleich zu immunhistochemischen Untersuchungen mit einem Antikörperpanel besitzt der *SV 40*-Nachweis – bei vergleichbar guter Spezifität – eine deutlich geringere Sensitivität.
- Die mit der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) nachweisbaren chromosomalen Defekte sind für Mesotheliome wenig spezifisch. Die Methode ist auch nur bedingt sensitiv. Für die Differentialdiagnose pleural lokalisierter Tumoren stellt die CGH eine im Einzelfall wenig geeignete Methode dar. Auch für die Differentialdiagnose benignen und malignen pleuraler Prozesse ist die CGH nur bedingt geeignet.

Zusammenfassend hat sich im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen der immunhistochemische Nachweis der Calretinin-Expression als Marker mit höchster Sensitivität und Spezifität erwiesen. Bei der pathologisch-anatomischen Begutachtung von Gewebeproben unter der Fragestellung eines Pleuramesothelioms sollte die Calretinin-Immunreaktion daher unbedingt durchgeführt werden. Letztendlich stellt für die Differentialdiagnose pleural lokalisierter Tumoren aber die Erfahrung des Untersuchers das entscheidende Kriterium bei der Auswahl geeigneter Zusatzuntersuchungen und bei der abschließenden diagnostischen Bewertung aller verfügbaren histomorphologischen, histochemischen, immunhistochemischen, staubanalytischen und letztendlich auch klinisch-radiologischen Befunde dar.

7. Literatur

1. Achatzy R., Beba W., Ritschler R., Worn H., Wahlers B., Macha H. N., Morgan J. A. (1989):
The diagnosis, therapy and prognosis of diffuse malignant mesothelioma .
Eur. J. Cardiothorac. Surg. 3, 445-447.
2. Attanoos R. L., Dojcinov S. D., Webb R., Gibbs A. R. (2000):
Anti-mesothelial markers in sarcomatoid mesothelioma and other spindle cell neoplasms [In Process Citation].
Histopathology 37, 224-231.
3. Balsara B. R., Bell D. W., Sonoda G., De Rienzo A., du Manoir S., Jhanwar S. C., Testa J. R. (1999):
Comparative genomic hybridization and loss of heterozygosity analyses identify a common region of deletion at 15q11.1-15 in human malignant mesothelioma.
Cancer Res. 59, 450-454.
4. Barberis M. C. P., Faleri M., Veronese S., Casadio C., Viale G. (1997):
Calretinin a selective marker of normal and neoplastic mesothelial cells in serous effusions.
Acta Cytol. 41, 1757-1761.
5. Baris Y. I. (1991):
Fibrous zeolite (erionite)-related diseases in Turkey.
Am. J. Ind. Med. 19, 374-378.
6. Bianchi C., Brollo A., Ramani L., Zuch C. (1997):
Pleural plaques as risk indicators for malignant pleural mesothelioma: a necropsy-based study.
Am. J. Ind. Med. 32, 445-449.
7. Björkqvist A. M., Tammilehto L., Anttila S., Mattson K., Knuutila S. (1997):
Recurrent DNA copy number changes in 1q, 4q, 6q, 9p, 13q, 14q and 22q detected by comparative genomic hybridization in malignant mesothelioma.
Br. J. Cancer 75, 523-527.
8. Björkqvist A. M., Tammilehto L., Nordling S., Nurminen M., Anttila S., Mattson K., Knuutila S. (1998):
Comparison of DNA copy number changes in malignant mesothelioma, adenocarcinoma and large-cell anaplastic carcinoma of the lung.
Br. J. Cancer 77, 260-269.
9. Bocchetta M., Di Resta I., Powers A., Fresco R., Tosolini A., Testa J. R., Pass H. I., Rizzo P., Carbone M. (2000):
From the cover: human mesothelial cells are unusually susceptible to simian virus 40-mediated transformation and asbestos cocarcinogenicity.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 10214-10219.
10. Boffetta P., Saracci R., Andersen A., Bertazzi P. A., Chang-Claude J., Cherrie J., Ferro G., Frentzel-Beyme R., Hansen J., Olsen J., Plato N., Teppo L., Westerholm P., Winter P. D., Zocchetti C. (1997):
Cancer mortality among man-made vitreous fiber production workers.
Epidemiology 8, 259-268.
11. Brockmann M. (1992):
Malignes diffuses Pleuramesotheliom - Heterogenität, Differentialdiagnose und

- Histogenese. Sankt Augustin: Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften (HVBG)
12. Brockmann, M., Müller, K.-M.(1998):
Pathologische Anatomie der primären und sekundären Pleuratumoren
In: Drings, P., Vogt-Moykopf, I. (Eds.): Thoraxtumoren: Diagnostik - Staging -
gegenwärtiges Konzept. S. 427-444. Berlin: Springer
 13. Brockstedt U., Gulyas M., Dobra K., Dejmek A., Hjerpe A. (2000):
An optimized battery of eight antibodies that can distinguish most cases of epithelial
mesothelioma from adenocarcinoma.
Am. J. Clin. Pathol. 114, 203-209.
 14. Butz M., Hamacher E. (1993):
Die Kosten der Leistungsfälle im Berufskrankheiten-Geschehen. 2. Ed. Sankt Augustin:
Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften (HVBG)
 15. Carbone M. (1999):
Simian virus 40 and human tumors: It is time to study mechanisms.
J. Cell. Biochem. 76, 189-193.
 16. Carbone M., Pass H. I., Rizzo P., Marinetti M. R., Di Muzio M., Mew D. J. Y., Levine
A., Procopio A. (1994):
Simian virus 40-like DNA sequences in human pleural mesothelioma.
Oncogene 9, 1781-1790.
 17. Carbone M., Rizzo P., Grimley P. M., Procopio A., Mew D. J. Y., Shridhar V., De
Bartolomeis A., Esposito V., Giuliano M. T., Steinberg S. M., Levine A. S., Giordano
A., Pass H. I. (1997):
Simian virus-40 large-T antigen binds p53 in human mesotheliomas.
Nature Med. 3, 908-912.
 18. Carbone M., Rizzo P., Pass H. I. (1997):
Simian virus 40, poliovaccines and human tumors: a review of recent developments.
Oncogene 15, 1877-1888.
 19. Celio M. R., Pauls T., Schwaller B. (1996):
Guidebook to the calcium binding proteins. Oxford: Oxford University Press
 20. Churg A. (1997):
The pathogenesis of pleural plaques.
Indoor Built Environ. 6, 73-78.
 21. Churg, A.(1998):
Neoplastic asbestos-induced disease
In: Churg, A., Green, F. H. Y. (Eds.): Pathology of occupational lung disease. 2 Ed. S.
339-391. Baltimore: Williams & Wilkins
 22. Churg A., Colby T. V., Cagle P., Corson J., Gibbs A. R., Gilks B., Grimes M.,
Hammar S., Roggli V., Travis W. D. (2000):
The separation of benign and malignant mesothelial proliferations.
Am. J. Surg. Pathol. 24, 1183-1200.
 23. Coenen, W.(1998):
Asbest - Risikoermittlung und Präventionsansätze
In: Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften (Ed.): 25 Jahre Zentrale
Erfassungsstelle für asbeststaubgefährdete Arbeitnehmer 1972 - 1997. Bilanz und

- Perspektiven. S. 57-78. Sankt Augustin: Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften (HVBG)
24. Colt H. G. (1997):
Mesothelioma: epidemiology, presentation, and diagnosis.
Semin. Resp. Crit. Care Med. 18, 353-361.
 25. Cora E., Kane A. (1993):
Alterations in a tumour suppressor gene p53 in mouse mesotheliomas induced by crocidolite asbestos.
Eur. Respir. Rev. 3, 148-150.
 26. Cote R. J., Jhanwar S. C., Novick S., Pellicer A. (1991):
Genetic alterations of the p53 gene are a feature of malignant mesotheliomas.
Cancer Res. 51, 5410-5416.
 27. Cury P. M., Butcher D. N., Fisher C., Corrin B., Nicholson A. G. (2000):
Value of the mesothelium-associated antibodies thrombomodulin, cytokeratin 5/6, calretinin, and CD44H in distinguishing epithelioid pleural mesothelioma from adenocarcinoma metastatic to the pleura.
Mod. Pathol. 13, 107-112.
 28. Dasika G. K., Lin S. C., Zhao S., Sung P., Tomkinson A., Lee E. Y. (1999):
DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis.
Oncogene 18, 7883-7899.
 29. Doglioni C., Tos A. P., Laurino L., Iuzzolino P., Chiarelli C., Celio M. R., Viale G. (1996):
Calretinin: a novel immunocytochemical marker for mesothelioma.
Am. J. Surg. Pathol. 20, 1037-1046.
 30. Donna A., Betta P. G. (1981):
Mesodermomas: a new embryological approach to primary tumours of coelomic surfaces.
Histopathology 5, 31-44.
 31. Dowell S., Derias N., Wilson P. O., Lane D. P., Hall P. A. (1993):
Expression of p53 in reactive mesothelium.
Histopathology 22, 96-97.
 32. Emri S., Kocagoz T., Olut A., Gungen Y., Mutti L., Baris Y. I. (2000):
Simian virus 40 is not a cofactor in the pathogenesis of environmentally induced malignant pleural mesothelioma in Turkey.
Anticancer Res. 20, 891-894.
 33. Esposito V., Baldi A., De Luca A., Claudio P. P., Signoriello G., Bolognese A., Centonze P., Giordano G. G., Caputi M., Baldi F., Giordano A. (1997):
p53 immunostaining in differential diagnosis of pleural mesothelial proliferations.
Anticancer Res. 17, 733-736.
 34. Galateau-Salle F., Bidet P., Iwatsubo Y., Gennetay E., Renier A., Letourneux M., Paireon J. C., Moritz S., Brochard P., Jaurand M. C., Freymuth F. (1998):
SV40-like DNA sequences in pleural mesothelioma, bronchopulmonary carcinoma, and non-malignant pulmonary diseases.
J. Pathol. 184, 252-257.

35. Galateau-Salle, F., Cagle, P. T. (2000):
Nonmalignant versus malignant proliferations on pleural biopsy
In: Cagle, P. T. (Ed.): Diagnostic pulmonary pathology. S. 555-569. New York:
Dekker
36. Gotzos V., Schwaller B., Hetzel N., Bustos-Castillo M., Celio M. R. (1992):
Expression of the calcium binding protein calretinin in WiDr cells and its correlation to
their cell cycle.
Exp. Cell Res. 202, 292-302.
37. Gotzos V., Vogt P., Celio M. R. (1996):
The calcium binding protein calretinin is a selective marker for malignant pleural
mesotheliomas of the epithelial type.
Pathol. Res. Pract. 192, 137-147.
38. Hillerdal G. (1997):
Pleural plaques: incidence and epidemiology, exposed workers and the general
population.
Indoor Built Environ. 6, 86-95.
39. Hirvonen A., Mattson K., Karjalainen A., Ollikainen T., Tammilehto L., Hovi T., Vainio
H., Pass H. I., Di R., I, Carbone M., Linnainmaa K. (1999):
Simian virus 40 (SV40)-like DNA sequences not detectable in Finnish mesothelioma
patients not exposed to SV40-contaminated polio vaccines.
Mol. Carcinog. 26, 93-99.
40. Huang H., Reis R., Yonekawa Y., Lopes J. M., Kleihues P., Ohgaki H. (1999):
Identification in human brain tumors of DNA sequences specific for SV40 large T
antigen.
Brain Pathol. 9, 33-42.
41. Janus F., Albrechtsen N., Dornreiter I., Wiesmüller L., Grosse F., Deppert W. (1999):
The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity.
Cell. Mol. Life Sci. 55, 12-27.
42. Jones J. S. P., Lund C., Planteydt H. T. (1985):
Colour atlas of mesothelioma. Lancaster: MTP Press
43. Kafiri G., Thomas D., Shepherd N., Krausz T., Lane D., Hall P., Thomas D. M.,
Shepherd N. A., Lane D. P., Hall P. A. (1992):
p53 expression is common in malignant mesothelioma.
Histopathology 21, 331-334.
44. Kivipensas P., Björkqvist A. M., Karhu R., Pelin K., Linnainmaa K., Tammilehto L.,
Mattson K., Kallioniemi O. P., Knuutila S. (1996):
Gains and losses of DNA sequences in malignant mesothelioma by comparative
genomic hybridization.
Cancer Genet. Cytogenet. 89, 7-13.
45. Knuutila S., Aalto Y., Autio K., Björkqvist A. M., El-Rifai W., Hemmer S., Huhta T.,
Kettunen E., Kiuru-Kuhlefelt S., Larramendy E., Lushnikova T., Monni O., Pere H.,
Tapper J., Tarkkanen M., Varis A., Wasenius V. M., Wolf M., Zhu Y. (1999):
DNA copy number losses in human neoplasms.
Am. J. Pathol. 155, 683-694.
46. Knuutila S., Armengol G., Björkqvist A. M., el Rifai W., Larramendy M. L., Monni O.,
Szymanska J. (1998):
Comparative genomic hybridization study on pooled DNAs from tumors of one

- clinical-pathological entity.
Cancer Genet. Cytogenet. 100, 25-30.
47. Kraus T., Raithel H. J. (2000):
Frühdiagnostik asbeststaubverursachter Erkrankungen. Sankt Augustin: Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften (HVBG)
48. Krismann M. (2001):
Muster chromosomaler Imbalancen und DNA-Aneuploidie bei malignen Mesotheliomen - Molekularpathologische und DNA-cytophotometrische Charakterisierung.
Ruhr-Universität Bochum, Medizinische Fakultät, Bochum (Habilitation)
49. Krismann M., Adams H., Jaworska M., Müller K.-M., Johnen G. (2000):
Patterns of chromosomal imbalances in benign solitary fibrous tumours of the pleura. Virchows Arch. 437, 248-255.
50. Krismann M., Jaworska M., Müller K.-M., Johnen G. (2000):
Severe chromosomal aberrations in pleural mesotheliomas with unusual mesodermal features - CGH evidence for a mesothelioma subgroup.
J. Mol. Diag. 2, 209-216
51. Krismann M., Müller K.-M. (2000):
Malignes Mesotheliom der Pleura, des Perikards und des Peritoneums.
Chirurg 71, 877-886.
52. Lechner J. F., Tesfaigzi J., Gerwin B. I. (1997):
Oncogenes and tumor-suppressor genes in mesotheliomas.
Environ. Health Perspect. 105, 1061-1068.
53. Leers M. P., Aarts M. M., Theunissen P. H. (1998):
E-cadherin and calretinin: a useful combination of immunochemical markers for differentiation between mesothelioma and metastatic adenocarcinoma.
Histopathology 32, 209-216.
54. Libbus B. L., Craighead J. E. (1988):
Chromosomal translocations with specific breakpoints in asbestos-induced rat mesotheliomas.
Cancer Res. 48, 6455-6461.
55. Mangano W. E., Cagle P. T., Churg A., Vollmer R. T., Roggli V. L. (1998):
The diagnosis of desmoplastic malignant mesothelioma and its distinction from fibrous pleurisy: a histologic and immunohistochemical analysis of 31 cases including p53 immunostaining.
Am. J. Clin. Pathol. 110, 191-199.
56. Mark J. (1978):
Monosomy 14, monosomy 22 and 13q - three chromosomal abnormalities observed in cells of two malignant mesotheliomas studied by banding techniques.
Acta Cytol. 22, 398-401.
57. May P., May E. (1999):
Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein.
Oncogene 18, 7621-7636.
58. Mayall F. G., Goddard H., Gibbs A. R. (1992):
p53 immunostaining in the distinction between benign and malignant mesothelial

- proliferations using formalin-fixed paraffin sections.
J. Pathol. 168, 377-381.
59. Mayall F. G., Goddard H., Gibbs A. R. (1993):
The frequency of p53 immunostaining in asbestos-associated mesotheliomas and non-asbestos-associated mesotheliomas.
Histopathology 22, 383-386.
60. McDonald J. C., McDonald A. D. (1996):
The epidemiology of mesothelioma in historical context.
Eur. Resp. J. 9, 1932-1942.
61. Metcalf R. A., Welsh J. A., Bennett W. P., Seddon M. B., Lehman T. A., Pelin K., Linnainmaa K., Tammilehto L., Mattson K., Gerwin B. I. (1992):
p53 and Kirsten-ras mutations in human mesothelioma cell lines.
Cancer Res. 52, 2610-2615.
62. Midgley C. A., Fisher C. J., Bártek J., Vojtesek B., Lane D., Barnes D. M. (1992):
Analysis of p53 gene expression in human tumours: an antibody raised against human p53 expressed in *E. coli*.
J. Cell Sci. 101, 183-189.
63. Miserocchi G., Agostoni E. (1971):
Contents of the pleural space.
J. Appl. Physiol. 30, 208-213.
64. Mor O., Yaron P., Huszar M., Yellin A., Jakobovitz O., Brok-Simoni F., Rechavi G., Reichert N. (1997):
Absence of p53 mutations in malignant mesotheliomas.
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 16, 9-13.
65. Mulatero C., Suretheran T., Breuer J., Rudd R. M. (1999):
Simian virus 40 and human pleural mesothelioma.
Thorax 54, 60-61.
66. Murthy S. S., Testa J. R. (1999):
Asbestos, chromosomal deletions, and tumor suppressor gene alterations in human malignant mesothelioma.
J. Cell Physiol 180, 150-157.
67. Muscat J. E., Wynder E. L. (1991):
Cigarette smoking, asbestos exposure, and malignant mesothelioma.
Cancer Res. 51, 2263-2267.
68. Müller, K.-M.(1983):
Pleura
In: Doerr, W., Seifert, G. (Eds.): *Pathologie der Lunge*. S. 1295-1398. Berlin: Springer
69. Müller, K.-M.(1994):
Erkrankungen der Pleura - pathologische Anatomie
In: Nakhosteen, J. A., Inderbitzi, R. (Eds.): *Atlas und Lehrbuch der thorakalen Endoskopie*. S. 325-339. Berlin: Springer
70. Müller, K.-M.(1997):
Pleura
In: Remmele, W. (Ed.): *Pathologie*. 2 Ed. S. 715-732. Berlin: Springer

71. Müller K.-M., Wiethage Th. (1995):
Molekularpathologie: p53 - Molekül des Jahres 1993.
Atemw. Lungenkrkh. 21, S38-S43.
72. Neumann V., Günther S., Müller K.-M., Fischer M. (2001):
Malignant mesothelioma - German Mesothelioma Register 1987 to 1999.
Int. Arch. Occup. Environ. Health [im Druck]
73. Ni Z., Liu Y., Keshava N., Zhou G., Whong W., Ong T. (2000):
Analysis of K-ras and p53 mutations in mesotheliomas from humans and rats exposed
to asbestos.
Mutat. Res. 468, 87-92.
74. Noll S., Schaub-Kuhnen S. (2000):
Praxis der Immunhistochemie. München: Urban & Fischer
75. Oates J., Edwards C. (2000):
HBME-1, MOC-31, WT1 and calretinin: an assessment of recently described markers
for mesothelioma and adenocarcinoma.
Histopathology 36, 341-347.
76. Ordóñez N. G. (1997):
The value of antibodies 44-3A6, SM3, HBME-1, and thrombomodulin in
differentiating epithelial pleural mesothelioma from lung adenocarcinoma.
Am. J. Surg. Pathol. 21, 1399-1408.
77. Ordóñez N. G. (1998):
Value of calretinin immunostaining in differentiating epithelial mesothelioma from lung
adenocarcinoma.
Mod. Pathol. 11, 929-933.
78. Ordóñez N. G. (1999):
Role of immunohistochemistry in differentiating epithelial mesothelioma from
adenocarcinoma.
Am. J. Clin. Pathol. 112, 75-89.
79. Oren M., Rotter V. (1999):
p53 - the first twenty years.
Cell. Mol. Life Sci. 55, 9-11.
80. Petersen I., Bujard M., Petersen S., Wolf G., Goeze A., Schwendel A., Langreck H.,
Gellert K., Reichel M., Just K., du Manoir S., Cremer T., Dietel M., Ried T. (1997):
Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell
carcinoma of the lung.
Cancer Res. 57, 2331-2335.
81. Petersen I., Schwendel A., Bockmühl U., Dietel M. (1996):
Die komparative genomische Hybridisierung.
Pathologe 17, 333-341.
82. Phillips S. (1999):
Calretinin bei primären und sekundären Tumoren der serösen Häute -
Immunhistochemische Untersuchungsbefunde.
Ruhr-Universität Bochum, Medizinische Fakultät, Bochum (Dissertation)
83. Plas E., Riedl C. R., Pflüger H. (1998):
Malignant mesothelioma of the tunica vaginalis testis - review of the literature and

- assessment of prognostic parameters.
Cancer 83, 2437-2446.
84. Popescu N. C., Chahinian A. P., DiPaolo J. A. (1988):
Nonrandom chromosome alterations in human malignant mesothelioma.
Cancer Res. 48, 142-147.
85. Ramael M., Lemmens G., Eerdekens C., Buysse C., Deblie I., Jacobs W., Vanmarck E., van Marck E. (1992):
Immunoreactivity for p53 protein in malignant mesothelioma and non-neoplastic mesothelium.
J. Pathol. 168, 371-375.
86. Riera J. R., Astengo-Osuna C., Longmate J. A., Battifora H. (1997):
The immunohistochemical diagnostic panel for epithelial mesothelioma: a reevaluation after heat-induced epitope retrieval.
Am. J. Surg. Pathol. 21, 1409-1419.
87. Rusch V. W. (1996):
A proposed new International TNM staging system for malignant pleural mesothelioma from the International Mesothelioma Interest Group.
Lung Cancer 14, 1-12.
88. Schirren J., Muley T., Schneider P., Trainer C., Bulzebruck H., Dienemann H., Vogt-Moykopf I. (1998):
Behandlungsstrategie beim Pleuramesotheliom.
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Kongressbd. 115, 498-506.
89. Segers K., Backhovens H., Singh S. K., Devoecht J., Ramael M., Vanbroeckhoven C., Vanmarck E. (1995):
Immunoreactivity for p53 and mdm2 and the detection of p53 mutations in human malignant mesothelioma.
Virchows Archiv. 427, 431-436.
90. Shivapurkar N., Wiethage Th., Wistuba I. I., Milchgrub S., Müller K.-M., Gazdar A. F. (2000):
Presence of simian virus 40 sequences in malignant pleural, peritoneal and noninvasive mesotheliomas.
Int. J. Cancer 85, 743-745.
91. Shivapurkar N., Wiethage Th., Wistuba I. I., Salomon E., Milchgrub S., Müller K.-M., Churg A., Pass H., Gazdar A. F. (1999):
Presence of simian virus 40 sequences in malignant mesotheliomas and mesothelial cell proliferations.
J. Cell. Biochem. 76, 181-188.
92. Strickler H. D., Goedert J. J., Fleming M., Travis W. D., Williams A. E., Rabkin C. S., Daniel R. W., Shah K. V. (1996):
Simian virus 40 and pleural mesothelioma in humans.
Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 5, 473-475.
93. Strickler H. D., Rosenberg P. S., Devesa S. S., Hertel J., Fraumeni J. F., Jr., Goedert J. J. (1998):
Contamination of poliovirus vaccines with simian virus 40 (1955-1963) and subsequent cancer rates.
JAMA 279, 292-295.

94. Taguchi T., Jhanwar S. C., Siegfried J. M., Keller S. M., Testa J. R. (1993):
Recurrent deletions of specific chromosomal sites in 1p, 3p, 6q, and 9p in human malignant mesothelioma.
Cancer Res. 53, 4349-4355.
95. Testa J. R., Carbone M., Hirvonen A., Khalili K., Krynska B., Linnainmaa K., Pooley F., Rizzo P., Rusch V., Xiao G. H. (1998):
A multi-institutional study confirms the presence and expression of Simian Virus 40 in human malignant mesothelioma .
Cancer Res. 58, 4505-4509.
96. Tiainen M., Tammilehto L., Mattson K., Knuutila S. (1988):
Nonrandom chromosomal abnormalities in malignant pleural mesothelioma.
Cancer Genet. Cytogenet. 33, 251-274.
97. Travis W. D., Colby T. V., Corrin B., Shimosato Y., Brambilla E., and collaborators from 14 countries. (1999):
Histological typing of lung and pleural tumors. 3. Ed. Berlin: Springer
98. Ungar S., Van de Meeren A., Tammilehto L., Linnainmaa K., Mattson K., Gerwin B. I. (1996):
High levels of MDM2 are not correlated with the presence of wild- type p53 in human malignant mesothelioma cell lines.
Br. J Cancer 74, 1534-1540.
99. Wagner J. C., Sleggs C. A., Marchand P. (1960):
Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province.
Br. J. Ind. Med. 17, 260-271.
100. Walts A. E., Said J. W., Koeffler H. P. (1994):
Is immunoreactivity for p53 useful in distinguishing benign from malignant effusions - localization of p53 gene product in benign mesothelial and adenocarcinoma cells.
Mod. Pathol. 7, 462-468.
101. Wiethage Th., Junker C., Johnen G., Krismann M., Müller K.-M. (2000):
Pathologie und Molekularbiologie bösartiger Lungentumoren.
Pathologe 21, 404-423.
102. Wiethage Th., Voss B., Müller K.-M. (1995):
P53 accumulation and proliferating-cell nuclear antigen expression in human lung cancer.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 121, 371-377.
103. Woitowitz H.-J. (1987):
Epidemiologie und Prävention des malignen Pleuramesothelioms.
Med. Klin. 82, 578-581.

Danksagung

- Herrn Professor Müller, Direktor des Instituts für Pathologie an den Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Bergmannsheil in Bochum und Leiter des Deutschen Mesotheliomregisters gilt besonderer Dank für seine kontinuierliche großzügige Unterstützung, die diese Arbeit erst möglich gemacht hat, für die kritische Diskussion bei der Durchführung der Untersuchungen und der Abfassung der Arbeit und nicht zuletzt für die Hinführung zur Lungen- und Pleurapathologie.
- Herrn Professor Schmid, Direktor des Instituts für Pathologie der Universität Essen, danke ich für die Bereitschaft zur Betreuung der Themas sowie die kritische Diskussion bei der Durchführung der Untersuchungen und der Abfassung der Arbeit.
- Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pathologie an den Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Bergmannsheil in Bochum, die mich bei der Durchführung der Arbeiten fachlich beratend unterstützt haben, gilt besonderer Dank. Herrn Dr. M. Krismann, Herrn Dr. G. Johnen und Frau Dr. M. Jaworska gilt der spezielle Dank für die Unterstützung bei den CGH-Untersuchungen, den technischen Assistentinnen Frau U. Thomek, Frau S. Schaub-Kuhnen, Frau G. Müller und Frau C. Troske für die Unterstützung bei der Durchführung der PCR, Immunhistochemie und der digitalen Fotoarbeiten.
- Dank gilt ferner Herrn Professor A. F. Gazdar und Herrn Dr. N. Shivapurkar, Southwestern Medical Center, University of Texas, Dallas TX, für die Unterstützung bei der Mikrodissektion von Gewebeproben für den SV 40 Nachweis und die Sequenzierung von PCR-Produkten.
- Meiner Familie gilt Dank für das Verständnis und die geopfert Zeit, ohne die die Untersuchungen und die Abfassung der Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Lebenslauf

Name	Thorsten Wiethege	
Geburtsdatum	10. Mai 1966	
Geburtsort	Münster / Westf.	
Staatsangehörigkeit	Deutsch	
Familienstand	verheiratet mit Dr. med. Almut Wiethege, geb. Bartling, 1 Kind	
Eltern	Rolf Wiethege und Karin Wiethege, geb. Benien	
Grundschule	1972 - 1976	Agatha Grundschule, Bottrop
Gymnasium	1976 - 1985	Heinrich-Heine Gymnasium, Bottrop Abitur 20.05.1985
Wissenschaftliche Ausbildung	WS 1985/86 - WS 1989/90	Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum; Abschluss: Diplom-Biologe (08.03.1990) Diplomarbeit: „Primärstruktur und Organisation der Histongene von <i>Chironomus thummi piger</i> “
	31.01.1990 - 31.01.1994	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Berufsgenossenschaftlichen Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin (BGFA) an der Ruhr-Universität Bochum, Abt. Medizinische Biologie (Dr. B. Voss)
	01.02.1994 - 31.07.1994	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg im Rahmen des Forschungsvorhabens <i>Deutsche WISMUT Studie</i> ; Abt. Biophysik & Medizinische Strahlenphysik (Dr. H. Wesch)
	seit 01.08.1994	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pathologie / Deutschen Mesotheliomregister an den Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Bergmannsheil, Universitätsklinik, Ruhr-Universität Bochum, Direktor Prof. Dr. K.-M. Müller
Mitgliedschaften in wissenschaftlichen Vereinigungen	<ul style="list-style-type: none">• American Association for Cancer Research• Gesellschaft für Lungen- und Atmungsforschung• Gesellschaft für Genetik• Society for Leukocyte Biology	