Aus dem Institut für Pathologie
Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister
(Leiter: Herr Prof. Dr. med. W. Klapper)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

CHARAKTERISIERUNG DER PROGNOSTISCH RELEVANTEN PROLIFERATIVEN TUMORZELLEN IN MANTELZELLLYMPHOMEN

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

vorgelegt von

NIKLAS VOGT
aus Hamburg

Kiel 2013

1. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. med. W. Klapper

2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. med. M. Weichenthal

Tag der mündlichen Prüfung: 07.04.2014

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 19.12.2013

gez.:
Prof. Dr. med. J. Roider
Vorsitzender der Prüfungskommission

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis V

1. Einleitung 1

Fragestellungen 6

2. Materialien und Methoden 7

2.1 Verwendete Materialien und Chemikalien 7

2.2 Gewebeproben 9

2.3 Zytologie und Wachstumsmuster 10

2.4 Ki67-Index 11

2.5 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen 11

2.6 Anfertigung der digitalen Bilder am Fluoreszenzmikroskop 13

2.7 Digitale Bildanalyse der Immunfluoreszenzdoppelfärbungen 14

2.8 Statistische Analysen 15

3. Ergebnisse 16

3.1 Analysen der sequentiellen MCL 16

3.1.1 Zytologie 17

3.1.2 Wachstumsmuster 18

3.1.3 Ki67-Index 18

3.1.4 Einfluss der Zytologie, des Wachstumsmusters und des Ki67-Index auf das Überleben der Patienten 22

3.2 Charakteristika der immunfluoreszenz-gefärbten MCL-Biopsien 26

3.2.1 Ki67 und Cyclin D1 27

3.2.2 Ki67 und p53 30

3.2.3 Ki67 und p27 31

3.2.4 Ki67 und Survivin bzw. Phospho-Histone-H3 32

4. Diskussion 35

5. Zusammenfassung 44

Publikation der Ergebnisse 45

6. Literaturverzeichnis 46

Danksagungen 52

Lebenslauf 53

Abkürzungsverzeichnis

Cdk	*Cyclin dependent kinase* (Cyclin-abhängige Kinase)
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHAP	Dexamethason, Cytarabin und Cisplatin
FISH	*Fluorescence in situ hybridization* (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung)
HPF	*High power field* (Hochvergrößerungsfeld)
Ki67-Index	prozentualer Anteil Ki67-positiver Zellen
MCL	*Mantle Cell Lymphoma* (Mantelzelllymphom)
MCP	Mitoxantron, Chlorambucil und Prednisolon
MIPI	*MCL International Prognostic Index* (MCL Internationaler Prognoseindex)
MRD	*Minimal residual disease* (Minimale Resterkrankung)
PCR	*Polymerase-Chain-Reaction* (Polymerasekettenreaktion)

1. Einleitung

Das Mantelzelllymphom (MCL) ist ein B-Zell-Lymphom, das durch die Translokation t(11;14)(q13;q32) charakterisiert ist (Swerdlow et al. 2008). Die Erstbeschreibung unter dem Begriff „centrocytisches Lymphom“ geht auf Lennert et al. zurück (Gérard-Marchant et al. 1974). MCL stellen einen Anteil von etwa 5-10% aller B-Zell-Lymphome (Jares et al. 2007). Männer sind häufiger betroffen als Frauen (etwa 2-7:1; Jares et al. 2007). Das MCL tritt bevorzugt bei älteren Menschen auf (medianes Alter 60 Jahre, Bereich 29-85 Jahre; Jares et al. 2007).

Das mittlere Gesamtüberleben beträgt gegenwärtig 3-7 Jahre (Dreyling et al. 2013). Es wird von Einzelfällen berichtet, in denen Patienten über 12 Jahre nach der Diagnosestellung noch am Leben waren, was auf eine Subgruppe mit sehr guter Prognose hinweist (Nodit et al. 2003). Die Einteilung der Stadien erfolgt nach der Ann-Arbor-Klassifikation, die ursprünglich für das Hodgkin Lymphom entwickelt wurde. Es werden folgende Stadien unterschieden: Stadium I: Befall einer Lymphknotenregion; Stadium II: Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells; Stadium III: Befall auf beiden Seiten des Zwerchfells; Stadium IV: diffuser oder disseminierter Befall (Carbone et al. 1971). Unter B-Symptomen werden nicht erklärbares Fieber über 38°C, Gewichtsverlust über 10% des Körpergewichtes innerhalb der letzten sechs Monate oder Nachtschweiß zusammengefasst (Carbone et al. 1971). Das MCL wird überwiegend in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert (Ann-Arbor IV>70%; Harel et al. 2011) und B-Symptome sind bei 35% der MCL-Patienten nachweisbar (Tiemann et al. 2005). Ein Knochenmarksbefall tritt in 60-80%, ein Blutbefall in 25-50%, ein Befall des Gastrointestinaltraktes in über 90% und ein Befall des zentralen Nervensystems in 5% der MCL-Fälle auf (Harel et al. 2011).

Derzeit besteht die Primärtherapie bei jungen MCL-Patienten in einer hochdosierten cytarabinhaltigen Induktionstherapie, gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation zur Konsolidierung (Dreyling et al. 2013). Während der letzten 30 Jahre wurde das MCL als unheilbare Erkrankung angesehen (Harel et al. 2011). Auch heutzutage rezidivieren MCL häufig und die Heilungsrate bleibt niedrig (Dreyling et al. 2013, Harel et al. 2011). Der klinische Verlauf der Erkrankung ist sehr

variabel und kann in der Primärbiopsie auch unter moderner Immunchemotherapie mit CD20-Antikörpern durch Bestimmung des Ki67-Index, des prozentualen Anteils Ki67-positiver bzw. proliferierender Zellen, abgeschätzt werden (Determann et al. 2008). Ein hoher Ki67-Index ist mit einer schlechten Prognose assoziiert. Weitere prognostische Faktoren des MCL sind in einem Prognoseindex (Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index, MIPI) zusammengefasst, der unter der Berücksichtigung der vier Kriterien Alter, funktionelle Leistungsfähigkeit, Laktatdehydrogenase-Serumspiegel und Anzahl der Leukozyten im Blut bei der Diagnosestellung eine klinische Risikoabschätzung ermöglicht (Hoster et al. 2008). Der vielleicht stärkste prognostische Marker ist die Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD) durch Nachweis eines lymphomspezifischen Immunglobulinrearrangements mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (PCR) aus dem Blut (Pott et al. 2010). Die MRD wird im Gegensatz zum Ki67-Index und dem MIPI nicht zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, sondern nach der Therapie im Blut und Knochenmark gemessen.

Morphologisch sind die MCL-Zellen etwas größer als Lymphozyten, die Zellkerne bohnenförmig oder eingekerbt (Klapper 2011). Diese Zytologie wird als klassisch bezeichnet und ist in etwa 90% der Fälle nachweisbar (Tiemann et al. 2005). In den übrigen Fällen ist die Zytologie sehr variabel: von kleinzellig ähnlich der chronisch lymphatischen Leukämie, über pleomorph ähnlich dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom, bis blastisch ähnlich dem lymphoblastischen Lymphom (Klapper 2011). Die pleomorphe und die blastische Variante werden auch unter der Bezeichnung „blastoid“ zusammengefasst (Klapper 2011). Die blastoide Variante weist in der Regel einen höheren Ki67-Index auf als die klassische und zeigt häufig Mitosen (Swerdlow et al. 2008, Tiemann et al. 2005). Die Prognose der blastoiden Variante ist schlechter als die der klassischen (Norton et al. 1995, Tiemann et al. 2005).

Histologisch können drei Wachstumsmuster differenziert werden: Mantelzonen-, noduläres und diffuses Wachstum (Klapper 2011). Das namensgebende Mantelzonenwachstum ist selten (1,4% der Fälle), während das noduläre (18,1%) und das diffuse Wachstum (80,5%) am häufigsten nachweisbar sind (Tiemann et al. 2005). Das Mantelzonenwachstum wird charakterisiert durch die Ausbreitung der Lymphomzellen in den abnormal verbreiterten Mantelzonen der reaktiven

Lymphfollikel, während die Keimzentren nicht infiltriert werden (Klapper 2011). Das noduläre Wachstum zeichnet sich durch die Kompression und das Verschwinden der Keimzentren aus, wobei ein organisch knotiger Aspekt nachweisbar bleibt, der beim diffusen Wachstum verloren geht (Klapper 2011). In der Literatur wird zur Abgrenzung von nodulärem und diffusem Wachstum ein knotiger Anteil von 50% vorgeschlagen (Klapper 2011). Bei einem höheren Anteil spricht man von einem nodulären, bei einem geringeren Anteil von einem diffusen Wachstum. Das Mantelzonenwachstum und das noduläre Wachstum haben in einigen Studien eine bessere Prognose als das diffuse Wachstum (Tiemann et al. 2005).

Neben der beschriebenen Morphologie weist das MCL auch einen typischen Immunphänotyp auf. Die MCL-Zellen sind positiv für den klassischen B-Zell-Marker CD20, den T-Zell-Marker CD5 und den klassischen MCL-Marker Cyclin D1 sowie meist negativ für CD23 und CD10 (Klapper 2011).

In 95% der MCL kann die Translokation t(11;14)(q13;q32) mit Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) nachgewiesen werden (Vaandrager et al. 1996). Die Translokation t(11;14) wird als primäres genetisches Ereignis der Tumorgenese angesehen und ereignet sich in B-Zellen des Prä-B-Stadiums, also einer frühen Differenzierung während der V(D)J-Rekombination im Knochenmark (Jares et al. 2007). Durch diese reziproke Translokation wird das CCND1-Gen, das für Cyclin D1 kodiert, von Chromosom 11q13 auf Chromosom 14q32 in die Nähe des Immunglobulinschwerkettengens positioniert (Jares et al. 2007). Unter dem Einfluss des Promotors des Immunglobulinschwerkettengens resultiert die Überexpression der Cyclin D1-mRNA und eines funktionellen Cyclin D1-Proteins (Lukas et al. 1994). Die physiologische Rolle von Cyclin D1 ist die Einleitung des Überganges von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus (Lukas et al. 1994). Cyclin D1 bindet und aktiviert die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (Cdk), welche wiederum das Retinoblastom-Protein phosphorylieren (Coqueret 2002). Im phosphorylierten Zustand setzt das Retinoblastom-Protein den Transkriptionsfaktor EF2 frei, welcher S-Phase-Gene aktiviert und den G1-S-Übergang induziert (Coqueret 2002). Cyclin D1 entfernt durch Bindung die inhibierenden Proteine der Cip/Kip-Proteinfamilie, z.B. p27, vom Cyclin E/Cdk2-Komplex, welcher dadurch aktiv wird und den Zellzyklus beschleunigt (Coqueret 2002). Das MCL gilt somit als Paradigma für ein Lymphom

mit gestörter Zellzykluskontrolle. Da das physiologische lymphatische Gewebe kein immunhistochemisch nachweisbares Cyclin D1 exprimiert, ist die Expression von Cyclin D1 ein hilfreicher diagnostischer Marker für das MCL (de Boer et al. 1995, Yang et al. 1994). Allerdings exprimieren auch einige Fälle der chronisch lymphatischen Leukämie, der Haarzellleukämie (de Boer et al. 1995, Yang et al. 1994), des multiplen Myeloms (Quinn et al. 2010) und des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms (Hsiao et al. 2012) Cyclin D1.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Translokation t(11;14) als einziges onkogenes Ereignis zur Pathogenese des MCL nicht ausreicht und weitere genetische Aberrationen in einer Zelle mit dieser Translokation auftreten müssen, damit ein Lymphom entsteht. In einer Studie an 100 augenscheinlich gesunden Individuen konnte die Translokation t(11;14) im peripheren Blut eines Probanden nachgewiesen werden (Hirt et al. 2004). Transgene Mäuse, die infolge der Translokation Cyclin D1 exprimieren, entwickelten keine spontanen Lymphome; erst die Kombination mit dem Onkogen MYC führte zur schnellen Entwicklung von B-Zell Lymphomen (Lovec et al. 1994). Genetische Studien zeigen, dass das MCL, insbesondere die blastoide Variante, im Vergleich mit anderen Non-Hodgkin-Lymphomen, ein hohes Maß an genetischer Instabilität aufweist (Salaverria et al. 2006). So konnten mittels FISH z.B. Deletionen des TP53-Gens in 43% der MCL nachgewiesen werden (Sander et al. 2007). Sekundäre genetische Veränderungen können eine zusätzliche Zellzyklusdysregulation durch Alterationen des INK4A/CDK4/RB1- und des ARF/MDM2/p53-Signaltransduktionsweges bedingen (Jares und Campo 2008). Weiterhin kann eine Dysregulation der Reaktion auf DNA-Schäden, resultierend aus Mutationen des ATM-Gens, sowie eine Verminderung der Apoptoserate als Folge der Aktivierung des AKT-Signalweges auftreten (Jares und Campo 2008).

Insgesamt gibt es nur wenige Arbeiten in der Literatur, die mehrere Biopsien eines Patienten im Zeitverlauf der Erkrankung analysiert haben. Dennoch basiert auf diesen Analysen ein Modell der histologischen Lymphomprogression. Diese Analysen sequentieller Biopsien zeigen, dass sich die Zytologie und das Wachstumsmuster im Krankheitsverlauf ändern können (Norton et al. 1995, Swerdlow et. al. 1983). Auf zytologischer Ebene wurde eine Entwicklung von der klassischen zur blastoiden Variante im Rezidiv angenommen (Norton et al. 1995,

Swerdlow et. al. 1983). Das Wachstumsmuster entspricht nur bei Diagnosestellung überwiegend dem Mantelzonenwachstum und ist im Rezidiv eher nodulär oder diffus (Norton et al. 1995, Swerdlow et. al. 1983). Genetische Analysen eines Patienten wiesen eine klonale Verbindung zwischen der blastoiden Variante des Rezidivs und der klassischen bei der Diagnosestellung nach (László und Matolcsy 1999). Somit wird davon ausgegangen, dass die blastoide Variante direkt aus der klassischen hervorgeht und nicht de-novo entsteht. Sehr aktuell ist die Entdeckung von sogenannten MCL „in situ“-Fällen als möglicherweise früheste Form des MCL (Carvajal-Cuenca et al. 2012). Diese sind dadurch definiert, dass sich einzelne atypische Zellen in der Mantelzone von reaktiven Lymphfollikeln befinden, die die charakteristische Translokation t(11;14) und die Überexpression von Cyclin D1 aufweisen (Carvajal-Cuenca et al. 2012). Basierend auf diesen Beobachtungen wurde ein Modell der Pathogenese des MCL vorgeschlagen, das eine Progression vom MCL „in situ“ über ein Mantelzonenwachstum zu nodulärem oder diffusem Wachstum und von der klassischen Zytologie bis hin zur pleomorphen und blastischen als Ausdruck der Lymphomprogression postuliert (Jares et al. 2007).

Ki67, der klassische Proliferationsmarker, ist das zentrale Antigen dieser Arbeit. Das Ki67-Antigen zeigt sich nur in einer proliferierenden und ist abwesend in einer ruhenden Zellpopulation (Gerdes et al. 1984). Die Ki67-Expression markiert also die Zellen, die sich in der G1-, S-, G2-, und M-Phase des Zellzyklus befinden (Braun et al. 1988, Gerdes et al. 1984). Die prognostische Relevanz des prozentualen Anteils der Ki67-positiven Zellen, ausgedrückt als Ki67-Index, konnte für das MCL in vielen Arbeiten gezeigt werden (Determann et al. 2008, Tiemann et al. 2005). Survivin wird spezifischer nur in der G2- und der M-Phase des Zellzyklus exprimiert (Li et al. 1998) und ist analog zu Ki67 im MCL mit dem Gesamtüberleben assoziiert (Martinez et al. 2004). Phospho-Histone-H3 wird ausschließlich in der M-Phase des Zellzyklus exprimiert (Nasr und El-Zammar 2008). Erstellt man einen Quotienten aus den genannten Markern, so erhält man ein Maß für die Zellzyklusgeschwindigkeit. Das p27-Protein gehört zur Cip/Kip-Proteinfamilie, die viele verschiedene Cdk/Cyclin-Komplexe inhibiert (Sherr und Roberts 1999). Das nicht mutierte p53 wird aktiviert, wenn ein DNA-Schaden in der G1-Phase auftritt und verhindert den Übergang in die S-Phase (Hunter und Pines 1994). Die Expression von p53 in

immunhistochemischen Färbungen ist mit Mutationen des TP53-Gens assoziiert (Bataille et al. 2003).

Mit einer Immunfluoreszenzdoppelfärbung kann die Expression von zwei Markern in einer Biopsie differenziert auf die einzelne Zelle untersucht werden. Dabei kann entweder festgestellt werden, dass beide Marker von einer Population exprimiert werden (Co-Expression) oder dass die Marker in unterschiedlichen Populationen exprimiert werden (inverse Expression).

Fragestellungen

1) Kann aus der Untersuchung sequentieller Biopsien im Krankheitsverlauf des MCL ein Modell für die Lymphomevolution und –progression abgeleitet werden?

2) Kann durch molekulare Charakterisierung der proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen der postulierte Zellzyklusdefekt des MCL dargestellt werden?

2. Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Materialien und Chemikalien

- Fluoreszenzmikroskop: Universalmikroskop „Axioplan“ 2 IMAGING (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland)

- Antikörper:

    - Ki67 (Epitomics, Burlingame, USA, Katalognummer: 4203-1)

    - Ki67 (S5, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Deutschland)

    - Cyclin D1 (Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA, Katalognummer: 9104-S)

    - p53 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA, Katalognummer: sc-263)

    - p27 (Dako Glostrup, Dänemark, Katalognummer: M720301)

    - Survivin (Novus Biologicals, Littleton, USA, Katalognummer: NB500-201)

    - Phospho-Histone-H3 (Biocare Medical, Concord, USA, Katalognummer: CP 404 A)

    - Alexa Fluor 488 Anti-Rabbit (Life Technologies, Grand Island, USA, Katalognummer: A-21206)

    - Alexa Fluor 555 Anti-Rabbit (Life Technologies, Grand Island, USA, Katalognummer: A-31572)

    - Alexa Fluor 488 Anti-Mouse (Life Technologies, Grand Island, USA, Katalognummer: A-21202)

    - Alexa Fluor 555 Anti-Mouse (Life Technologies, Grand Island, USA, Katalognummer: A-31570)

- Filter (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland)

    - DAPI: Filterset 02, Bestellnummer: 488002-9901-000
    - Alexa 555: Filterset 20, Bestellnummer: 488020-9901-000
    - GFP: Filterset 38HE, Bestellnummer: 489038-9901-000
    - Fitc: Filterset 10, Bestellnummer: 488010-9901-000

- VisiView: Version 2.0.6 (Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland)
- Axioplan: AxioVs40V 4.8.2.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland)
- TissueQuest: Beta Version 2.2.4.0105 (TissueGnostics GmbH, Wien, Österreich)
- Graph Pad Prism: Version 5.04 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, USA)
- Dampfkochtopf: Modell-Clipso (Tefal, Offenbach, Deutschland)
- Pipetten, (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- Pipettenspitzen (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- Heizplatte
- Lichtabweisende Box
- Deckgläser, Objektträger
- Citrat-Puffer: pH6, 10,5g Citronensäure-Monohydrat und 65ml Natronlauge (2mol/L) auf 5L destilliertes Wasser (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Phosphat-Puffer: Phosphate Buffered Saline (PBS), (Life Technologies, Grand Island, USA)
- Antikörperverdünner: VIR-DIL Probenverdünnungspuffer (medac GmbH, Wedel, Deutschland)

- DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)
- Eindeckmedium: Fluorescent Mounting Medium, (DAKO, Glostrup, Dänemark)

2.2 Gewebeproben

Die Gewebeproben sind in der Datenbank der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister des Instituts für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel registriert und wurden entsprechend den Kriterien der WHO als MCL klassifiziert (Swerdlow et al. 2008). Alle Patienten mit MCL im Zeitraum zwischen 1991 und 2011 wurden identifiziert (n=1231) und auf weitere Biopsien im Zeitverlauf überprüft. Solche sequentiellen Biopsien fanden sich bei 140 von 1231 Patienten. Um eine optimale histologische Beurteilung zu gewährleisten, wurden Knochenmarkstanzen und sehr kleine oder schlecht erhaltene Biopsien ausgeschlossen, sodass das untersuchte Kollektiv 67 Patienten umfasste. Als Einschlusskriterium mussten mindestens zwei Biopsien von jedem Patienten vorliegen, von denen mindestens eine aus einem Lymphknoten entnommen sein musste. Wenn mehr als zwei Biopsien eines Patienten verfügbar waren, wurden alle analysiert. Von den 67 untersuchten Patienten mussten fünf von der Analyse ausgeschlossen werden, da keine Primärbiopsie zum Diagnosezeitpunkt vor Therapiebeginn vorlag. Bei 15 Patienten erfolgte die Entnahme der zweiten Biopsie innerhalb von 70 Tagen nach der Primärbiopsie. Bei fünf dieser 15 Patienten war aus klinischen Angaben bekannt, dass die zweite Biopsie unter der Therapie entnommen wurde. Bei den anderen zehn Patienten musste ebenfalls davon ausgegangen werden. Deshalb wurden diese 15 Patienten von der Analyse der sequentiellen Verläufe ausgeschlossen, sodass die finale Kohorte 47 Patienten umfasste. Die Behandlung der Patienten erfolgte an unterschiedlichen Kliniken. Die klinischen Daten hinsichtlich Diagnosestadium, Therapie, letzter Kontrolluntersuchung bzw. Todeszeitpunkt wurden im Rahmen des diagnostischen Prozesses mithilfe eines Fragebogens erhoben. Das Gesamtüberleben der Patienten wurde aus dem Zeitraum zwischen Entnahme der Primärbiopsie (dies entspricht dem Datum der Diagnosestellung) und der letzten Kontrolluntersuchung bzw. dem Tod des Patienten berechnet. Wenn für die statistischen Analysen andere Überlebenszeiten, z.B. Zeitraum zwischen Entnahme der Biopsie des Rezidivs und der letzten

Kontrolluntersuchung bzw. dem Tod des Patienten, ermittelt wurden, wird explizit darauf hingewiesen.

Für die Immunfluoreszenzdoppelfärbung wurden insgesamt 18 Patientenfälle ausgewählt (15 Fälle aus dem Jahr 2011 sowie jeweils einer aus den Jahren 2005, 2007 und 2009). Die Einschlusskriterien waren eine Exzisionsbiopsie aus einem Lymphknoten von mindestens 1cm² Größe und die optimale Fixierung des Gewebes. Das Vorhandensein klinischer Daten oder sequentieller Biopsien war für diese Untersuchung keine Voraussetzung. Die Kontrolle der Färbung und die Ermittlung von Referenzwerten erfolgte an vier reaktiven Tonsillen, zwei Mammakarzinomen und drei diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen.

Alle Untersuchungen erfolgten in Übereinstimmung mit den Empfehlungen der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zur Verwendung von Gewebeproben aus dem Archiv des Lymphknotenregisters (Az D447/10). Alle patientenbezogenen Daten wurden in pseudonymisierter Form nur innerhalb des gesicherten Datennetzes der Universität Kiel gespeichert. Alle Publikationen wurden in vollständig anonymisierter Form verfasst.

2.3 Zytologie und Wachstumsmuster

Die Morphologie der MCL-Zellen wurde anhand von Giemsa- bzw. Hämatoxylin-Eosin-Färbungen analog zu vorherigen Studien (Tiemann et al. 2005) und der WHO Klassifikation (Swerdlow et al. 2008) beurteilt. Zytologisch wurden folgende Varianten unterschieden: kleinzellig, klassisch, pleomorph und blastisch. Für die statistischen Analysen der sequentiellen Biopsien wurden die MCL mit klassischer und kleinzelliger Variante zur Gruppe „klassisch/kleinzellig“, sowie die pleomorphen und blastischen zur Gruppe „blastoid“ zusammengefasst. Wenn in derselben Biopsie sowohl eine klassisch/kleinzellige als auch eine pleomorphe oder blastische Variante nachweisbar waren, wurde diese als blastoid klassifiziert.

Die Wachstumsmuster wurden ausschließlich an Lymphknotenexzisionen analog zu den publizierten Studien beurteilt (Tiemann et al. 2005). Ein Mantelzonenwachstumsmuster wurde diagnostiziert, wenn dieses dominant war und eine Kompression oder das Verschwinden der Keimzentren in weniger als 50% des Gewebes vorlag. Die Wachstumsmuster wurden bei einem diffusen Anteil von

weniger als 25% als nodulär, bei einem diffusen Anteil von 25-75% als nodulär-diffus und bei einem diffusen Anteil von mehr als 75% als diffus klassifiziert. Durch die zusätzliche Aufteilung in nodulär-diffuse und diffuse Wachstumsmuster sollte der große Anteil des diffusen Wachstumsmusters innerhalb aller MCL besser differenziert werden. Für die statistischen Analysen wurde eine Dichotomisierung in Mantelzonenwachstum und in noduläres sowie nodulär-diffuses und diffuses durchgeführt.

2.4 Ki67-Index

Der Ki67-Index entspricht dem prozentualen Anteil der Ki67-positven Lymphomzellen und wurde nach den Richtlinien des Europäischen MCL-Netzwerkes ermittelt (Klapper et al. 2009). Dazu wurden repräsentative Areale ausgewählt, die keine residualen Keimzentren, Zentren der Proliferation oder proliferierende T-Zellen enthielten. Pro Biopsie wurden in zwei Hochvergrößerungsfeldern (HPF) jeweils 100 Zellen ausgezählt und ein Mittelwert gebildet. Die prozentuale Abweichung des zweiten vom ersten HPF betrug im Median 24,8% des ersten Wertes. Die Änderung des Ki67-Index zwischen Primär- und Sekundärbiopsie wurde mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt. Zum einen wurden alle Änderungen berücksichtigt und zum anderen nur die relativen Änderungen zwischen Primär- und Sekundärbiopsie, die größer als 24,8% und damit größer als der mittlere Fehler bei der Auszählung mehrerer HPF waren. Bei Patienten, von denen drei Biopsien vorlagen, wurde für die statistische Analyse nur die Änderung von der Primär- zur Sekundärbiopsie beurteilt. Für die Überlebensanalysen wurden die in früheren Publikationen etablierten Gruppen von <10%, 10-30% und >30% Ki67-Index verwendet (Determann et al. 2008).

2.5 Immunfluoreszenzdoppelfärbungen

Das Prinzip einer Immunfluoreszenzdoppelfärbung besteht darin, dass zwei unterschiedliche Primärantikörper, z.B. Anti-Ki67 und Anti-Cyclin D1 aus verschiedenen Spezies, z.B. Maus und Kaninchen, an ihre Epitope binden. Danach werden die Primärantikörper mit gegen ihre Herkunftsspezies gerichteten Sekundärantikörpern, z.B. aus Esel Anti-Maus und aus Esel Anti-Kaninchen, nachgewiesen. Die beiden Sekundärantikörper sind mit einem roten bzw. grünen

Fluoreszenzfarbstoff (Wellenlänge 555nm bzw. 488nm) markiert. Nur die Sekundärantikörper sind unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Die zur Immunfluoreszenzdoppelfärbung verwendeten histologischen Schnitte wurden am Schlittenmikrotom angefertigt und wiesen eine Dicke von 2-3µm auf.

Die Immunfluoreszenzdoppelfärbungen wurden nach den in der Pathologie üblichen Standards für paraffineingebettetes Gewebe durchgeführt. Nach zehnminütigem Verbleib in Xylol erfolgte die Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe bis zu 70% Alkohol. Die Antigene wurden durch 3-4 minütiges Kochen in Citrat-Puffer bei pH6 im Dampfkocher demaskiert. Die beiden primären Antikörper wurden in den jeweiligen Konzentrationen als Mischung mit 100µl Antikörperverdünner pro Objektträger angesetzt und auf den Objektträger getropft. Nach einstündiger Inkubation wurden die Präparate in Phosphat-Puffer gewaschen. Die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sekundärantikörper wurden ebenfalls als Mischung mit 100µl Phosphat-Puffer pro Objektträger vermischt und auf den Objektträger getropft. Da die Fluoreszenzfarbstoffe sehr lichtempfindlich sind und schnell ausbleichen, wurde von diesem Arbeitsschritt an in der Dunkelkammer gearbeitet. Nach einstündiger Inkubation wurden die Präparate in Phosphat-Puffer gewaschen. Die Kernfärbung erfolgte durch 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in der Verdünnung 1:5000 in 100 µl Phosphat-Puffer pro Objektträger. Nach zweiminütiger Inkubation wurden die Präparate erneut in Phosphat-Puffer gewaschen. Abschließend wurden die Präparate mit Eindeckmedium und Deckgläsern verschlossen sowie mit Nagellack versiegelt. Die verwendeten Antikörper, die Herkunftsspezies, der Klon und die Verdünnung werden in Tabelle 1 aufgeführt.

Zur Beurteilung des Expressionsmusters wurde Ki67 mit Cyclin D1, p53, p27, Survivin und Phospho-Histone-H3 kombiniert. Die Kombinationen der Primärantikörper, die Kochdauer und die verwendeten Filter werden in Tabelle 2 dargestellt.

Bezeichnung des AK	Herkunftsspezies	Klon	Verdünnung
Ki67 (S5)	Maus		1:5
Ki67	Kaninchen	Sp6	1:50
Cyclin D1	Kaninchen	Sp4	1:25
p53	Maus	Bp53-12	1:200
p27	Maus	SX53G8	1:100
Survivin	Kaninchen		1:500
Phospho-Histone-H3	Kaninchen		1:100
Alexa Fluor 488 Anti-Rabbit	Esel		1:100
Alexa Fluor 555 Anti-Rabbit	Esel		1:100
Alexa Fluor 488 Anti-Mouse	Esel		1:100
Alexa Fluor 555 Anti-Mouse	Esel		1:100

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Antikörper, der Herkunftsspezies, des Klons und der Verdünnung. AK: Antikörper.

Kochdauer	1. Primär-AK	Filter	2. Primär-AK	Filter
4 min	Ki67 (S5)	Fitc	Cyclin D1	Alexa 555
3 min	Ki67	Fitc	p27	Alexa 555
3 min	Ki67	Alexa 555	p53	GFP
3 min	Ki67 (S5)	Fitc	Survivin	Alexa 555
3 min	Ki67 (S5)	Fitc	Phosho-Histone-H3	Alexa 555

Tabelle 2: Kombination der Primärantikörper, Kochdauer und Filter. AK: Antikörper. min: Minuten.

2.6 Anfertigung der digitalen Bilder am Fluoreszenzmikroskop

Die fluoreszenzgefärbten Präparate wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop in einer Dunkelkammer analysiert. Es wurde beurteilt, ob die Antigene durch Primär- und Sekundärantikörper, sowie die Kerne durch die DAPI-Kernfärbung in der gewünschten Intensität angefärbt worden waren. Bei 100-facher Vergrößerung erfolgte die Auswahl eines repräsentativen Areals. Dieses sollte viele Tumorzellen und aufgrund ihrer Autofluoreszenz wenig Erythrozyten enthalten. Residuale Keimzentren, Zentren der Proliferation oder Areale proliferierender T-Zellen wurden vermieden (Klapper et al. 2009). In jedem Präparat wurden zwei unabhängige, nicht überlappende Areale in 400-facher Vergrößerung aufgenommen (VisiView Software, Version 2.0.6, Visitron Systems GmbH). Dementsprechend fanden sich zwischen 800-1200 Zellen auf einem Bild. Entsprechend den Einstellungen nimmt die Software die Bilder für die verschiedenen Wellenlängen automatisch nach dem Filterwechsel auf. Die farbigen Bilder wurden einzeln als tif-Dateien gespeichert und in der digitalen Bildanalyse weiterverarbeitet.

2.7 Digitale Bildanalyse der Immunfluoreszenzdoppelfärbungen

Mit dem Programm Axioplan (AxioVs40V 4.8.2.0, Carl Zeiss Microscopy GmbH) wurden die farbigen Bilder in Schwarz-Weiß-Bilder überführt. Des Weiteren wurde die Helligkeit der Bilder so adjustiert, dass der interzelluläre Hintergrund der Bilder minimiert wurde und die Zellkerne möglichst scharf voneinander abgrenzbar waren. In das Programm TissueQuest (Beta Version 2.2.4.0105, TissueGnostics GmbH) wurden die nachbearbeiteten Bilder der DAPI-Kernfärbung und der Sekundärantikörper einzeln eingelesen. Das Programm bestimmte anhand der Kernfärbung landkartenartig die Grenzen der einzelnen Zellkerne. Für jeden Zellkern konnte auf diese Weise separat die Intensität der Fluoreszenz der beiden Sekundärantikörper bestimmt werden. Die Ergebnisse wurden analog zu einer durchflusszytometrischen Analyse in einem Scattergramm dargestellt, wobei jeder Punkt einer Zelle entspricht. Auf der x- und y-Achse wurden die Intensitäten der beiden Sekundärantikörper logarithmisch gegeneinander aufgetragen. Zwei definierte Grenzwerte unterteilten die Zellen für jeweils einen der Sekundärantikörper in positiv und negativ. Auf die Weise wurden vier Quadranten erzeugt. Im ersten Quadrant waren die Zellen für beide, im zweiten und dritten für jeweils einen sowie im vierten für keinen der Sekundärantikörper positiv. Die Grenzwerte wurden so gewählt, dass unmittelbar um die Grenzwerte herum jeweils die Hälfte der Zellen positiv bzw. negativ für den Sekundärantikörper war. Für die Kontrollen wurden jeweils drei sowie für die MCL jeweils zwei Areale fotografiert, analysiert und die Mittelwerte gebildet.

Exprimierten innerhalb der Ki67-positiven Population relativ mehr Zellen das zweite Antigen, z.B. p53, als in der Ki67-negativen, wurde das als Co-Expression definiert. Das Gegenteil wurde inverse Expression genannt. Co-Expression und inverse Expression wurde anhand zweier Methoden beurteilt. Bei Auslesemethode 1 wurde die absolute Anzahl der Zellen in allen vier Quadranten ausgezählt. Für die Ki67-positive und -negative Population wurde der Prozentsatz der Zellen, die positiv für den zweiten Sekundärantikörper waren (Dichotomisierung), berechnet. Bei Auslesemethode 2 wurde die Intensität der Fluoreszenz des zweiten Sekundärantikörpers jeweils in der Ki67-positiven und -negativen Population bestimmt (Intensitätsbestimmung). Hinsichtlich einer Co-Expression oder inversen Expression wurden die Kombinationen Ki67 mit Cyclin D1, p53 und p27 beurteilt.

Für die Kombinationen Ki67 mit Survivin und Phospho-Histone-H3 wurde die Ki67-positive Population detaillierter untersucht. Der Prozentsatz der Survivin- bzw. Phospho-Histone-H3-positiven innerhalb der Ki67-positiven Zellen wurde als Surrogatparameter für die Geschwindigkeit des Zellzyklus in dem jeweiligen Gewebe definiert. Ein hoher Prozentsatz entspricht dabei einer hohen Zellzyklusgeschwindigkeit. Bei der digitalen Bildanalyse in einem geeigneten repräsentativen Areal der immunfluoreszenz-gefärbten MCL entspricht der prozentuale Anteil aller Ki67-positiven Zellen dem Ki67-Index. Für die Berechnung des Zusammenhanges des Prozentsatzes der Survivin- bzw. Phospho-Histone-H3-positiven innerhalb der Ki67-positiven Zellen mit dem Ki67-Index wurde der durch die digitale Bildanalyse bestimmte Prozentsatz herangezogen. So konnten mögliche Fehler der digitalen Bildanalyse ausgeglichen werden.

2.8 Statistische Analysen

Für die statistische Analyse wurde das Programm Graph Pad Prism 5.04 verwendet. Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden bei stetigen, aber nicht normal verteilten Daten mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Bei nominalen und unverbundenen Daten wurde der zweiseitige Binomialtest sowie bei nominalen und verbundenen Daten der McNemar-Test verwendet. Korrelationen zwischen zwei Variablen wurden mit dem Spearman-Test unter Angabe des Korrelationskoeffizienten berechnet. Die Überlebenszeit der Patienten wurde in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Unterschiede zwischen zwei bzw. drei Gruppen wurden durch den Log-Rank-Test bzw. den Log-Rank-Trend-Test ermittelt. Die Auswertung der stetigen, aber nicht normalverteilten Daten für die Kombinationen Ki67 mit Cyclin D1, p53 und p27 erfolgte für beide Auslesemethoden mit einem gepaarten Wilcoxon-Rangsummen-Test. Pro Patient wurde die Ki67-positive mit der -negativen Gruppe hinsichtlich des Prozentsatzes der Zellen, die positiv für den zweiten Sekundärantikörper waren, bzw. der Intensität des zweiten Sekundärantikörpers verglichen. Zur Analyse des Zusammenhanges zwischen dem Ki67-Index und dem Prozentsatz der Survivin- bzw. Phospho-Histone-H3-positiven innerhalb der Ki67-positiven Zellen wurde der Spearman-Test angewendet. Die p-Werte wurden auf vier Stellen hinter dem Komma gerundet. Zur Bestimmung eines statistisch signifikanten Unterschieds wurden p-Werte kleiner als 0,05 definiert.

3. Ergebnisse

3.1 Analysen der sequentiellen MCL

Die final analysierte Kohorte der sequentiellen Verläufe umfasste 47 Patienten. Bei 38 Patienten waren zwei Biopsien vorhanden, bei acht drei, und bei einem sechs. Der Zeitraum zwischen erster und zweiter Biopsie war sehr variabel (Median 966 Tage, Bereich 126 bis 3557). Bei 74% (35/47) der Patienten war aus klinischen Informationen bekannt, dass die Entnahme der zweiten Biopsie im ersten Rezidiv erfolgte. Die Patienten waren zumeist männlich (74%, 35/47; M:W=2,92:1) und älter als 60 Jahre (60%, 28/47; medianes Alter 63 Jahre, Bereich 30 bis 80 Jahre). Die Mehrzahl der Patienten präsentierte sich bei Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung nach Ann-Arbor-Klassifikation (Stadium I: zwei, Stadium II: sechs, Stadium III: sechs, Stadium IV: 25, unbekannt: acht Fälle; Stadium III und IV: 66%, 31/47). B-Symptome waren bei 36% (13/36) der Patienten nachweisbar. Bei 91% (43/47) der Patienten lagen klinische Daten bezüglich des Überlebens vor. Für diese Patienten wurde das mediane Gesamtüberleben aus einer Kaplan-Meier-Kurve mit 2537 Tagen berechnet, entsprechend etwa 83 Monaten bzw. 6 Jahren und 11 Monaten. Die applizierte Primärtherapie bestand bei 70% (33/47) der Patienten aus einer Anthrazyklin-basierten, d.h. z.B. Doxorubicin oder Mitoxantron enthaltenden Polychemotherapie. Im Einzelnen: CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon) bei 26% (12/47), CHOP in Kombination mit anti-CD20 Therapie (Rituximab) bei 36% (17/47), CHOP und DHAP (Dexamethason, Cytarabin und Cisplatin) in Kombination mit anti-CD20 Therapie bei 4% (2/47), MCP (Mitoxantron, Chlorambucil und Prednisolon) bei 4% (2/47), Strahlentherapie bei 6% (3/47), sonstige Therapieregime bei 15% (7/47) und keine Informationen bezüglich der Primärtherapie bei 9% (4/47) der Patienten.

Die Primärbiopsien wurden in 45 Fällen aus Lymphknoten und in jeweils einem Fall aus dem Gastrointestinaltrakt sowie der Tonsille entnommen. Die Sekundärbiospien stammten in 33 Fällen aus Lymphknoten, in neun aus dem Gastrointestinaltrakt und in fünf aus anderen Lokalisationen. Biopsien des Knochenmarks wurden von der Analyse ausgeschlossen, um Verfälschungen des Ki67-Index durch die Hämatopoese zu verhindern, da die Blutbildung mit einer hohen Proliferationsrate assoziiert ist.

3.1.1 Zytologie

In der Primärbiopsie wurden 79% (37/47) der Fälle als klassische/kleinzellige und 21% (10/47) als blastoide Variante klassifiziert. Eine Änderung der zytologischen Variante konnte im zeitlichen Verlauf in 28% (13/47) der Fälle nachgewiesen werden (Abbildung 1 und 2). Ein Wechsel von klassisch/kleinzellig zu blastoid war absolut gesehen häufiger. Bei prozentualer Betrachtungsweise war jedoch ein Wechsel von blastoid zu klassisch/kleinzellig häufiger (50%, 5/10 vs. 22%, 8/36; Tabelle 3), wenn auch nicht signifikant (McNemar: p=0,5791). In einem Fall, der in der Primärbiopsie der klassischen Variante zugeordnet wurde, war die Analyse der folgenden Biopsien aufgrund von Fixierungsmängeln nicht möglich.

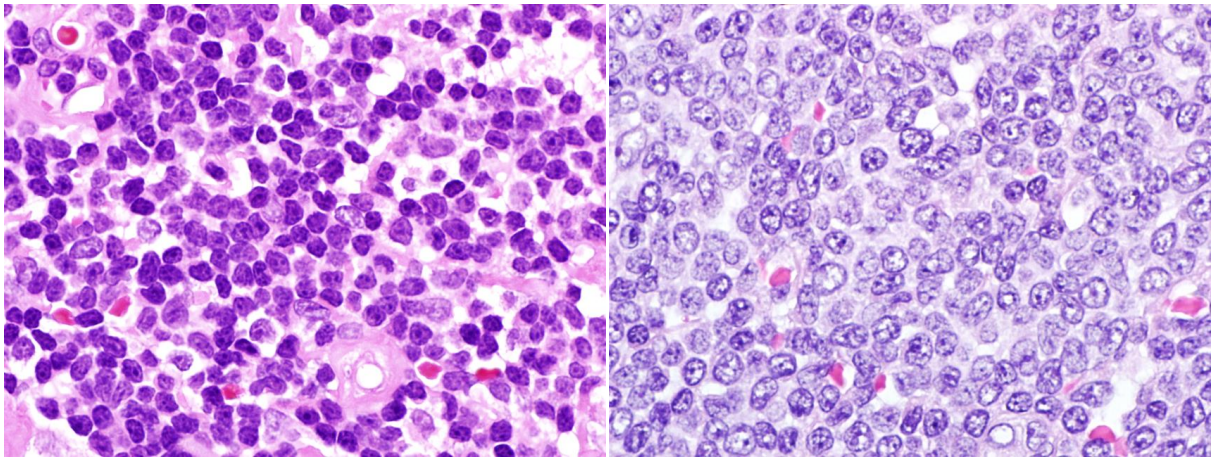

Abbildung 1: Änderung der Zytologie von klassisch (links) nach blastisch (rechts); Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 1000-fache Vergrößerung.

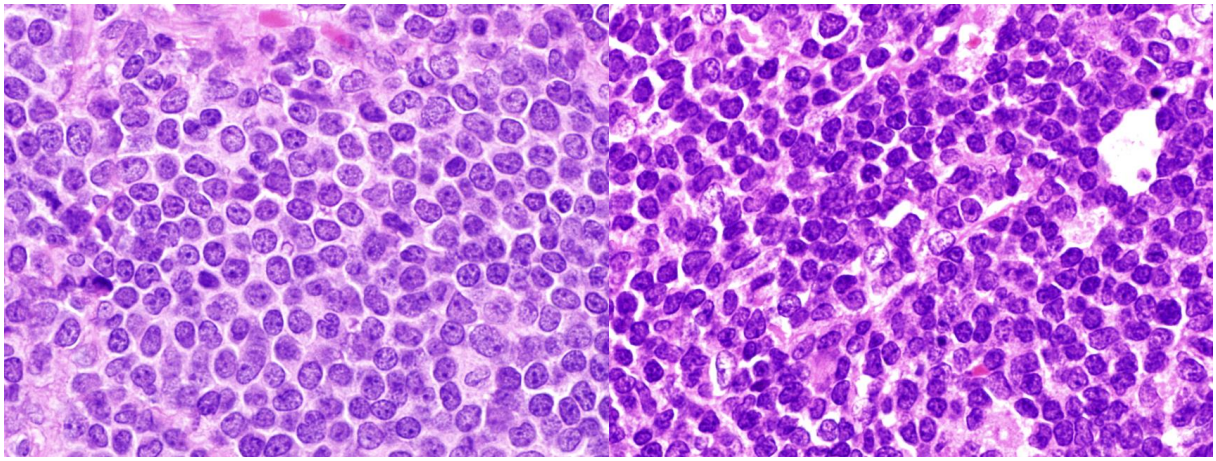

Abbildung 2: Änderung der Zytologie von blastisch (links) nach klassisch (rechts); Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 1000-fache Vergrößerung.

	Sekundär- bzw. Tertiärbiopsie		
Primärbiopsie	klassisch/kleinzellig	blastoid	n.a.
klassisch/kleinzellig (n=37)	28/37 (75,7%)	8/37 (21,6%)	1/37 (2,7%)
blastoid (n=10)	5/10 (50%)	5/10 (50%)	0 (0%)

Tabelle 3: Absolute und prozentuale Änderung der Zytologie von Primärbiopsien auf folgende Biopsien. 42 Sekundärbiopsien und vier Tertiärbiopsien wurden beurteilt. n.a.: nicht auswertbar.

3.1.2 Wachstumsmuster

In der Primärbiopsie zeigten 15% (7/47) der MCL bzw. 16% (7/44) der auswertbaren MCL ein Mantelzonenwachstum, 34% (16/47) bzw. 36% (16/44) ein noduläres, 19% (9/47) bzw. 21% (9/44) ein nodulär-diffuses und 26% (12/47) bzw. 27% (12/44) ein diffuses Wachstum. In 6% (3/47) der Fälle war eine Auswertung nicht möglich. In fast allen MCL (71%, 5/7) war das in der Primärbiopsie nachgewiesene Mantelzonenwachstum in der folgenden Biopsie in ein noduläres (14%, 1/7) oder ein diffuses Wachstum (72%, 4/7) übergegangen. Nur in einem Fall war auch in der folgenden Biopsie (14%, 1/7) das Mantelzonenwachstum nachweisbar, während das Wachstumsmuster eines weiteren Falles nicht ausgewertet werden konnte (14%, 1/7). Ein Wechsel vom nodulären, nodulär-diffusen oder diffusen zum Mantelzonenwachstum trat in 8% (3/37) der MCL auf. In Tabelle 4 werden die Änderungen der Wachstumsmuster dargestellt.

	Sekundärbiopsie				
Primärbiopsie	Mantelzonen	nodulär	nodulär-diffus	diffus	n.a.
Mantelzonen (n=7)	1/7 (14,3%)	0/7 (0%)	1/7 (14,3%)	4/7 (57,1%)	1/7 (14,3%)
nodulär (n=16)	1/16 (6%)	2/16 (13%)	4/16 (25%)	1/16 (6%)	8/16 (50%)
nodulär-diffus (n=9)	0/9 (0%)	1/9 (11,1%)	1/9 (11,1%)	4/9 (44,5%)	3/9 (33,3%)
diffus (n=12)	2/12 (16,7%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	7/12 (58,3%)	3/12 (25%)

Tabelle 4: Absolute und prozentuale Änderung des Wachstumsmusters in 44 Fällen. Das Wachstumsmuster wurde in den Primär- und den Sekundärbiopsien beurteilt. n.a.: nicht auswertbar.

3.1.3 Ki67-Index

Der Ki67-Index war in den blastoiden Varianten signifikant höher als in der klassisch/kleinzelligen (Abbildung 3), sowohl in der Primärbiopsie (Median 51% vs. 13%; Mann-Whitney-Test: p=0,0003) als auch in der Sekundärbiopsie (Median 50% vs. 22%; Mann Whitney-Test: p=0,0324).

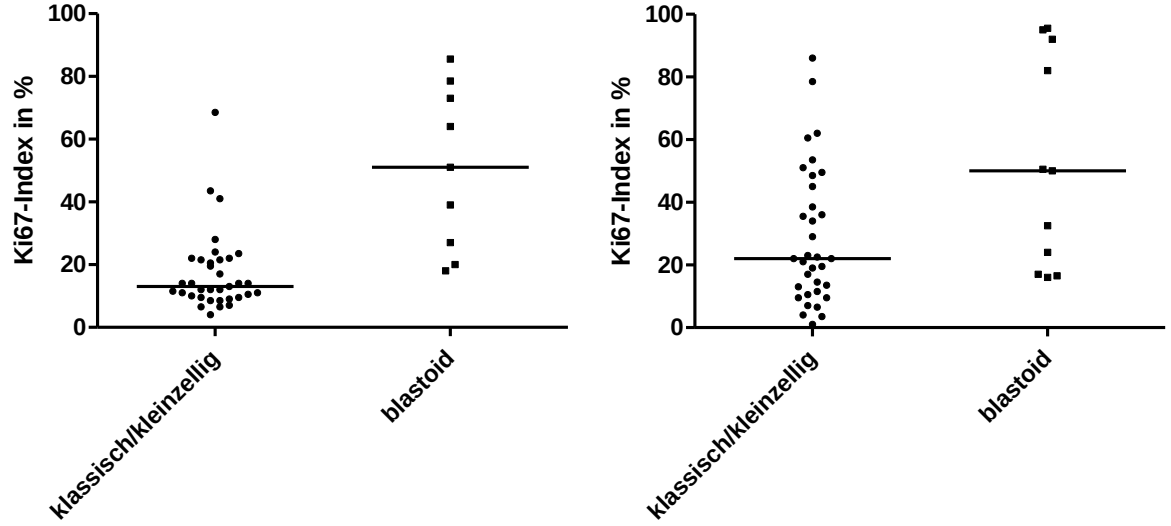

Abbildung 3: Darstellung des Ki67-Index in der klassisch/kleinzelligen (n=35 bzw. n=34) und der blastoiden Variante (n=9 bzw. n=11). Links Primärbiopsie (Mann-Whitney-Test: p=0,0003). Rechts Sekundärbiopsie (Mann-Whitney-Test: p=0,0324). Der schwarze Balken ist der Median.

Im Durchschnitt war der Ki67-Index in den Primärbiopsien (Median 15,5%, Bereich 4% bis 85,5%) niedriger als in den Sekundärbiopsien (Median 23,5%, Bereich 1% bis 95,5%) und den Tertiärbiopsien (Median 28,5%, Bereich 14.5% bis 77%). Der Unterschied zwischen Primär- und Sekundärbiopsie war signifikant (Mann-Whitney-Test: p=0,0318), nicht jedoch zwischen Sekundär- und Tertiärbiopsie (Abbildung 4).

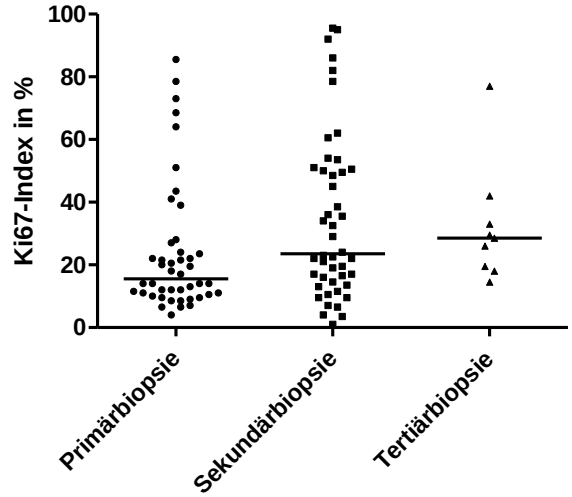

Abbildung 4: Darstellung des Ki67-Index in der Primär- (n=44), der Sekundär- (n=46) und der Tertiärbiopsie (n=9). Der schwarze Balken ist der Median. Mann-Whitney-Test: p=0,0318 (zwischen Primär- und Sekundärbiopsie).

Im Vergleich der einzelnen Patienten stieg der Ki67-Index von der Primär- zur Sekundärbiopsie in 74% (32/43) der Patienten und sank in 26% (11/43) der Patienten (Abbildung 5). In vier Fällen war eine Auswertung des Ki67-Index entweder in der Primär- oder der Sekundärbiopsie nicht möglich. Es war statistisch signifikant, dass in der Mehrzahl der Fälle der Ki67-Index anstieg (zweiseitiger Binomialtest: p=0,0019).

Abbildung 5: Darstellung des Verlaufs des Ki67-Index in der Primär- und der Sekundärbiopsie. Der Ki67-Index der Primärbiopsie wurde gleich 0 gesetzt. Die prozentuale Änderung des Ki67-Index von der Primär- zur Sekundärbiopsie wurde aufgetragen. n=40. Zweiseitiger Binomialtest: p=0,0019.

In einem zweiten Schritt wurde überprüft, ob die Veränderungen des Ki67-Index mehr als 24,8% betrugen und damit größer waren als der mittlere Fehler bei der Auszählung mehrerer HPF. Hier trat in 84% (36/43) der Patienten eine größere Änderung des Ki67-Index und in 16% (7/43) eine geringere auf. Im Einzelnen war in 63% (27/43) der Patienten ein Anstieg des Ki67-Index und in 21% (9/43) ein Abfall zu verzeichnen. Um zu prüfen, ob die Änderungen im Ki67-Index abhängig vom krankheitsfreien Intervall sind, wurde eine Korrelation zwischen den prozentualen Änderungen und dem Zeitraum zwischen den Biopsien durchgeführt. Es war eine positive Korrelation der prozentualen Änderung des Ki67-Index mit der Zeit nachweisbar (Spearman-Test: Korrelationskoeffizient r=0,4113, p=0,0061; Abbildung 6). Das bedeutet, dass die Änderungen im Ki67-Index größer waren, je länger die Biopsien zeitlich auseinander lagen.

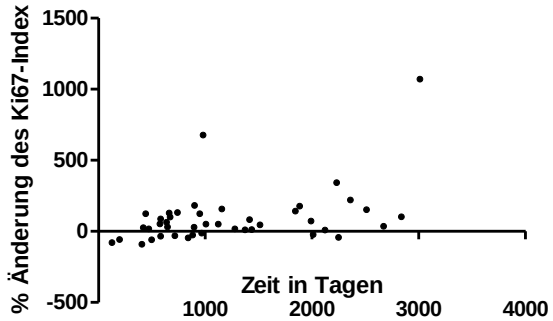

Abbildung 6: Darstellung der Korrelation der prozentualen Änderung des Ki67-Index von der Primär- zur Sekundärbiopsie mit der Zeit zwischen der Entnahme der Primär- und der Sekundärbiopsie. n=43. Spearman-Test: p=0,0061, Korrelationskoeffizient r=0,4113.

Die Fälle, in denen die Zytologie von blastoid nach klassisch/kleinzellig wechselte, zeigten keine Reduktion des hohen Ki67-Index in der Biopsie des Rezidivs (Abbildung 7).

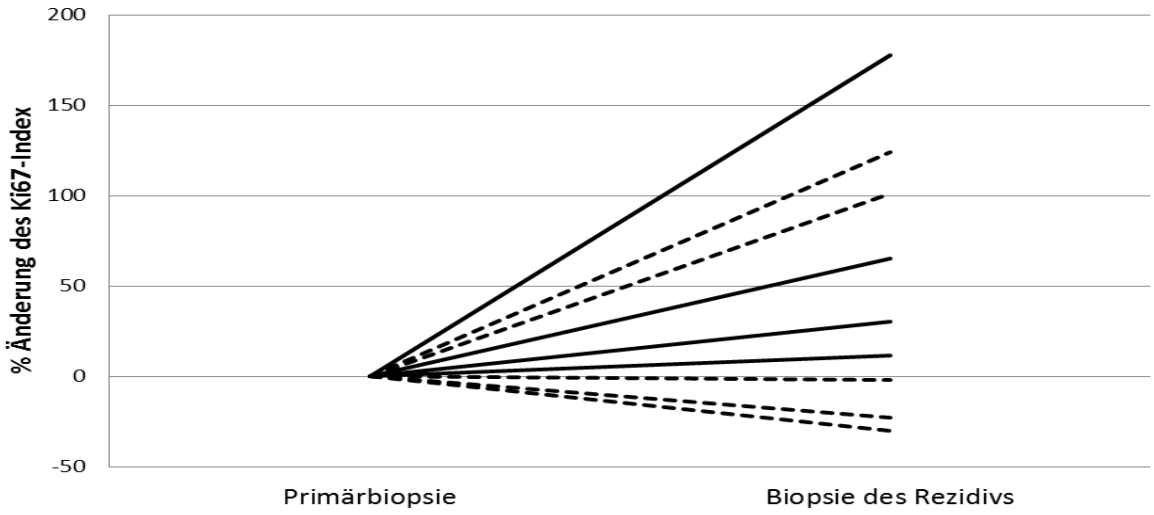

Abbildung 7: Darstellung des Verlaufs des Ki67-Index in blastoiden Primärbiopsien und Biopsien des Rezidivs. Der Ki67-Index der Primärbiopsie wurde gleich 0 gesetzt. Die prozentuale Änderung des Ki67-Index von der Primärbiopsie zur Biopsie des Rezidivs wurde aufgetragen. Durchgezogene Linie: blastoide Variante in der Biopsie des Rezidivs (n=4); gestrichelte Linie: klassisch/kleinzellige Variante in der Biopsie des Rezidivs (n=5). Die Biopsie des Rezidivs war eine Sekundär- oder Tertiärbiopsie.

In sieben Fällen waren mehr als zwei Biopsien vorhanden, in denen der Ki67-Index bestimmt werden konnte. Hier zeigte sich, dass ein Anstieg bzw. Abfall des Ki67-Index von der Primär- zur Sekundärbiopsie mit einem Abfall bzw. Anstieg von der

Sekundär- zur Tertiärbiopsie verbunden war (Abbildung 8). Insgesamt stieg der Ki67-Index von der Primär- zur Tertiärbiopsie in 71% (5/7) der Fälle an.

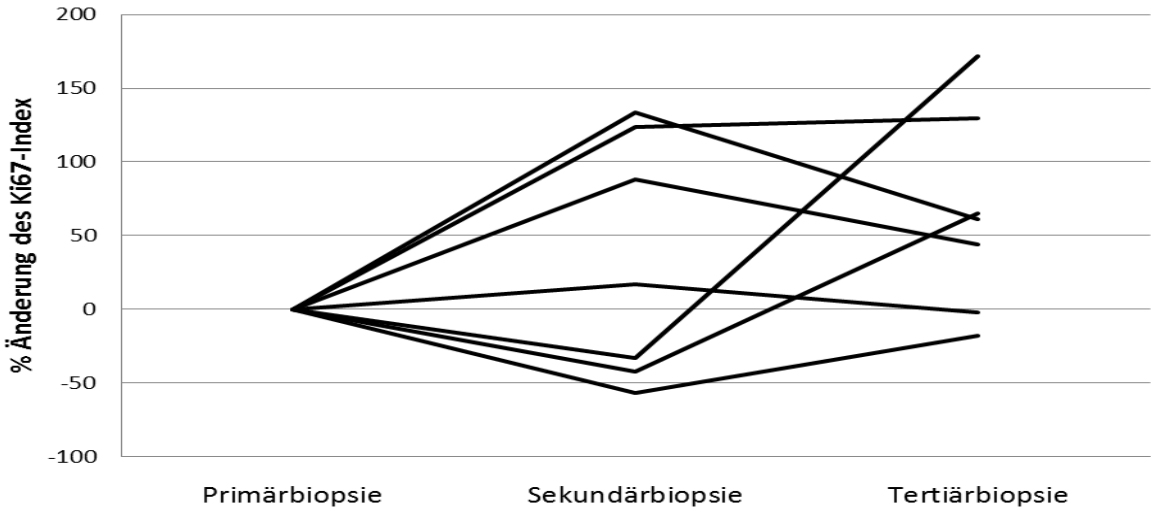

Abbildung 8: Darstellung des Verlaufs des Ki67-Index für alle Fälle, in denen drei Biopsien verfügbar waren (n=7). Der Ki67-Index der Primärbiopsie wurde gleich 0 gesetzt. Die prozentualen Änderungen des Ki67-Index von der Primär- zur Sekundär- und Tertiärbiopsie wurden aufgetragen.

In keiner Biopsie konnte ein Verlust der Expression von CD20 der MCL-Zellen nachgewiesen werden. Mindestens eine Biopsie jedes Patienten zeigte eine Überexpression von Cyclin D1.

3.1.4 Einfluss der Zytologie, des Wachstumsmusters und des Ki67-Index auf das Überleben der Patienten

In der Primärbiopsie war eine blastoide Variante, verglichen mit einer klassisch/kleinzelligen, mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben der Patienten nach Entnahme der Primärbiopsie assoziiert (medianes Überleben 1522 vs. 3344 Tage; Log-Rank-Test: p=0,0046; Abbildung 9). In der Sekundärbiopsie blieb ein nicht signifikanter Trend nachweisbar (medianes Überleben nach Entnahme der Sekundärbiopsie 629 vs. 1060 Tage; Log-Rank-Test: p=0,0693; Abbildung 9).

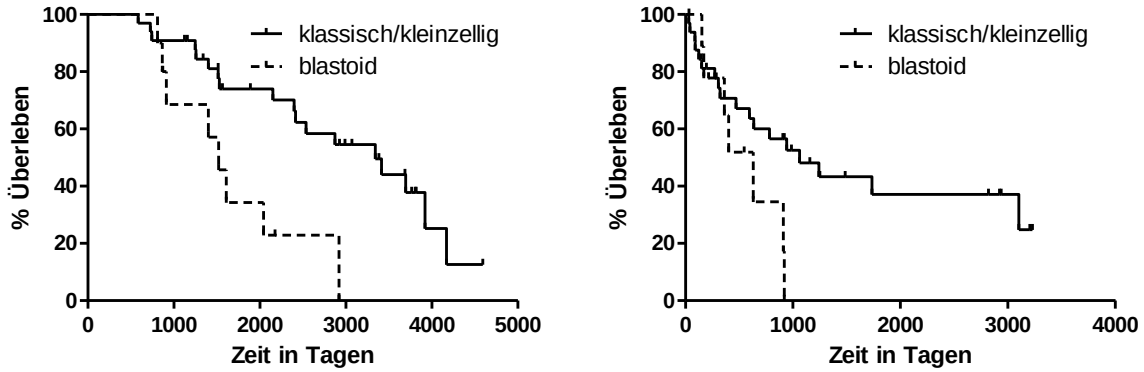

Abbildung 9: Darstellung des Überlebens nach Entnahme der Primär- (links, Log-Rank-Test: p=0,0046) bzw. der Sekundärbiopsie (rechts, Log-Rank-Test: p=0,0693) in einer Kaplan-Meier-Kurve sortiert nach klassisch/kleinzelligen (n=33 bzw. n=32) und blastoiden Varianten (n=10 bzw. n=10).

Ein Übergang von einer klassisch/kleinzelligen Variante bei der Diagnosestellung in eine blastoide im Rezidiv zeigte einen negativen, aber nicht signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten nach dem Rezidiv (medianes Überleben 629 vs. 1242 Tage; Log-Rank-Test: p=0,5774; Abbildung 10).

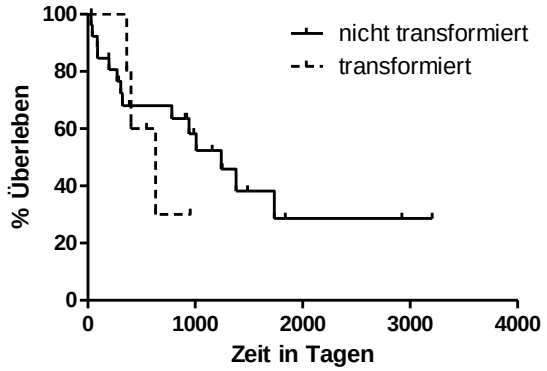

Abbildung 10: Darstellung des Überlebens nach dem Rezidiv in einer Kaplan-Meier-Kurve sortiert nach von klassisch/kleinzellig nach blastoid transformierten (n=6) und nicht transformierten (n=26) Fällen. Log-Rank-Test: p=0,5774.

Das Mantelzonenwachstum und das noduläre waren, verglichen mit dem nodulär-diffusen und dem diffusen Wachstum, nur in der Primärbiopsie mit einem minimal, aber nicht signifikant längeren Gesamtüberleben der Patienten verbunden (medianes Überleben nach Entnahme der Primärbiopsie 2537 vs. 2399 Tage; Log-Rank-Test: p=0,9723; Abbildung 11).

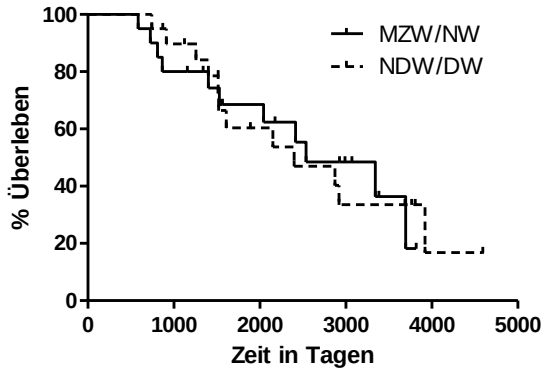

Abbildung 11: Darstellung des Überlebens in einer Kaplan-Meier-Kurve sortiert nach Wachstumsmuster der Primärbiopsie. Mantelzonenwachstum (MZW) und noduläres (NW), n=20, bzw. nodulär-diffuses (NDW) und diffuses Wachstum (DW), n=20. Log-Rank-Test: p=0,9723.

Ein Anstieg des Ki67-Index von der Primär- zur Sekundärbiopsie zeigte im Vergleich mit einem Abfall des Ki67-Index einen schlechteren, aber nicht signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten (medianes Überleben nach Entnahme der Sekundärbiopsie 629 bzw. 1060 Tage; Log-Rank-Test: p=0,511; Abbildung 12). Wurde nach einem Anstieg des Ki67-Index von mehr als 24,8% sortiert, ergab sich ein stärkerer, aber ebenfalls nicht signifikanter Einfluss auf das Überleben der Patienten (medianes Überleben nach Entnahme der Sekundärbiopsie 470 bzw. 1060 Tage; Log-Rank-Test: p=0,1823; Abbildung 12). Ein Änderung des Ki67 von mehr als 24,8% bedeutet, dass sie größer war als der mittlere Fehler bei der Auszählung mehrerer HPF.

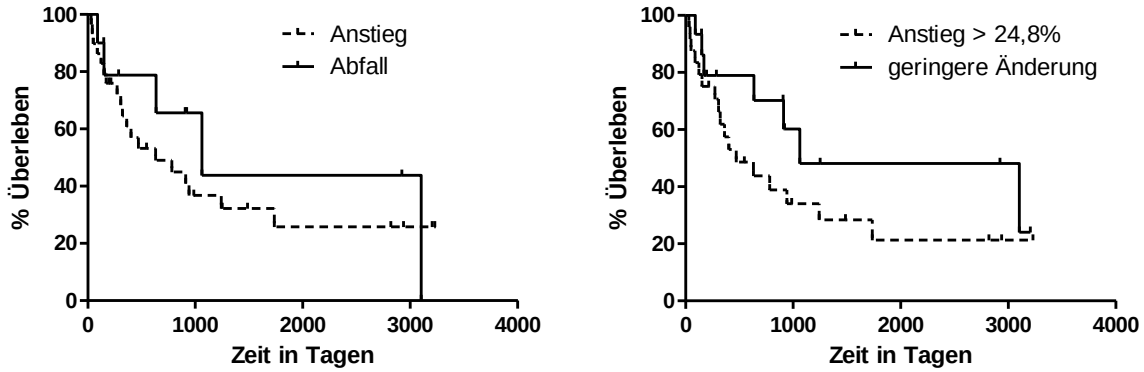

Abbildung 12: Darstellung des Überlebens nach Entnahme der Sekundärbiopsie in einer Kaplan-Meier-Kurve sortiert nach Anstieg (n=30) bzw. Abfall (n=10) des Ki67-Index von der Primär- zur Sekundärbiopsie (links). Log-Rank-Test: p=0,511. Darstellung des Überlebens nach Entnahme der Sekundärbiopsie in einer Kaplan-Meier-Kurve sortiert nach Anstieg größer als 24,8% (n=25) bzw. geringerer Änderung des Ki67-Index (n=15) von der Primär- zur Sekundärbiopsie (rechts). Log-Rank-Test: p=0,1823.

Nach dem Ki67-Index in der Primärbiopsie wurden die Patienten in folgende Gruppen eingeteilt: 1. Ki67-Index <10%: 20% (9/44) der Fälle, 2. Ki67-Index 10%-30%: 60% (26/44) und 3. Ki67-Index >30%: 20% (9/44). Nur für 93% (41/44) dieser Patienten waren klinische Daten hinsichtlich des Überlebens vorhanden. Bei diesen Patienten war das Gesamtüberleben nach Entnahme der Primärbiopsie mit der Einteilung in Gruppen assoziiert (1. Gruppe: 3415 Tage, n=8; 2. Gruppe: 2922 Tage, n=24; 3. Gruppe: 1400 Tage, n=9) und signifikant unterschiedlich (Log-Rank-Trend-Test: p=0,0186; Abbildung 13). Analog zeigte das Überleben nach Entnahme der Sekundärbiopsie eine Assoziation mit der Einteilung in Gruppen nach Ki67-Index in der Sekundärbiopsie (1. Gruppe: 3102 Tage, n=6; 2. Gruppe: 1242 Tage, n=16; 3. Gruppe: 273 Tage, n=16). Der statistisch signifikante Unterschied zwischen den Gruppen blieb bestehen (Log-Rank-Trend-Test: p=0,0004; Abbildung 13).

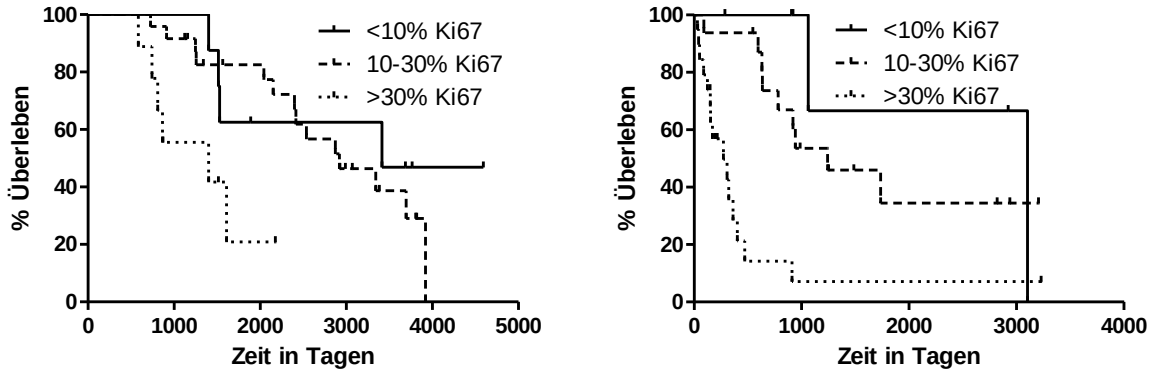

Abbildung 13: Darstellung des Überlebens nach Entnahme der Primär- bzw. der Sekundärbiopsie in einer Kaplan-Meier-Kurve sortiert nach Ki67-Index in Gruppen in der Primär- (links, Log-Rank-Trend-Test: p=0,0186) bzw. in der Sekundärbiopsie (rechts, Log-Rank-Trend-Test: p=0,0004).

3.2 Charakteristika der immunfluoreszenz-gefärbten MCL-Biopsien

Nach dem Befund aus der Datenbank der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister wurden zwei Fälle als kleinzellige Variante, 13 als klassische, einer als klassische mit pleomorpher Komponente und zwei als blastische klassifiziert (Tiemann et al. 2005). Der an immunhistochemischen Schnitten erhobene Ki67-Index aus dem Befund betrug im Median aller 18 untersuchten MCL 20% (Bereich 5% bis 72%), während bei der digitalen Bildanalyse aller Antikörper-Kombinationen ein Ki67-Index von im Median 11% (Bereich 1% bis 53%) ermittelt werden konnte. Der Anteil der männlichen Patienten betrug etwa 83% (15/18) und das mediane Alter bei Diagnosestellung lag bei 70 Jahren (Bereich 51-86 Jahre).

Die Antigene Ki67, p53, p27, Survivin und Phospho-Histone-H3 zeigten in allen Färbungen der Kontrollgewebe und der MCL eine nukleäre Expression.

Fehler hinsichtlich des Expressionsmusters der Marker können am ehesten durch die Adjustierung der Helligkeit der Bilder mit dem Programm Axioplan entstanden sein. Dieser Vorgang ist jedoch unbedingt notwendig, um die spezifische Fluoreszenzmarkierung durch die Sekundärantikörper von unspezifischen Fluoreszenzphänomenen differenzieren zu können. Erst nach diesem Schritt ist die Analyse im Programm TissueQuest möglich, welches die Intensität der Fluoreszenzsignale misst. Durch die allgemeine Reduktion der Helligkeit werden auch die Intensitäten der spezifischen Fluoreszenzmarkierungen vermindert. Dies hat zur Folge, dass schwache Signale herausgefiltert werden können. Aufgrund

dessen kann erklärt werden, dass der unter dem Lichtmikroskop an immunhistochemisch-gefärbten Schnitten erhobene Median des Ki67-Index höher als der durch digitale Bildanalyse berechnete Vergleichswert war. Für die Analyse des Zusammenhanges zwischen der Zellzyklusgeschwindigkeit und der Proliferationsrate wurde der durch die digitale Bildanalyse bestimmte Ki67-Index herangezogen, um Fehler auszugleichen, die bei der digitalen Bildanalyse auftreten.

Besonders die schwache Expression von Ki67 in der G1-Phase des Zellzyklus (Braun et al. 1988) wird im Zusammenhang mit der Reduktion der Helligkeit das Ergebnis der inversen Expression von Ki67 und Cyclin D1 beeinflusst haben. In Anbetracht dieses Fehlers kann eine Co-Expression der genannten Marker nicht ausgeschlossen werden, da der Grenzbereich nicht optimal aufgelöst wird. Jedoch kann für den Extrembereich festgehalten werden, dass eine Tumorzelle des MCL, die Cyclin D1 stark exprimiert, sich eher in der G1-Phase (einem frühen Stadium des Zellzyklus) als in der S-, G2- oder M-Phase (fortgeschrittenen Stadien des Zellzyklus) befindet.

Eine weitere Fehlerquelle stellt die manuelle Einstellung der Grenzwerte bei der digitalen Bildanalyse im Programm TissueQuest dar. Diese kann nicht automatisch bestimmt werden, sondern muss individuell an das vorliegende Bild angepasst werden. Die Grenzwerte wurden so festgelegt, dass unmittelbar um die Grenzwerte herum jeweils die Hälfte der Zellen positiv bzw. negativ für den Sekundärantikörper war. Dadurch wurde ein hohes Maß an Objektivität sichergestellt. Dennoch bedingt auch diese Fehlerquelle einen Sensitivitätsverlust beim Nachweis schwacher Signale.

3.2.1 Ki67 und Cyclin D1

Im Kontrollgewebe der Tonsille waren nur die basalen Schichten des Epithels positiv für Cyclin D1 und die Lymphfollikel blieben ausgespart. Bei beiden Methoden des Auslesens (erste: Dichotomisierung in Cyclin D1-positiv und –negativ; zweite: Intensitätsbestimmung für Cyclin D1) wurden im Epithel der Tonsille in allen drei Fällen Cyclin D1 und Ki67 co-exprimiert (Abbildung 14).

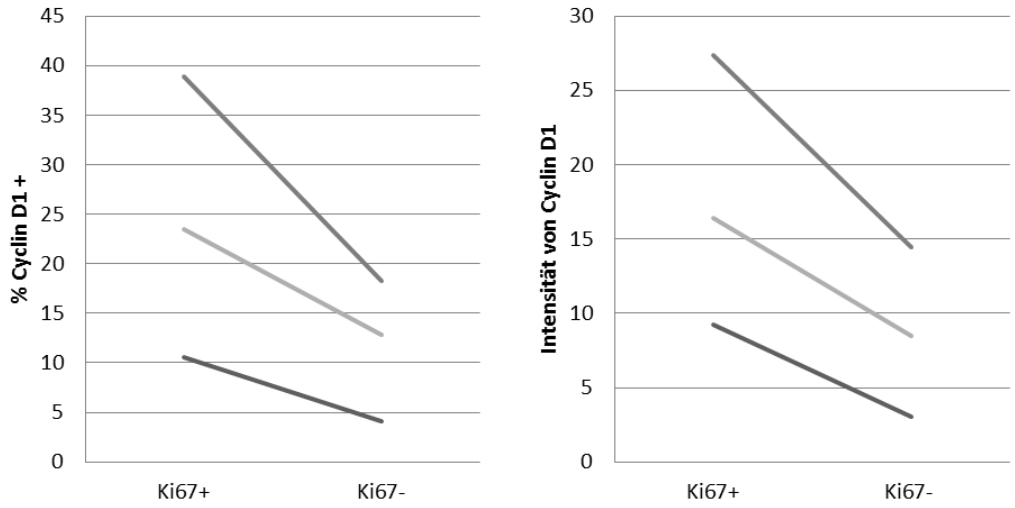

Abbildung 14: Darstellung des Prozentsatzes der Cyclin D1-positiven Zellen (links) und der Intensität von Cyclin D1 (rechts) innerhalb der Ki67-positiven (Ki67+) und -negativen (Ki67-) Population in drei Tonsillen (n=3).

In MCL wurden Ki67 und Cyclin D1 in unterschiedlichem Maß exprimiert. In jeder untersuchten Biopsie fanden sich Zellen aller möglichen Färbekombinationen: Expression eines einzelnen Proteins, beider Proteine oder keines der beiden Proteine. Im MCL war überwiegend eine inverse Expression von Ki67 und Cyclin D1 (Abbildung 15) nachweisbar. Elf von 18 Fällen zeigten in beiden Arealen und mit beiden Auslesemethoden ein inverses Expressionsmuster. Wurde der Mittelwert von beiden Arealen gebildet, so fand sich mittels der ersten Methode in 15 von 18 Fällen, mittels der zweiten Methode in 16 von 18 Fällen ein inverses Muster. Nur in einem Fall war im Mittel mit beiden Methoden eine Co-Expression nachweisbar, jedoch in keinem Fall mit beiden Methoden in jedem einzelnen Areal. Das aufmerksame Studium der Präparate am Fluoreszenzmikroskop lieferte bereits einen starken Hinweis auf das inverse Expressionsmuster. Die statistische Analyse der Mittelwerte beider Areale zeigte, dass die inverse Expression von Ki67 und Cyclin D1 in den 18 analysierten Fällen signifikant häufiger war als die Co-Expression derselben Marker (gepaarter Wilcoxon-Rangsummen-Test: p(erste Methode)=0,0035, p(zweite Methode)=0,0013). Der mithilfe der digitalen Bildanalyse bestimmte prozentuale Anteil der Cyclin D1-positiven Zellen betrug im Median aller 18 untersuchten MCL 72% (Bereich 42% bis 83%) und der Ki67-Index im Median 7% (Bereich 1% bis 42%).

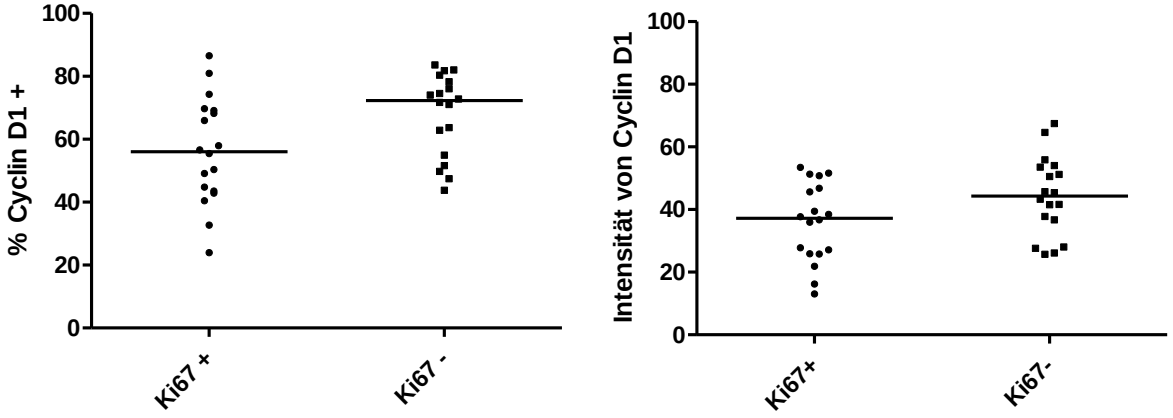

Abbildung 15: Darstellung des Prozentsatzes der Cyclin D1-positiven Zellen (links, gepaarter Wilcoxon-Rangsummen-Test: p=0,0035) und der Intensität von Cyclin D1 (rechts, gepaarter Wilcoxon-Rangsummen-Test: p=0,0013) innerhalb der Ki67-positiven (Ki67+) und -negativen (Ki67-) Population in 18 Mantelzelllymphomen (n=18). Der schwarze Balken ist der Median.

Um der Frage nachzugehen, ob das inverse Expressionsmuster von Ki67 und Cyclin D1 spezifisch für MCL ist oder auch in anderen Tumoren mit Cyclin D1-Expression auftritt, wurden mit dergleichen Technik zwei Mammakarzinome und drei diffus großzellige B-Zell-Lymphome untersucht. Die zwei duktalen Mammakarzinome zeigten in beiden Methoden des Auslesens eine inverse Expression von Ki67 mit Cyclin D1 (Abbildung 16).

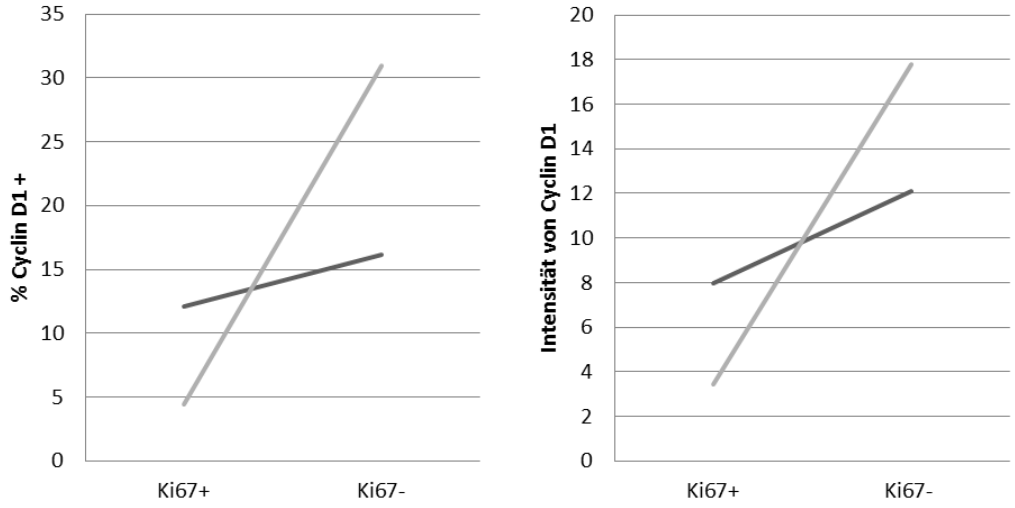

Abbildung 16: Darstellung des Prozentsatzes der Cyclin D1-positiven Zellen (links) und der Intensität von Cyclin D1 (rechts) innerhalb der Ki67-positiven (Ki67+) und -negativen (Ki67-) Population in zwei Mammakarzinomen (n=2).

Von den drei ausgewählten diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen mit partieller Cyclin D1-Expression nach konventioneller immunhistochemischer Analyse (Daten nicht gezeigt) zeigten zwei mit beiden Auslesemethoden eine inverse Expression und ein Fall eine Co-Expression mit Ki67 (Abbildung 17).

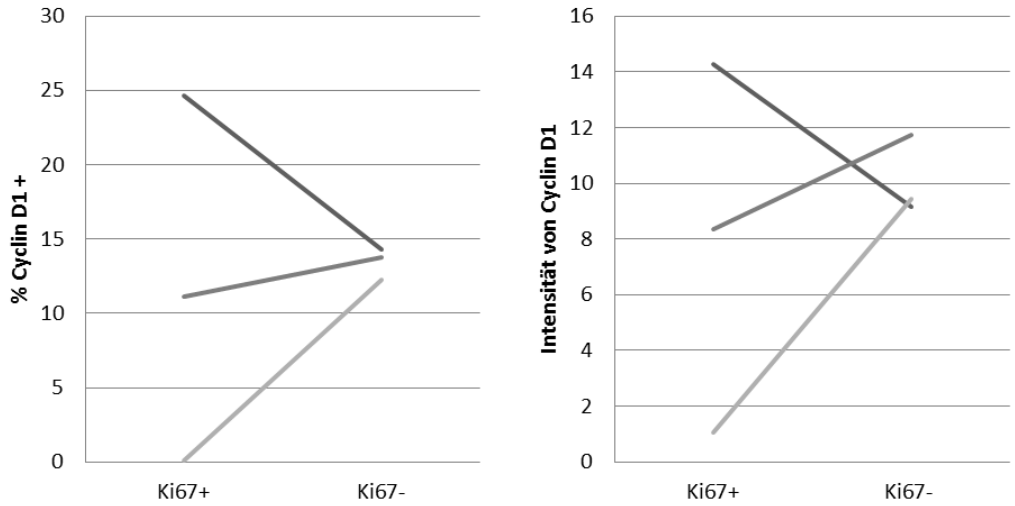

Abbildung 17: Darstellung des Prozentsatzes der Cyclin D1-positiven Zellen (links) und der Intensität von Cyclin D1 (rechts) innerhalb der Ki67-positiven (Ki67+) und -negativen (Ki67-) Population in drei diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen (n=3).

3.2.2 Ki67 und p53

In hyperplastischem Tonsillengewebe exprimierten alleine basale Schichten des Epithels p53. Das lymphatische Gewebe war weitestgehend negativ. Die meisten MCL exprimierten p53 schwach in einem variablen Anteil der Tumorzellen. Nur ein Fall einer blastischen Variante eines MCL wies eine starke Expression von p53 in der Mehrheit der Tumorzellen auf. Mit beiden Auslesemethoden konnte in beiden Arealen der 18 MCL eine Co-Expression von Ki67 und p53 nachgewiesen werden (Abbildung 18). Die statistische Analyse der Mittelwerte beider Areale zeigte, dass die Co-Expression von Ki67 und p53 in den 18 analysierten Fällen signifikant häufiger war als die inverse Expression derselben Marker (gepaarter Wilcoxon-Rangsummen-Test: p(erste Methode)=0,0002, p(zweite Methode)=0,0002). Der mithilfe der digitalen Bildanalyse bestimmte prozentuale Anteil der p53-positiven Zellen betrug im Median aller 18 untersuchten MCL 22% (Bereich 8% bis 80%) und der Ki67-Index im Median 20% (Bereich 4% bis 53%).

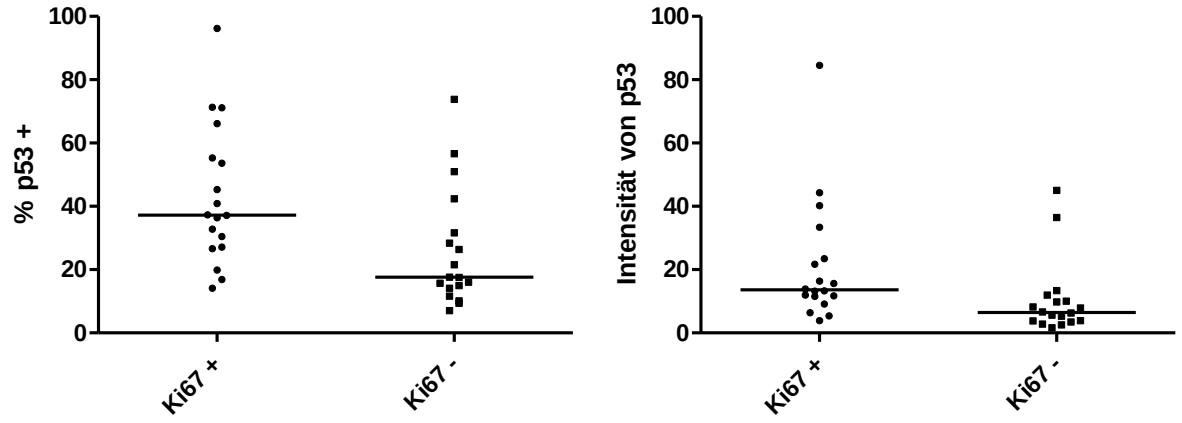

Abbildung 18: Darstellung des Prozentsatzes der p53-positiven Zellen (links, gepaarter Wilcoxon-Rangsummen-Test: p=0,0002) und der Intensität von p53 (rechts, gepaarter Wilcoxon-Rangsummen-Test: p=0,0002) innerhalb der Ki67-positiven (Ki67+) und -negativen (Ki67-) Population in 18 Mantelzelllymphomen (n=18). Der schwarze Balken ist der Median.

3.2.3 Ki67 und p27

Die Untersuchung hyperplastischen Tonsillengewebes zeigte, dass die helle Zone des Keimzentrums p27 erheblich stärker exprimiert als die dunkle Zone. In allen drei untersuchten Tonsillen wurde mit beiden Auslesemethoden eine inverse Expression von Ki67 und p27 nachgewiesen (Abbildung 19).

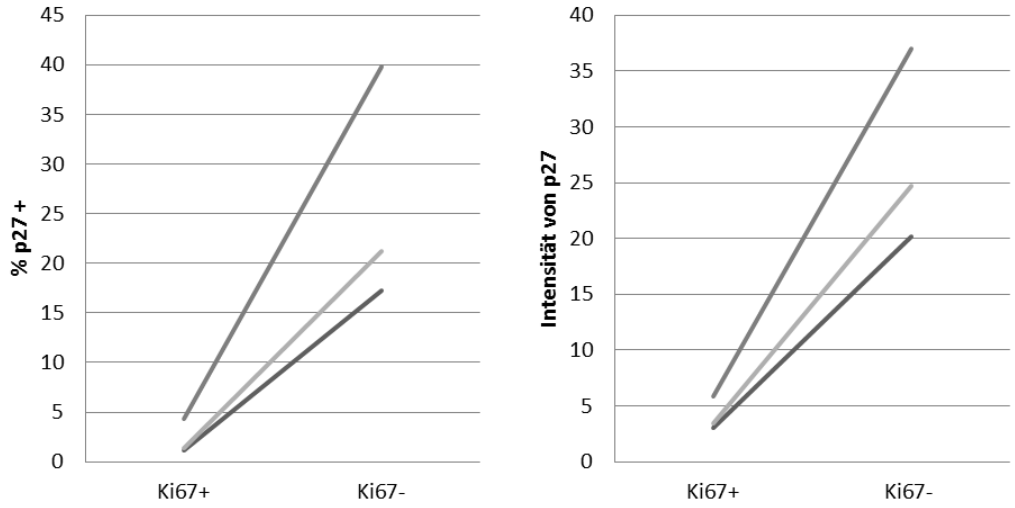

Abbildung 19: Darstellung des Prozentsatzes der p27-positiven Zellen (links) und der Intensität von p27 (rechts) innerhalb der Ki67-positiven (Ki67+) und -negativen (Ki67-) Population in drei Tonsillen (n=3).

In 17 von 18 MCL zeigten Ki67 und p27 in beiden Arealen und mit beiden Auslesemethoden eine inverse Expression und in einem von 18 Fällen eine Co-Expression (Abbildung 20). Der Fall mit der Co-Expression war eine kleinzellige Variante mit einem Ki67-Index von 5%. Die statistische Analyse der Mittelwerte beider Areale zeigte, dass die inverse Expression von Ki67 und p27 in den 18 analysierten Fällen signifikant häufiger war als die Co-Expression derselben Marker (gepaarter Wilcoxon-Rangsummen-Test: p(erste Methode)=0,0007, p(zweite Methode)=0,0003). Der mithilfe der digitalen Bildanalyse bestimmte prozentuale Anteil der p27-positiven Zellen betrug im Median aller 18 untersuchten MCL 19% (Bereich 3% bis 75%) und der Ki67-Index im Median 10% (Bereich 2% bis 44%). Einen sehr hohen prozentualen Anteil p27-positiver Zellen wiesen ein blastischer Fall mit 44% und ein klassischer Fall mit pleomorphem Anteil mit 40% auf. Der andere blastische Fall zeigte hingegen mit 3% einen sehr niedrigen Anteil p27-positiver Zellen.

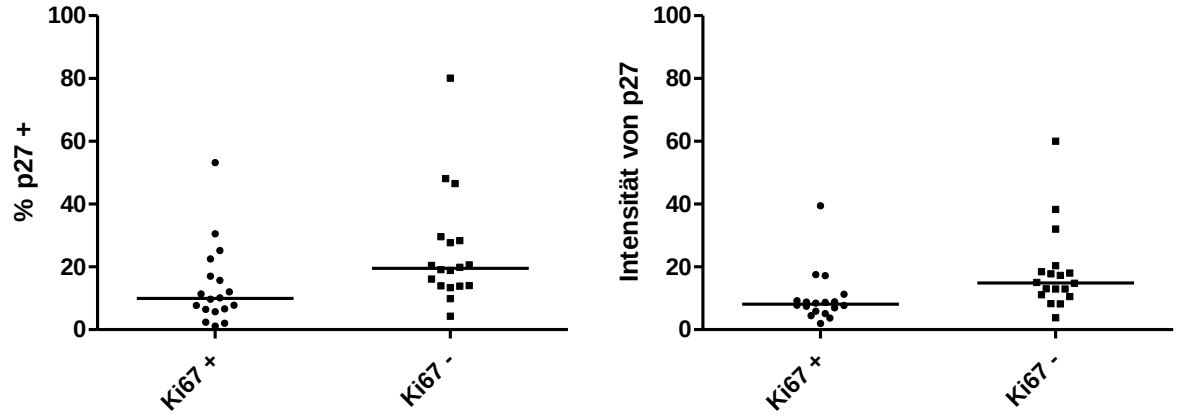

Abbildung 20: Darstellung des Prozentsatzes der p27-positiven Zellen (links, gepaarter Wilcoxon-Rangsummen-Test: p=0,0007) und der Intensität von p27 (rechts, gepaarter Wilcoxon-Rangsummen-Test: p=0,0003) innerhalb der Ki67-positiven (Ki67+) und -negativen (Ki67-) Population in 18 Mantelzelllymphomen (n=18). Der schwarze Balken ist der Median.

3.2.4 Ki67 und Survivin bzw. Phospho-Histone-H3

Sowohl in allen untersuchten Tonsillen als auch in allen MCL wurden Survivin und Phospho-Histone-H3 in beiden Arealen ausschließlich von den Ki67-positiven Zellen exprimiert. Survivin- oder Phospho-Histone-H3-positive Zellen, die nicht gleichzeitig Ki67 exprimierten, konnten nicht nachgewiesen werden. Der mithilfe der digitalen Bildanalyse für die Kombination Ki67 mit Survivin bestimmte prozentuale Anteil der

Survivin-positiven Zellen betrug im Median aller 18 untersuchten MCL 7% (Bereich 2% bis 26%) und der Ki67-Index im Median 10% (Bereich 3% bis 44%). Für die Kombination Ki67 mit Pospho-Histone-H3 wurde analog der prozentuale Anteil der Phospho-Histone-H3-positiven Zellen im Median aller 18 untersuchten MCL auf 0,3% (Bereich 0,1% bis 0,8%) bestimmt und der Ki67-Index im Median auf 12% (Bereich 3% bis 32%). Der Prozentsatz der Survivin- bzw. Phospho-Histone-H3-positiven innerhalb der Ki67-positiven Zellen nahm in den Tonsillen von der Mantelzone über die helle Zone bis zur dunklen Zone des Keimzentrums zu. In der Mantelzone fanden sich keine Phospho-Histone-H3-positiven Zellen. Der Mittelwert des entsprechenden Prozentsatzes aller MCL rangierte zwischen dem der hellen und dem der dunklen Zone des Keimzentrums (Abbildung 21). In den einzelnen MCL war keine Korrelation des Ki67-Index mit dem Prozentsatz der Survivin- bzw. Phospho-Histone-H3-positiven innerhalb der Ki67-positiven Zellen nachweisbar (Spearman-Test: Korrelationskoeffizient r=0,2219, p=0,3762 bzw. r=-0,4138, p=0,0878; Abbildung 22).

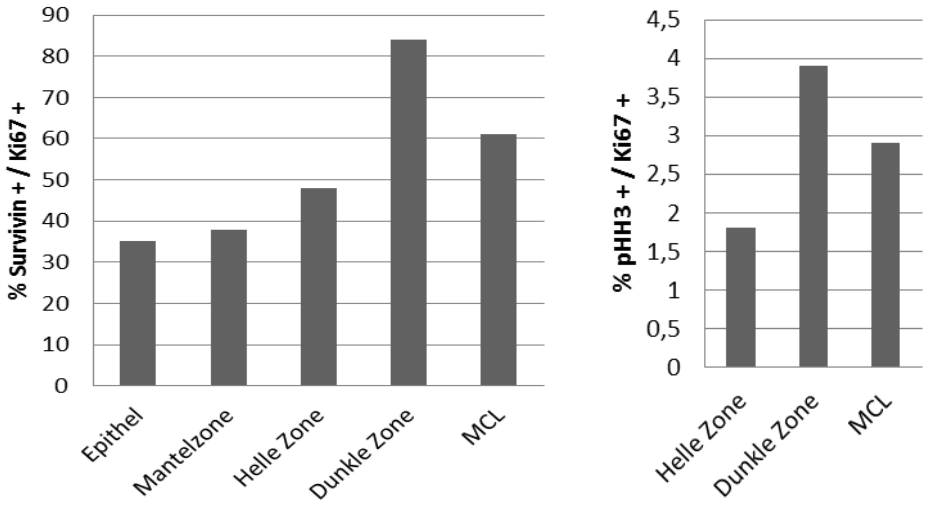

Abbildung 21: Darstellung des prozentualen Anteils Survivin- (links) bzw. Phopho-Histone-H3-positiver (pHH3, rechts) Zellen an allen Ki67-positiven Zellen. Innerhalb der Tonsille Unterteilung in Epithel, Mantelzone, helle Zone und dunkle Zone des Keimzentrums. Mittelwerte aller 18 Mantelzelllymphome (MCL).

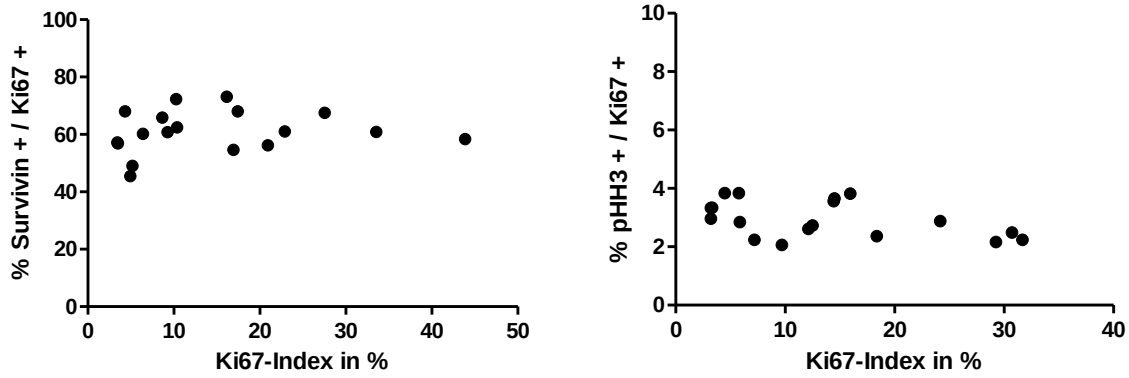

Abbildung 22: Darstellung des prozentualen Anteils Survivin- (links, Spearman-Test: p=0,3762, Korrelationskoeffizient r=0,2219) bzw. Phopho-Histone-H3-positiver (pHH3, rechts, Spearman-Test: p=0,0878, Korrelationskoeffizient r=-0,4138) Zellen an allen Ki67-positiven Zellen für jedes einzelne Mantelzelllymphom in Abhängigkeit vom Ki67-Index. n=18.

4. Diskussion

Das erste Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, aus der Untersuchung sequentieller Biopsien im Krankheitsverlauf des MCL ein Modell für die Lymphomevolution und –progression abzuleiten. In vorherigen Studien war bereits ein solches Modell entwickelt worden (Jares et al. 2007, Norton et al. 1995, Swerdlow et al. 1983). Die vorliegende Arbeit ergänzt im Hinblick auf die Bestimmung des Ki67-Index die älteren Studien und berücksichtigt die moderne Immunchemotherapie mit CD20-Antikörpern bei der Behandlung der Patienten. Dafür wurde ein sehr seltenes Biopsiekollektiv von MCL zusammengestellt, das bei ein- und demselben Patienten, den Zeitpunkt der Diagnosestellung vor der ersten Therapie bzw. den des Rezidivs nach erfolgter Therapie repräsentiert. Um die Aussagekraft der Untersuchungen an diesem Kollektiv einschätzen zu können, musste diese Probensammlung zunächst drauf überprüft werden, ob sie im Hinblick auf klinische Charakteristika repräsentativ für das MCL im Allgemeinen ist. Das mediane Gesamtüberleben der Patienten von 6 Jahren und 11 Monaten in der vorliegenden Arbeit liegt im oberen Bereich der in der Literatur angegebenen 3-7 Jahre (Dreyling et al. 2013). Die Altersverteilung (Median 63 Jahre) sowie die Geschlechterverteilung (M:W=2,92:1) der Patienten in der vorliegenden Arbeit entspricht den für das MCL bekannten epidemiologischen Daten (Swerdlow et al. 2008). Die Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Stadium (Ann-Arbor III/IV=66%) deckt sich mit Daten aus der Literatur (Harel et al. 2011, Tiemann et al. 2005). Dasselbe gilt für die ermittelte Rate von B-Symptomen bei 36% der Patienten (Tiemann et al. 2005). Die applizierten Therapieregime sind infolge der retrospektiven Datenerhebung, der großen Zeitspannen zwischen den Diagnosestellungen der einzelnen Fälle und damit den Behandlungen durch unterschiedliche Therapien sehr heterogen. Die Mehrheit der Patienten (70%) wurde jedoch mit einer Anthrazyklin-basierten, d.h. z.B. Doxorubicin oder Mitoxantron enthaltenden Polychemotherapie behandelt. Die klinischen Charakteristika der hier untersuchten Patienten sind also repräsentativ für MCL. Die in dieser Arbeit untersuchten MCL wiesen in 21% der Fälle eine blastoide Morphologie zum Zeitpunkt der Diagnosestellung auf, was verglichen mit den Literaturwerten relativ viel ist. Allerdings schwankt der Anteil blastoider MCL in größeren publizierten Serien

zwischen 9% und 16,3% (Norton et al. 1995, Rosenwald et al. 2003, Tiemann et al. 2005). Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Anteile des Mantelzonenwachstums mit 16% und des nodulären Wachstums mit 36% sind ebenfalls höher als in anderen Studien (Tiemann et al. 2005).

Der Transformation eines MCL, definiert als ein Übergang von der klassisch/kleinzelligen Variante bei Diagnosestellung zur blastoiden Variante im Rezidiv, können grundsätzlich zwei Mechanismen zugrunde liegen. Entweder wird durch die Therapie ein blastoider Subklon selektioniert, der zum Zeitpunkt der Diagnose nur in der Minderheit war und deshalb morphologisch nicht erfasst wurde (parallele Evolution), oder der Klon der Erkrankung, der in der Primärbiopsie dominierte, erfährt eine Zunahme genetischer Veränderungen und wandelt sich dadurch in eine blastoide Variante um (sequentielle Evolution). In beiden Modellen muss aufgrund der Assoziation zwischen Zytologie und Karyotyp (Salaverria et al. 2006) sowie Ki67-Index (Jares et al. 2007, Swerdlow et al. 2008, Tiemann et al. 2005) mit einer Zunahme der genetischen Aberrationen und der Proliferationsrate gerechnet werden. Da das initiale MCL und das transformierte MCL klonal miteinander verwandt sind, gehen einige Autoren davon aus, dass die blastoide Variante direkt aus der klassischen hervorgeht und nicht de-novo entsteht (László und Matolcsy 1999). Publizierte genetische Untersuchungen an wenigen sequentiellen MCL-Biopsien liefern Hinweise auf eine parallele Evolution. So wurden bei einem Patienten in der Primärbiopsie bei Diagnosestellung genetische Aberrationen von p53, ATM und p16 entdeckt, die in der Biopsie des Rezidivs nicht nachweisbar waren (Sander et al. 2007). Für diesen Fall kann eine Vorläuferläsion postuliert werden, aus der die Primärläsion und das Rezidiv hervorgegangen sind, die jedoch zum Zeitpunkt der Primärdiagnose in der histologischen Untersuchung nicht erfasst wurde.

Die Transformation von einer klassisch/kleinzelligen Variante bei Diagnosestellung zu einer blastoiden entspricht dem allgemein akzeptierten Modell der Lymphomprogression des MCL (Jares et al. 2007). Die nachgewiesene Transformationsrate beträgt in dieser Untersuchung 22% und ist mit der von 15% (beschrieben als „increase in cell size and chromatin dispersal“/ „Zunahme der

Zellgröße und der Chromatinverstreuung“, Swerdlow et al. 1983) bzw. 20% (Norton et al. 1995) aus den wenigen zuvor publizierten Studien vergleichbar.

In der vorliegenden Arbeit kann erstmals eine umgekehrte Transformation von einer blastoiden Variante bei Diagnosestellung in eine klassisch/kleinzellige Variante im Rezidiv in der Hälfte der Fälle demonstriert werden. Eine solche Beobachtung wurde in der Literatur noch nicht beschrieben und stellt somit eine Ergänzung zum allgemein akzeptierten Modell der Lymphomprogression des MCL dar (Jares et al. 2007, Norton et al. 1995, Swerdlow et al. 1983). Als Entstehungsmechanismus wird in diesen Fällen eine parallele Evolution postuliert. Entsprechend der Assoziation zwischen Zytologie und Karyotyp (Salaverria et al. 2006) sowie Ki67-Index (Jares et al. 2007, Swerdlow et al. 2008, Tiemann et al. 2005) wird mit geringeren genetischen Aberrationen und einer geringeren Proliferationsrate im klassisch/kleinzelligen Rezidiv gerechnet. Es bleibt jedoch zweifelhaft, ob in diesen Fällen die Selektion eines geringer atypischen Klons vorliegt. Erstens konnte an der Biopsie des Rezidivs kein Nachweis der Reduktion der Proliferationsaktivität erbracht werden. Zweitens bestand in den Fällen mit klassisch/kleinzelligem Rezidiv kein Bias der Therapie hin zur modernen Immunchemotherapie mit CD20-Antikörpern anstatt konventioneller Polychemotherapie.

Der beobachtete Übergang des Mantelzonenwachstums der Primärbiopsie in ein noduläres, nodulär-diffuses oder diffuses Wachstum in der Sekundärbiopsie in 71% der Fälle rangiert im Bereich der publizierten Daten (Norton et al. 1995, Swerdlow et al. 1983). Die hier erzielten Beobachtungen spiegeln das allgemein akzeptierte Modell der Lymphomprogression des MCL wieder (Jares et al. 2007). Entsprechend diesem Modell infiltrieren die Lymphomzellen zuerst die Mantelzone des Lymphfollikels, die sich daraufhin abnormal verbreitert, während die Keimzentren ausgespart bleiben. Infolge hoher Proliferationsaktivität der Tumorzellen resultieren die Kompression und das Verschwinden der Keimzentren, wobei zunächst ein organisch knotiger Aspekt nachweisbar bleibt. Dieser geht im weiteren Verlauf der Erkrankung schließlich verloren (Jares et al. 2007, Klapper 2011).

In dieser Arbeit wurde, erstmals an einer größeren Kohorte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und des Rezidivs, der Ki67-Index im Krankheitsverlauf des MCL

systematisch erhoben. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Mitoseraten in sequentiellen Biopsien häufig anstiegen, manchmal aber auch abfielen (“mitotic rates (…) frequently more than doubled over time but also occasionally fell“, Swerdlow et. al 1983). Des Weiteren wurde in einer vier Fälle umfassenden Serie in jeweils der Hälfte der Fälle ein Abfall bzw. ein Anstieg des Ki67-Index nachgewiesen (Sander et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit weist der Verlauf des Ki67-Index in drei sequentiellen Biopsien darauf hin, dass sich die Proliferation vorübergehend verringern kann, der Verlauf der Erkrankung jedoch generell mit einem Anstieg der Zellproliferation verbunden ist.

Zusammenfassend kann das allgemein akzeptierte Modell der Lymphomevolution und -progression des MCL um zwei in der vorliegenden Arbeit erzielte Ergebnisse ergänzt werden. Erstens geht der Verlauf der Erkrankung mit einem Anstieg der Proliferationsaktivität einher. Zweitens kann eine umgekehrte Transformation von einer blastoiden Variante bei Diagnosestellung zu einer klassisch/kleinzelligen im Rezidiv in einigen Fällen beobachtet werden. Morphologie und Zellproliferation sind also nicht immer miteinander korreliert. Das Auftreten der klassischen/kleinzelligen Zytologie im Rezidiv eines primär blastoiden MCL kann als Hinweis auf eine parallele Evolution gedeutet werden. Diese Hypothese muss jedoch anhand zukünftiger genetischer Analysen weiter überprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten bekannte prognostisch relevante Faktoren für das MCL bestätigt werden. So ist die blastoide Variante bei Diagnosestellung mit einer schlechteren Prognose assoziiert, was sich mit der Literatur deckt (Norton et al. 1995, Tiemann et al. 2005). Des Weiteren stellt ein hoher Ki67-Index einen prognostisch negativen Faktor dar (Determann et al. 2008, Tiemann et al. 2005). Prognostische Faktoren im MCL wurden bisher ausschließlich für den Zeitpunkt der Diagnosestellung evaluiert (Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index, MIPI, Hoster et al. 2008) oder nach der Therapie gemessen (Minimale Resterkrankung, MRD, Pott et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit kann erstmals die Assoziation zwischen Ki67-Index des Rezidivs und dem weiteren Überleben der Patienten nachgewiesen werden. Der Ki67-Index ist damit der erste Prognosefaktor für MCL im Rezidiv. Eine Anwendung dieses Prognosemarkers im Rezidiv wird vor allem deshalb zukünftig an Bedeutung gewinnen, da MCL mehr und mehr mittels

Durchflusszytometrie initial diagnostiziert werden und ein Ki67-Index dann nicht erhoben werden kann.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war es den aufgrund der Überexpression von Cyclin D1 postulierten Zellzyklusdefekt am G1-S-Übergang nachzuweisen. In älteren Studien konnte im MCL ein Zusammenhang zwischen hohen Spiegeln der mRNA von Cyclin D1, einer hohen Proliferationsaktivität und einer schlechten Prognose der Patienten hergestellt werden (Rosenwald et al. 2003). Das MCL gilt somit als ein Paradigma für ein Lymphom mit gestörter Zellzykluskontrolle. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von Immunfluoreszenzdoppelfärbungen die Proteinexpression von Cyclin D1 im Hinblick auf die Proliferationsaktivität analysiert.

Nach Literaturangaben wird Ki67 in der späten G1-, S-, G2- und M-Phase (Gerdes et al. 1984), Survivin in der G2- und M-Phase (Li et al. 1998) und Phospho-Histone-H3 in der M-Phase exprimiert (Nasr und El-Zammar 2008). Der Prozentsatz der Survivin- bzw. Phospho-Histone-H3-positiven innerhalb der Ki67-positiven Zellen kann also als Surrogatparameter für die Zellzyklusgeschwindigkeit in dem jeweiligen Gewebe angesehen werden. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit liegt die durchschnittliche Zellzyklusgeschwindigkeit aller untersuchten MCL zwischen der der hellen und der der dunklen Zone des physiologischen Keimzentrums (Abbildung 21). Somit ist die Zellzyklusgeschwindigkeit der Tumorzellen in MCL nicht über die physiologische Grenze hinaus gesteigert und damit keinesfalls exzessiv erhöht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Zellzyklusgeschwindigkeit in MCL konstant bleibt und sich damit unabhängig von der Proliferationsrate bzw. dem Ki67-Index verhält (Abbildung 22). Deshalb bleibt bei konstanter Zellzyklusgeschwindigkeit im MCL die Bestimmung des Ki67-Index ein guter Parameter, um die absolute Tumorzellverdopplungszeit abzuschätzen.

Cyclin D1 bindet und aktiviert die Proteine Cdk 4 und Cdk 6 und entfernt durch Bindung die inhibierenden Proteine der Cip/Kip-Familie, z.B. p27, vom Cyclin E/Cdk2-Komplex (Coqueret 2002). Die Funktion von Cyclin D1 im Zellzyklus ist also die Initiierung oder Beschleunigung des Übergangs von der G1- in die S-Phase (Lukas et al. 1994). Basierend auf dieser Funktion sollte die Expression von Cyclin D1 vor allem in den Zellen verstärkt auftreten, die sich im Zellzyklus befinden und

deshalb den Proliferationsmarker Ki67 exprimieren. Somit entspricht die Co-Expression von Ki67 und Cyclin D1 im physiologischen Epithel der Tonsille den Erwartungen. Auch in den MCL, Mammakarzinomen und den diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen wäre eine Co-Expression von Ki67 und Cyclin D1 sehr plausibel. Diese konnte mithilfe von Immunfluoreszenzdoppelfärbungen jedoch nicht bestätigt werden. Vielmehr liegt eine inverse Expression der Marker vor. Dies ist insbesondere für die MCL überraschend. Erwartungsgemäß wäre die Expression von Cyclin D1, die in MCL durch eine chromosomale Translokation bedingt ist, in allen Phasen des Zellzyklus konstant. Offensichtlich unterliegt die Expression von Cyclin D1 auch in MCL einer bisher noch nicht verstandenen Regulation. Die stärkste Expression von Ki67 tritt in der S-, G2- und M-Phase und eine schwächere in der späten G1-Phase des Zellzyklus auf (Braun et al. 1988, Gerdes et al. 1984). Entgegengesetzt konnte in MCL-Zelllinien die maximale Expression von Cyclin D1 in der mittleren bis späten G1-Phase und die minimale Expression in der S-Phase nachgewiesen werden (Lukas et al. 1994). Insofern liegt die Vermutung nahe, dass sich die Zellen, die positiv für Cyclin D1 und negativ für Ki67 sind, in der frühen bis mittleren G1-Phase des Zellzyklus befinden, doppelt positive Zellen in der späten G1-Phase und Zellen, die positiv für Ki67 und negativ für Cyclin D1 sind, in der S-, G2- oder M-Phase. Demnach kann postuliert werden, dass die Expression von Cyclin D1 in den Tumorzellen des MCL zellzyklusabhängig variiert, was bereits für MCL-Zelllinien beschrieben wurde (Lukas et al. 1994). Im Einklang mit dieser Hypothese steht, dass der Anteil an Tumorzellen im MCL in der G2- und M-Phase des Zellzyklus mit 61% aller proliferierenden Zellen deutlich höher ist als im Epithel der Tonsille mit nur 35%, wie aus der Analyse der Kombination von Ki67 mit Survivin hervorgeht. Demzufolge ist die Co-Expression von Ki67 und Cyclin D1 in der Tonsille durch einen hohen Anteil an proliferierenden Zellen in frühen Stadien des Zellzyklus bedingt. Das MCL zeichnet sich hingegen durch einen hohen Anteil an proliferierenden Zellen in späten Phasen des Zellzyklus aus und zeigt eine inverse Expression der Marker. Warum allerdings die Expression des durch eine chromosomale Translokation aktivierten Cyclin D1 solchen Schwankungen unterliegt muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

Die vorliegenden Ergebnisse betonen den Zusammenhang zwischen der Zellzyklusgeschwindigkeit der Tumorzellen und der Expression von Cyclin D1. So bedingt die Expression von Cyclin D1, ohne in der proliferierenden Population prädominant zu sein, einen hohen Anteil von Tumorzellen in fortgeschrittenen Phasen des Zellzyklus. Dies stimmt mit den Genexpressionsstudien des MCL überein, wonach die Expression der mRNA für Cyclin D1 mit gesteigerter Proliferation und verkürzter Gesamtüberlebenszeit korreliert (Rosenwald et al. 2003). Die alleinige Expression von Cyclin D1, wie sie im Epithel der Tonsille beobachtet werden kann, hat jedoch einen geringeren Effekt auf den G1-S-Übergang als im MCL mit potentiell zusätzlichen Alterationen, wie z.B. Mutationen von p53. Ähnliches gilt für die Mammakarzinome und die diffus großzelligen B-Zell-Lymphome. Dies steht im Einklang mit *in-vitro* und *in-vivo* Ergebnissen aus der Literatur. In einer MCL-Zelllinie hatte die gezielte Ausschaltung von Cyclin D1 nur moderaten Einfluss auf das Wachstum, führte nicht zur Induktion der Apoptose und hatte insgesamt einen minimalen Effekt auf das Überleben der Zellen (Klier et al. 2008). Transgene Mäuse, die infolge der Translokation Cyclin D1 exprimierten, entwickelten keine spontanen Lymphome; erst die Kombination mit dem Onkogen MYC führte zur schnellen Entwicklung von B-Zell Lymphomen (Lovec et al. 1994).

Häufige sekundäre genetische Alterationen in MCL sind Mutationen des TP53-Gens, die in 43% der untersuchten MCL nachgewiesen wurden (Sander et al. 2007). In immunhistochemischen Färbungen weisen viele MCL eine Expression von p53 auf, wobei die blastoide Variante besonders häufig p53-positiv ist (Quintanilla-Martinez et al. 1998). Das Gesamtüberleben der Patienten mit TP53-Mutationsnachweis ist signifikant kürzer (Greiner et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit wurden Analysen mit den Markern p53 und Ki67 durchgeführt, um einen Zusammenhang zwischen der p53-Expression und der Proliferationsaktivität herzustellen. Der Nachweis einer Expression von p53 in immunhistochemischen Färbungen kann dadurch bedingt sein, dass Mutationen des TP53-Gens zu einer verlängerten Halbwertszeit des Proteins führen (Louie et al. 1995). Die Expression von p53 in immunhistochemischen Färbungen mit dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper ist mit Mutationen des TP53-Gens assoziiert (Bataille et al. 2003). In anderen Studien konnte in 75% der untersuchten MCL mit TP53-Mutationen die Expression

von p53 in immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen werden, die in keinem der Fälle ohne Mutation vorlag (Greiner et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde in einer blastischen Variante des MCL eine starke Expression von p53 nachgewiesen, der möglicherweise eine Mutation des TP53-Gens zugrunde liegt. Als Hinweis auf eine Loss of Function-Mutation kann angeführt werden, dass die Expressionen von p53 und p27 in gegensätzlichen Zellpopulationen nachweisbar sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass das mutierte p53 die Transkription von Cdk-Inhibitoren, wie z.B. p21 oder p27, nicht stimulieren kann und der Zellzyklus beschleunigt wird (Hunter und Pines 1994). Die Co-Expression von p53 mit dem Proliferationsmarker Ki67 in diesem untersuchten Fall kann so interpretiert werden, dass ein möglicherweise mutiertes p53 die Proliferationsaktivität des MCL begünstigt.

Hinweise auf die Beteiligung von p27 am postulierten Zellzyklusdefekt konnten in der vorliegenden Arbeit nicht generiert werden. So wurde ein inverser Zusammenhang zwischen dem Proliferationsmarker Ki67 und der Expression von p27 nachgewiesen. Dieser lässt sich gut mit der den Zellzyklus inhibierenden Funktion von p27 in Einklang bringen (Sherr und Roberts 1999) und entspricht den Beobachtungen in vielen anderen Non-Hodgkin-Lymphomen, in denen ein gegenläufiger Zusammenhang zwischen Proliferationsaktivität und Expression von p27 nachgewiesen werden konnte (Ouintanilla Martinez et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit ist eine hohe Expression von Cyclin D1 und p27 in derselben Zellpopulation nachweisbar. Dies passt zu den Beobachtungen, wonach die Expression von Cyclin D1 mit der von p27 korreliert (Quintanilla-Martinez et al. 2003). Infolge der Überexpression von Cyclin D1 in MCL wird p27 aus der Bindung an den Cyclin E/Cdk2-Komplex entfernt, kann diesen Komplex dann nicht mehr inaktivieren und dadurch den Zellzyklus am Ende der G1-Phase nicht anhalten (Jares und Campo 2008, Quintanilla-Martinez et al. 1998, Quintanilla-Martinez et al. 2003). Laut Literaturangaben liegt der größte Anteil des p27-Proteins im MCL gebunden an Cyclin D1 vor und ist dadurch inaktiv (Quintanilla-Martinez et al. 2003). Die Frage, ob das in der vorliegenden Arbeit angefärbte p27 in der aktiven freien oder in der inaktiven, an Cyclin D1 gebundenen Form vorliegt, kann mit den angewendeten Methoden nicht beantwortet werden. Für die aktive Form spricht, dass eine stärkere

Expression von p27 in der Ki67-negativen bzw. nicht proliferierenden Population nachgewiesen werden konnte. Dies könnte durch die Zellzyklus inhibierende Funktion von p27 erklärt werden. Für die inaktive, an Cyclin D1 gebundene Form kann angeführt werden, dass die Ki67-negative Population sowohl p27 als auch Cyclin D1 stark exprimiert.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass der postulierte Zellzyklusdefekt am G1-S-Übergang mit den durchgeführten Immunfluoreszenzdoppelfärbungen nicht nachgewiesen werden konnte. Die oszillierende Expression von Cyclin D1 im MCL entspricht den physiologischen Verhältnissen und somit nicht den Erwartungen, wonach die Translokation t(11;14) eine konstante Überexpression bedingt. Der große Anteil von Tumorzellen im MCL in einem fortgeschrittenen Stadium der Zellzyklus kann jedoch als Hinweis auf einen Zellzyklusdefekt gewertet werden.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit sollten zwei Fragestellungen beantwortet werden. Die erste Fragestellung nach der Lymphomevolution und –progression wurde anhand der histologischen Analyse von sequentiellen Biopsien im Krankheitsverlauf untersucht. Abschließend kann ein Krankheitsverlauf analog zum allgemein akzeptierten Modell der Lymphomprogression des MCL nachvollzogen werden. Im Hinblick auf die Zytologie bedeutet dies eine Transformation von der klassisch/kleinzelligen zur blastoiden Variante. Der Verlauf des Wachstumsmusters zeichnet sich durch einen Übergang vom Mantelzonenwachstum über das noduläre zum diffusen Wachstumsmuster aus. Die Proliferationsrate bzw. die Anzahl der Mitosen ist durch eine Zunahme im Krankheitsverlauf charakterisiert. Ergänzt wird das Modell durch die statistische Bestätigung, dass die Proliferationsrate der Tumorzellen beim selben Patienten von der Diagnosestellung zum Rezidiv zunimmt. Des Weiteren kann in einigen Fällen gezeigt werden, dass sich die Proliferationsrate und die Zytologie der Tumorzellen unabhängig voneinander verhalten. Eine sequentielle Evolution des MCL, bei der der in der Primärbiopsie dominierende Klon zunehmend genetische Veränderungen erfährt, kann für die Fälle postuliert werden, in denen eine Transformation von der klassisch/kleinzelligen zur blastoiden Variante nachgewiesen wurde. Eine parallele Evolution, bei der ein Klon, der in der Primärbiopsie nicht erfasst wurde, unter der Therapie selektioniert wird, kann für die Fälle mit umgekehrter Transformation von einer blastoiden zu einer klassisch/kleinzelligen Variante angenommen werden.

Die zweite Fragestellung nach einem Zellzyklusdefekt am G1-S-Übergang wurde anhand der digitalen Bildanalyse immunfluoreszenzgefärbter MCL untersucht. Zusammenfassend kann für das MCL bei Patienten eine oszillierende Expression von Cyclin D1 in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus postuliert werden. Es kann festgehalten werden, dass die Expression von Cyclin D1 in MCL nicht konstant erhöht ist, sondern auch mit der Translokation t(11;14) einer Regulation entsprechend den Phasen des Zellzyklus zugänglich bleibt. Gleichwohl bleibt die konstitutive Überexpression von Cyclin D1 in jedem untersuchten MCL nachweisbar. Die Herausforderung zukünftiger Forschungsprojekte besteht darin, die Regulation der Transkription von Cyclin D1 unter der Kontrolle des Promotors des

Immunglobulinschwerkettengens zu entschlüsseln. Einerseits spiegelt die oszillierende Expression von Cyclin D1 mit einem Maximum in der G1-Phase die physiologische Funktion des Proteins wieder, da es in dieser Phase benötigt wird, um den G1-S-Übergang zu beschleunigen. Andererseits kann der hohe Anteil der proliferierenden Zellen in späten Phasen des Zellzyklus durch die konstitutive Überexpression von Cyclin D1 und weitere genetische Aberrationen im Sinne eines Zellzyklusdefektes am G1-S-Übergang erklärt werden.

Publikation der Ergebnisse

Publiziertes Abstract:

Vogt, N., Koch, K., Abramov, D., Klapper, W. (2012): Cell cycle dynamics of mantle cell lymphoma. **Der Pathologe**, Supplement 1

Meeting Report:

Dreyling, M., Kluin-Nelemans, H. C., Beà, S., Klapper, W., **Vogt, N.**, Delfau-Larue, M. H., Hutter, G., Cheah, C., Chiappella, A., Cortelazzo, S., Pott, C., Hess, G., Visco, C., Vitolo, U., Klener, P., Aurer, I., Unterhalt, M., Ribrag, V., Hoster, E., Hermine, O. (2013): Update on the molecular pathogenesis and clinical treatment of mantle cell lymphoma: report of the 11th annual conference of the European Mantle Cell Lymphoma Network. **Leuk. Lymphoma**, 54, 699-707

Originalarbeit:

Vogt, N., Klapper, W. (2013): Variability in morphology and cell proliferation in sequential biopsies of mantle cell lymphoma at diagnosis and relapse: clinical correlation and insights into disease progression. **Histopathology**, 62, 334-342

6. Literaturverzeichnis

Bataille, F., Rümmele, P., Dietmaier, W., Gaag, D., Klebl, F., Reichle, A., Wild, P., Hofstädter, F., Hartmann, A. (2003): Alterations in p53 predict response to preoperative high dose chemotherapy in patients with gastric cancer. Mol. Pathol., 56, 286-292

Braun, N., Papadopoulos, T., Müller-Hermelink, H. K. (1988): Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol., 56, 25-33

Carbone, P. P., Kaplan, H. S., Musshoff, K., Smithers, D. W., Tubiana, M. (1971): Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. Cancer Res., 31, 1860-1861

Carvajal-Cuenca, A., Sua, L. F., Silva, N. M., Pittaluga, S., Royo, C., Song, J. Y., Sargent, R. L., Espinet, B., Climent, F., Jacobs, S. A., Delabie, J., Naresh, K. N., Bagg, A., Brousset, P., Warnke, R. A., Serrano, S., Harris, N. L., Swerdlow, S. H., Jaffe, E. S., Campo, E. (2012): In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. Haematologica, 97, 270-278

Coqueret, O. (2002): Linking cyclins to transcriptional control. Gene, 299, 35-55

de Boer, C. J., Schuuring, E., Dreef, E., Peters, G., Bartek, J., Kluin, P. M., van Krieken, J. H. (1995): Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma. Blood, 86, 2715-2723

Determann, O., Hoster, E., Ott, G., Wolfram Bernd, H., Loddenkemper, C., Leo Hansmann, M., Barth, T. E., Unterhalt, M., Hiddemann, W., Dreyling, M., Klapper, W. (2008): Ki-67 predicts outcome in advanced-stage mantle cell lymphoma patients treated with anti-CD20 immunochemotherapy: results from randomized trials of the European MCL Network and the German Low Grade Lymphoma Study Group. Blood, 111, 2385-2387

Dreyling, M., Kluin-Nelemans, H. C., Beà, S., Klapper, W., Vogt, N., Delfau-Larue, M. H., Hutter, G., Cheah, C., Chiappella, A., Cortelazzo, S., Pott, C., Hess, G., Visco, C., Vitolo, U., Klener, P., Aurer, I., Unterhalt, M., Ribrag, V., Hoster, E., Hermine, O.

(2013): Update on the molecular pathogenesis and clinical treatment of mantle cell lymphoma: report of the 11th annual conference of the European Mantle Cell Lymphoma Network. Leuk. Lymphoma, 54, 699-707

Gérard-Marchant, R., Hamlin, I., Lennert, K., Rilke, F., Stansfeld, A. G., van Unnik, J. A. (1974): Classification of non-Hodgkin's lymphomas. Lancet, 2, 405-408

Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U., Stein, H. (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J. Immunol., 133, 1710-1715

Greiner, T. C., Moynihan, M. J., Chan, W. C., Lytle, D. M., Pedersen, A., Anderson, J. R., Weisenburger, D. D. (1996): p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. Blood, 87, 4302-4310

Harel, S., Delarue, R., Ribrag, V., Dreyling, M., Hermine, O. (2011): Treatment of younger patients with mantle cell lymphoma. Semin. Hematol., 48, 194-207

Hirt, C., Schüler, F., Dölken, L., Schmidt, C. A., Dölken, G. (2004): Low prevalence of circulating t(11;14)(q13;q32)-positive cells in the peripheral blood of healthy individuals as detected by real-time quantitative PCR. Blood, 104, 904-905

Hoster, E., Dreyling, M., Klapper, W., Gisselbrecht, C., van Hoof, A., Kluin-Nelemans, H. C., Pfreundschuh, M., Reiser, M., Metzner, B., Einsele, H., Peter, N., Jung, W., Wörmann, B., Ludwig, W. D., Dührsen, U., Eimermacher, H., Wandt, H., Hasford, J., Hiddemann, W., Unterhalt, M. (2008): A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. Blood, 111, 558-565

Hsiao, S. C., Cortada, I. R., Colomo, L., Ye, H., Liu, H., Kuo, S. Y., Lin, S. H., Chang, S. T., Kuo, T. U., Campo, E., Chuang, S. S. (2012): SOX11 is useful in differentiating cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma from mantle cell lymphoma. Histopathology, 61, 685–693

Hunter, T., Pines, J. (1994): Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. Cell, 79, 573-582

Jares, P., Campo, E. (2008): Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. Br. J. Haematol., 142, 149-165

Jares, P., Colomer, D., Campo, E. (2007): Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. Nat. Rev. Cancer, 7, 750-762

Klapper, W. (2011): Histopathology of mantle cell lymphoma. Semin. Hematol., 48, 148-154

Klapper, W., Hoster, E., Determann, O., Oschlies, I., van der Laak, J., Berger, F., Bernd, H. W., Cabeçadas, J., Campo, E., Cogliatti, S., Hansmann, M. L., Kluin, P. M., Kodet, R., Krivolapov, Y. A., Loddenkemper, C., Stein, H., Möller, P., Barth, T. E., Müller-Hermelink, H. K., Rosenwald, A., Ott, G., Pileri, S., Ralfkiaer, E., Rymkiewicz, G., van Krieken, J. H., Wacker, H. H., Unterhalt, M., Hiddemann, W., Dreyling, M. (2009): Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma-consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. J. Hematop., 2, 103-111

Klier, M., Anastasov, N., Hermann, A., Meindl, T., Angermeier, D., Raffeld, M., Fend, F., Quintanilla-Martinez, L. (2008): Specific lentiviral shRNA-mediated knockdown of cyclin D1 in mantle cell lymphoma has minimal effects on cell survival and reveals a regulatory circuit with cyclin D2. Leukemia, 22, 2097-2105

László, T., Matolcsy, A. (1999): Blastic transformation of mantle cell lymphoma: genetic evidence for a clonal link between the two stages of the tumour. Histopathology, 35, 355-359

Li, F., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C., Altieri, D. C. (1998): Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. Nature, 396, 580-584

Louie, D. C., Offit, K., Jaslow, R., Parsa, N. Z., Murty, V. V., Schluger, A., Chaganti, R. S. (1995): p53 overexpression as a marker of poor prognosis in mantle cell lymphomas with t(11;14)(q13;q32). Blood, 86, 2892-2899

Lovec, H., Grzeschiczek, A., Kowalski, M. B., Möröy, T. (1994): Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. EMBO J., 13, 3487-3495

Lukas, J., Jadayel, D., Bartkova, J., Nacheva, E., Dyer, M. J., Strauss, M., Bartek, J. (1994): BCL-1/cyclin D1 oncoprotein oscillates and subverts the G1 phase control in B-cell neoplasms carrying the t(11;14) translocation. Oncogene, 9, 2159-2167

Martinez, A., Bellosillo, B., Bosch, F., Ferrer, A., Marcé, S., Villamor, N., Ott, G., Montserrat, E., Campo, E., Colomer, D. (2004): Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. Am. J. Pathol., 164, 501-510

Nasr, M. R., El-Zammar, O. (2008): Comparison of pHH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. Am. J. Dermatopathol., 30, 117-122

Nodit, L., Bahler, D. W., Jacobs, S. A., Locker, J., Swerdlow, S. H. (2003): Indolent mantle cell lymphoma with nodal involvement and mutated immunoglobulin heavy chain genes. Hum. Pathol., 34, 1030-1034

Norton, A. J., Matthews, J., Pappa, V., Shamash, J., Love, S., Rohatiner, A. Z., Lister, T. A. (1995): Mantle cell lymphoma: natural history defined in a serially biopsied population over a 20-year period. Ann. Oncol., 6, 249-256

Pott, C., Hoster, E., Delfau-Larue, M. H., Beldjord, K., Böttcher, S., Asnafi, V., Plonquet, A., Siebert, R., Callet-Bauchu, E., Andersen, N., van Dongen, J. J., Klapper, W., Berger, F., Ribrag, V., van Hoof, A. L., Trneny, M., Walewski, J., Dreger, P., Unterhalt, M., Hiddemann, W., Kneba, M., Kluin-Nelemans, H. C., Hermine, O., Macintyre, E., Dreyling, M. (2010): Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. Blood, 115, 3215-3223

Quinn, J., Percy, L., Glassford, J., Somana, K., Rodriguez-Justo, M., Yong, K. (2010): CD20-positive multiple myeloma - differential expression of cyclins D1 and D2 suggests a heterogeneous disease. Br. J. Haematol., 149, 156-159

Quintanilla-Martinez, L., Thieblemont, C., Fend, F., Kumar, S., Pinyol, M., Campo, E., Jaffe, E. S., Raffeld, M. (1998): Mantle cell lymphomas lack expression of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor. Am. J. Pathol., 153, 175-182

Quintanilla-Martinez, L., Davies-Hill, T., Fend, F., Calzada-Wack, J., Sorbara, L., Campo, E., Jaffe, E. S., Raffeld, M. (2003): Sequestration of p27Kip1 protein by cyclin D1 in typical and blastic variants of mantle cell lymphoma (MCL): implications for pathogenesis. Blood, 101, 3181-3187

Rosenwald, A., Wright, G., Wiestner, A., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., Gascoyne, R. D., Grogan, T. M., Muller-Hermelink, H. K., Smeland, E. B., Chiorazzi, M., Giltnane, J. M., Hurt, E. M., Zhao, H., Averett, L., Henrickson, S., Yang, L., Powell, J., Wilson, W. H., Jaffe, E. S., Simon, R., Klausner, R. D., Montserrat, E., Bosch, F., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Sanger, W. G., Dave, B. J., Lynch, J. C., Vose, J., Armitage, J. O., Fisher, R. I., Miller, T. P., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Holte, H., Delabie, J., Staudt, L. M. (2003): The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. Cancer Cell, 3, 185-197

Salaverria, I., Perez-Galan, P., Colomer, D., Campo, E. (2006): Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives. Haematologica, 91, 11-16

Sander, B., Wallblom, A., Ekroth, A., Porwit, A., Kimby, E. (2007): Characterization of genetic changes in MCL by interphase FISH on tissue sections. Leuk. Lymphoma, 48, 1344-1352

Sherr, C. J., Roberts, J. M. (1999): CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev., 13, 1501-1512

Swerdlow, S. H., Habeshaw, J. A., Murray, L. J., Dhaliwal, H. S., Lister, T. A., Stansfeld, A. G. (1983): Centrocytic lymphoma: a distinct clinicopathologic and immunologic entity. A multiparameter study of 18 cases at diagnosis and relapse. Am. J. Pathol., 113, 181-197

Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N., Jaffe, E. S., Pileri, S., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J. W. (2008): WHO Classification of Tumors of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC, Lyon

Tiemann, M., Schrader, C., Klapper, W., Dreyling, M. H., Campo, E., Norton, A., Berger, F., Kluin, P. M., Ott, G., Pileri, S., Pedrinis, E., Feller, A. C., Merz, H.,

Janssen, D., Hansmann, M. L., Krieken, H., Möller, 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, 29-38

Vaandrager, J. W., Schuuring, E., Zwikstra, E., de Boer, C. J., Kleiverda, K. K., van Krieken, J. H., Kluin-Nelemans, H. C., van Ommen, G. J., Raap, A. K., Kluin, P. M. (1996): Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence in situ hybridization. Blood, 88, 1177-1182

Yang, W. I., Zukerberg, L. R., Motokura, T., Arnold, A., Harris, N. L. (1994): Cyclin D1 (Bcl-1, PRAD1) protein expression in low-grade B-cell lymphomas and reactive hyperplasia. Am. J. Pathol., 145, 86-96

Danksagungen

Für die Überlassung des Themas, die Anleitung bei den Veröffentlichungen der Ergebnisse und die umfangreiche Betreuung der gesamten Dissertation bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. W. Klapper.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister danke ich für die Unterstützung. Die Einarbeitung von Charlotte war zauberhaft. Dima, Karoline und Christiane danke ich für die Hilfe am Fluoreszenzmikroskop und bei der digitalen Bildanalyse. Monika, Neus, Olivera, Susanne und Susanne danke ich für die Motivation und die Unterstützung beim Durchsuchen der Datenbank des Lymphknotenregisters. Die Besprechung der Ergebnisse mit Ilske nach dem Lymphoma-Lunch war sehr hilfreich.

Den kooperierenden Pathologen und Onkologen danke ich für die Zusammenarbeit.

Die statistischen Hilfestellungen von Herrn Jochens waren sehr zielführend.

Danke fürs Korrekturlesen bei Nicole, Karoline, Vera, Eik, Oma und Papa!

Lebenslauf

23.09.1987	geboren in Hamburg
1994-2007	Grundschule Hittfeld; Orientierungsstufe Hittfeld; Ratsgymnasium Minden; Ronald Reagan High School in San Antonio, TX; Gymnasium Hittfeld
26.06.2007	Abitur am Gymnasium Hittfeld
2007-2009	Medizinstudium an der Ruhr-Universität-Bochum, Vorklinischer Studienabschnitt
31.08.2009	1. Ärztliche Prüfung an der Ruhr-Universität-Bochum
ab 09.2009	Medizinstudium an der Christian Albrechts Universität zu Kiel, Klinischer Studienabschnitt
2011-2013	Doktorand bei Herrn Prof. Dr. med. W. Klapper, Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
07.08.2012	Zulassung zum Praktischen Jahr