

**Aus der Klinik für Allgemeine Innere Medizin  
(Direktor: Prof. Dr. S. Schreiber)  
im Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Kiel  
an der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel**

**KLINISCH- PATHOLOGISCHE UNTERSUCHUNG VON  
REAKTIVEN TUMORINFILTRIERENDEN  
CD3-, CD8- UND FOXP3- POSITIVEN T- ZELLEN  
IM MANTELZELL- LYMPHOM**

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

vorgelegt von  
**Öcal Akaltun**  
aus Neumünster

Kiel 2013

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 24.02.2013

gez.: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Michael Kneba

*Meinen Eltern,  
meiner Ehefrau und meiner Tochter in Dankbarkeit gewidmet*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>5</b>
2.1	Patientencharakteristika	5
2.2	Immunhistochemische Untersuchung	5
2.2.1	APAAP- Methode	7
2.2.2	StreptABC- Methode	8
2.3	Kontrollen	9
2.4	Auswertung der Immunhistochemischen Färbung	9
2.5	Statistische Auswertung	9
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>10</b>
3.1	Immunhistochemische Befunde	10
3.1.1	CD3- Färbung	10
3.1.2	CD8- Färbung	12
3.1.3	FoxP3- Färbung	14
3.2	CD4- Analyse	16
3.3	Korrelation der T- Zellen mit dem Gesamtüberleben	18
3.3.1	CD3	18
3.3.2	CD8	20
3.3.3	FoxP3	22
3.3.4	CD4	24
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>37</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>45</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>46</b>
	<b>SCHRIFTENVERZEICHNIS</b>	<b>47</b>

## 1 EINLEITUNG

Die malignen Lymphome, welche zur Gruppe der bösartigen hämatologischen Erkrankungen gehören, verzeichnen in den letzten Jahren eine zunehmende Inzidenz und Mortalität. Lymphome und Leukämien sind mit einem Anteil von 7,2 % bei Frauen und 7,6 % bei Männern die vierthäufigste Todesursache. Die Einteilung der malignen Lymphome erfolgt in das Hodgkin- Lymphom und die heterogene Gruppe der Non- Hodgkin- Lymphome (NHL), welche wiederum in B- und T- Zell- Lymphome unterteilt werden. Die Einteilung dieser Erkrankungen erfolgt aufgrund der Morphologie, der Immunhistotypisierung und der genetischen Veränderungen. Die Einteilung der malignen Lymphome war in der Vergangenheit uneinheitlich, wobei verschiedene Klassifikationssysteme Verwendung fanden. So hatte in Europa seit Mitte der 70er Jahre die Kiel- Klassifikation Gültigkeit (1, 2). In Amerika stand sie Anfang der 80er Jahre der Working- Formulation und später auch der REAL- Klassifikation gegenüber. Mit Einführung der neuen WHO- Klassifikation (3) gibt es nunmehr ein weltweit anerkanntes, einheitliches System, welches eine bessere Transparenz und Vergleichbarkeit von Studienergebnissen gewährleistet.

Das Mantelzell- Lymphom (MCL) wurde zunächst als Germinozytom, in der Kiel- Klassifikation als centrocytisches (cc) Lymphom, bezeichnet, wobei es in die Gruppe der niedrigmalignen B- Zell- Lymphome eingeordnet wurde (1). Die endgültige Bezeichnung, Mantelzell- Lymphom, erfolgte im Jahre 1992 durch Banks und Mitarbeiter (4). Diese Zuordnung als niedrigmalignes Lymphom erwies sich jedoch als ungeeignet, da das MCL klinisch aggressiver verläuft als andere niedrigmalignen Lymphome und somit eher in die Gruppe der hochmalignen Lymphome einzuordnen ist (5, 6). In der WHO- Klassifikation werden die malignen Lymphome analog der Kiel- Klassifikation in ein B- und T- Zellsystem eingeteilt, wobei eine zusätzliche Unterscheidung in Vorläufer- und reifzellige Lymphome erfolgt (3). Die Translokation t(11;14), welche typisch für dieses Lymphom ist, wurde erstmals 1991 von Williams und Mitarbeitern beschrieben (7). Es entsteht durch die Translokation eine Umlagerung des Onkogens bcl1 von Chromosom 11 in den Immunglobulin- Schwerkettenloкус auf Chromosom 14. Infolgedessen kommt es zu einer Überexpression von Cyclin D1, dessen kodierende Region in der Nähe des bcl1- Bruchpunktes auf Chromosom 11 lokalisiert ist. Das Zellzyklusprotein Cyclin D1 bildet zusammen mit den Cyclin- abhängigen Kinasen (CDK) 4 und 6 einen Komplex,

welcher die Umwandlung des Produktes des Retinoblastomgens (pRb) in seine phosphorylierte Form fördert. Bei diesem Prozess wird ein Transkriptionsfaktor E2F frei, der wiederum den Übergang der Zelle von der G1- in die S- Phase fördert. Als Folge entsteht eine unkontrollierte Proliferation der entsprechenden Zelle.

Die Patienten mit einem MCL haben das schlechteste Gesamtüberleben aller Lymphompatienten, geprägt durch häufige Rezidive nach Chemotherapie (8). Als Standardtherapie wird heute die Immun- Chemotherapie verwendet (Rituximab-CHOP), wobei bei Patienten unter 60 Jahren eine autologe periphere Blutstammzell-Transplantation in Betracht gezogen werden sollte. Ergebnisse zeigen, dass die Ansprechraten und das progressionsfreie Überleben verlängert werden konnten, allerdings konnte noch kein Plateau im Gesamtüberleben erreicht werden (9).

In neuen Studienansätzen wurden Patientenkollektive untersucht, welche einen langsam progredienten Verlauf und Gesamtüberlebensraten von über zehn Jahren aufwiesen (10). Es wurde vor allem versucht klinische Prognosefaktoren zu identifizieren, welche eine Differenzierung gegenüber den Patienten mit einer sehr schlechten Prognose erlaubt. Zu diesen Prognosefaktoren gehören eine hohe LDH, ein fortgeschrittenes Stadium, ein schlechter Performance Status und ein hohes Alter (6). Weitere wichtige Prognosefaktoren sind die proliferationsassoziierten Proteine wie zum Beispiel Topoisomerase- 2- alpha Überexpression, welche mit einem schlechten klinischen Verlauf und einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit assoziiert ist (11). Eine Überexpression des Repp86 (restrictedly expressed proliferation-associated protein 86 kDa) führt ebenfalls zu einer verkürzten medianen Überlebenszeit (12). Das für die DNA- Replikation wichtige Minichromosome Maintenance Protein 6 (MCM6) ist ebenfalls ein bedeutender Proliferationsmarker, wobei gezeigt wurde, dass Patienten mit mehr als 75% positiven MCM6- Zellen eine deutlich geringere mediane Überlebenszeit haben, als Patienten mit weniger als 25% positiven MCM6- Zellen (13). Das Ziel dieser Studien war es, Prognosefaktoren zu ermitteln, um in Zukunft Stratifikationsmerkmale für Therapiestudien zu haben, um so Patienten mit aggressiveren Verläufen adäquat zu behandeln.

Der Internationale Prognose Index (IPI), der für die hochmalignen Lymphome entwickelt wurde, wurde auch zur Prognoseeinschätzung des MCL verwendet (6). Allerdings wurde in Studien gezeigt, dass der IPI bei diversen Patientenkollektiven mit MCL nicht signifikant ist (14). Infolgedessen ist im Jahre 2008 der erste, für das MCL spezifische, Prognoseindex (PI) erarbeitet worden: der Mantle Cell Lymphoma

International Prognostic Index (MIPI) (15). Der MIPI wird in eine Niedrig-, eine Mittlere- und eine Hochrisikogruppe unterteilt, wobei das Alter, der Performance Status, der Laktatdehydrogenasewert und die Leukozytenzahl in diesem Index einbezogen sind (15).

Man hat bei Patienten mit Tumorerkrankungen entdeckt, dass das körpereigene Immunsystem eine Rolle für den Krankheitsverlauf spielt. So werden beim Nierenzellkrebs und beim Melanom unter immunstimulierenden Therapien mit Interleukinen- 2 auch Spontanremissionen gesehen. Auch bei anderen Krebserkrankungen wurde der Einfluss des Immunsystems auf den Tumor untersucht.

Als Meilenstein kann sicherlich die Arbeit von Zhang und Mitarbeiter angesehen werden (16). In dieser Arbeit konnte bei Frauen mit einem Ovarialkarzinom gezeigt werden, dass diejenigen Patientinnen, die viele T- Lymphozyten in ihrem Tumor aufwiesen, eine bessere 5- Jahres Überlebensrate von 73,9% hatten als Patientinnen mit einer geringen Anzahl an T- Zellen (11,9% Überlebensrate) (16). In den folgenden Jahren konnte auch bei anderen bösartigen Erkrankungen, wie beispielsweise dem malignen Melanom, ein solcher Zusammenhang dargestellt werden (17). Diesbezüglich wurde gezeigt, dass bei Vorhandensein von vielen CD25- und CD134- positiven Zellen die Patienten eine günstigere Prognose haben, einhergehend mit einer geringeren Melanomgröße und mit weniger Fernmetastasen (17). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass bei gleichartigem Krankheitsstadium eine erhöhte intratumorale T- Zellkonzentration zu einer günstigeren Prognose bei diesen soliden Tumorerkrankungen führt.

Bei malignen Lymphomen, die bösartige Erkrankungen des Immunsystems sind, spielen die körpereigenen T- Zellen im Tumor (Lymphom) ebenfalls eine prognostische Bedeutung. So konnte die Arbeitsgruppe um Tzankov und Mitarbeiter bei einem Kollektiv von 926 Patienten zeigen, dass eine hohe Dichte an FoxP3- positiven T- Zellen (=Tregs) einen positiven Einfluss auf die Prognose beim folliculären Lymphom ( $p= 0.053$ ), beim diffusen großzelligen B- Zell- Lymphom ( $p= 0.051$ ) sowie beim klassischen M. Hodgkin ( $p= 0.004$ ) hatte (18). Auch Carreras und Mitarbeiter konnten beim folliculären Lymphom nachweisen, dass Patienten mit einer hohen Anzahl an Tregs ein verbessertes Gesamtüberleben haben. Hierbei hatten Patienten mit mehr als 10% Tregs eine 5- Jahres- Überlebensrate von 80%, wohingegen Patienten mit weniger als 5 % Tregs lediglich eine 5- Jahres-

Überlebensrate von 50% aufwiesen ( $p= 0.01$ ) (19). Ein weiteres Beispiel für die prognostische Bedeutung von tumorinfiltrierenden T- Zellen bei hämatologischen Erkrankungen konnten Hasselblom et al in einer retrospektiven Studie von 195 Patienten mit primärem diffusem großzelligem B-Zell-Lymphom darstellen. Man sah, dass eine niedrige Anzahl an CD8- positiven T- Zellen (= Cytotoxische T-Zellen= CTL) mit einer besseren Prognose in Bezug auf das Gesamtüberleben und die progressionsfreie Überlebenszeit einhergeht (20). Ähnliche Ergebnisse konnten durch Murriss et al demonstriert werden. So konnte beim primären diffus großen zelligen B-Zell-Lymphom nachgewiesen werden, dass Patienten mit mehr als 15% aktivierten CTL einen schlechteren klinischen Verlauf zeigten, einhergehend mit einer geringeren progressionsfreien- sowie schlechteren Gesamtüberlebenszeit, im Gegensatz zu Patienten mit weniger als 15 % aktivierten CTL (21).

Man sieht folglich an den dargestellten Beispielen, dass tumorinfiltrierende T- Zellen sowohl einen positiven als auch einen negativen Verlauf bei Erkrankungen aus dem hämatologischen Formenkreis vorhersagen und somit als prognostische Faktoren eingesetzt werden können. Beim Mantelzell- Lymphom gibt es noch keine größeren Untersuchungen hinsichtlich der Relevanz von tumorinfiltrierenden Zellen.

Ziel dieser Arbeit ist es, anhand eines sehr großen Patientenkollektivs mit Mantelzell-Lymphom den Einfluss von CD3-, CD8-, sowie der regulatorischen FoxP3- positiven T-Zellen auf das MCL zu untersuchen und ihre möglichen prognostischen Werte zu ermitteln.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Patientencharakteristika**

In der vorliegenden Arbeit wurden formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Lymphknotenbiopsate von insgesamt 94 Patienten (72 Männer, 22 Frauen) untersucht. Diese waren in zwei großen deutschen Therapiestudien behandelt worden (22, 23).

Die Patienten hatten folgende Charakteristika: Das mediane Lebensalter betrug 65 Jahre (Durchschnitt 63.5 Jahre, Spannweite 41-86 Jahre). Der WHO Performance Status war bei der Mehrheit der Patienten gut bis sehr gut mit einem Wert von 0 oder 1 (n= 71, 76%). 21 Patienten (22%) hatten einen WHO Performance Status von 2 oder mehr. 53 Patienten (56%) hatten B- Symptome wie Fieber, Nachtschweiß oder Gewichtsverlust, 39 Patienten (41%) hatten keine B- Symptome. Es handelte sich überwiegend um fortgeschrittene Stadien III und IV (n=80, 85%), ein geringerer Teil hatte ein lokales Ann- Arbor- Stadium I oder II (n= 14, 15%). In 57 Fällen (61%) lag eine Knochenmarkinfiltration vor, 36 Patienten (38%) waren ohne Knochenmarkbefall. Einen extranodalen Befall hatten 83 (88%) Patienten, 11 Patienten (12%) hatten keinen extranodalen Befall. Der Internationale Prognose Index (IPI) war bei 71 Patienten (76%) bei über/ gleich 2, bei 23 Patienten (24%) war er 0 oder 1. Die Therapie war in der Regel eine Chemotherapie. 36 Patienten (38%) erhielten Chlorambucil+Prednison, 34 (36%) Cyclophosphamid+Vincristin+Prednison (COP) , 10 Patienten (11%) Cyclophosphamid+Doxorubicin+Vincristin+Prednison (CHOP), 9 Patienten (10%) eine alleinige Extended field- Bestrahlung und 3 Patienten (3%) keine Therapie, von 2 Patienten (2%) lagen keine Informationen vor.

### **2.2 Immunhistochemische Untersuchung**

Es lagen zum Beginn der Untersuchung schon fertige ungefärbte Schnittpräparate zur Verfügung. Alle Präparate waren bereits in der Hämatoxylin und Eosin (H&E)- und nach Giemsa- Färbung von einem Referenzpathologen (RP) zur Sicherung der Diagnose beurteilt worden.

Um die Epitope wieder für den Antikörper erkennbar zu machen, kam es zum Einsatz der Antigendemaskierung nach Cattoretti (24). Hierbei werden die Schnitte in einem Dampfdrucktopf für 2 Min. 45 Sek. in einer 0,01 molaren Zitratpuffer- Lösung im kochenden Puffer behandelt. Die Zitratpuffer- Lösung wird ihrerseits hergestellt durch

Lösung von 10,5 g Zitronensäuremonohydrat (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) in 5 Liter Aqua dest, wobei anschließend eine Titrierung mit 2 molarer NaOH (Fa. Merck) auf einen pH- Wert von 6,0 erfolgt. Die Präparate wurden anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur und 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser abgekühlt bevor sie in Waschpuffer (TBS-Puffer) eingelegt worden sind, welcher 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. bestand. Mit 1 molarer HCl (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde der Waschpuffer dann auf einen 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.

Sämtliche Gewebsexzitate der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe spezifischer Primär- Antikörper immunhistochemisch untersucht (siehe Tabelle 1).

Zunächst wurden die Präparate mit einem Primärantikörper in einer Lösungsmenge von 100 µl pro Schnitt in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert (siehe Tabelle1).

**Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper**

<i>Antikörper</i>	<i>Antigen</i>	<i>Bezugsquelle</i>	<i>Färbe- Methode</i>
<b>Anti- CD3</b>	CD3	Neomarkers	Strept- ABC
<b>Anti- CD8</b>	CD8	Dako	APAAP
<b>Anti- FoxP3</b>	FoxP3	Cell Signaling	Strept- ABC

Die Primärantikörper werden aus einer Maus gewonnen und sind spezifisch gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet. Um die Primärantikörper zu verdünnen wurde eine Lösung aus 20 ml RPMI (Seromed, Berlin, Deutschland), 20 ml bei 57° C über 60 Minuten wärmeinaktiviertes Rinderserum (Sigma, St. Louis, USA), 0,2 g Natriumacid (Merck, Deutschland) und 160 ml Aqua dest. verwendet, welche auf einen pH- Wert von 7,4 titriert wurde. Das Rinderserum soll unspezifische Hintergrundreaktionen verringern, wobei das Natriumacid einer bakteriellen Besiedlung der Lösung entgegenwirken soll. Für das Verdünnungsmedium der Sekundärantikörper wurde dieser Lösung noch 10 Vol% inaktiviertes Humanserum

hinzugefügt, mit dem Ziel das Risiko anti- humaner Kreuzreaktionen zu verringern. Nach Ablauf der Inkubationszeit mit dem Primärantikörper und im Anschluss an jeden weiteren Färbeschritt erfolgte eine Spülung der Präparate mit Waschpuffer. Mit Hilfe der APAAP- und der Strept- ABC- Färbe Methode erfolgte die immunhistochemische Begutachtung der Gewebeproben.

### **2.2.1 APAAP- Methode**

Die Paraffinschnitte für die CD8- Färbung wurden mit der Alkalische- Phosphatase- Anti- Alkalische- Phosphatase- Technik (APAAP) gefärbt (25). Um eine Färbung mit dieser Technik zu ermöglichen, benötigt man einen Primärantikörper, einen Sekundärantikörper, den APAAP- Komplex, bestehend aus Alkalischer Phosphatase (AP) mit daran gebundenem Anti- Alkalische- Phosphatase- Antikörper (AAP) sowie eine Entwicklungslösung, um die Antigen- Antikörper- Reaktion zu visualisieren.

Als Sekundärantikörper diente der Kaninchen- Anti- Maus Brückenantikörper Z 259 (DAKO, Hamburg, Deutschland), welcher zusammen mit den Gewebeproben in einer Verdünnung im Verhältnis von 1:100 für 30 Minuten bei 25°C inkubiert und anschließend mit Waschpuffer gespült wurde. Nach diesem Schritt erfolgte die Inkubation der Präparate für 30 Minuten bei 25°C mit dem APAAP- Komplex. Dieser Komplex besteht aus 10 mg/ml Alkalischer Phosphatase (AP) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) und einem Anti- Alkalische- Phosphatase- Antikörper (AAP), welcher im Institut für Pathologie der Universität Kiel aus Zellüberstand (A88-12) gewonnen wurde. Um die Färbereaktion zu intensivieren, erfolgte eine zweimalige Wiederholung der Inkubation mit dem Brückenantikörper und dem APAAP- Komplex bei Einwirkzeiten von je 10 Minuten, wobei die Schnitte abschließend erneut mit Waschpuffer gespült worden sind. Bei der Entwicklung der Farbreaktion wurden in einem ersten Schritt drei Teillösungen hergestellt, aus welchen die endgültige Entwicklungslösung gemischt wurde. Im Folgenden werden die Zusammensetzungen der drei Teillösungen dargestellt:

Die erste Lösung bestand aus 175 ml Entwicklungspuffer, welcher aus 1,5 g TRIS- HCl und 4,9 g TRIS Base (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland), 62,5 ml Propandiolpuffer (Merck, Deutschland) und 100 mg Levamisol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) zusammengesetzt war. Das Levamisol dient zur Inhibierung der Aktivität der endogenen alkalischen Phosphatase. Die zweite Lösung, bestehend aus 50 mg Natriumnitrit (Merck, Deutschland), gelöst in 1250 µl

Aqua bidest., wurde im Anschluss ebenso wie die dritte Lösung, welche aus 125 mg Naphtol- AS- Biphosphat (Enzymsubstrat der alkalischen Phosphatase) (Merck, Deutschland) gelöst in 1500 µl N,N-Dimethylformamid (Merck, Deutschland) bestand, hinzugegeben. Dies geschah unter Zugabe von 500 µl Neufuchsin- Lösung (Merck, Deutschland) aus 5 g Neufuchsin in 100 ml 2 molarer Salzsäure. Die vollständige Entwicklungslösung wurde mit 2 molarer HCl und mit Hilfe von einem pH- Meter (WTW, Weilheim, Deutschland) und nachfolgender Papierfiltration (Papierfilter 545 ½ Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) auf den pH- Wert von 8,7 eingestellt. Anschließend wurden die Schnittpräparate in der hergestellten Entwicklungslösung für 30 Minuten auf einem Schüttler (Gerhard, Bonn, Deutschland) bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem zweimal mit Aqua dest. gespült wurde erfolgte eine Kerngegenfärbung mit Hämalalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt, Deutschland), welche 5 Minuten andauerte. Die nun gefärbten Präparate wurden insgesamt 10 Minuten mit Leitungswasser gebläut und dann in einer aufsteigenden 80-, 96- und 100- prozentigen Ethanolreihe dehydriert und für 5 Minuten in Xylol eingelegt. Zum Abschluss erfolgte eine Eindeckung der Gewebeproben mit Pertex (Medite, Burgdorf, Deutschland).

### **2.2.2 StreptABC- Methode**

Eine weitere immunhistochemische Färbemethode stellt neben der zuvor vorgestellten APAAP- Methode die Streptavidin- Biotin- Peroxidase- Complex- Technik (StreptABC) (modifiziert nach Hsu et al) dar (26). Die Färbemethode wurde für die CD3- und FoxP3- Färbung angewandt. Zunächst erfolgt das zuvor beschriebene Verfahren der Antigendemaskierung, jedoch wurden vor Beginn der Färbeschritte die Schnittpräparate zwecks Blockierung der endogenen Peroxidase für 10 Minuten einem Gemisch, bestehend aus 4 ml einer 30- prozentigen Wasserstoffperoxid- Lösung (Merck, Deutschland), in 200 ml Methanol (Merck, Deutschland) ausgesetzt. Danach erfolgte unter Raumtemperatur für 60 Minuten die Inkubation der Paraffinschnitte mit jeweils 100 µl Primärantikörper, verdünnt mit einer Lösung aus 1- prozentigem bovinem Serum- Albumin (BSA, Sigma- Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) in TBS- Puffer. Es erfolgte erneut eine dreimalige Spülung mit Waschpuffer. Den Sekundärantikörper stellte bei monoklonalen Primärantikörpern das biotonylierte Kaninchen- Anti- Maus- IgG E354 (DAKO, Hamburg, Deutschland), bei polyklonalen Primärantikörpern hingegen das

biotinylierte Schwein- Anti- Kaninchen- IgG E353 (DAKO, Hamburg, Deutschland) dar. Der Sekundärantikörper wurde jeweils im Verhältnis von 1:200 mit inaktiviertem, 1:10 in TBS- Puffer verdünntem Humanserum verdünnt. Nach 30 minütiger unter Raumtemperatur stattfindender Inkubation der Schnitte mit dem Sekundärantikörper erfolgte daraufhin die Spülung der Schnitte mit Waschpuffer. Abschließend wurde ein Peroxidase- konjugierter Streptavidin- Biotin- Komplex (DAKO, Hamburg, Deutschland) hinzugefügt.

### **2.3 Kontrollen**

Zwecks Positivkontrolle der Antikörper wurde formalinfixiertes und paraffineingebettetes Tonsillengewebe mitgefärbt, wohingegen als Negativkontrolle der primäre Antikörper durch Serum ersetzt wurde. Diese Kontrollen wurden bei jedem Färbeprozess durchgeführt

### **2.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbung**

Die gefärbten Präparate wurden lichtmikroskopisch an einem Durchlichtmikroskop (Axioskop, Zeiss, Deutschland) untersucht. Die Auswertung beinhaltet das Zählen der gefärbten Zellen in jedem Präparat bei 40 facher Vergrößerung, welches einem High Power Field (HPF) analog der Auswertung von Zhang und Mitarbeitern entspricht (16). Es wurde pro High- Powerfield (Gesichtsfeld) die Anzahl der markierten Zellen bestimmt, wobei bei jedem Präparat insgesamt zehn High Power Fields auszählt wurden. Anschließend wurde der Mittelwert und der maximale Wert (Hot Spot) bestimmt.

### **2.5 Statistische Auswertung**

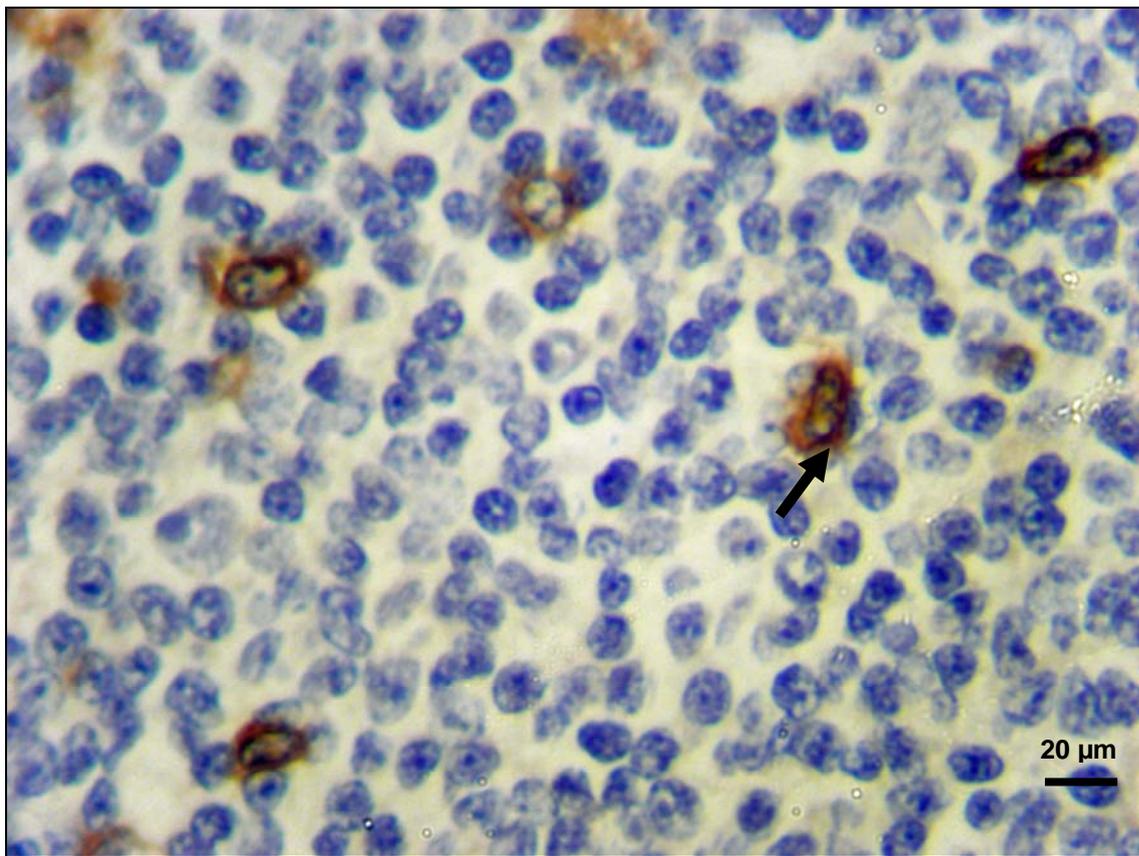
Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm Graph Path Prism (Version 11) durchgeführt. Bei der Analyse im Hinblick auf die Überlebenszeit wurde auf die Kaplan- Meier- Methode zurückgegriffen.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1. Immunhistochemische Befunde

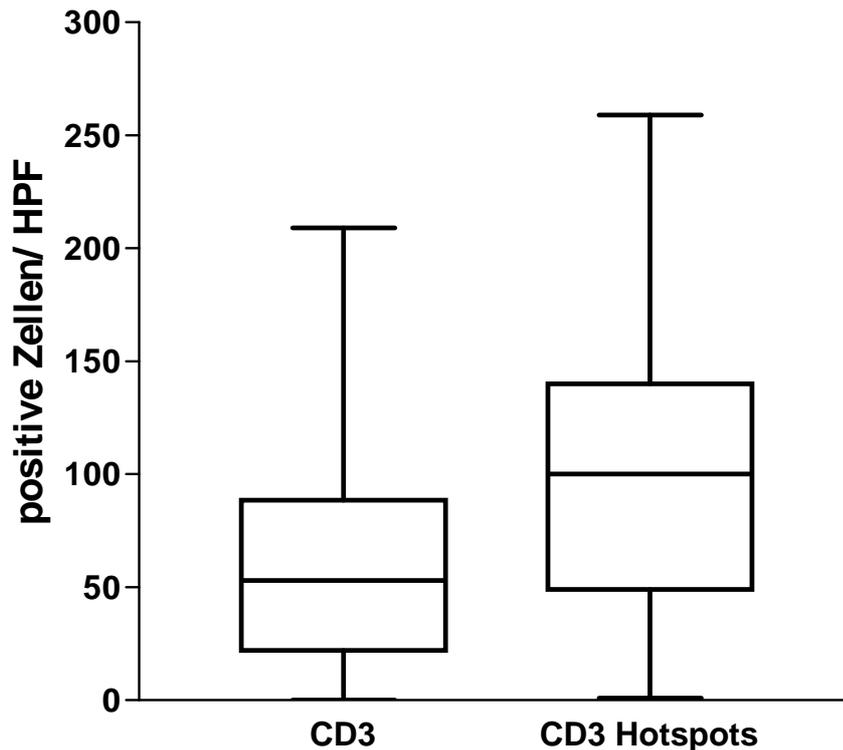
##### 3.1.1 CD3- Färbung

Die CD3- Färbung ist eine membranständige braune Färbung (siehe Abbildung 1). Nur eindeutige und ausreichend gut gefärbte Präparate wurden ausgewertet. In sieben Fällen konnten die Präparate aus technischen Gründen nicht ausgewertet werden. 87 gefärbte Schnittpräparate waren gut zu beurteilen. Der minimale Wert lag bei 1/HPF, der maximale Wert bei 209/HPF (siehe Abbildung 2). Der Mittelwert betrug 56/HPF, die Standardabweichung bei 44/HPF. In der Hotspot- Analyse war der minimale Wert bei 1/HPF, der maximale Wert bei 259/HPF mit einem Mittelwert von 97/HPF und einer Standardabweichung von 64/HPF.



**Abbildung 1:** Immunhistochemischer Nachweis von **CD3**- positiven T-Zellen (braun gefärbt, siehe Pfeil- Kennzeichnung) im Mantelzell-Lymphom. StreptABC- Färbung, Vergrößerung x400.

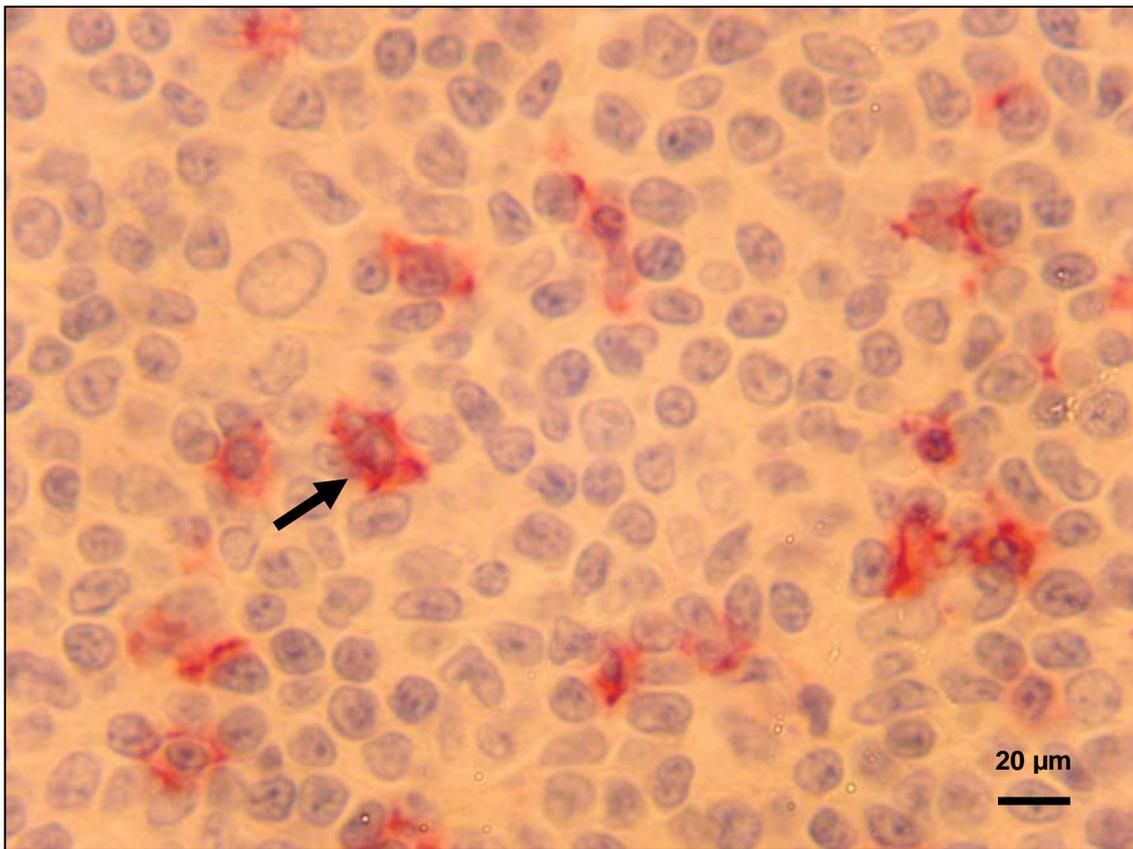
In der Box- Plot Analyse der CD3- Färbung liegt der Median bei 53/ HPF, die 25% Perzentile bei 22/ HPF, die 75% Perzentile bei 89/ HPF (Abbildung 2). In der Hotspot- Analyse liegt der Median bei 100/ HPF, die 25% Perzentile bei 49/ HPF und die 75% Perzentile bei 140 /HPF (Abbildung 2, Abbildung 8).



**Abbildung 2** : Verteilung der T Zellen nach der **CD3- Färbung** im Durchschnitt (links) und bei den Hotspots (rechts) als Box-Plot Analyse (mit Spannweite, Median, oberes und unteres Quartil).

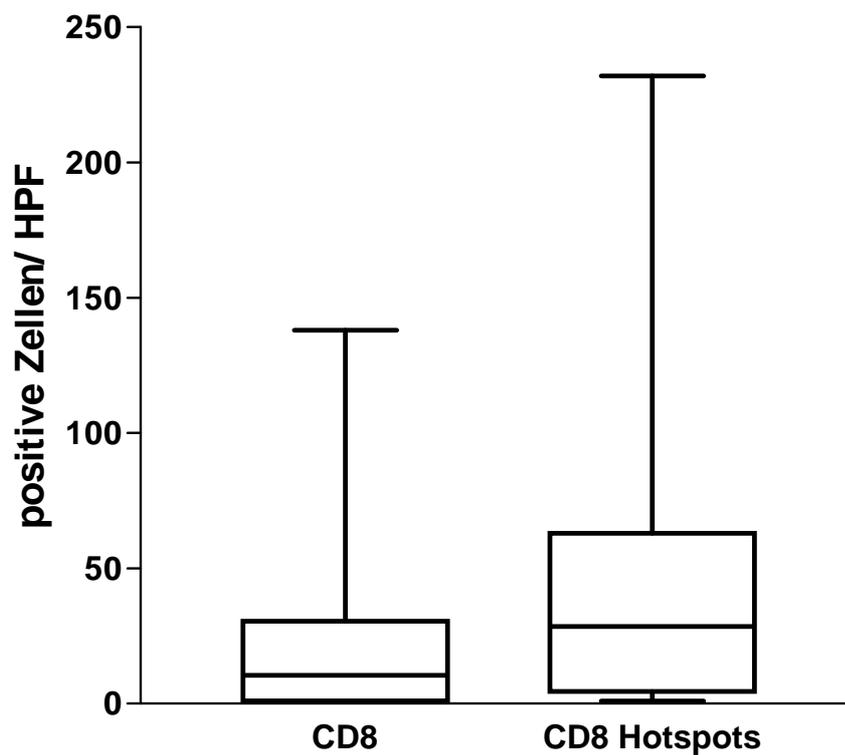
### 3.1.2 CD8- Färbung

Die CD8- Untersuchung ist durch die APAAP Entwicklung eine rote Färbung, welche wie die CD3- Färbung ebenfalls membranständig ist (siehe Abbildung 3). 78 Präparate konnten gut ausgewertet werden. Bei 16 Färbungen waren die Antigene trotz Wiederholungen nicht ausreichend detektierbar. Der minimale Wert lag bei 0/ HPF, der maximale Wert bei 138/ HPF (Abbildung 4), der Mittelwert betrug 19/ HPF, die Standardabweichung 23/ HPF. In der Hotspot- Analyse war der minimale Wert bei 1/HPF, der maximale Wert bei 232/ HPF (Abbildung 4, Abbildung 8), der Mittelwert bei 39/ HPF und die Standardabweichung bei 41/HPF.



**Abbildung 3:** Immunhistochemischer Nachweis von **CD8- positiven T- Zellen** (rot gefärbt, Pfeil) im Mantelzell- Lymphom. APAAP- Färbung, Vergrößerung x400.

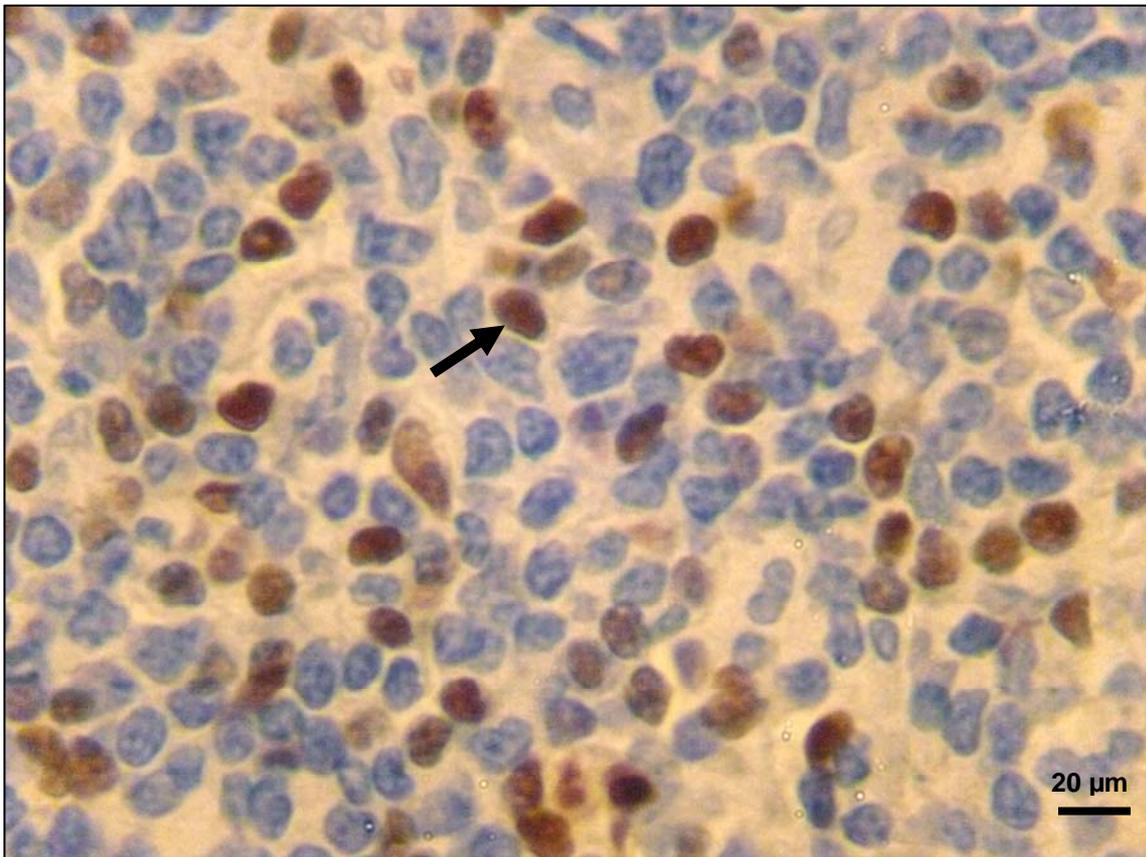
In der Box- Plot Analyse der CD8- Färbung liegt der Median bei 11/ HPF, die 25% Perzentile bei 1/ HPF, die 75% Perzentile bei 31/ HPF (Abbildung 4). In der Hotspot-Analyse liegt der Median bei 29/ HPF, die 25% Perzentile bei 5/ HPF und die 75% Perzentile bei 63 /HPF (Abbildung 4).



**Abbildung 4 :** Verteilung der T Zellen nach der **CD8- Färbung** im Durchschnitt und bei den Hotspots als Box-Plot Analyse (mit Spannweite, Median, oberes und unteres Quartil).

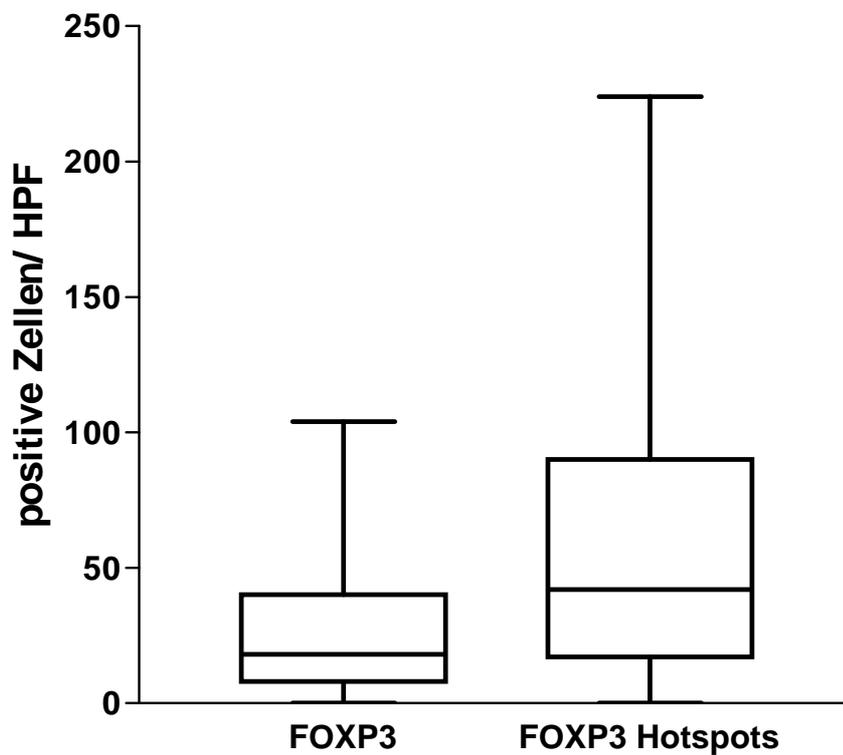
### 3.1.3 FoxP3- Färbung

Die FoxP3- Färbung ist eine Kernfärbung. Diese ist durch die Entwicklung mit der StreptABC- Methode braun (siehe Abbildung 5). 73 gefärbte Präparate waren sicher auswertbar. In 21 Fällen waren die Färbungen zu schwach oder falsch negativ, da in jedem Präparat mindestens eine positive Zelle nachweisbar sein sollte. Der minimale Wert lag bei 0/ HPF, der maximale Wert bei 104/ HPF (Abbildung 6), der Mittelwert betrug 27/ HPF, die Standardabweichung lag bei 25/ HPF. In der Hotspot- Analyse war der minimale Wert bei 0/HPF, der maximale Wert bei 224/ HPF (Abbildung 6, Abbildung 8), der Mittelwert bei 57/ HPF und die Standardabweichung bei 48/HPF.



**Abbildung 5:** Immunhistochemischer Nachweis von **FoxP3- positiven T- Zellen** (braun gefärbt) im Mantelzell- Lymphom. StreptABC- Färbung, Vergrößerung x400.

In der Box- Plot Analyse der FoxP3- Färbung liegt der Median bei 18/ HPF, die 25% Perzentile bei 8 HPF, die 75% Perzentile bei 40 HPF (Abbildung 6). In der Hotspot-Analyse liegt der Median bei 42/ HPF, die 25% Perzentile bei 17/ HPF und die 75% Perzentile bei 90 /HPF (Abbildung 6).

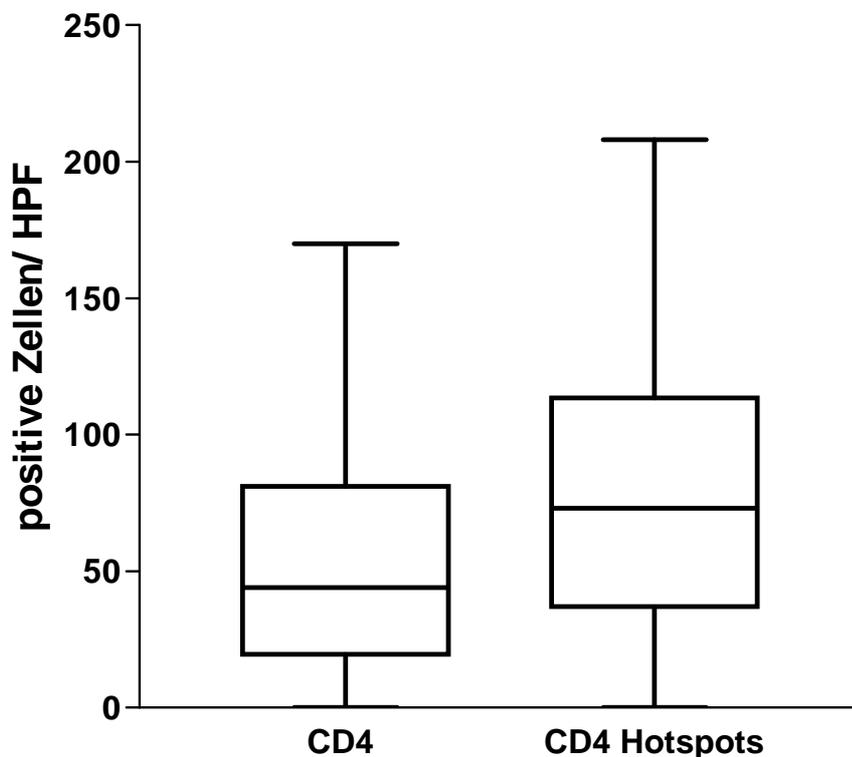


**Abbildung 6 :** Verteilung der T- Zellen nach der **FoxP3- Färbung** im Durchschnitt und bei den Hotspots als Box- Plot Analyse (mit Spannweite, Median, oberes und unteres Quartil).

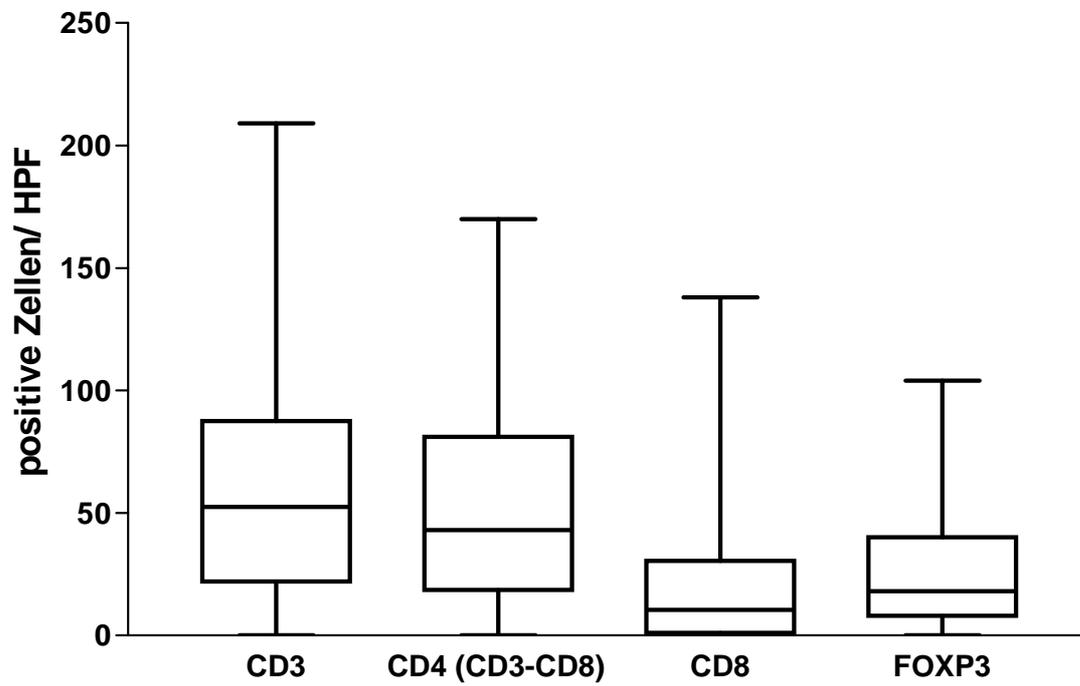
### 3.2 CD4- Analyse

Leider standen nicht mehr genügend Leerpräparate von allen Patienten zur Untersuchung der CD4- Färbung zur Verfügung. Die Anzahl an CD4- Zellen pro Schnitt wurde aus der Differenz der Durchschnittswerte von den CD3- Zellen und den CD8- Zellen ermittelt, da die CD3- positiven Zellen in der Regel überwiegend aus CD4- und CD8- Zellen bestehen.

Der minimale Wert lag bei 0/ HPF, der maximale Wert bei 170/ HPF (Abbildung 7, Abbildung 8), der Mittelwert betrug 51/ HPF, die Standardabweichung lag bei 39/ HPF, der Median bei 44/ HPF, die 25% Perzentile bei 20/ HPF, die 75% Perzentile bei 81/ HPF (Abbildung 7). In der Hotspot- Analyse war der minimale Wert bei 0/HPF, der maximale Wert bei 208/ HPF (Abbildung 7), der Mittelwert bei 79/ HPF und die Standardabweichung bei 52/HPF. Der Median liegt bei 73/ HPF, die 25% Perzentile bei 37/ HPF, die 75% Perzentile bei 114/ HPF (Abbildung 7).



**Abbildung 7** : Verteilung der T- Zellen nach den **CD4- Zellen** im Durchschnitt als Box- Plot Analyse (mit Spannweite, Median, oberes und unteres Quartil).

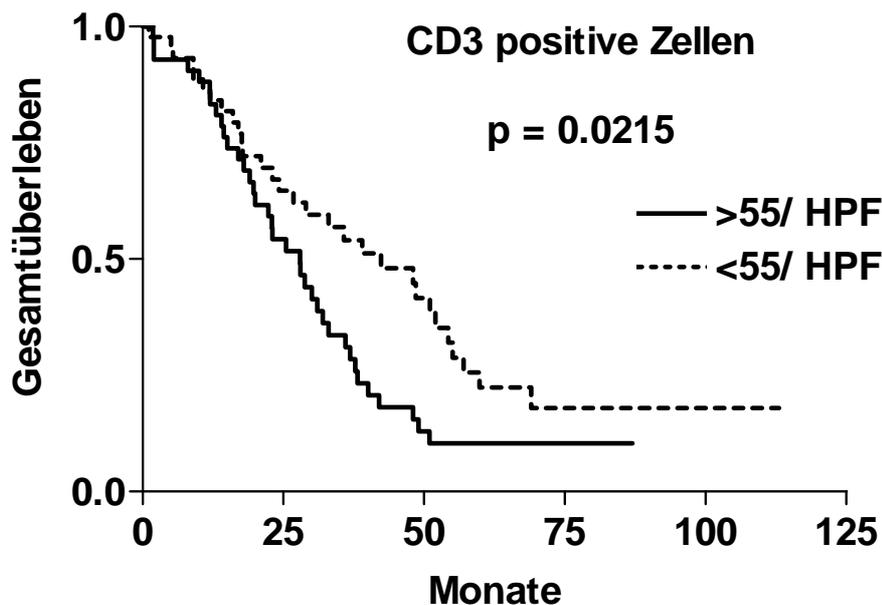


**Abbildung 8 :** Verteilung der T- Zellen (CD3, CD4, CD8 und FoxP3) als Box- Plot Analyse (mit Spannweite, Median, oberes und unteres Quartil).

### 3.3 Korrelation der Anzahl der T- Zellen mit dem Gesamtüberleben

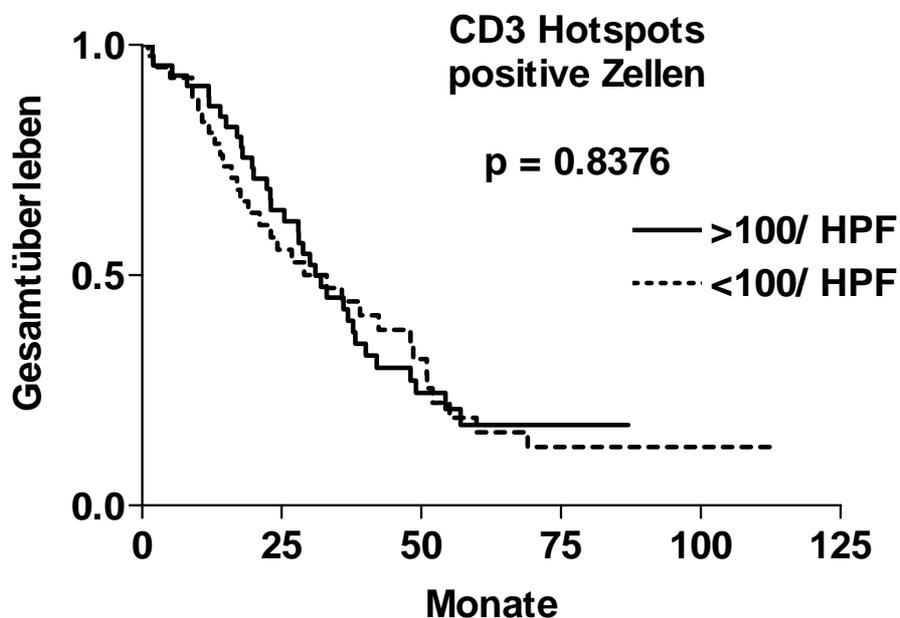
#### 3.3.1 CD3

In der Untersuchung der Anzahl an CD3- Zellen im Tumor in Bezug auf das Gesamtüberleben wurde ein Cut- off- Wert von 55 CD3- positiven Zellen/ HPF genommen. Die Univarianz- Kaplan- Meier- Analyse zeigte mit einem p-Wert von 0.00215 einen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben zwischen den beiden Vergleichsgruppen. In der Gruppe >55 CD3- positive Zellen/ HPF hatten die Patienten ein medianes Gesamtüberleben von 28.0 Monaten. Die Gruppe mit <55 CD3- positive Zellen/ HPF hat ein längeres Gesamtüberleben von 42.3 Monaten ( $p=0.0215$ , Hazard Ratio= 1.731, Abbildung 9, Tabelle 2).



**Abbildung 9:** Kaplan- Meier- Analyse des Gesamtüberlebens in Monaten bei unterschiedlicher Anzahl an CD3- positiven Zellen /HPF.

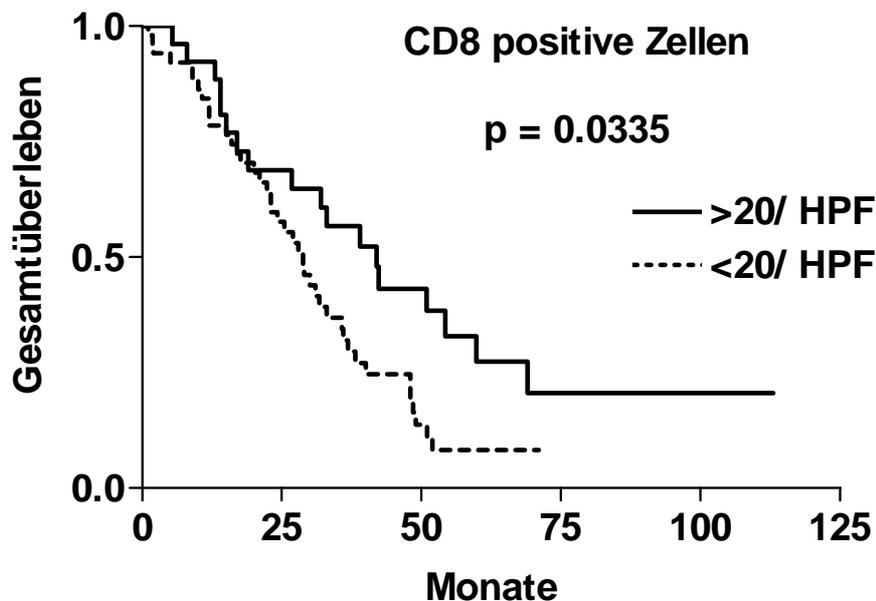
Bei der Hotspot- Analyse der CD3- Untersuchung in Bezug auf das Gesamtüberleben wurde ein Cut- off- Wert von 100 CD3- positive Zellen/ HPF genommen. Die Univarianz- Kaplan- Meier Analyse zeigte mit einem p-Wert von 0.8376 keinen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben zwischen den beiden Vergleichsgruppen (Abbildung 10, Tabelle 2). In der Gruppe >100 CD3 positive Zellen/ HPF hatten die Patienten ein medianes Gesamtüberleben von 31.0 Monaten. Die Gruppe mit <100 CD3- positive Zellen/ HPF hat ein medianes Gesamtüberleben von 33.0 Monaten ( $p= 0.8376$ , Hazard Ratio= 0.9511).



**Abbildung 10:** Kaplan- Meier- Analyse des Gesamtüberlebens in Monaten bei unterschiedlicher Anzahl an CD3- positiven Zellen /HPF in Hotspots.

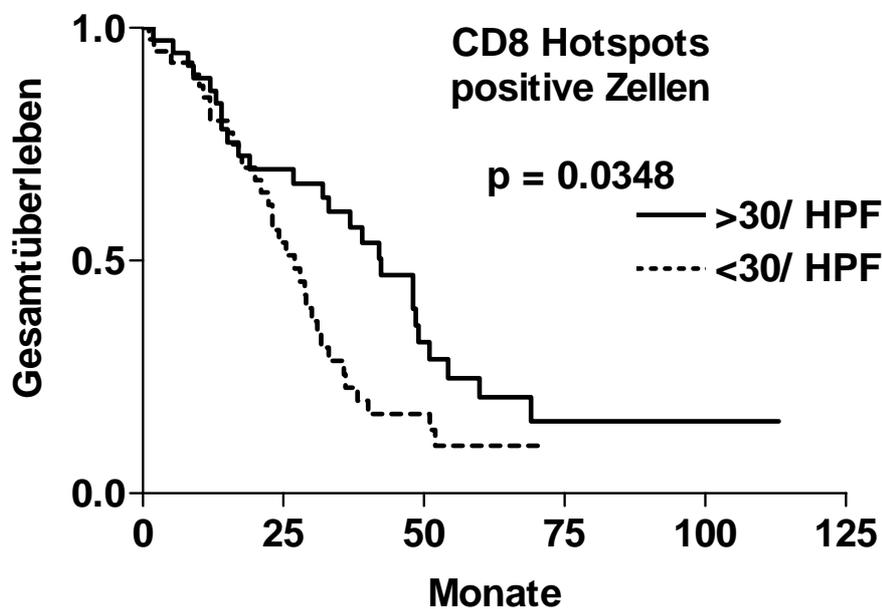
### 3.3.2 CD8

Bei der Analyse der Anzahl an CD8- Zellen im Tumor in Bezug auf das Gesamtüberleben wurde ein Cut- off- Wert von mehr und weniger als 20 CD3- positive Zellen/ HPF genommen. In der Univarianz- Kaplan- Meier- Analyse konnte mit einem p- Wert von 0.0335 ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben zwischen den beiden Gruppen gezeigt werden. In der Gruppe >20 CD8- positive Zellen/ HPF hatten die Patienten ein medianes Gesamtüberleben von 42.0 Monaten. Die Gruppe mit <20 CD8- positive Zellen/ HPF hat ein Gesamtüberleben von 28.8 Monaten (p=0.0335, Hazard Ratio= 0.5622, Abbildung 11, Tabelle 2).



**Abbildung 11** : Kaplan- Meier- Analyse des Gesamtüberlebens in Monaten bei unterschiedlicher Anzahl an CD8- positiven Zellen /HPF .

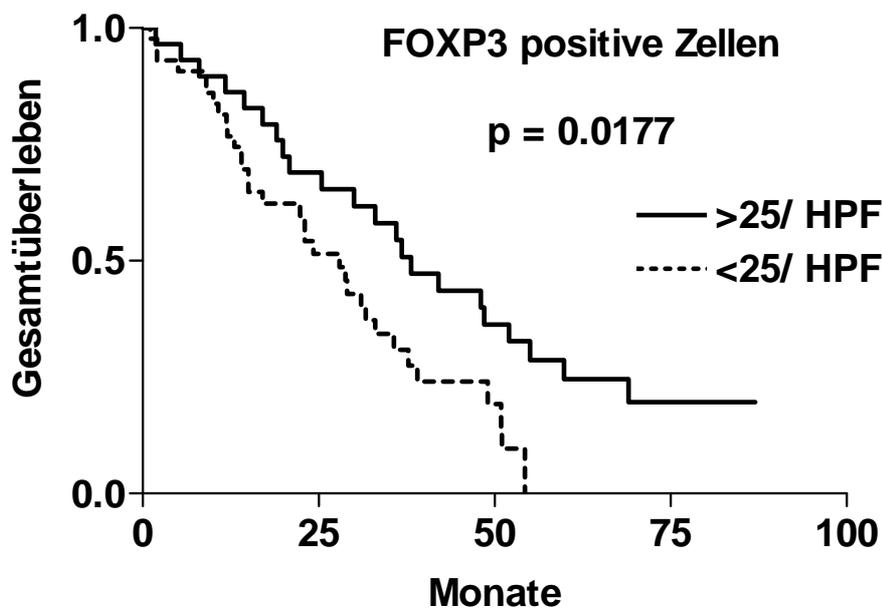
Für die Hotspot- Analyse der CD8- Untersuchung in Bezug auf das Gesamtüberleben wurde ein Cut- off- Wert von 30 CD8- positive Zellen/ HPF genommen. In der Univarianz- Kaplan- Meier- Analyse konnte mit einem p- Wert von 0.0348 ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben zwischen den beiden Vergleichsgruppen gezeigt werden (Abbildung 12, Tabelle 2). In der Gruppe >30 CD8- positive Zellen/ HPF war das mediane Gesamtüberleben bei 42.3 Monaten. Die Gruppe mit <30 CD8- positiven Zellen/ HPF hatte ein medianes Gesamtüberleben von 27.0 Monaten ( $p=0.0348$ , Hazard Ratio 0.5861).



**Abbildung 12** : Kaplan- Meier- Analyse des Gesamtüberlebens in Monaten bei unterschiedlicher Anzahl an CD8- positiven Zellen /HPF in Hotspots.

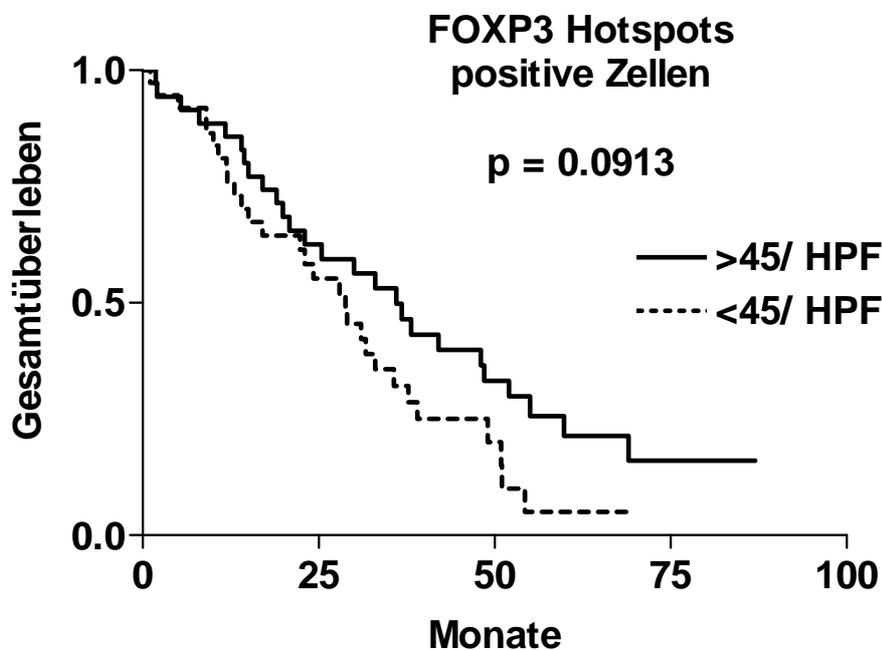
### 3.3.3 FoxP3

Für die Korrelation der FoxP3- positiven Zellen im Tumor in Bezug auf das Gesamtüberleben wurde ein Cut- off- Wert von 25 FoxP3- positive Zellen/ HPF genommen. Die Kaplan- Meier- Analyse zeigte mit einem p- Wert von 0.0177 einen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben zwischen den beiden Patientengruppen. In der Gruppe >25 FoxP3- positive Zellen/ HPF hatten die Patienten ein medianes Gesamtüberleben von 38.2 Monaten. Die Gruppe mit <25 FoxP3- positive Zellen/ HPF hat ein deutlich kürzeres Überleben von 28.0 Monaten ( $p= 0.0177$ , Hazard Ratio= 0.5446, Abbildung 13, Tabelle 2).



**Abbildung 13** : Kaplan- Meier- Analyse des Gesamtüberlebens in Monaten bei unterschiedlicher Anzahl an FoxP3- positiven Zellen /HPF.

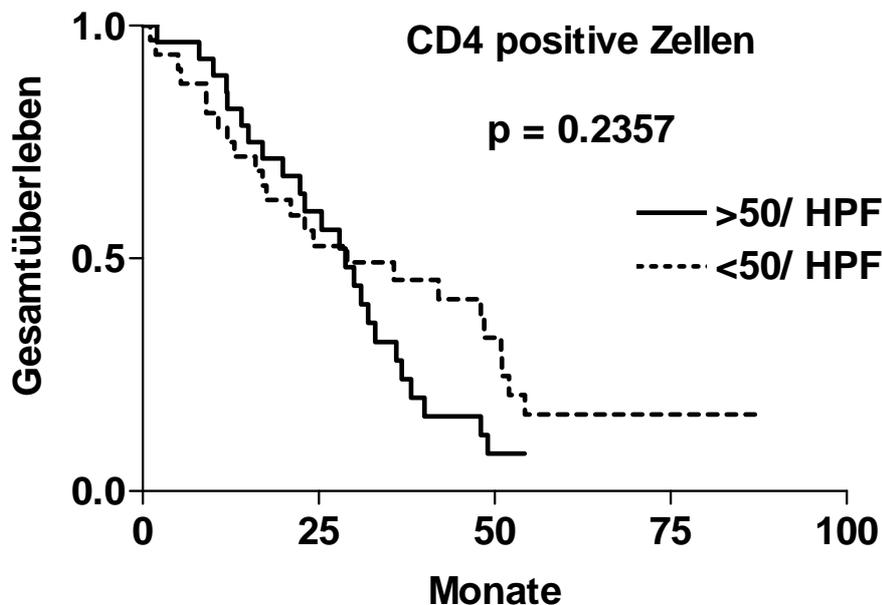
Die Hotspot- Analyse der FoxP3- Untersuchung in Korrelation auf das Gesamtüberleben wurde mit einem Cut- off- Wert von 45 FoxP3- positive Zellen/ HPF vorgenommen. Die Kaplan- Meier- Analyse zeigte mit einem p- Wert von 0.0913 zwar keinen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben zwischen den beiden Gruppen, jedoch konnte ein Trend für die Gruppe mit mehr FoxP3- positiven Zellen gezeigt werden (Abbildung 14, Tabelle 2). Die Patienten mit >45 FoxP3- positiven Zellen/ HPF hatten ein medianes Gesamtüberleben von 36.0 Monaten. Die Gruppe mit <45 FOXp3- positiven Zellen/ HPF hatten ein medianes Gesamtüberleben von 28.8 Monaten ( $p= 0.0913$ , Hazard Ratio=0.6433).



**Abbildung 14:** Kaplan- Meier- Analyse des Gesamtüberlebens in Monaten bei unterschiedlicher Anzahl an FoxP3- positiven Zellen /HPF in Hotspots.

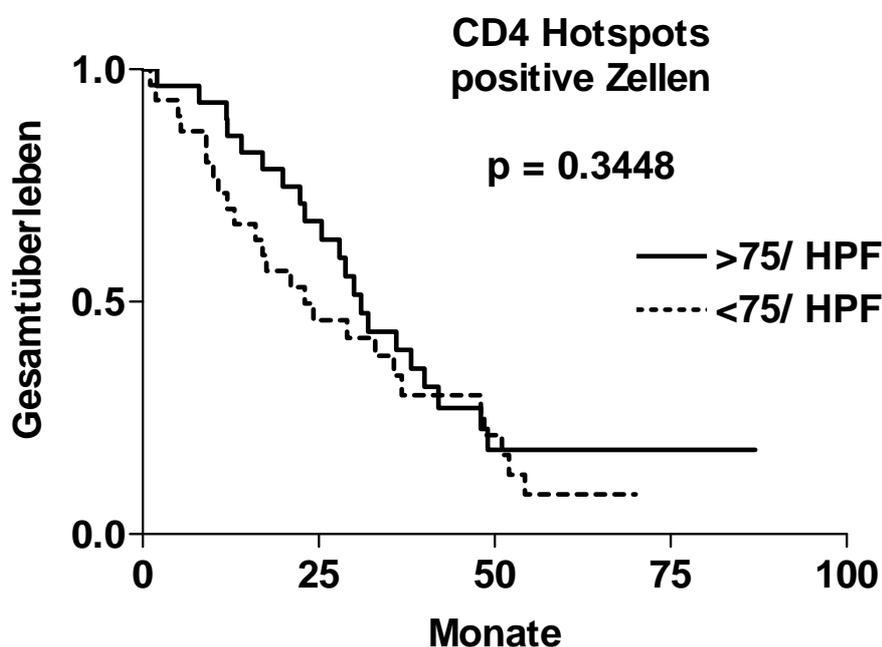
### 3.3.4 CD4

Für die Untersuchung der CD4 ermittelten Werte in Bezug auf das Gesamtüberleben wurde ein Cut- off- Wert von 50 positive Zellen/ HPF genommen. Die Kaplan- Meier- Analyse zeigte mit einem p- Wert von 0.2357 einen nicht signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben zwischen den beiden Vergleichsgruppen. In der Gruppe >50 CD4- positive Zellen/ HPF hatten die Patienten ein medianes Gesamtüberleben von 28.8 Monaten. Die Gruppe mit <50 CD4- positive Zellen/ HPF hatte ein Gesamtüberleben von 29 Monaten (p= 0.2357, Hazard Ratio= 1.393, Abbildung 15, Tabelle 2).



**Abbildung 15:** Kaplan- Meier- Analyse des Gesamtüberlebens in Monaten bei unterschiedlicher Anzahl an CD4- positiven Zellen /HPF.

Bei der Hotspot- Analyse der CD4- Untersuchung in Bezug auf das Gesamtüberleben wurde ein Cut- off- Wert von 75 CD4- positive Zellen/ HPF genommen. Die Kaplan- Meier- Analyse zeigte mit einem p- Wert von 0.3448 keinen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben zwischen den beiden Vergleichsgruppen (Abbildung 16, Tabelle 2). In der Gruppe >75 CD4- positive Zellen/ HPF hatten die Patienten ein medianes Gesamtüberleben von 23.0 Monaten. Die Gruppe mit <75 CD4- positive Zellen/ HPF hat ein medianes Gesamtüberleben von 31.0 Monaten ( $p= 0.3448$ , Hazard Ratio= 0.7582).



**Abbildung 16:** Kaplan- Meier- Analyse des Gesamtüberlebens in Monaten bei unterschiedlicher Anzahl an CD4- positiven Zellen /HPF in Hotspots.

**Tabelle 2:** Univarianz- Cox- Regressionsanalyse der medianen Überlebenszeit und der Verteilung der Anzahl der T- Zellen je nach Färbung

Antigen	n (%)	Überlebenszeit		Hazard Ratio
		Median (Monate)	p-Wert	
<b>CD3</b>				
< 55 /HPF	45	42.3	<b>0.0215</b>	1.731
> 55 /HPF	42	28.0		
n.a.	7			
<b>CD3 Hotspots</b>				
< 100 /HPF	43	33.0	0.8376	0.9511
> 100 /HPF	45	31.0		
n.a.	7			
<b>CD8</b>				
< 20 /HPF	52	28.8	<b>0.0335</b>	0.5622
> 20 /HPF	26	42.0		
n.a.	16			
<b>CD8 Hotspots</b>				
< 30 /HPF	42	27.0	<b>0.0348</b>	0.5861
> 30 /HPF	37	42.3		
n.a.	16			
<b>FoxP3</b>				
< 25 /HPF	43	28.0	<b>0.0177</b>	0.5446
> 25 /HPF	30	38.2		
n.a.	21			
<b>FoxP3 Hotspots</b>				
< 45 /HPF	37	28.8	0.0913	0.6433
> 45 /HPF	36	36.0		
n.a.	21			
<b>CD4 (CD3-CD8)</b>				
< 50 /HPF	32	29.0	0.2357	1.393
> 50 /HPF	28	28.8		
n.a.	34			
<b>CD4 (CD3-CD8) Hotspots</b>				
< 75 /HPF	30	31.0	0.3448	0.7582
> 75 /HPF	28	23.0		
n.a.	36			

n.a.: nicht auswertbar

## 4 DISKUSSION

Das Mantelzell- Lymphom (MCL) ist ein malignes Non- Hodgkin- Lymphom der B- Zellreihe und wurde erstmals Mitte der 60er Jahre von Prof. Lennert beschrieben (1). Charakteristisch für das MCL ist eine Translokation t(11; 14), welche zu einer Umlagerung des Onkogens bcl-1 von Chromosom 11 in den Schwereketten- Immunglobulinlokus auf Chromosom 14 führt (7). Diese Translokation bewirkt eine Überexpression von bcl-1, einem Zellzyklusprotein, welches den Übergang der Zelle von der G1- in die S- Phase reguliert. Infolgedessen wird der Eintritt der Zelle in die S- Phase gefördert und es kommt zur unkontrollierten Proliferation der jeweiligen Zelle. Der schlechte klinische Verlauf dieser Erkrankung ist gekennzeichnet durch ein medianes Überleben von 3-4 Jahren, durch hohe Rezidivraten und durch ein geringes Gesamtüberleben (5). Seit 2008 existiert mit dem MIPI ein Prognoseindex, der spezifisch für das MCL ist und folgende Prognosefaktoren beinhaltet: Lebensalter, Performance Status, Laktatdehydrogenasewert und die Leukozytenzahl (15).

Beim MCL kommen neben der klassischen aggressiven Form auch Verläufe vor, bei denen Patienten eine relativ gute Prognose mit Überlebenszeiten von mehr als 10 Jahren haben (10). Es wurde in verschiedenen Arbeiten versucht Prognosefaktoren zu identifizieren, die eine Differenzierung zwischen diesen beiden Verlaufsformen erlauben. Diesbezüglich wurden neben dem Mitose- Index und dem Ki-67- Index die proliferationsassoziierten Proteine hervorgehoben, die einen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung haben (27). Hierzu zählen Topoisomerase- II- alpha, MCM6 und Repp86 (11, 12,13). Neben diesen proliferationsassoziierten Proteinen, die auch bei anderen Tumorerkrankungen eine prognostische Bedeutung haben, konnte in weiteren Untersuchungen gezeigt werden, dass auch tumorinfiltrierende Immunzellen einen Einfluss auf den Verlauf und auf die Prognose der malignen Erkrankungen haben. Aus dem Bereich der soliden Tumoren wurden beispielsweise beim Ovariakarzinom, beim malignen Melanom und beim hepatozellulären Karzinom gezeigt, dass Patienten mit einer hohen Anzahl von tumorinfiltrierenden Immunzellen, speziell von T- Lymphozyten, ein besseres Gesamtüberleben, weniger Metastasen und insgesamt eine bessere Prognose haben (16, 17, 28). Zusätzlich zu den soliden Tumoren wurden auch bei hämatologischen Erkrankungen, speziell den malignen Lymphomen derartige Arbeiten durchgeführt. So konnte beim follikulären

Lymphom, beim diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom und beim Morbus Hodgkin gezeigt werden, dass tumorinfiltrierende Immunzellen den Verlauf und die Prognose wesentlich beeinflussen (29, 30, 31). Patienten mit einer hohen Anzahl an tumorinfiltrierenden T- Zellen haben eine bessere Prognose als Patienten mit wenigen reaktiven T- Zellen im Tumor. Einen weiteren Beleg für den Einfluss von Immunzellen auf Tumorzellen stellt die allogene Blutstammzelltransplantation bei Lymphom- Patienten dar. Neben der Tatsache, dass die neuen Immunzellen den Empfänger als fremd erkennen (Transplantat gegen Wirt Reaktion), bekämpfen diese Zellen auch noch vorhandene maligne Lymphom oder Leukämiezellen und töten diese ab. Dieser Effekt wird auch als Transplantat gegen Lymphom Reaktion bezeichnet. Ritgen und Mitarbeiter haben diesbezüglich gezeigt, dass mit zunehmender Transplantat gegen Wirt Reaktion bei abnehmender Immunsuppression die Tumorlast nach allogener Transplantation bei Patienten mit B- CLL deutlich verringert wird (32).

In Anbetracht dieser Ergebnisse ist das Ziel dieser Arbeit den Einfluss von spezifischen tumorinfiltrierenden Immunzellen auf das MCL zu analysieren und zu bewerten. Hierbei handelt es sich um CD3-, CD8- sowie FoxP3- positive T- Zellen.

Blutleukozyten (ca. 4000- 10000/  $\mu$ l Blut) werden unterteilt in Granulozyten (ca. 60% der Leukozyten), Monozyten (ca. 6% der Leukozyten) und Lymphozyten (ca. 30% der Leukozyten). Alle dienen der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen, abgestorbenen körpereigenen Zellen, artfremden Proteinen sowie Virus- infizierten und auch entarteten Zellen. Die Lymphozyten wiederum werden unterteilt in B- und T- Lymphozyten, wobei ca. 80% der Lymphozyten B- und ca. 20 % T- Lymphozyten sind. Bei den T- Lymphozyten unterscheidet man zwischen CD4- positiven T- Helfer und CD8- positiven zytotoxischen T- Zellen (CTL). Das Verhältnis von CD4- zu CD8- positiven T- Zellen beträgt ca. 4: 1 zu Gunsten der CD4- positiven T- Zellen.

Die Lymphozyten reifen in den primären lymphatischen Organen, dem Knochenmark und dem Thymus, wobei sich die B- Lymphozyten im Knochenmark und die T- Lymphozyten im Thymus differenzieren. Nachdem im Knochenmark Vorstufen der späteren T-Lymphozyten, die sogenannten Prä- Thymozyten, entstehen, wandern diese zum Thymus und reifen zu Thymozyten heran (33).

Die entscheidenden Schritte der T- Zellentwicklung sind die Expression eines Antigenrezeptors (T- Zell- Rezeptor= TCR) sowie die Expression bestimmter Korezeptoren (CD4 und CD8) (34). Die Ontogenese im Thymus kann in 4 Schritte

eingeteilt werden: Stadium der doppelten Negativität, Stadium der doppelten Positivität, Stadium der einfachen Positivität und Reifung zur naiven T- Zelle (35, 36, 37).

Während der unterschiedlichen Schritte entsteht ein Vorläufer des TCR, ein Prä-TCR, bei dem die  $\beta$ - Kette des TCR mit einer  $\alpha$ - Ersatzkette verpaart und zudem mit CD3- Molekülen ergänzt wird (38). Es erfolgen Selektionsprozesse von TCR-tragenden T- Zellen, wobei zwischen positiver und negativer Selektion unterschieden wird. Bei der negativen Selektion erfahren alle T- Zellen mit einem TCR, der nicht mit MHC- Molekülen interagieren kann, den programmierten Zelltod (39). Die positive Selektion hingegen führt zu einer Hochregulation der TCR von T- Zellen, welche MHC- Moleküle erkennen und mit ihnen interagieren können. Abhängig davon, ob der TCR besser mit MHC- Molekülen der Klasse I oder Klasse II interagiert, entsteht entweder eine einfach positive T- Zelle mit CD-8- oder eine mit CD- 4- Molekül (40). Die CD- Moleküle (= Cluster of differentiation) sind membrangebundene Glykoproteine, die verschiedene Funktionen, wie beispielsweise Rezeptor- oder Signalfunktion, haben. Weiterhin nehmen die CD- Moleküle, wie bereits erwähnt, eine wichtige Rolle bei der interzellulären Kommunikation beispielsweise mit MHC- Molekülen bei der Erkennung von körpereigenen- und körperfremden Proteinen ein. (41). Das CD3- Molekül ist in der Reifung der T- Lymphozyten als Pan- T- Zell-Antigen anzusehen und ist auf allen T- Zellen exprimiert (42). Aufgrund dessen kann der immunhistochemische Nachweis der CD3- Moleküle Aufschluss über die Bedeutung von tumorinfiltrierenden Zellen in soliden Tumoren und bösartigen Erkrankungen des hämatologischen Systems geben.

Diesbezüglich konnte beim Östrogenrezeptor- negativem Mammakarzinom in der Gruppe um West und Mitarbeiter gezeigt werden, dass eine adjuvante Anthrazyklin-basierte Therapie nur bei Patienten mit einer hohen Dichte an tumorinfiltrierenden intraepithelialen CD3- positiven T- Zellen ein verlängertes tumorfreies Überleben bewirkte (43). Weiterhin gelang es Zhang und Mitarbeitern in einer Untersuchung den Einfluss von tumorinfiltrierenden T- Zellen auf die Prognose des Ovarialkarzinoms nachzuweisen. Man sah, dass ein Vorhandensein von Tumorinfiltrierenden T-Zellen mit einem verbesserten klinischen Verlauf assoziiert ist. Hierbei konnten bei 54.8 % der Patienten mit einem Ovarialkarzinom intratumorale CD-3- positive T- Zellen nachgewiesen werden. Die 5- Jahres- Überlebensrate

betrug 38 % bei Patienten mit tumorinfiltrierenden T- Zellen, im Gegensatz zu 4.5 % bei Patienten ohne Selbige (16).

In der vorliegenden Arbeit wurden 94 Fälle von CD3- positiven T- Zellen untersucht. Hierbei sah man, dass Patienten mit weniger als 55 CD3- positiven T- Zellen/ HPF ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben von etwa 14 Monaten aufwiesen, als Patienten mit mehr als 55 CD3- positive T-Zellen/ HPF ( $p= 0.0215$ ). Die Hotspot-Analyse zeigte keine signifikanten Ergebnisse, wobei bei einem Cut- off- Wert von 100 CD3- positiven Zellen/ HPF Patienten mit weniger als 100 CD3- positiven Zellen/ HPF ein verlängertes Gesamtüberleben von ca. 2 Monaten hatten, im Gegensatz zu Patienten die mehr als 100 CD3- positive Zellen/ HPF hatten ( $p= 0.8376$ ).

Insgesamt sind die von uns ermittelten Ergebnisse gegensätzlich zu den bisherigen Ergebnissen und der allgemeinen Annahme, dass Patienten mit einer hohen Anzahl von tumorinfiltrierenden T- Zellen eine bessere Prognose haben. Ein Erklärungsansatz für die diskrepanten Ergebnisse besteht möglicherweise in der Tatsache, dass nicht alle T- Zellen eine günstige Prognose auf hämato- onkologische Erkrankungen haben, jedoch wie bereits erwähnt die CD-3- Moleküle auf allen T- Zellen exprimiert sind. Somit werden bei einer immunhistochemischen Färbung der CD3- Moleküle auch die T- Zellen dargestellt, die möglicherweise eine ungünstige Prognose für Patienten mit einer hämato- onkologischen Erkrankung haben. In einer weiteren Dissertation über das MCL von F. Sirin (persönliche Mitteilung PD Dr. Schrader) konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine erhöhte Anzahl an Makrophagen eine ungünstige Prognose bei Patienten mit MCL bewirkt. Die Makrophagen wiederum werden hauptsächlich von CD4- positiven T- Zellen, den T- Helfer- Zellen aktiviert, welche, wie eingangs beschrieben, in einem Verhältnis von ca. 4:1 zu den CD8- positiven T- Zellen stehen und somit deutlich häufiger vorkommen. Somit lässt sich erklären, dass eine hohe Anzahl an CD3- positiven Zellen beim MCL eine ungünstige Prognose hat, wobei eine Darstellung der CD4- positiven T- Zellen zum Beleg dieser Hypothese notwendig ist und in folgenden Arbeiten untersucht werden sollte.

Die Cytotoxischen T- Zellen (CTL) gehören zu den Vertretern der spezifischen zellulären Immunantwort und spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Krankheitserregern. Sie werden im Thymus gebildet und geprägt und gelangen anschließend in die Peripherie, wo sie im Blut, in den Lymphknoten und in den

Organen mit körpereigenen Zellen interagieren und diejenigen abtöten, welche von Krankheitserregern befallen und dementsprechend modifiziert sind (44). Die Unterscheidung erfolgt mithilfe des T- Zell- Rezeptors und des MHC- I- Proteins, wobei sich die MHC- I- Proteine an der Oberfläche der körpereigenen Zellen befinden und Peptide (Antigene) aus dem Inneren der jeweiligen Zelle an sie gebunden sind. Die T- Zell- Rezeptoren befinden sich auf den CTL und binden nur ein spezifisches Antigen, womit folglich alle T- Zell- Rezeptoren einer CTL für ein Antigen spezifisch sind und alle anderen Antigene nicht erkennen können (45).

Um nicht fälschlicherweise körpereigene Zellen zu attackieren erfahren die CTL im Thymus einen Reifungsprozess, bei dem nur diejenigen CTL überleben, die nicht auf körpereigene MHC- gebundene Peptide reagieren. Alle anderen CTL, was etwa 95% der unreifen CTL entspricht, werden in den programmierten Zelltod (Apoptose) geschickt, sodass gewährleistet ist, dass keine CTL den Selektionsprozess überleben, die den eigenen Organismus attackieren würden. Dieser Mechanismus wird als zentrale Toleranz bezeichnet (40). Wenn die CTL durch ein für sie spezifisches Fremd- Antigen, beispielsweise im Rahmen eines Virusbefalls, aktiviert werden, schütten sie Perforine und Granzyme aus, welche die Fremd- Antigen-präsentierende Zelle in den programmierten Zelltod treibt. Zusätzlich wird von den aktivierten CTL das Interferon- $\gamma$  sezerniert, welches bei benachbarten Zellen die Produktion von MHC- I- Proteinen erhöht und es somit zu einer stärkeren Präsentation intrazellulär abgebauter Peptide kommt. Dadurch wird die Immunantwort im infizierten Bereich verstärkt, da mehr Antigene präsentiert und somit befallene Zellen schneller erkannt und abgetötet werden können (46). Die CTL spielen eine besondere Rolle bei der allogenen Stammzelltransplantation. Eine der Komplikationen der allogenen Stammzelltransplantation ist die Transplantat- gegen- Wirt- Reaktion (GvHD), bei der es zu einer Abwehrreaktion der übertragenen Spenderzellen gegen den Organismus des Empfängers kommt. Jedoch ist eine im geringen Ausmaß ausgeprägte GvHD erwünscht, da die noch vorhandenen Tumorzellen durch die übertragenen Spenderzellen zerstört werden. Diesen Effekt bezeichnet man als Transplantat- gegen- Leukämie- Reaktion (GvL). Die CTL sind hauptverantwortlich für die GvHD bzw. GvL, sodass gezeigt werden konnte, dass Patienten mit mehr CTL nach einer allogenen Transplantation eine bessere Prognose hatten als Patienten mit einer geringeren Anzahl. In verschiedenen Arbeiten wurde untersucht, inwiefern die Anzahl der CTL bei soliden Tumoren und

bei hämato- onkologischen Erkrankungen eine Bedeutung für das Gesamtüberleben der Patienten hat.

In der Arbeitsgruppe um Kawai und Mitarbeiter konnte beim Nichtkleinzelligem Bronchiakarzinom gezeigt werden, dass Patienten mit einer hohen Anzahl an CD8-positiven T- Zellen im Vergleich zu Patienten mit einer geringen Anzahl an Makrophagen und CD8- positiven T- Zellen ein signifikant ( $p= 0,070$ ) besseres Gesamtüberleben hatten (47). Beim primären diffusen großzelligen B- Zell- Lymphom hingegen, geht aus einer Untersuchung von Murrin und Mitarbeiter hervor, dass das Vorhandensein von  $> 15\%$  an aktivierten CTL einen schlechteren klinischen Verlauf, mit einem geringeren progressionsfreien- sowie einer schlechteren Gesamtüberlebenszeit nach sich zieht (21). Auch die Arbeitsgruppe um Hasselblom konnte in einer retrospektiven Studie von 195 Patienten mit primärem diffusem großzelligem B- Zell- Lymphom zeigen, dass eine niedrige Anzahl an CTL gleichbedeutend ist mit einer besseren Prognose in Bezug auf Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben (20).

In der vorliegenden Arbeit wurden 94 Fälle mit einem Mantelzell- Lymphom bezüglich des Vorhandenseins von CD8- positiven Zellen und deren Auswirkung auf das Gesamtüberleben untersucht. Sowohl in der Standardauswertung als auch in der Hotspot- Analyse konnte ein signifikanter Unterschied in Bezug auf das Gesamtüberleben festgestellt werden. Dabei leben Patienten mit mehr als 20 CD8-positiven Zellen pro High- Powerfield (HPF) im Mittel 13 Monate länger als Patienten, die weniger als 20 CD8- positive Zellen pro HPF haben ( $p= 0.0335$ ). In der Hotspot- Analyse betrug der Cut- off- Wert 30 CD8- positive Zellen/ HPF, wobei auch hier Patienten mit mehr als 30 CD8- positive Zellen/ HPF ein signifikant längeres Gesamtüberleben aufweisen, als Patienten mit weniger als 30 CD8- positive Zellen/ HPF ( $p= 0.0348$ ).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den bisherigen Arbeiten gezeigt wurde, dass bei soliden Tumoren eine hohe Anzahl an CD8- positiven Zellen mit einer besseren Prognose, wohingegen bei hämato- onkologischen Erkrankungen, wie zum Beispiel dem folliculären Lymphom, eine hohe Anzahl von CD8 Zellen im Tumor mit einer schlechten Prognose einhergeht. Beim MCL jedoch ist eine hohe Anzahl an CD8- positiven Zellen mit einer guten Prognose assoziiert.

B- und T- Zellen die selbstreaktiv sind, werden im Rahmen der Reifung in den primären lymphatischen Organen (Knochenmark, Thymus) durch Mechanismen der zentralen Toleranz ausselektiert. Es gibt aber auch Mechanismen, die in der Peripherie potentiell autoreaktive T- Zellen unterdrücken und überschießende Reaktionen des Immunsystems während eines Infektes regulieren. Diese Mechanismen werden als periphere Toleranz bezeichnet (48).

Die zentrale Toleranz richtet sich gegen T- Zellen, die während ihrer Reifung im Thymus mit hoher Affinität an Selbstpeptide binden, welche ihnen von dendritischen Zellen präsentiert werden. Diese Zellen erhalten ein Signal, welches sie in die Apoptose bringt und sie somit deletiert werden (Negativselektion). Einige von diesen T- Zellen, die mit hoher Affinität Selbstpeptide binden, werden nicht deletiert, sondern differenzieren zu regulatorischen T- Zellen aus, welche eine wichtige Funktion in der peripheren Toleranz spielen. Die periphere Toleranz beinhaltet Mechanismen, welche autoreaktive T- Zellen in der Peripherie inaktivieren. Zu diesen Mechanismen zählen unter anderem die Anergie und die Suppression (49).

An der Immunsuppression als solche sind regulatorische T- Zellen (Treg) beteiligt, welche als charakteristischen Marker CD25 (IL2R- alpha- Kette) tragen und den Transkriptionsfaktor Foxp3 (forkhead box P3) exprimieren. Cytokine wie vor allem TGF-  $\beta$  (transforming growth factor-  $\beta$ ) und Interleukin 10 (IL10), sowie direkte Zell-Zell Kontakte sind Mechanismen, mit denen die Treg die Suppression bewirken. Diesbezüglich inhibiert TGF-  $\beta$  die Proliferation von T- und B- Zellen und IL10 die Aktivierung von Makrophagen sowie die Differenzierung von CD4+ T- Zellen zu T-Helfer- 1 Zellen. In diesem Zusammenhang können die Treg auch Tumorzellen hemmen, welche ihre Tumorantigene - die in der Regel Selbstpeptide darstellen- über MHC- I präsentieren.

Es sind zwei Klassen von Treg beschrieben: natürliche und induzierte Treg. Die natürlichen Treg entstehen als eigene Reihe im Rahmen der T- Zell Differenzierung im Thymus, wohingegen induzierte Treg während der T- Zell Aktivierung in der Peripherie gebildet werden (50).

Aus dem Formenkreis der soliden Tumoren konnte beim Hepatozellulären Karzinom (HCC) gezeigt werden, dass eine hohe Konzentration an tumorinfiltrierenden Treg mit einem höheren Malignitätsgrad des Tumors sowie mit einer schlechteren Differenzierung einhergeht und somit eine schlechte Prognose daraus resultiert. (51). Weiterhin konnte selbige Erkenntnis, nämlich, dass eine hohe Treg- Dichte einer

negativen Prognose gleichbedeutend ist, beim Ösophaguskarzinom (52), beim Pankreaskarzinom (53), beim Magenkarzinom (54) und beim Kolorektalen Karzinom (55) festgestellt werden.

Bei den hämatologischen Tumorerkrankungen, wie beispielsweise dem peripheren T- Zell- Lymphom, konnte hingegen gezeigt werden, dass eine erhöhte Anzahl an Treg mit einem besseren Gesamtüberleben verbunden ist (56). Auch beim primären kutanen T- Zell- Lymphom konnte bewiesen werden, dass eine hohe Anzahl an Treg die Prognose verbessert (57). Beim klassischen Morbus Hodgkin zeigte sich ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben ( $p < 0,01$ ) sobald weniger als 25 % Treg vorhanden waren (58). Ähnliches konnte beim follikulären Lymphom beschrieben werden. In der Arbeit von Farinha und Mitarbeiter sah man, dass Patienten mit einer höheren Dichte an Tregs im Lymphom eine bessere progressionsfreie Überlebenszeit ( $p = 0.01$ ) sowie ein längeres Gesamtüberleben ( $p < 0.01$ ) hatten (30). Beim diffusen großzelligen B- Zell- Lymphom wurde ebenfalls beobachtet, dass ein höherer Anteil an Tregs mit einem signifikant verlängerten Gesamtüberleben assoziiert ist (59).

In unserer Arbeit wurden 94 Fälle mit FoxP3- positiven Tregs untersucht. Es zeigte sich ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben von etwa 10 Monaten bei Patienten mit mehr als 25 FoxP3- positiven Tregs/ HPF im Gegensatz zu denjenigen, die weniger als 25/ HPF aufwiesen ( $p = 0.0177$ ). In der Hotspot- Analyse konnten keine signifikanten Ergebnisse ermittelt werden. Bei einem Cut- off- Wert von 45 FoxP3- positiven Tregs/ HPF zeigte sich bei Patienten mit mehr als 45 FoxP3- positiven Tregs/ HPF ein verlängertes Gesamtüberleben von etwa 7 Monaten ( $p = 0.0913$ ). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass FoxP3- positive Tregs, ähnlich wie bei den übrigen hämato- onkologischen Erkrankungen, auch beim MCL einen positiven Einfluss auf die Prognose haben.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Mantelzell- Lymphom ist ein malignes Non- Hodgkin- Lymphom der B- Zellreihe mit einem medianen Überleben von 3 - 4 Jahren. Neben einer klinisch aggressiven Form gibt es auch Patienten mit Überlebensraten über 10 Jahre. Es gibt nur wenige anerkannte Prognosefaktoren, die eine Differenzierung zwischen der aggressiven und der langsam fortschreitenden Form ermöglichen. Hierzu zählen beispielsweise der Mitose- Index, der Ki- 67- Index sowie die proliferationsassoziierten Proteine. Es wurde gezeigt, dass tumorinfiltrierende Immunzellen eine besondere Rolle für den klinischen Verlauf bei diversen Krebserkrankungen spielen, so auch bei Lymphomen. Jedoch existieren nur wenige Studien die speziell die Bedeutung von Tumor infiltrierenden CD3-, CD8- sowie FoxP3- positiven T- Zellen für das Gesamtüberleben beim Mantelzell- Lymphom analysieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden Lymphknotenbiopsate von 94 Patienten (72 Männer, 22 Frauen) mit einem Mantelzell- Lymphom vor Therapiebeginn untersucht. Es wurde die Anzahl von tumorinfiltrierenden CD3-, CD8- sowie FoxP3- positiven T- Zellen immunhistochemisch bestimmt. Hierzu wurden in jedem Präparat die mit monoklonalen Antikörpern dargestellten Zellen in zehn High- Powerfields (HPF) gezählt sowie ein Mittelwert erstellt. Die Ergebnisse wurden anschließend unter Einbeziehung der klinischen Daten ausgewertet.

Wir konnten zeigen, dass Patienten mit MCL und vielen (über 20 Zellen/HPF) CD8- positiven T- Zellen im Tumor ein statistisch signifikant längeres Überleben mit 42 Monaten haben als Patienten mit einer niedrigeren Anzahl an CD8- positiven T- Zellen ( $p= 0.0335$ ). Bei der Untersuchung der tumorinfiltrierenden FoxP3- positiven T-Zellen zeigte sich ebenfalls ein statistisch signifikant längeres Überleben mit 38.2 Monaten bei Patienten mit einer hohen Anzahl (über 25 /HPF), im Gegensatz zu solchen mit einer niedrigen Anzahl (unter 25/HPF) an positiv markierten Zellen ( $p=0.177$ ). Auch die Hotspot- Analysen für CD8- und FoxP3- positive Zellen deckten sich mit den Analysen der Durchschnittswerte. Allerdings sah man bei den CD3- positiven Zellen ein gegensinniges Ergebnis. Denn die Auswertung ergab, dass Patienten mit einer hohen Anzahl (über 55/HPF) an CD3- positiven T- Zellen ein schlechteres Gesamtüberleben, als diejenigen mit einer niedrigen Anzahl (unter

55/HPF) hatten ( $p=0.0215$ ). Da CD3 jedoch auf allen reifen T- Zellen exprimiert wird und somit auch auf CD8- und FoxP3- positiven T- Zellen, scheint diese Beobachtung zunächst widersprüchlich zu den zuvor dargestellten Ergebnissen zu sein. Jedoch fehlt zur genauen Interpretation des Ergebnisses eine zusätzliche Untersuchung der Lymphknotenpräparate auf CD4- positive T- Zellen, da diese einen Großteil der T- Lymphozyten darstellen. Diese wurden aus der Differenz der CD3- und CD8- Zellen pro Schnitt ermittelt. Hierbei fanden sich in Korrelation zu den Überlebensdaten keine signifikanten Unterschiede.

Zusammenfassend konnte folglich gezeigt werden, dass tumorinfiltrierende T- Zellen (CD8 und FoxP3) einen wichtigen Prognosefaktor beim MCL darstellen. Patienten mit einer hohen Anzahl an CD8- bzw. FoxP3- positiven T- Zellen haben ein signifikant besseres Gesamtüberleben als diejenigen mit einer niedrigeren Anzahl. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine hohe Anzahl an CD3- positiven T- Zellen ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben bei Patienten mit MCL bedeutet.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Lennert K, Mohri N, Stein H, Kaiserling E. The histopathology of malignant lymphomata. *Br J Haematol* 1975;31 :193-203.
- (2) Lennert K, Feller AC. *Histopathologie der Non-Hodgkin-Lymphome (nach der aktualisierten Kiel-Klassifikation)*. 2 ed. Berlin, Heidelberg, New York, London, Pais, Tokyo, Hong Kong: Springer-Verlag; 1990.
- (3) Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press; 2001.
- (4) Banks PM, Chan J, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Gatter K, Grogan TM, Harris NL, Isaacson PG, Jaffe ES. Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data [see comments]. *Am J Surg Pathol* 1992;16(7):637-40.
- (5) Meusers P, Hense J, Brittinger G. Mantle cell lymphoma: diagnostic criteria, clinical aspects and therapeutic problems. *Leukemia* 1997 ;11 Suppl 2:S60-4.
- (6) Zucca E, Stein H, Coiffier B. European Lymphoma Task Force (ELTF): Report of the workshop on Mantle Cell Lymphoma (MCL) [see comments]. *Ann Oncol* 1994;5(6):507-11.
- (7) Williams ME, Meeker TC, Swerdlow SH. Rearrangement of the chromosome 11 bcl-1 locus in centrocytic lymphoma: analysis with multiple breakpoint probes. *Blood* 1991;78(2):493-8.
- (8) Lenz G, Dreyling M, Hiddemann W. Mantle cell lymphoma: established therapeutic options and future directions. *Ann Hematol* 2004;83(2):71-7.

- (9) Dreyling M, Lenz G, Hoster E, Van Hoof A, Gisselbrecht C, Schmits R, Metzner B, Truemper L, Reiser M, Steinhauer H, Boiron JM, Boogaerts MA, Aldaoud A, Silingardi V, Kluin-Nelemans HC, Hasford J, Parwaresch R, Unterhalt M, Hiddemann W. Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood* 2005;105(7):2677-84.
- (10) Campo E, Raffeld M, Jaffe ES. Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol* 1999;36(2):115-27.
- (11) Schrader C, Meusers P, Brittinger G, Teymoortash A, Siebmann JU, Janssen D, Parwaresch R, Tiemann M. Topoisomerase IIalpha expression in mantle cell lymphoma: a marker of cell proliferation and a prognostic factor for clinical outcome. *Leukemia* 2004 ;18(7):1200-6.
- (12) Schrader C, Janssen D, Meusers P, Brittinger G, Siebmann JU, Parwaresch R, Tiemann M. Repp86: a new prognostic marker in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2005 ;75(6):498-504.
- (13) Schrader C, Janssen D, Klapper W, Siebmann JU, Meusers P, Brittinger G, Kneba M, Tiemann M, Parwaresch R. 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* 2005 17;93(8):939-45.
- (14) Andersen NS, Jensen MK, de Nully BP, Geisler CH. A Danish population-based analysis of 105 mantle cell lymphoma patients. incidences, clinical features, response, survival and prognostic factors. *Eur J Cancer* 2002 ;38 (3):401 -838.

- (15) Hoster E, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, Van HA, Kluin-Nelemans HC, Pfreundschuh M, Reiser M, Metzner B, Einsele H, Peter N, Jung W, Wormann B, Ludwig WD, Duhren U, Eimermacher H, Wandt H, Hasford J, Hiddemann W, Unterhalt M. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 2008 ;111(2):558-65.
- (16) Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003;348(3):203-13.
- (17) Ladanyi A, Somlai B, Gilde K, Fejos Z, Gaudi I, Timar J. T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(2):521-30.
- (18) Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dirnhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FoxP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2008;93(2):193-200.
- (19) Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, Montserrat E, Campo E, Banham AH. High numbers of tumor-infiltrating FoxP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* 2006;108(9):2957-64.
- (20) Hasselblom S, Sigurdadottir M, Hansson U, Nilsson-Ehle H, Ridell B, Andersson PO. The number of tumour-infiltrating TIA-1+ cytotoxic T cells but not FoxP3+ regulatory T cells predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2007;137(4):364-73.
- (21) Muris JJ, Meijer CJ, Cillesen SA, Vos W, Kummer JA, Bladergroen BA, Bogman MJ, MacKenzie MA, Jiwa NM, Siegenbeek van Heukelom LH, Ossenkoppele GJ, Oudejans JJ. Prognostic significance of activated cytotoxic T-lymphocytes in primary nodal diffuse large B-cell lymphomas. *Leukemia* 2004;18(3):589-96.

- (22) Brittinger G, Bartels H, Common H, Duhmke E, Fulle HH, Gunzer U, Gyenes T, Heinz R, König E, Meusers P. 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* 1984;2(3):269-306.
- (23) Meusers P, Engelhard M, Bartels H, Binder T, Fulle HH, Gorg K, Gunzer U, Havemann K, Kayser W, König E. Multicentre randomized therapeutic trial for advanced centrocytic lymphoma: anthracycline does not improve the prognosis. *Hematol Oncol* 1989;7(5):365-80.
- (24) Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. 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* 1992;168(4):357-63.
- (25) Tiemann M, Teymoortash A, Schrader C, Werner JA, Parwaresch R, Seifert G, Kloppel G. Chronic sclerosing sialadenitis of the submandibular gland is mainly due to a T lymphocyte immune reaction. *Mod Pathol* 2002;15 (8 ):845 - 52.
- (26) Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29(4):577-80.
- (27) 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. 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* 2005;131(1):29-38.
- (28) Ju MJ, Qiu SJ, Gao Q, Fan J, Cai MY, Li YW, Tang ZY. Combination of peritumoral mast cells and T-regulatory cells predicts prognosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009;100(7):1267-74.

- (29) Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, Montserrat E, Campo E, Banham AH. High numbers of tumor-infiltrating FoxP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* 2006 ;108(9):2957-64.
- (30) Farinha P, Al-Tourah A, Gill K, Klasa R, Connors JM, Gascoyne RD. The architectural pattern of FoxP3-positive T cells in follicular lymphoma is an independent predictor of survival and histologic transformation. *Blood* 2010;115(2):289-95.
- (31) Lee AM, Clear AJ, Calaminici M, Davies AJ, Jordan S, MacDougall F, Matthews J, Norton AJ, Gribben JG, Lister TA, Goff LK. Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3-positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. *J Clin Oncol* 2006;24(31):5052-9.
- (32) Ritgen M, Bottcher S, Stilgenbauer S, Bunjes D, Schubert J, Cohen S, Humpe A, Hallek M, Kneba M, Schmitz N, Dohner H, Dreger P. Quantitative MRD monitoring identifies distinct GVL response patterns after allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: results from the GCLLSG CLL3X trial. *Leukemia* 2008;22(7):1377-86.
- (33) Cordier AC, Haumont SM. Development of thymus, parathyroids, and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. *Am J Anat* 1980;157(3):227-63.
- (34) Anderson G, Moore NC, Owen JJ, Jenkinson EJ. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol* 1996;14:73-99.
- (35) Zuniga-Pflucker JC, Lenardo MJ. Regulation of thymocyte development from immature progenitors. *Curr Opin Immunol* 1996 ;8(2):215-24.
- (36) Petrie HT, Hugo P, Scollay R, Shortman K. Lineage relationships and developmental kinetics of immature thymocytes: CD3, CD4, and CD8 acquisition in vivo and in vitro. *J Exp Med* 1990 1;172(6):1583-8.
- (37) van EW. T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu Rev Immunol* 1991;9:591-615.

- (38) Nehls M, Kyewski B, Messerle M, Waldschutz R, Schuddekopf K, Smith AJ, Boehm T. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science* 1996;272(5263):886-9.
- (39) Padovan E, Casorati G, Dellabona P, Meyer S, Brockhaus M, Lanzavecchia A. Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science* 1993;262(5132):422-4.
- (40) Shortman K, Egerton M, Spangrude GJ, Scollay R. The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol* 1990;2(1):3-12.
- (41) Kruisbeek AM, Amsen D. Mechanisms underlying T-cell tolerance. *Curr Opin Immunol* 1996;8(2):233-44.
- (42) Fink PJ, Bevan MJ. H-2 antigens of the thymus determine lymphocyte specificity. *J Exp Med* 1978;148(3):766-75.
- (43) West NR, Milne K, Truong PT, MacPherson N, Nelson BH, Watson PH. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011;13(6):R126.
- (44) Berke G. Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing. Lymphocyte-triggered internal target disintegration. *Immunol Today* 1991;12(11):396-9.
- (45) Shiver JW, Su L, Henkart PA. Cytotoxicity with target DNA breakdown by rat basophilic leukemia cells expressing both cytolysin and granzyme A. *Cell* 1992;71(2):315-22.
- (46) Kuppers RC, Henney CS. Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytolysis. IX. Relationships between antigen recognition and lytic expression in killer T cells. *J Immunol* 1977;118(1):71-6.

- (47) Kawai O, Ishii G, Kubota K, Murata Y, Naito Y, Mizuno T, Aokage K, Saijo N, Nishiwaki Y, Gemma A, Kudoh S, Ochiai A. Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2008;113(6):1387-95.
- (48) Miller JF, Flavell RA. T-cell tolerance and autoimmunity in transgenic models of central and peripheral tolerance. *Curr Opin Immunol* 1994;6(6):892-9.
- (49) Kornete M, Piccirillo CA. Functional crosstalk between dendritic cells and Foxp3(+) regulatory T cells in the maintenance of immune tolerance. *Front Immunol* 2012;3:165.
- (50) Xing Y, Hogquist KA. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012 1;4(6):a006957.
- (51) Mathai AM, Kapadia MJ, Alexander J, Kernochan LE, Swanson PE, Yeh MM. Role of Foxp3-positive Tumor-infiltrating Lymphocytes in the Histologic Features and Clinical Outcomes of Hepatocellular Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2012;36(7):980-6.
- (52) Wang G, Liu G, Liu Y, Li X, Su Z. FoxP3 Expression in Esophageal Cancer Cells is Associated with Poor Prognosis in Esophageal Cancer. *Hepatogastroenterology* 2012;59(119):10.
- (53) Yamamoto T, Yanagimoto H, Satoi S, Toyokawa H, Hirooka S, Yamaki S, Yui R, Yamao J, Kim S, Kwon AH. Circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with pancreatic cancer. *Pancreas* 2012;41(3):409-15.
- (54) Kashimura S, Saze Z, Terashima M, Soeta N, Ohtani S, Osuka F, Kogure M, Gotoh M. CD83(+) dendritic cells and Foxp3(+) regulatory T cells in primary lesions and regional lymph nodes are inversely correlated with prognosis of gastric cancer. *Gastric Cancer* 2012;15(2):144-53.
- (55) Bacic D, Uravic M, Bacic R, Sutic I, Petrosic N. Augmentation of regulatory T cells (CD4+CD25+Foxp3+) correlates with tumor stage in patients with colorectal cancer. *Coll Antropol* 2011;35 Suppl 2:65-8.:65-8.

- (56) Yamada S, Sato F, Xia H, Takino H, Kominato S, Ri M, Ishida T, Iida S, Inagaki H, Yamada K. Forkhead box P1 overexpression and its clinicopathologic significance in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified. *Hum Pathol* 2012 43(8); 1322-7.
- (57) Felcht M, Heck M, Weiss C, Becker JC, Dippel E, Muller CS, Nashan D, Sachse MM, Nicolay JP, Booken N, Goerdts S, Klemke CD. Expression of the T-cell regulatory marker FoxP3 in primary cutaneous large B-cell lymphoma tumor cells. *Br J Dermatol* 2012 167(2); 1365-2133.
- (58) Koreishi AF, Saenz AJ, Persky DO, Cui H, Moskowitz A, Moskowitz CH, Teruya-Feldstein J. The role of cytotoxic and regulatory T cells in relapsed/refractory Hodgkin lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010;18(3):206-11.
- (59) Lee WC, Wu TJ, Chou HS, Yu MC, Hsu PY, Hsu HY, Wang CC. The impact of CD4+ CD25+ T cells in the tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma. *Surgery* 2012;151(2):213-22.

## **DANKSAGUNG**

Herrn Priv.- Doz. Dr. med. C. Schrader gilt mein besonderer Dank dafür, dass er mir diese Dissertation ermöglicht hat, indem er mir das Thema überlassen hat und mir einen Arbeitsplatz organisiert hat. Zudem danke ich ihm für seine stetige Unterstützung und Betreuung bei dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. med. U. R. Fölsch und Prof. Dr. med. Stefan Schreiber, Direktor der I. Medizinischen Klinik, UKSH Campus Kiel danke ich dafür, die vorliegende Dissertation in ihrer Klinik durchführen zu können.

Herrn PD Dr. W. Klapper, Direktor der Sektion Hämatopathologie/ Lymphknotenregister Kiel und dem medizinisch technischen Assistenten Michael Weiss möchte ich insbesondere für die Unterstützung bei der Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen danken.

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 bei der Bereitstellung aller klinischen Daten der Therapiestudien, sowie für die Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse.

Herrn Dr. J. H. Claasen, ehemaliger Mitarbeiter der Klinik für Allgemeine Innere Medizin , Kiel, jetzt Klinik für Neurologie des Uniklinikums Dresden, danke ich für seine Hilfe bei der Auswertung der Schnittpräparate und der Ergebnisse.

Ein letzter herzlicher Dank gilt meiner Ehefrau Aylin und meiner neu geborenen Tochter Beyza, die mir die nötige Motivation und Kraft für diese Dissertation gegeben haben.

## **LEBENS LAUF**

### **Persönliche Daten**

Name: Akaltun  
Vorname: Öcal  
Geburtsdatum: 21.05.1984  
Geburtsort: Neumünster  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: Verheiratet

### **Schul Ausbildung**

07\2004 Allgemeine Hochschulreife, Gymnasium Holstenschule  
Neumünster

### **Hochschulausbildung**

10/2004 – 11/2010 Studium der Humanmedizin an der  
Christian- Albrechts- Universität zu Kiel

08\2009 – 08\2010 Praktisches Jahr

11/2010 Approbation als Arzt

### **Berufstätigkeit:**

Seit 12/2010 Assistenzarzt an der III. Medizinischen Klinik des  
Städtischen Krankenhauses Kiel

### **Wissenschaftliche Tätigkeiten:**

02/08 Doktorand in der Arbeitsgruppe PD Dr. C. Schrader  
Klinik für Allgemeine Innere Medizin  
(Direktor: Prof. Dr. Fölsch)

### **Sonstige Tätigkeiten:**

12\2006 – 04\2009 Kompass Klinik Kiel: Tätigkeit als Extrawache

### **Ehrenamtliche Tätigkeiten:**

01/2007- 08/2009 Förde Bildungsverein in SH e.V.  
Funktion: Nachhilfelehrer

10/2008 – 10/2010 Vorstandsmitglied der Hochschulgruppe Tangente an der  
Christian- Albrechts- Universität zu Kiel

Seit 01/2011 Vorstandsmitglied des Nord Dialog e.V.  
Tätigkeit: Interkultureller Dialog

### **Sprachkenntnisse**

Deutsch, Türkisch ( Muttersprache)  
Englisch ( Verhandlungssicher )  
Französisch ( fließend in Wort und Schrift )

Kiel, den 18.07.2012

## SCHRIFTENVERZEICHNIS

- [1] Schrader C, **Akaltun Ö**, Meusers P, Brittinger G, Claasen J and Klapper K. (2011) Account of CD 8 and FOXP 3 positive T cells predict survival in mantle cell lymphoma. Hematologica: **96**: (Suppl.2) #1389
  
- [2] Schrader C, **Akaltun Ö**, Meusers P, Brittinger G, Claasen J and Klapper K. (2011) Tumor infiltrating T cells predict survival in mantle cell lymphoma: an immunohistochemical study of 81 patients. Eur J Cancer: **47**: (Suppl.1) #9211
  
- [3] Schrader C, **Akaltun Ö**, Meusers P, Brittinger G, Claasen J and Klapper K. (2011) Reactive Tumor infiltrating T cells predict survival in mantle cell lymphoma: an immunohistochemical study of 81 patients. Onkologie: **34**: (Suppl.6) #475
  
- [4] Schrader C, **Akaltun Ö**, Meusers P, Brittinger G, Claasen J and Klapper K. (2012) Reactive Tumor infiltrating T cells predict survival in mantle cell lymphoma: an immunohistochemical study of 81 patients. Der Pathologe (Suppl.1) #27