

Aus der Klinik für Innere Medizin II
(Direktor: Prof. Dr. Dr. M. Kneba)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**APOPTOSE REGULIERENDE PROTEINE
UND DEREN KLINISCHE BEDEUTUNG
BEIM MANTELZELL-LYMPHOM:
EINE IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG**

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

vorgelegt von

Paul Christian Coumine Riis

aus Florenz

Kiel, 2009

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. habil. Carsten Schrader

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. habil. Axel Hauschild

Tag der mündlichen Prüfung: 07.10.2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 07.10.2009

gez.

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	3
2.1	Patienten	3
2.2	Erstellung der Schnittpräparate	3
2.3	Morphologische Untersuchung	3
2.4	Immunhistochemische Untersuchung	5
	2.4.1 Immunhistochemische Färbemethoden	5
	2.4.1.1 APAAP Methode	5
	2.4.1.2 StreptABC Methode	8
	2.4.2 Kontrollen	8
	2.4.3 Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung	9
2.5	Statistische Untersuchung	9
3	ERGEBNISSE	10
3.1	Konventionelle Färbungen	10
3.2	Immunhistochemische Befunde der Apoptose Marker	10
	3.2.1 p53 Expression	10
	3.2.2 Bcl2 Expression	11
	3.2.3 Bax Expression	12
	3.2.4 Caspase 8 Expression	14
	3.2.5 aktivierte Caspase 3 Expression	15
4	DISKUSSION	21
5	ZUSAMMENFASSUNG	26
6	LITERATURVERZEICHNIS	27
	DANKSAGUNG	32
	LEBENS LAUF	33

1 EINLEITUNG

Die malignen hämatologischen Erkrankungen weisen eine zunehmende Inzidenz und Mortalität auf. Neben Leukämien nehmen die Lymphdrüsenkrebserkrankungen, die so genannten malignen Lymphome, eine zunehmende Bedeutung in der Todesursachenstatistik ein. So sind Leukämien und maligne Lymphome heute die vierthäufigste Todesursache bei Männern (7,2%) und bei Frauen (7,6%).

In Europa wurden die letzten Jahrzehnte die malignen Lymphome nach der Kiel-Klassifikation eingeteilt (1). Diese Einteilung war eine morphologische Einteilung nach der Zellart. Zytische Lymphome waren niedrigmaligne und blastische Lymphome hochmaligne. Die klinische Relevanz dieser Klassifikation konnten Prof. Brittinger und Mitarbeiter 1984 in einer großen Untersuchung an über 1000 Patienten zeigen (2). Niedrigmaligne Lymphome verliefen klinisch langsam, hochmaligne Lymphome hatten einen aggressiven Verlauf. Nur eine Entität verlief klinisch eher aggressiv, obwohl es nach der Kiel-Klassifikation ein niedrigmalignes Lymphom ist, das Mantelzell-Lymphom. Diese Erkrankung war lange Jahre der Hauptkritikpunkt der Amerikaner am Kieler Klassifikationssystem. Seit wenigen Jahren werden die malignen Lymphome nach der neuen WHO Klassifikation eingeteilt (3). Diese unterteilt die Erkrankung wie die Kiel-Klassifikation in ein B- und T-Zell-System sowie in Vorläufer- und reifzellige Lymphome.

Das Mantelzell-Lymphom (MCL) zeigt wie erwähnt klinisch einen aggressiven Verlauf mit einer medianen Überlebensrate von drei bis vier Jahren (4). Die Nomenklatur des MCL war viele Jahre uneinheitlich. Prof. Lennert nannte es zunächst Germinozytom und später auch Centrocytisches Lymphom (cc). Die endgültige Bezeichnung der Erkrankung als Mantelzell-Lymphom, nach dessen Wachstumsmuster in frühen Stadien, wurde 1992 festgelegt (5). Zytogenetisch konnten Williams und Mitarbeiter 1991 (6) die für diese Erkrankung typische Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ identifizieren. Hierbei kommt es zu einer Umlagerung des *bcl1* Onkoproteins von Chromosom 11 in den Immunglobulinschwerkettenloкус auf dem Chromosom 14, wodurch vermehrt *bcl1* abgelesen und überexprimiert wird. *Bcl1* kodiert Cyclin D1, ein wichtiger Regulator im Zellzyklus.

Da einzelne Patienten mit einem MCL klinisch einen auffällig langsam progredienten Verlauf zeigen, wurde nach Prognosefaktoren gesucht, um die Patienten genauer zu identifizieren, die auch frühzeitig einer intensiven Therapie bedürfen. So sind

zahlreiche Studien zur Prognoseeinschätzung bezüglich histopathologischer, immunphänotypischer, genetischer und molekularer Merkmale durchgeführt worden. Die klinische Relevanz proliferationsassoziierter Proteine beim MCL ist von der Kieler Arbeitsgruppe um Prof. Parwaresch untersucht worden (7-10). Durch Genexpressionsanalyse konnte bestätigt werden, dass der Kontrollverlust des Zellzyklus sowie eine hohe Proliferation mit einer schlechten Prognose korrelieren (11).

Zusätzlich zu den Änderungen im Zellzyklus sind Veränderungen in den DNA Reparaturmechanismen, den so genannten „*DNA damage response pathways*“ oft nachweisbar, zum Beispiel der Verlust des ATM-Gens sowie p53-Mutationen oder -Deletionen. Letztere scheinen auch häufiger mit einer blastoiden Morphologie, einer erhöhten Proliferation und einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein (12, 13).

Aufgrund der in Malignomen häufig dysregulierten Balance zwischen Zellteilung, der Proliferation und dem programmiertem Zelltod, der Apoptose, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von Proteinen untersucht, die zur Apoptose beim MCL beitragen.

Zur Auslösung der Apoptose sind zwei Hauptwege beschrieben worden: ein extrinsischer, ligandengebundener Weg, der so genannte „*death receptor pathway*“, sowie ein intrinsischer, mitochondrialer Weg.

Ziel dieser Arbeit ist es, die unterschiedlichen Proteine, die an der Apoptose beteiligt sind, zu untersuchen. Wir haben uns auf die Proteine konzentriert, die an dem so genannten „*DNA damage response*“ (p53) und am mitochondrialen Weg (BCL2, BAX) beteiligt sind, als auch auf Effektor-Proteine der Apoptose (Caspase 8, Caspase 3). Die Ergebnisse sollen dann mit dem klinischen Verlauf korreliert werden, ob unterschiedliche Expressionsprofile einen Einfluss auf das Gesamtüberleben haben? Außerdem sollen zum Vergleich auch klinische Parameter in einer multivariaten Analyse mituntersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patienten

Es wurden Lymphknotenbiopsaten von 93 Patienten (72 Männer, 21 Frauen) aus zwei deutschen Therapiestudien (1975-1980 und 1982-1985) in die Arbeit aufgenommen (2, 14). Der mediane Lebensalter betrug 65 Jahre (Durchschnitt: 63,2 Jahre, Spannweite: 41-86 Jahre). Tabelle 1 zeigt die Charakteristika der 93 Patienten. Alle Biopsien wurden vor Therapiebeginn gewonnen.

2.2 Erstellung der Schnittpräparate

Von den formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebsproben wurden am Schlittenmikrotom (Jung, Heidelberg, Deutschland) 3-5 μm dicke Schnitte angefertigt und nach Entspannung im Wasserbad (Medax Nagel, Kiel) bei 45-55 °C auf 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES)-beschichtete Adhäsions-Objektträger (Histobond, Marienfeld, Deutschland) übertragen. Nach einer Trocknungszeit von 24 Stunden im Wärmeschrank bei 37°C wurden die Paraffinschnitte für 30 Minuten in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden 100-, 96- und 80-prozentigen Ethanolreihe für jeweils 3 Minuten rehydriert.

2.3 Morphologische Untersuchung

Die Schnittpräparate wurden mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) und nach Giemsa gefärbt, sowie nach Gomori versilbert. Die Schnitte wurden durch einen Referenz-Hämatopathologen (Prof. Parwaresch) beurteilt und die Diagnose entsprechend den Kriterien der WHO-Klassifikation verifiziert (3). Jede Probe wurde einem der beiden histologischen Subtypen, klassisch oder blastoid, zugeteilt (15).

Tabelle 1: Charakteristika der 93 Patienten für die Untersuchungen

	<i>Merkmale</i>	<i>n (%)</i>
<u>Geschlecht:</u>	Männlich	72 (77.4)
	Weiblich	21 (22.6)
<u>Alter:</u>	< 60. Lebensjahr	38 (40.9)
	> 60. Lebensjahr	55 (59.1)
<u>B-Symptome:</u>	Ja	37 (39.8)
	Nein	54 (58.1)
<u>Knochenmarksinfiltration:</u>	Ja	56 (60.2)
	Nein	36 (38.7)
<u>Stadium (Ann Arbor):</u>	1+2	7 (7.5)
	3+4	79 (84.9)
<u>Performance Status (WHO):</u>	0-1	71 (76.3)
	≥ 2	20 (21.5)
<u>Extranodale Beteiligung:</u>	Ja	82 (88.2)
	Nein	11 (11.8)
<u>Lactatdehydrogenase (LDH):</u>	Normal	71 (76.3)
	Erhöht	14 (15.1)
<u>Internationaler Prognose Index (IPI-Score):</u>		
	0-1	24 (25.8)
	≥ 2	69 (74.2)
<u>Therapie:</u>		
	Chlorambucil+Prednison	38 (40.9)
	Cyclophosphamid+Vincristin+Prednison (COP)	31 (33.3)
	Cyclophosphamid+Doxorubicin+Vincristin+Prednison (CHOP)	10 (10.8)
	Alleinige Extended field-Bestrahlung	9 (9.7)
	Keine Therapie	3 (3.2)
	Unbekannt	2 (2.2)
<u>Histologischer Subtyp:</u>	Klassisch	76 (81.7)
	Blastoid	17 (18.3)

2.4 Immunhistochemische Untersuchung

Anschließend wurde die Antigendemaskierung (16) eingesetzt um die Epitope für den Antikörper wieder erkennbar zu machen.

Dabei erfolgte die Antigendemaskierung im Dampfdrucktopf für 2 min 45 sec., indem die Gewebsschnitte in einer 0,01 molaren Zitratpuffer-Lösung im kochenden Puffer behandelt wurden. Zur Herstellung der Zitratpuffer-Lösung wurden 10,5 g Zitronensäuremonohydrat (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) in 5 Liter Aqua dest. gelöst und mit 2 normaler NaOH (Fa. Merck) auf einen pH-Wert von 6,0 titriert.

Im Anschluss wurden die Präparate (zunächst) 30 Minuten bei Raumtemperatur und dann für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser abgekühlt und (zuletzt) in Waschpuffer eingelegt. Der Waschpuffer (TBS-Puffer) bestand aus 68,5 g TRIS-HCl, 9 g TRIS-NaOH (beide Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) und 87,8 g NaCl (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) in 10 l Aqua dest. und wurde mit 1 molarer HCl (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) auf einem pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Das Epitop CD3 wurde mittels 0,02%iger Protease XXIV (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) 15 Minuten bei pH 7,5 demaskiert.

2.4.1 Immunhistochemische Färbemethoden

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Gewebsexzisate mit Hilfe spezifischer Primär-Antikörper immunhistochemisch untersucht (siehe Tabelle 2).

Zur immunhistochemischen Begutachtung der zu untersuchenden Gewebeproben wurden die APAAP- und die StreptABC-Methode angewendet.

2.4.1.1 APAAP-Methode

Die so vorbereiteten Paraffinschnitte wurden mit der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Technik (APAAP) (17) gefärbt, für die ein Primärantikörper, ein Sekundärantikörper, der APAAP-Komplex aus Alkalischer Phosphatase (AP) mit daran gebundenem Anti-Alkalische-Phosphatase-Antikörper (AAP) und eine Entwicklungslösung zur Visualisierung der zu Grunde liegenden Antigen-Antikörper-Reaktion notwendig sind.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Bezugsquelle</i>	<i>Methode</i>
CD20	DAKO, Hamburg, Deutschland	APAAP
CD3	DAKO, Hamburg, Deutschland	ABC
CD5	Novocastra, Newcastle, UK	APAAP
CD23	Novocastra, Newcastle, UK	APAAP
Cyclin D1	Novocastra, Newcastle, UK	ABC
p53	Novocastra, Newcastle, UK	APAAP
Bcl2	Zyted, Berlin, Deutschland	APAAP
Bax	Acris, Hiddenhausen, Deutschland	ABC
Caspase 8	BD, Hannover, Deutschland	ABC
Aktivierte Caspase 3	BD, Hannover, Deutschland	ABC

Die Präparate wurden zuerst mit dem Primärantikörper, der aus der Maus gewonnen wird und spezifisch gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet ist, in einer Lösungsmenge von 100 µl pro Schnitt in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert.

Als Verdünnungsmedium für die Primärantikörper diente eine Lösung aus 20 ml RPMI (Seromed, Berlin, Deutschland), 20 ml bei 57° C über 60 Minuten wärmeinaktiviertes Rinderserum (Sigma, St. Louis, USA) zur Verminderung von unspezifischen Hintergrundreaktionen, 0,2 g Natriumacid (Merck, Deutschland) zur Verhinderung einer bakteriellen Besiedlung der Lösung und 160 ml Aqua dest., die auf einen pH-Wert von 7,4 titriert wurde.

Für die Verdünnung der Sekundärantikörper beziehungsweise des APAAP-Komplexes wurde dieser Lösung zusätzlich 10 Vol% inaktiviertes Humanserum zugefügt, um mögliche anti-humane Kreuzreaktionen zu reduzieren. Nach dem Ende der Inkubationszeit mit dem Primärantikörper sowie im Anschluss an jeden weiteren Färbeschritt wurden die Präparate mit Waschpuffer gespült. Als Sekundärantikörper diente der Kaninchen-Anti-Maus Brückenantikörper Z 259 (DAKO, Hamburg, Deutschland), der aus Kaninchenserum gewonnen wird und gegen Immunglobuline

von Mäusen gerichtet ist. Die Gewebeproben wurden mit dem Sekundärantikörper in einer Verdünnung im Verhältnis von 1:100 für 30 Minuten bei 25 °C inkubiert und danach mit Waschpuffer gespült. Als Nächstes erfolgte die Inkubation der Präparate für 30 Minuten bei 25 °C mit dem APAAP-Komplex, einem Kopplungsprodukt aus 10 mg/ml Alkalischer Phosphatase (AP) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) und im Institut für Pathologie der Universität Kiel aus Zellüberstand (A88-12) gewonnenem Anti-Alkalische-Phosphatase-Antikörper (AAP).

Zur Verstärkung der Farbreaktion wurde die Inkubation mit dem Brückenantikörper und dem APAAP-Komplex jeweils zweimal bei Einwirkzeiten von je 10 Minuten wiederholt, zuletzt wurden die Schnitte noch einmal mit Waschpuffer gespült.

Zur Entwicklung der Farbreaktion wurden zunächst drei Teillösungen hergestellt, aus denen später die eigentliche Entwicklungslösung gemischt wurde. Die erste Lösung bestand aus 175 ml Entwicklungspuffer, zusammengesetzt aus 1,5 g TRIS-HCl und 4,9 g TRIS Base (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) in 1000 ml Aqua dest. gelöst; 62,5 ml Propandiolpuffer, bestehend aus 21 g Propandiol (Merck, Deutschland) in 1000 ml Aqua dest., und 100 mg Levamisol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) zur Inhibierung der Aktivität der endogenen alkalischen Phosphatase. Anschließend wurde nacheinander eine zweite Lösung aus 50 mg Natriumnitrit (Merck, Deutschland), gelöst in 1250 µl Aqua bidest. unter Zugabe von 500 µl Neufuchsin-Lösung (Merck, Deutschland) aus 5 g Neufuchsin in 100 ml 2 molarer Salzsäure, sowie ein dritter Ansatz aus 125 mg Naphthol-AS-Biphosphat (Merck, Deutschland) als Enzymsubstrat der alkalischen Phosphatase, gelöst in 1500 µl N,N-Dimethylformamid (Merck, Deutschland), hinzugegeben. Nach Einstellung der vollständigen Entwicklungslösung mit 2 molarer HCl auf den pH-Wert von 8,7 mittels pH-Meter (WTW, Weilheim, Deutschland) und nachfolgender Papierfiltration (Papierfilter 545 ½, Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) wurden die Schnittpräparate in der frisch hergestellten Entwicklungslösung für 30 Minuten auf einem Schüttler (Gerhard, Bonn, Deutschland) bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach zweimaligem Spülen mit Aqua dest. erfolgte anschließend eine fünfminütige Kerngegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die gefärbten Präparate wurden nach zehnminütigem Bläuen mit Leitungswasser in einer aufsteigenden 80-, 96- und 100-prozentigen Ethanolreihe dehydriert und für 5

Minuten in Xylol eingelegt. Abschließend wurden die Gewebeproben mit Pertex (Medite, Burgdorf, Deutschland) eingedeckt. Die gefärbten Gewebeproben konnten nun lichtmikroskopisch (Axioskop, Zeiss, Deutschland) untersucht werden.

2.4.1.2 StreptABC-Methode

Als zweite immunhistochemische Färbemethode wurde neben der APAAP-Methode die Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Complex-Technik (StreptABC) (modifiziert nach Hsu et al (18)) eingesetzt. Nach den oben beschriebenen Verfahren zur Antigendemaskierung und vor Beginn der Färbeschritte wurden die Schnittpräparate zunächst zur Blockierung der endogenen Peroxidase für 10 Minuten einem Gemisch aus 4 ml einer 30-prozentigen Wasserstoffperoxid-Lösung (Merck, Deutschland) in 200 ml Methanol (Merck, Deutschland) ausgesetzt. Für 60 Minuten erfolgte dann bei Raumtemperatur die Inkubation der Paraffinschnitte mit je 100 µl Primärantikörper, der mit einer Lösung aus 1-prozentigem bovinem Serum-Albumin (BSA, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) in TBS-Puffer verdünnt wurde. Nach dreimaligem Spülen mit Waschpuffer diente als Sekundärantikörper bei monoklonalen Primärantikörpern das biotinylierte Kaninchen-Anti-Maus-IgG E354 (DAKO, Hamburg, Deutschland), bei polyklonalen Primärantikörpern das biotinylierte Schwein-Anti-Kaninchen-IgG E353 (DAKO, Hamburg, Deutschland). Die Verdünnung des Sekundärantikörpers erfolgte jeweils im Verhältnis von 1:200 mit inaktiviertem, 1:10 in TBS-Puffer verdünntem Humanserum. Die Schnitte wurden 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert und anschließend mit Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss wurde ein Peroxidase-konjugierter Streptavidin-Biotin-Komplex (DAKO, Hamburg, Deutschland) hinzugefügt.

2.4.2 Kontrollen

Als Positiv-Kontrolle der Antikörper wurde formalinfixiertes und paraffineingebettetes Tonsillengewebe mitgefärbt. Als Negativkontrolle wurde der primäre Antikörper durch Serum ersetzt. Die Kontrollen wurden bei jedem Färbevorgang durchgeführt.

2.4.3 Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung

Die Standardfärbungen (CD5, CD3, CD20, CD23 und Cyclin D1) wurden ausgewertet nach positiv, negativ oder nicht beurteilbar.

Die Ergebnisse für Bax, Bcl2 und Caspase 8 (zytoplasmatische Färbung) wurden wie folgt eingeteilt (an Pagnano angelehnt (19)).:

- weniger als 5% positive Tumorzellen = negativ
- 5-50% positive Tumorzellen
- mehr als 50% positive Tumorzellen

Die p53-Färbung wurde wie folgt eingeteilt:

- keine Anfärbung = negativ
- unter 50% positive Tumorzellen
- mehr als 50% positive Tumorzellen

Die Zellen mit einer Kernanfärbung für die aktivierte Caspase 3 wurden in zehn Gesichtsfeldern mit 400-facher Vergrößerung (HPF) gezählt und Anzahl von positiven Zellen pro HPF ausgerechnet (an Soini and Pääkkä angelehnt (20)).

Folgende Kategorien wurden gebildet:

- weniger als 1 Zelle/HPF = negativ
- 1 bis 2 positive Zellen/HPF = leicht positiv
- mehr als 2 Zellen/HPF = stark positiv.

2.5 Statistische Untersuchung

Die statistische Analyse erfolgte mit der SPSS-Software (Version 11). Beim Vergleich der Expressionsraten dreier apoptotischer Marker in den histologischen Subtypen wurde die Analyse nach dem Likelihood-Quotienten durchgeführt; sollten nur zwei Marker verglichen werden, erfolgte dies mit dem Fisher-Test. Für Uni- und Multivarianzanalysen der apoptotischen Marker im Hinblick auf die Überlebenszeit wurde auf die Kaplan-Meier-Methode zurückgegriffen (21). Die Ki-67-Indices in den drei Stufen der aktivierten Caspase 3-Expression wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) verglichen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Konventionelle Färbungen

Die immunhistochemische Untersuchung der Studien ergab in allen Fällen (100%) eine Koexpression von CD20 und CD5. Bei 89 (96%) bzw. 91 (98%) Fällen fand sich eine fehlende Expression von CD23 bzw. CD3. Ein immunhistochemischer Nachweis der Cyclin D1 Expression gelang in 91 Fällen (98%). Nur Fälle mit einer eindeutigen Kernfärbung wurden als positiv gewertet.

3.2 Immunhistochemische Befunde der Apoptosemarker

3.2.1 p53-Expression

In nur 6,8% der Fälle (Tabelle 3) konnte eine p53-positive Kernreaktion in mehr als 50% der Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 1).

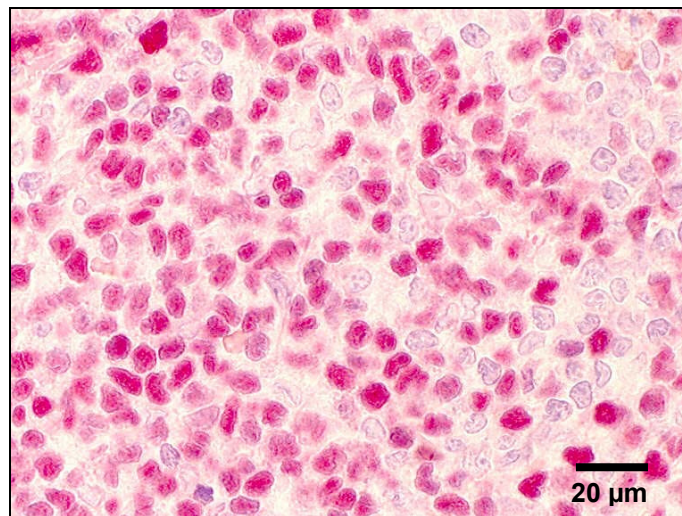


Abbildung 1: Immunhistochemischer Nachweis von **p53**, rot gefärbt sind positive Zellen. APAAP, Vergrößerung x400.

Blastoide Subtypen traten nicht häufiger auf in der Gruppe mit mehr als 50% positive Zellen, als in der Gruppe mit weniger als 50% bzw. keinen positiven Zellen (Tabelle 3, $p=0,180$). Verglichen mit den Patienten mit mehr als 50% p53-positiven Zellen (6,8%, 11,4 Monate mediane Überlebenszeit) hatten die Patienten mit weniger als 50% positiven Zellen bzw. keinen positiven Zellen eine deutlich längere Überlebenszeit (29,6%, 22,9 Monate mediane Überlebenszeit bzw. 63,9%, 37,7

Monate). Durch die Univarianz-Kaplan-Meier-Analyse konnte ein signifikanter Unterschied der Überlebenszeiten dieser drei Gruppen nachgewiesen werden ($p < 0,0001$, Abbildung 2).

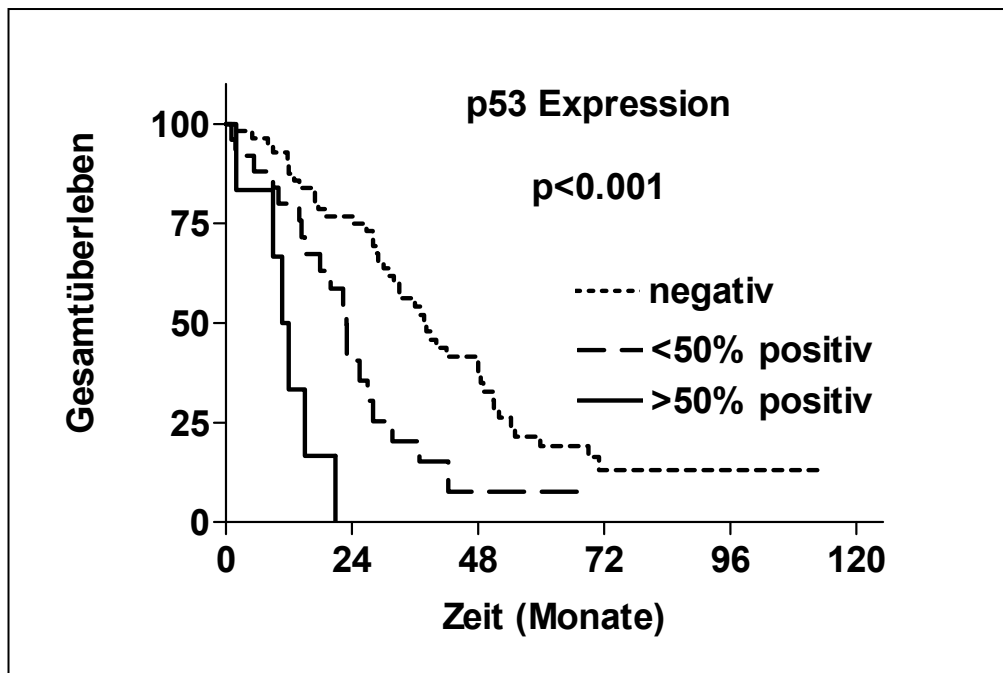


Abbildung 2: Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens bei unterschiedlicher p53-Expression.

3.2.2 Bcl-2-Expression

Alle Proben aus diesem Kollektiv exprimierten Bcl-2. Mehr als 50% positive Zellen zeigten sich in 74 Fällen (82,2%, Abbildung 3, Tabelle 3), und Patienten, deren Lymphome eine derart hohe Bcl-2 Expression aufwiesen, hatten einen günstigeren Verlauf (32,0 Monate mediane Überlebenszeit) gegenüber den Patienten mit weniger als 50% Expression (mediane Überlebenszeit 21 Monate, $p = 0,040$, Abbildung 4). Bezüglich der Bcl-2 Expression gab es keinen signifikanten Unterschied innerhalb der beiden histologischen Subtypen.

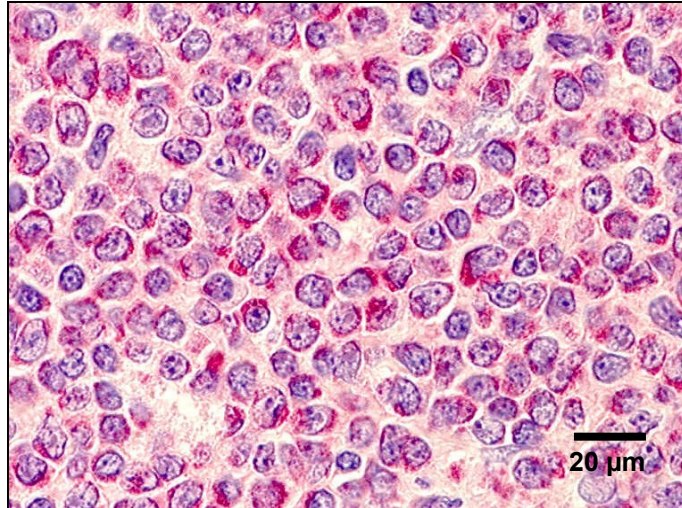


Abbildung 3: Immunhistochemischer Nachweis von **Bcl-2** im Mantelzell-Lymphom mit >50% positiven (rot gefärbt) Zellen. APAAP, Vergrößerung x400.

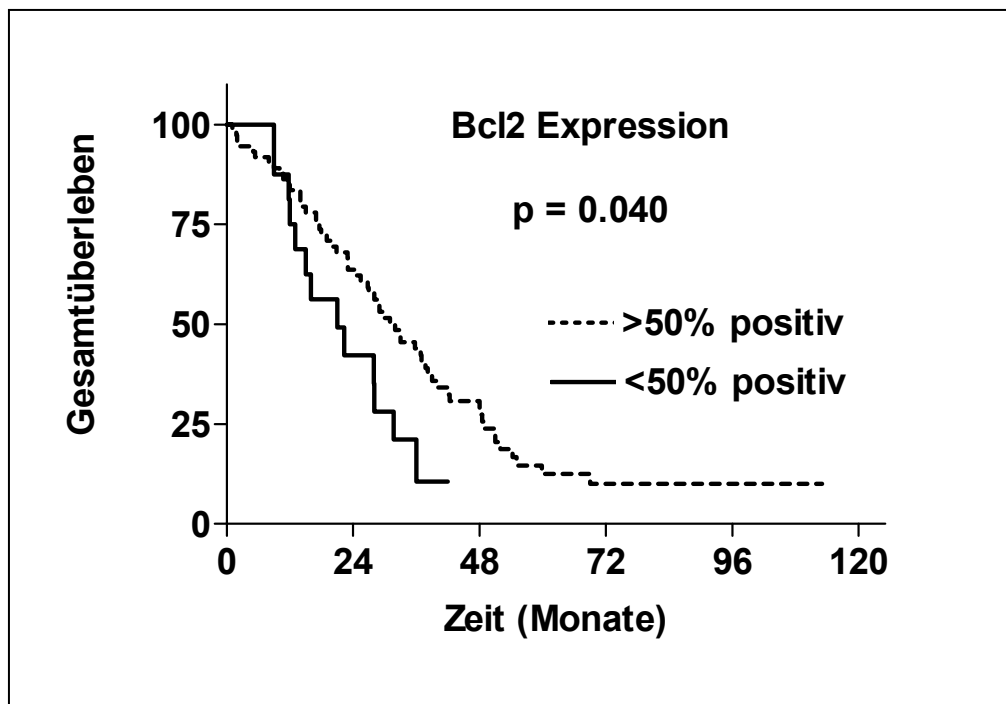


Abbildung 4: Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens bei unterschiedlicher Bcl-2-Expression.

3.2.3 Bax-Expression

Nur zwei Fälle waren Bax-negativ. Die Mehrheit der Fälle (53,6%) zeigten eine leichte Positivität, 44% eine starke Positivität (mehr als 50% aller Zellen, Tabelle 3, Abbildung 5). Die Bax-Expression stellt keinen prognostischen Faktor beim MCL dar

(Tabelle 3, Abbildung 6) $p=0,914$). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden histologischen Subtypen nachgewiesen werden ($p=0,384$, Tabelle 3).

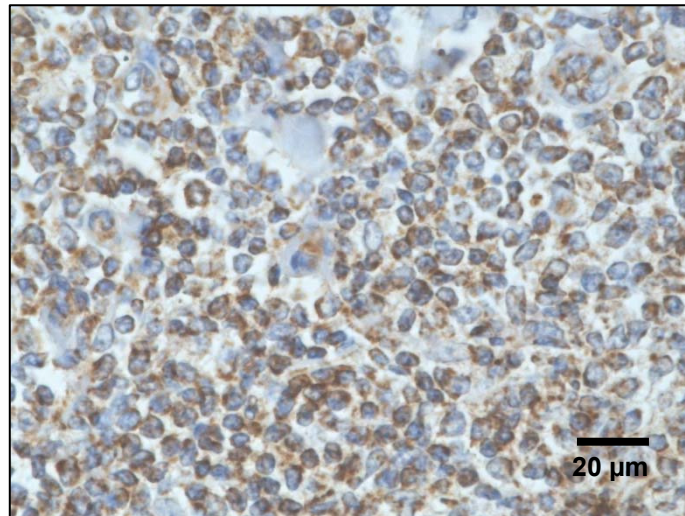


Abbildung 5: Immunhistochemischer Nachweis von **Bax** im Mantelzell-Lymphom mit >50% positiven (braun gefärbt) Zellen. ABC Färbung, Vergrößerung x400.

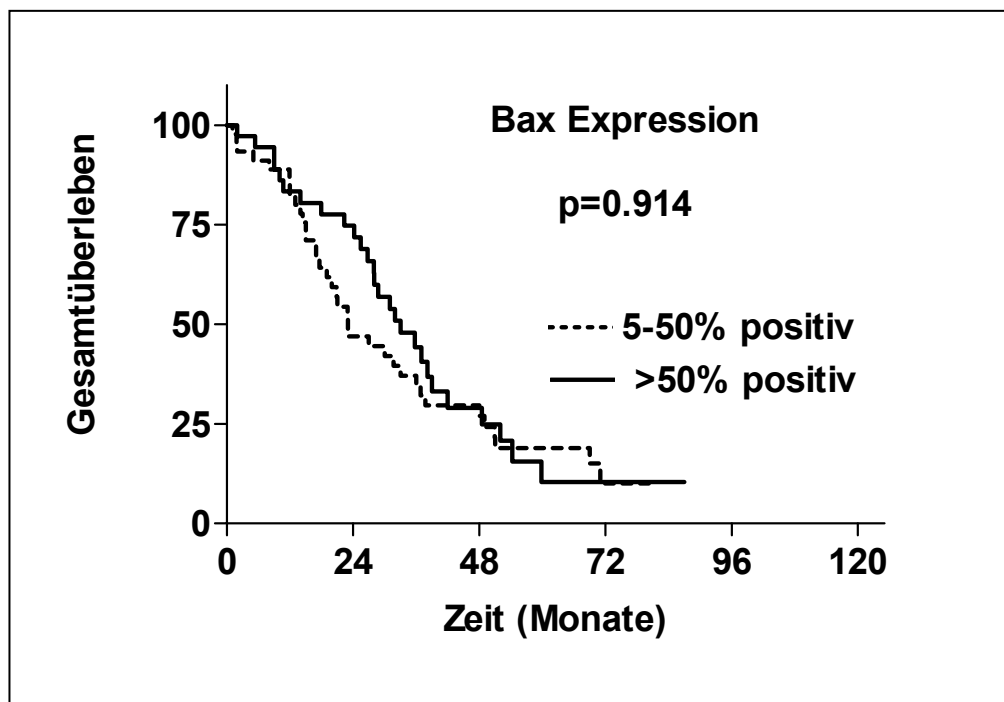


Abbildung 6: Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens bei unterschiedlicher Bax-Expression.

3.2.4 Caspase 8-Expression

In der Mehrheit der Fälle (56,6%) waren weniger als 50% der Zellen für Caspase 8 positiv, in 23,8% der Fälle waren mehr als 50% der Zellen positiv (Abbildung 7). Die Gesamtüberlebenszeit blieb von der Caspase 8-Expression unbeeinflusst (Tabelle 3, $p=0,423$). Eine unterschiedliche Expressionsrate bezüglich der histologischen Subtypen konnte nicht nachgewiesen werden (Tabelle 3, $p=0,494$).

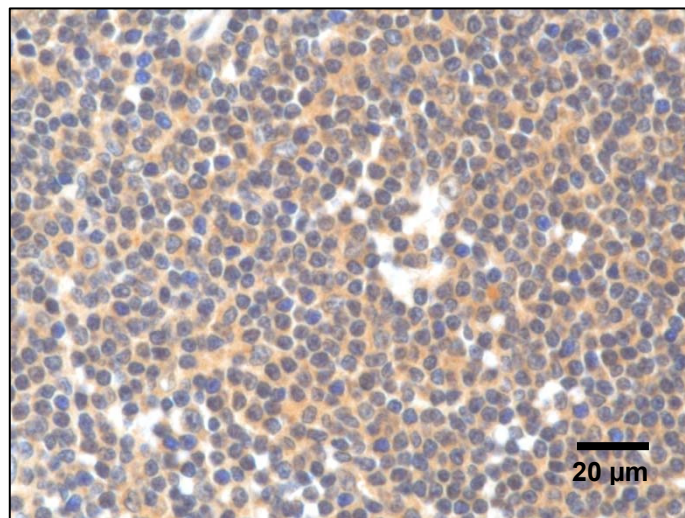


Abbildung 7: Immunhistochemischer Nachweis von **Caspase 8** im Mantelzell-Lymphom mit >50% positiven (braun gefärbt) Zellen. ABC Färbung, Vergrößerung x400.

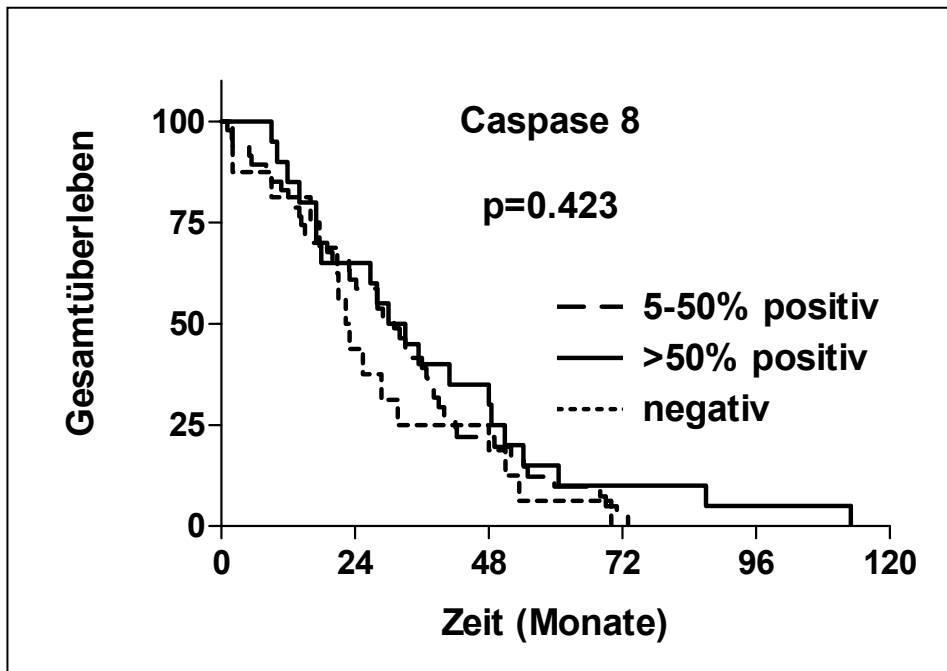


Abbildung 8: Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens bei unterschiedlicher Caspase 8-Expression.

3.2.5 Aktivierte Caspase 3-Expression

Die Minderheit der Fälle (44,0%) zeigten weniger als eine Caspase 3-positive Zelle/HPF. Bei 32,0% konnten eine bis zwei, bei 24,0% mehr als zwei positive Zellen/HPF identifiziert werden (Abbildung 9, Tabelle 3).

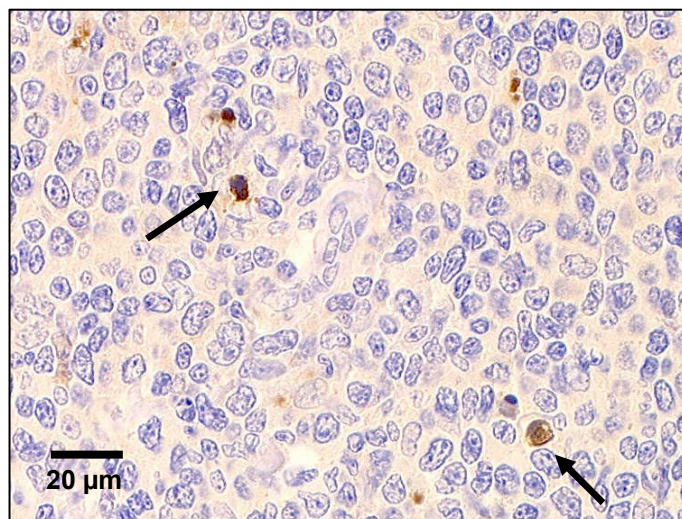


Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von **aktivierter Caspase 3** in einzelnen Tumorzellen (Pfeil), braun gefärbt sind positive Zellen. ABC, Vergrößerung x400.

In einer früheren Studie des gleichen Patientenkollektives wurde anhand der Ki-67-Expression die Proliferationsrate untersucht (21). Der Ki-67-Index der aktivierten Caspase 3-negativen Gruppe (Mittelwert 11,8%, Medianwert 10,3%, Spanne 1,2-33,4%) war signifikant niedriger als in der Gruppe mit einer bis zwei positiven Zellen/HPF (Mittelwert 21,8%, Medianwert 18,4%, Spanne 2,4-64,2%), und ebenfalls niedriger als in der Gruppe mit mehr als zwei positiven Zellen/HPF (Mittelwert 27,3%, Medianwert 24,4%, Spanne 2,4-52,3%, $p < 0,001$, Abbildung 10).

Verglichen mit Patienten mit einer bis zwei bzw. weniger als einer positiven Zelle/HPF, die eine mediane Gesamtüberlebenszeit von 27,0 bzw. 48,0 Monaten aufwiesen, hatten Patienten mit mehr als zwei positiven Zellen/HPF eine mediane Gesamtüberlebenszeit von 15,0 Monaten. Mittels Univarianz-Analyse der drei Kategorien der Caspase 3-Expression konnte in der Kaplan-Meier-Analyse ein signifikanter Unterschied der Gesamtüberlebenszeit nachgewiesen werden (Abbildung 12, Tabelle 3, $p < 0,001$). Es gab keinen signifikanten Unterschied der Expression innerhalb der histologischen Subtypen ($p = 0,331$).

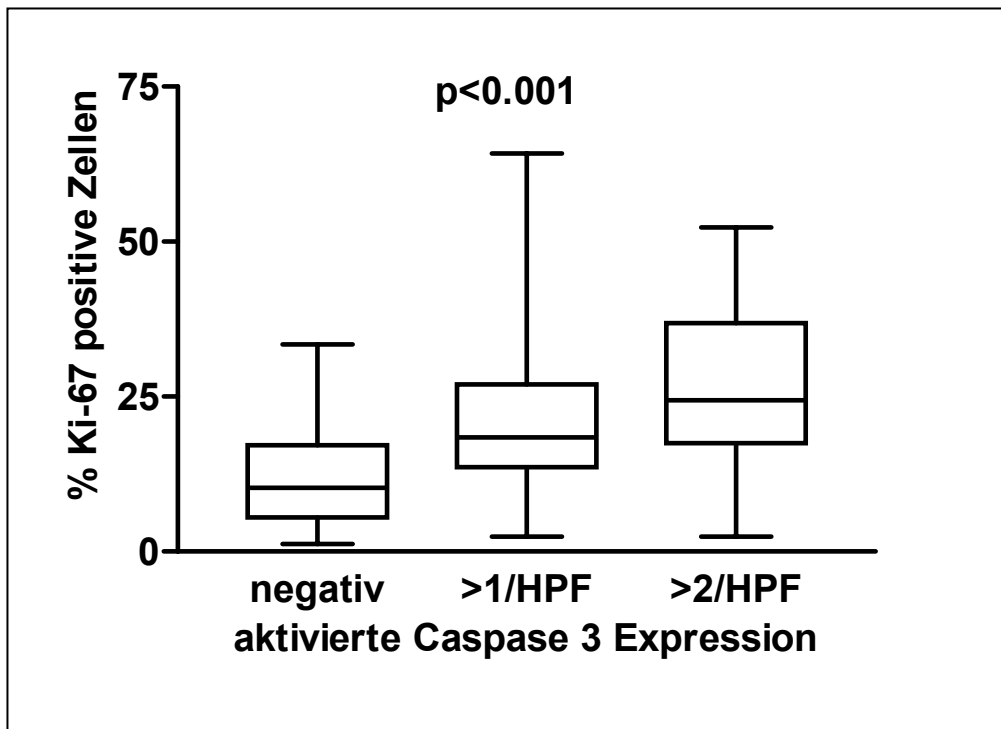


Abbildung 10: Ki-67 Index bei unterschiedlicher aktivierter Caspase 3-Expression.

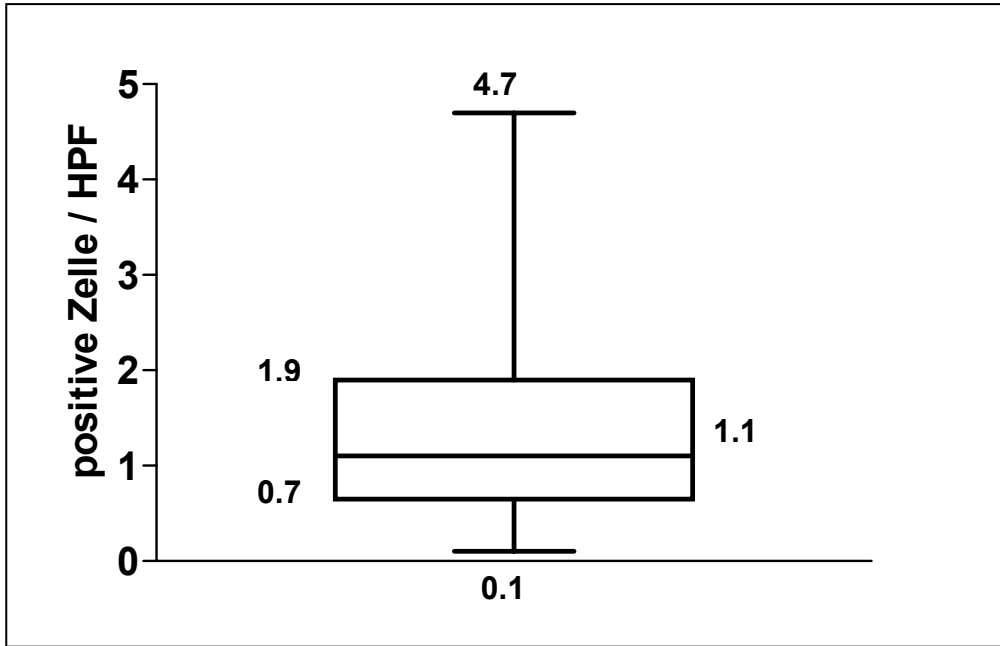


Abbildung 11: Box Plot Analyse der aktivierten Caspase 3-Expression mit Spannweite und Median.

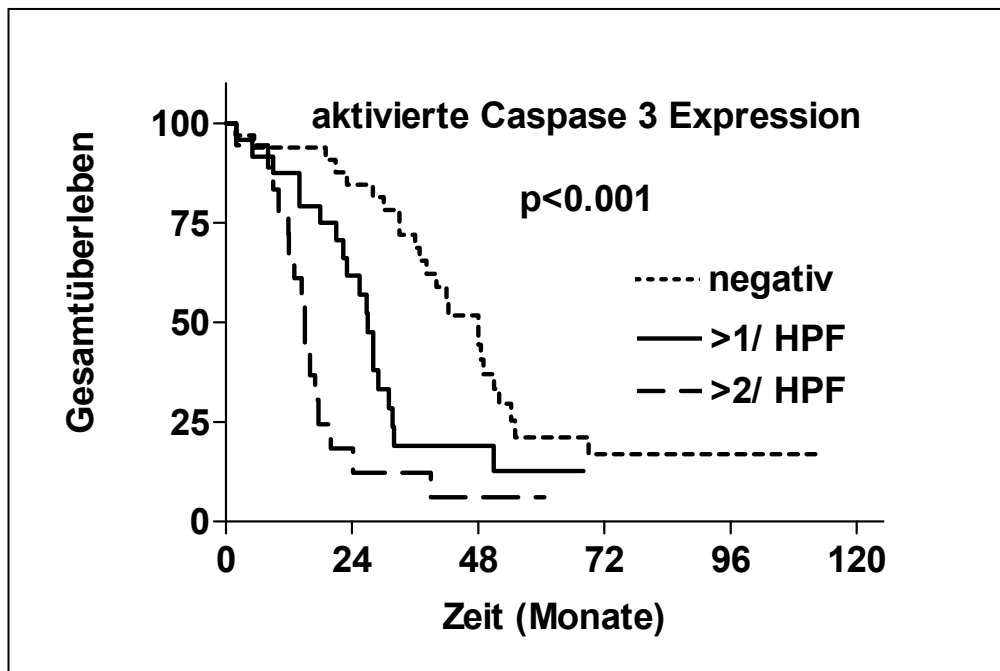


Abbildung 12: Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens bei unterschiedlicher aktivierter Caspase 3-Expression.

Tabelle 3: Univarianz-Cox-Regressionsanalyse der medianen Überlebenszeit und der Verteilung der histologischen Subtypen je nach Expression apoptotischer Proteine in 93 MCL-Fällen.

Antikörper	n (%)	Überlebenszeit		Histologischer Subtyp		
		Median (Monate)	p-Wert	Klassisch (n)	Blastoid (n)	p-Wert
<u>p53</u>						
Negativ	56 (63.6)	37.7		47	9	
<50%	26 (29.6)	22.9	<0.001	22	4	0.180 [†]
>50%	6 (6.8)	11.4		3	3	
<u>Bcl-2</u>						
Negativ	0 (0)					
5-50%	16 (17.8)	21.0	0.040	12	4	0.492*
>50%	74 (82.2)	32.0		61	13	
<u>Bax</u>						
Negativ	2 (2.4)	40.0		1	1	
5-50%	45 (53.6)	23.0	0.914	39	6	0.384*
>50%	37 (44.0)	32.0		29	8	
<u>Caspase 8</u>						
Negativ	17 (20.2)	22.7		12	5	
5-50%	47 (56.0)	31.0	0.423	39	8	0.494 [†]
>50%	20 (23.8)	31.5		17	3	
<u>aktivierte Caspase 3</u>						
Negativ	33 (44.0)	48.0		30	3	
1-2 Zellen/HPF	24 (32.0)	27.0	<0.001	19	5	0.331 [†]
>2 Zellen/HPF	18 (24.0)	15.0		14	4	

† = Likelihood-Quotient; * = Fisher-Test (zweiseitig)

Eine multivariate Analyse aller 93 Patienten war aufgrund unvollständiger klinischer Informationen nicht möglich. Aufgrund dessen wurden nur die p53 Expression und die aktivierte Caspase 3 Expression mit eingeschlossen. Somit waren 55 Patienten mit kompletten Daten auswertbar. Hier fand sich, dass die aktivierte Caspase 3 ($p < 0.001$), der Internationale Prognose Index (IPI, $p < 0.001$) sowie das Alter ($p = 0.036$) unabhängige Prognosefaktoren sind. Die LDH, das Geschlecht, das Vorhandensein von B-Symptomen, eine Knochenmarkinfiltration, das Stadium der Erkrankung, der Performance Status und eine extranodale Beteiligung haben keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben (Tabelle 4).

Tabelle 4: Uni- und Multivarianz-Cox-Regressionsanalyse von Apoptosemarkern und anderen prognostischen Faktoren bezüglich der Gesamtüberlebenszeit bei 55 von 93 Patienten mit MCL mit vollständigen klinischen Daten.

Merkmale	Referenz-Level	p-Wert	
		Univariat	Multivariat
p53	Negativ vs. <50% vs. >50%	0.001	0.202
Bcl2	5-50% vs. >50%	n.u.	n.u.
Bax	Negativ vs. 5-50% vs. >50%	n.u.	n.u.
Caspase 8	Negativ vs. 5-50% vs. >50%	n.u.	n.u.
Aktivierte Caspase 3*	Negativ vs. 1-2 Zellen/HPF vs. >2 Zellen/HPF	0.001	<0.001
Internationaler Prognose Index	0-1 vs. ≥ 2	<0.001	<0.001
LDH	Absoluter Wert	0.007	0.183
Alter	<60 vs. >60	<0.001	0.036
Geschlecht	Männlich vs. Weiblich	0.678	0.573
B-Symptome	Ja vs. Nein	0.597	0.643
Knochenmarksinfiltration	Ja vs. Nein	0.028	0.346
Stadium	1+2 vs. 3+4	0.277	0.964
Performance Status (WHO)	0+1 vs. ≥ 2	0.003	0.403
Extranodale Beteiligung	Ja vs. Nein	0.404	0.182

n.u. = nicht untersucht in der multivariaten Analyse.

4 DISKUSSION

Das Mantelzell-Lymphom wurde erstmals von Prof. Lennert (22) Mitte der 60er Jahre beschrieben. Es ist morphologisch den Zentrozyten sehr ähnlich und erhielt daher in der Kiel-Klassifikation zunächst den Namen Zentrozytisches Lymphom (englisch: centrocytic lymphoma), abgekürzt cc. Dieses Lymphom ist zytogenetisch durch die Translokation t(11;14) gekennzeichnet. Hierbei kommt es zu einer Umlagerung des Onkoproteins Bcl-1 vom Chromosom 11 in den Immunglobulinschwerkettenloкус auf das Chromosom 14 (6). Durch diese Translokation wird Bcl-1, welches auch Cyclin D1 genannt wird, vermehrt abgelesen und gebildet. Dies ist ein wichtiges Zellzyklusprotein, das im Zellzyklus den Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase reguliert. Durch die Überexpression wird der Eintritt der Zelle in die S-Phase gefördert.

Klinisch ist die Erkrankung durch einen ungünstigen Verlauf mit einer medianen Überlebenszeit von 3-4 Jahren gekennzeichnet (4). Als klinische Prognosefaktoren sind eine hohe LDH, ein schlechter Performance Status, ein fortgeschrittenes Stadium und ein hohes Lebensalter weitgehend anerkannt (4, 23). Den Stellenwert anderer Faktoren hinsichtlich ihrer prognostischen Aussagekraft wie der Internationale Prognose Index (IPI), die Zytologie, das Wachstumsmuster und hohe Proliferationsindices (Ki-67 und Mitose-Index) wurde lange Zeit in der Literatur sehr diskrepanz diskutiert. Die klinische Bedeutung proliferationsassoziiierter Proteine wie Ki-67, Repp86, Topoisomerase II alpha und MCM6 beim MCL ist von der Kieler Arbeitsgruppe (Prof. Parwaresch und PD Dr. Schrader) untersucht worden (7-10). Diese Daten sind übereinstimmend mit Genexpressionsanalysen, welche zeigen konnten, dass der Kontrollverlust des Zellzyklus sowie eine hohe Proliferation mit einer schlechten Prognose korrelieren (11).

Zusätzlich zur Zellproliferation spielt der programmierte Zelltod, die Apoptose, eine Schlüsselrolle im Tumorwachstum. Eine erhöhte Proliferationsrate konnte beim Mantelzell-Lymphom als Risikofaktor für einen aggressiveren Verlauf nachgewiesen werden (7, 10, 21, 24). Andererseits wurde der Einfluss verschiedener apoptoseassoziierten Proteine in malignen Lymphomen in mehreren Studien untersucht (19, 20, 25-28). Obwohl die Expression apoptoseassoziiierter Gene auf mRNA-Ebene verändert sein können (29, 30), sind Untersuchungen apoptoseassoziiierter Proteine an Biopsiematerial und eine klinische Korrelation bis

jetzt nicht durchgeführt worden. Aus dem Grund ist es interessant zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression apoptoseassoziiierter Proteine und dem klinischen Verlauf besteht. Zu diesem Zweck wurde ein Patientenkollektiv ausgewählt, welches klinisch gut charakterisiert ist und an dem schon proliferationsassoziierte Proteine untersucht wurden (21, 9, 8). Aufgrund der langen Nachsorge, der passenden Patientenzahl und der gleichmäßigen Behandlung innerhalb zweier Therapiestudien eignet sich diese Kohorte gut für die Untersuchung von Risikofaktoren beim Mantelzell-Lymphom. Dieses wurde in einem Kommentar von Korkolopoulou und Vassilakopoulos (31) bestätigt.

Als Antwort auf zellulären Stress, beispielsweise auf eine DNA-Schädigung, erfolgt eine Hochregulation des Transkriptionsfaktors p53. Beim MCL ist eine hohe p53-Expression mit einem schlechteren klinischen Verlauf assoziiert (32-34). Es ist unklar, ob eine Überexpression von p53 hauptsächlich beim blastoiden Subtyp vorkommt (35-37). In unserer Untersuchung waren blastoide Subtypen mit einer p53-Überexpression nicht überproportional häufig vertreten (mehr als 50% positive Zellen, Tabelle 3, $p=0,180$). In unserer Untersuchung konnten wir die prognostische Relevanz der p53-Expression beim Mantelzell-Lymphom bestätigen. Patienten mit mehr als 50% p53-positiven Zellen hatten jedoch eine kürzere Gesamtüberlebenszeit (6,8%, 11,4 Monate) als Patienten mit weniger als 50% (29,6%; 22,9 Monaten) bzw. gar keinen positiven Zellen (63,9%, 37,7 Monate, $p<0,0001$, Abbildung 2). Ob beim MCL ein Zusammenhang zwischen p53-Expression und Mutationen oder Deletionen besteht, ist unklar. Es scheint jedoch aufgrund der fehlenden Korrelation zwischen der Menge an p53-mRNA und Mutationen oder Deletionen im p53-Gen sehr unwahrscheinlich, dass eine Korrelation zwischen genetischer Änderung und Proteinexpression nachgewiesen werden wird (13). Deswegen könnte die p53-Expression einen vom p53-Genstatus unabhängigen prognostischen Faktor darstellen.

Die Bcl-2-Familie spielt eine Rolle in der intrinsischen, mitochondrialen Apoptose-Kaskade. Die Protein-Familie kann in zwei Gruppen unterteilt werden: einerseits in Apoptose-Antagonisten wie Mcl-1, Bcl-x und Bcl2, und andererseits in Agonisten wie Bad und Bax. Das Verhältnis von Apoptose-Agonisten zu –Antagonisten bestimmt letztendlich die Apoptose-Bereitschaft einer Zelle (38). Eine Überexpression von Bcl-2 konnte in bis zu 40% diffuser großzelliger B-Zell-Lymphome nachgewiesen werden

und ist bei diesen Lymphomen mit einer schlechteren Prognose assoziiert (39 bis 42). Beim Mantelzell-Lymphom ist eine Genüberexpression von Bcl-2 häufig nachweisbar, obwohl die klinische Relevanz dieses Ergebnisses unklar war (25, 29, 43, 44). Auch hier konnte eine Bcl-2-Überexpression in allen Fällen nachgewiesen werden. Anders als beim diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom hatten Fälle mit einer starken Bcl-2-Überexpression (mehr als 50% der Fälle) einen günstigeren Verlauf (mediane Überlebenszeit 32,0 Monate vs. 21 Monate, $p=0,040$, Abbildung 4). Wir konnten zum ersten Mal zeigen, dass eine erhöhte Bcl-2-Expression einen prognostisch günstigen Faktor beim Mantelzell-Lymphom darstellt.

Die klinische Relevanz der Bax-Expression in malignen Lymphomen ist unklar (19, 27, 45, 46). In wenigen Studien kleiner MCL-Kollektive wurde die Bax-Expression mittels immunhistochemischer Methoden untersucht (19, 25, 47). Den Ergebnissen zu diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen entsprechend zeigte unsere Studie, dass die Bax-Expression keinen Einfluss auf die Prognose beim MCL hat (Tabelle 3, $p=0,914$, Abbildung 6) (19, 47). Zusammengefasst beeinflusst die Expression des pro-apoptotischen Bax den klinischen Verlauf beim MCL nicht.

Apoptoseassoziierte Effektor-Proteine sind beispielsweise Caspase 8 und Caspase 3. Die Caspasen bilden eine Proteasen-Familie, welche beim Menschen mindestens 11 Mitglieder ausmacht, die in der Degradations-Phase der Apoptose aktiviert werden (48). Die meisten Fälle unseres Kollektives (56,6%) hatten weniger als 50% Caspase 8-positive Zellen, und es bestand kein Zusammenhang zwischen der Caspase 8-Expression und der Gesamtüberlebenszeit (Tabelle 3, $p=0,423$, Abbildung 8).

Caspase 8 kann Caspase 3 aktivieren, Letzteres liegt im Zytoplasma gesunder Zellen als Proenzym vor. Nach Aktivierung der Caspase 3 erfolgt eine Verlagerung in den Zellkern, wo das Enzym eine Schlüsselrolle in der gemeinsamen Endstrecke der Apoptose spielt (20). In einer neuen Studie (49) wurden 52 Fälle von Non-Hodgkin-Lymphomen immunhistochemisch auf unter anderem aktivierte Caspase 3 untersucht, und sämtliche fünf Mantelzell-Lymphom-Fälle waren negativ. Dagegen waren in einer anderen Studie (26) von 11 Mantelzell-Lymphom-Fällen acht für Caspase 3 positiv. Mit einem Primärantikörper, der nur die aktivierte, nukleäre Form

des Enzyms markiert, ließen sich in unserer Studie nur wenige morphologisch intakte Zellkerne, dafür nahezu alle apoptotischen Zellkerne anfärben (Abbildung 9). Die Färbung für aktivierte Caspase 3 scheint deswegen auch als zuverlässiger Apoptose-Marker beim Mantelzell-Lymphom einsetzbar zu sein. 44,0% der Fälle hatten weniger als eine positive Zelle/HPF, 32,0% eine bis zwei Zellen, und 24,0% mehr als zwei positive Zellen/HPF (Tabelle 3). Letztere Patienten hatten eine mediane Überlebenszeit von 15,0 Monaten, deutlich kürzer als Patienten mit einer bis zwei (27,0 Monate) oder keiner positiven Zelle/HPF (48,0 Monate, $p < 0,001$, Abbildung 12, Tabelle 3,4). Interessanterweise war die aktivierte Caspase 3-Expression bezüglich des histologischen Subtyps gleich ($p = 0,331$). Die Ergebnisse zeigen, dass eine hohe Apoptoserate, an der Expression aktivierter Caspase 3 gemessen, einen ungünstigen prognostischen Faktor darstellt.

Caspase 8 kann in der Apoptose-Kaskade weiter abwärts gelegene Caspasen, wie die Caspase 3, aktivieren und spielt eine Rolle in der anfänglichen Phase der Apoptose-Auslösung. Entsprechend ist in dieser Studie die Zahl Caspase 8-positiver Zellen deutlich höher als die Zahl Caspase 3-positiver Zellen (Tabelle 3). Des Weiteren spiegelt die aktivierte Caspase 3-Expression die Zahl apoptotischer und prä-apoptotischer Zellen beim MCL genauer wider. Diese Ergebnisse basieren auf Präparate, die vor Beginn einer Behandlung gewonnen sind.

Zusätzlich konnte anhand der Ki-67-Indices gezeigt werden, dass Fälle mit einem hohen Apoptose-Index (hohe Caspase 3-Expression) auch eine hohe Proliferationsrate hatten (Abbildung 10).

Aufgrund der eingeschränkten Menge klinischer Daten konnte die Multivarianz-Analyse nur für aktivierte Caspase 3 und p53 durchgeführt werden. Diese apoptoseassoziierten Proteine zeigten die höchstsignifikanten Werte in der Univarianzanalyse (beide $p < 0,001$). Von 93 Patienten wurden 55 in die Multivarianzanalyse aufgenommen. Die aktivierte Caspase 3-Expression stellt einen unabhängigen, anderen Apoptose-Markern überlegenen prognostischen Faktor dar, der dem internationalen prognostischen Index gleich ist ($p < 0,001$, Tabelle 4). In der Multivarianzanalyse konnte der p53-Expression keine prognostische Aussagekraft zugeschrieben werden ($p = 0,202$).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die p53-Expression als prognostischer Marker beim Mantelzell-Lymphom eine Rolle spielt, jedoch ist die Expression der aktivierten Caspase 3 aussagekräftiger. Die Apoptoserate anhand der Expression aktivierter Caspase 3 zu messen, scheint ein wertvoller prognostischer Marker bezüglich der Überlebenszeit von Patienten mit MCL zu sein, und kann mit dem internationalen prognostischen Index gleichgestellt werden. Die prognostische Wertigkeit der aktivierten Caspase 3 Expression zeigt sich darin, dass nicht nur in der univariaten Analyse sondern auch in der multivariaten Analyse dieser Prognosefaktor statistisch hoch signifikant ist. Beim MCL besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Expression aktivierter Caspase 3 und der Proliferationsrate. Diese scheinen auf biologischer Ebene eng miteinander verflochten zu sein und sind mit einem klinisch ungünstigeren Verlauf assoziiert.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Neben der Zellteilung, der Proliferation, spielt der programmierte Zelltod, die Apoptose, bei vielen Tumorerkrankungen als Prognosefaktor eine wichtige Rolle. Bei der Apoptose wird auf molekularer Ebene sowohl ein extrinsischer (Liganden-gebundener) als auch ein intrinsischer (mitochondrialer) Auslösemechanismus beschrieben. Es gibt nur wenige Daten über die Expression apoptotischer Proteine beim Mantelzell-Lymphom und deren Bedeutung für den klinischen Verlauf.

In dieser Arbeit wurde die Expression von p53, einem Indikator einer DNA-Schädigung, von Regulationsproteinen des intrinsischen Weges (Bcl2 und Bax) sowie von Effektor-Proteinen der Apoptose (Caspase 8 und aktivierte Caspase 3) bei 93 Patienten mit einem Mantelzell-Lymphom untersucht und mit dem klinischen Verlauf verglichen.

Früheren Arbeiten entsprechend korrelierte eine erhöhte Expression von p53 mit einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit. Im Gegensatz zum diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom konnten günstigere Verläufe bei Patienten mit einer erhöhten Expression des anti-apoptotisch wirkenden BCL2 nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte sich eine hohe Apoptose-Rate vor Therapiebeginn, an der Expression aktivierter Caspase 3 gemessen, als einen sehr zuverlässigen Marker für ungünstigere Verläufe ($p < 0,001$). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Apoptose-Rate an sich einen wichtigen prognostischen Marker beim MCL darstellt.

In dieser Untersuchung konnte erstmalig an einem großen Patientenkollektiv mit einem Mantelzell-Lymphom gezeigt werden, dass der immunhistochemische Nachweis der Expression von aktivierter Caspase 3 ein unabhängiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben ist.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Lennert K, Mohri N, Stein H, Kaiserling E (1975): The histopathology of malignant lymphomata. *Br J Haematol*, 31 Suppl: 193-203.
- (2) Brittinger G, Bartels H, Common H, Duhmke E, Fulle HH, Gunzer U, Gyenes T, Heinz R, König E, Meusers P (1984): Clinical and prognostic relevance of the Kiel classification of non-Hodgkin lymphomas results of a prospective multicenter study by the Kiel Lymphoma Study Group. *Hematol Oncol* 2(3): 269-306.
- (3) Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (2001): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon.
- (4) Meusers P, Hense J, Brittinger G (1997): Mantle cell lymphoma: diagnostic criteria, clinical aspects and therapeutic problems. *Leukemia*, 11 Suppl 2: 60-64.
- (5) Banks PM, Chan J, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Gatter K, Grogan TM, Harris NL, Isaacson PG, Jaffe ES (1992): Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. *Am J Surg Pathol*, 16(7): 637-640.
- (6) Williams ME, Meeker TC, Swerdlow SH (1991): Rearrangement of the chromosome 11 bcl-1 locus in centrocytic lymphoma: analysis with multiple breakpoint probes. *Blood*, 15, 78(2): 493-498.
- (7) Tiemann M, Schrader C, Klapper W, Dreyling MH, Campo E, Norton A, Berger F, Kluin P, Ott G, Pileri S, Pedrinis E, Feller AC, Merz H, Janssen D, Hansmann ML, Krieken H, Moller P, Stein H, Unterhalt M, Hiddemann W, Parwaresch R (2005): Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol*, 131(1): 29-38.
- (8) Schrader C, Janssen D, Meusers P, Brittinger G, Siebmann JU, Parwaresch R, Tiemann M (2005): Repp86: a new prognostic marker in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol*, 75(6): 498-504.
- (9) Schrader C, Janssen D, Klapper W, Siebmann JU, Meusers P, Brittinger G, Kneba M, Tiemann M, Parwaresch R (2005): Minichromosome maintenance protein 6, a proliferation marker superior to Ki-67 and independent predictor of survival in patients with mantle cell lymphoma. *Br J Cancer*, 17; 93(8): 939-945.
- (10) Raty R, Franssila K, Joensuu H, Teerenhovi L, Elonen E (2002): Ki-67 expression level, histological subtype, and the International Prognostic Index as outcome predictors in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol*, 69(1): 11-20.

- (11) Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, Gascoyne RD, Grogan TM, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Chiorazzi M, Giltzane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Henrickson S, Yang L, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Montserrat E, Bosch F, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Fisher RI, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Staudt LM (2003): The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell*, 3(2): 185-197.
- (12) Ott G, Kalla J, Ott MM, Schryen B, Katzenberger T, Muller JG, Muller-Hermelink HK (1997): Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. *Blood*, 89(4): 1421-1429.
- (13) Greiner TC, Dasgupta C, Ho VV, Weisenburger DD, Smith LM, Lynch JC, Vose JM, Fu K, Armitage JO, Brazier RM, Campo E, Delabie J, Gascoyne RD, Jaffe ES, Muller-Hermelink HK, Ott G, Rosenwald A, Staudt LM, Im MY, Karaman MW, Pike BL, Chan WC, Hacia JG (2006): Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(7): 2352-2357.
- (14) Meusers P, Engelhard M, Bartels H, Binder T, Fulle HH, Gorg K, Gunzer U, Havemann K, Kayser W, Konig E (1989): Multicentre randomized therapeutic trial for advanced centrocytic lymphoma: anthracycline does not improve the prognosis. *Hematol Oncol*, 7(5): 365-380.
- (15) Campo E, Raffeld M, Jaffe ES (1999): Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol*, 36(2): 115-127.
- (16) Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J (1992): Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*, 168(4): 357-363.
- (17) Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY (1984): Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem*, 32(2): 219-229.
- (18) Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981): Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29(4): 577-580.
- (19) Pagnano KB, Silva MD, Vassallo J, Aranha FJ, Saad ST (2002): Apoptosis-regulating proteins and prognosis in diffuse large B cell non-Hodgkin's lymphomas. *Acta Haematol*, 107(1): 29-34.

- (20) Soini Y, Paakko P (1999): Apoptosis and expression of caspases 3, 6 and 8 in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *APMIS*, 107(11): 1043-1050.
- (21) Schrader C, Meusers P, Brittinger G, Teymoortash A, Siebmann JU, Janssen D, Parwaresch R, Tiemann M (2004): Topoisomerase II alpha expression in mantle cell lymphoma: a marker of cell proliferation and a prognostic factor for clinical outcome. *Leukemia*, 18(7): 1200-1206.
- (22) Tolksdorf G, Stein H, Lennert K (1980): Morphological and immunological definition of a malignant lymphoma derived from germinal-centre cells with cleaved nuclei (centrocytes). *Br J Cancer*, 41(2): 168-182.
- (23) Zucca E, Stein H, Coiffier B (1994): European Lymphoma Task Force (ELTF): Report of the workshop on Mantle Cell Lymphoma (MCL). *Ann Oncol*, 5(6): 507-511.
- (24) Velders GA, Kluin-Nelemans JC, de BC, Hermans J, Noordijk EM, Schuurung E, Kramer MH, Van DW, Rahder JB, Kluin PM, van KJ (1996): Mantle-cell lymphoma: a population-based clinical study. *J Clin Oncol*, 14(4): 1269-1274.
- (25) Schlaifer D, Krajewski S, Galoin S, Rigal-Huguet F, Laurent G, Massip P, Pris J, Delsol G, Reed JC, Brousset P (1996): Immunodetection of apoptosis-regulating proteins in lymphomas from patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Am J Pathol*, 149(1): 177-185.
- (26) Krajewski S, Gascoyne RD, Zapata JM, Krajewska M, Kitada S, Chhanabhai M, Horsman D, Berean K, Piro LD, Fugier-Vivier I, Liu YJ, Wang HG, Reed JC (1997): Immunolocalization of the ICE/Ced-3-family protease, CPP32 (Caspase-3), in non-Hodgkin's lymphomas, chronic lymphocytic leukemias, and reactive lymph nodes. *Blood*, 89(10): 3817-3825.
- (27) Sohn SK, Jung JT, Kim DH, Kim JG, Kwak EK, Park T, Shin DG, Sohn KR, Lee KB (2003): Prognostic significance of bcl-2, bax, and p53 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol*, 73(2): 101-107.
- (28) Arai M, Sasaki A, Saito N, Nakazato Y (2005): Immunohistochemical analysis of cleaved caspase-3 detects high level of apoptosis frequently in diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system. *Pathol Int*, 55(3): 122-129.
- (29) Martinez N, Camacho FI, Algara P, Rodriguez A, Dopazo A, Ruiz-Ballesteros E, Martin P, Martinez-Climent JA, Garcia-Conde J, Menarguez J, Solano F, Mollejo M, Piris MA (2003): The molecular signature of mantle cell lymphoma reveals multiple signals favoring cell survival. *Cancer Res*, 63(23): 8226-8232.
- (30) Korz C, Pscherer A, Benner A, Mertens D, Schaffner C, Leupolt E, Dohner H, Stilgenbauer S, Lichter P (2002): Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. *Blood*, 99(12): 4554-4561.
- (31) Korkolopoulou P, Vassilakopoulos TP (2004): Topoisomerase II alpha as a prognostic factor in mantle cell lymphoma. *Leukemia*, 18(8): 1347-1349.

- (32) Greiner TC, Moynihan MJ, Chan WC, Lytle DM, Pedersen A, Anderson JR, Weisenburger DD (1996): p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood*, 87(10): 4302-4310.
- (33) Louie DC, Offit K, Jaslow R, Parsa NZ, Murty VV, Schluger A, Chaganti RS (1995): p53 overexpression as a marker of poor prognosis in mantle cell lymphomas with t(11;14)(q13;q32). *Blood*, 86(8): 2892-2899.
- (34) Hernandez L, Fest T, Cazorla M, Teruya-Feldstein J, Bosch F, Peinado MA, Piris MA, Montserrat E, Cardesa A, Jaffe ES, Campo E, Raffold M (1996): p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood*, 87(8): 3351-3359.
- (35) Ott G, Kalla J, Hanke A, Muller JG, Rosenwald A, Katzenberger T, Kretschmar R, Kreipe H, Muller-Hermelink HK (1998): The cytomorphological spectrum of mantle cell lymphoma is reflected by distinct biological features. *Leuk Lymphoma*, 32(1-2): 55-63.
- (36) Zoldan MC, Inghirami G, Masuda Y, Vandekerckhove F, Raphael B, Amorosi E, Hymes K, Frizzera G (1996): Large-cell variants of mantle cell lymphoma: cytologic characteristics and p53 anomalies may predict poor outcome. *Br J Haematol*, 93(2): 475-486.
- (37) Izban KF, Alkan S, Singleton TP, Hsi ED (2000): Multiparameter immunohistochemical analysis of the cell cycle proteins cyclin D1, Ki-67, p21WAF1, p27KIP1, and p53 in mantle cell lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*, 124(10): 1457-1462.
- (38) Yang E, Korsmeyer SJ (1996): Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*, 88(2): 386-401.
- (39) Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay MF, Briere J, Lavignac C, Fillet G, Salles G, Marolleau JP, Diebold J, Reyas F, Gaulard P (1996): Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood*, 87(1): 265-272.
- (40) Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewska M, Horsman DE, Tolcher AW, O'Reilly SE, Hoskins P, Coldman AJ, Reed JC, Connors JM (1997): Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 90(1): 244-251.
- (41) Wilson WH, Teruya-Feldstein J, Fest T, Harris C, Steinberg SM, Jaffe ES, Raffold M (1997): Relationship of p53, bcl-2, and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*, 89(2): 601-609.
- (42) Kramer MH, Hermans J, Parker J, Krol AD, Kluin-Nelemans JC, Haak HL, van Groningen K, Van Krieken JH, de Jong D, Kluin PM (1996): Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol*, 14(7): 2131-2138.

- (43) Tracey L, Perez-Rosado A, Artiga MJ, Camacho FI, Rodriguez A, Martinez N, Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Martinez B, Cuadros M, Garcia JF, Lawler M, Piris MA (2005): Expression of the NF-kappaB targets BCL2 and BIRC5/Survivin characterizes small B-cell and aggressive B-cell lymphomas, respectively. *J Pathol*, 206(2): 123-134.
- (44) Swerdlow SH, Utz GL, Williams ME (1993): Bcl-2 protein in centrocytic lymphoma; a paraffin section study. *Leukemia*, 7(9): 1456-1458.
- (45) Bai M, Skyrilas A, Agnantis NJ, Kamina S, Tsanou E, Grepis C, Galani V, Kanavaros P (2004): Diffuse large B-cell lymphomas with germinal center B-cell-like differentiation immunophenotypic profile are associated with high apoptotic index, high expression of the proapoptotic proteins bax, bak and bid and low expression of the antiapoptotic protein bcl-xl. *Mod Pathol*, 17(7): 847-856.
- (46) Gascoyne RD, Krajewska M, Krajewski S, Connors JM, Reed JC (1997): Prognostic significance of Bax protein expression in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 90(8): 3173-3178.
- (47) Martini M, D'Alo F, Pierconti F, Ricci R, Capelli A, Leone G, Larocca LM (2000): Bax mutations are an infrequent event in indolent lymphomas and in mantle cell lymphoma. *Haematologica*, 85(10): 1019-1023.
- (48) Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996): Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87(2): 171.
- (49) Xerri L, Palmerini F, Devilard E, Defrance T, Bouabdallah R, Hassoun J, Birg F (2000): Frequent nuclear localization of ICAD and cytoplasmic co-expression of caspase-8 and caspase-3 in human lymphomas. *J Pathol*, 192(2): 194-202.

DANKSAGUNG

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. habil. C. Schrader gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die Organisation eines Arbeitsplatzes und des Untersuchungsgutes im Institut für Hämatopathologie/Lymphknotenregister Kiel sowie für seine stetige Unterstützung und Betreuung bei dieser Dissertation.

Mein ganz spezieller Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. R. Parwaresch, ehemaliger Direktor des Instituts für Hämatopathologie und Lymphknotenregisters Kiel, welcher am 01.11.2005 unerwartet verstarb. Seine uneingeschränkte, stetige Unterstützung und Ratschläge haben zum Gelingen der vorgestellten Untersuchungen beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Dr. M. Kneba, Direktor der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik, UKSH Campus Kiel danke ich für die Möglichkeit die vorliegende Dissertation in seiner Klinik durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. P. Meusers und Herrn Prof. Dr. G. Brittinger, ehemaliger Direktor der Klinik für Hämatologie des Universitätsklinikums Essen danke ich für die Unterstützung nicht nur bei der Bereitstellung aller klinischen Daten der Therapiestudien, sondern auch bei der Auswertung der Ergebnisse.

Herrn PD Dr. W. Klapper, kommissarischer Direktor Instituts für Hämatopathologie und Lymphknotenregisters Kiel und Herrn Dr. D. Janssen bin ich aufgrund seiner Hilfe insbesondere bei der Anfertigung des Dissertation zu großem Dank verpflichtet.

Ich danke Herrn J. U. Siebmann für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Herrn PD. Dr. A. Teymoortash danke für seine Unterstützung bei der Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen.

Ein besonderer Dank gilt den medizinisch technischen Assistentinnen und Assistenten Michael Weiss, Monika Hauberg und Christiane Mäder für die engagierte Hilfe.

Die der Dissertationsschrift zugrunde liegenden Arbeit wurden unterstützt von der Europäischen Union (Biomed II Grant BMH4-CT-96-1539 und European Framework 5 Grant QLG1-CT-2000-00687).

Ein letzter herzlicher Dank gilt meiner Freundin Sanne sowie meinen Eltern und meinem Bruder für Ihre stetige uneingeschränkte Unterstützung.

LEBENS LAUF**Persönliche Daten:**

Name: Paul Christian Coumine Riis
 Geburtsdatum/Ort: 08. Januar 1980, Florenz
 Staatsangehörigkeit: Dänisch
 Familienstand: Ledig
 Religion: Griechisch-orthodox
 Sprachliche Kenntnisse: Dänisch, Französisch (Muttersprachen)
 Deutsch, Englisch (Fremdsprachen)

Schulbildung:

1985-1997 Lycée Français de Copenhague, Kopenhagen

Hochschulausbildung:

1997-1998 Sprachkurs Deutsch am Lektorat Deutsch als
 Fremdsprache, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
 1998-2005 Studium der Humanmedizin an der
 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
 2004-2005 Praktisches Jahr am UKSH, Campus Kiel (Innere Medizin,
 Neurochirurgie, Chirurgie)
 12/2005 Approbation als Arzt

Berufstätigkeit:

Seit 01/2006 Assistenzarzt an der Neurochirurgischen Klinik der
 Diakonissenanstalt Flensburg

Wissenschaftliche Tätigkeiten:

09/2000-02/2001 Wissenschaftliche Hilfskraft im Kurs der makroskopischen
 Anatomie, Anatomisches Institut am UKSH Campus Kiel
 03/2004-08/2004 Wissenschaftliche Hilfskraft im Praktikum der Physiologie
 Teil I, Physiologisches Institut am UKSH Campus Kiel
 10/2001-09/2004 Experimentelle Labortätigkeit als Grundlage zur Promotion

Flensburg, den 27. Januar 2009