

Aus dem Institut für Pathologie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. A. Rosenwald

IMP3-Expression in Mantelzellymphomen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Vanessa Oberski (geb. Trapp)

aus Tübingen

Karlsruhe, Juli 2017

Referent: Professor Dr. med. A. Rosenwald

Korreferent: Professor Dr. med. R. Bargou

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2018

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Definition und Epidemiologie des Mantelzelllymphoms (MCL)	1
1.2 Klinisches Erscheinungsbild des MCL	1
1.3 Verlauf und Therapie	3
1.4 Morphologie und Immunphänotyp	3
1.6 Molekulargenetik des MCL	6
1.6.1 Zellzyklusdysregulation in MCL	6
1.6.2 Chromosomale Alteration in MCL	7
1.7 IMP3	8
1.8 Kleinzelliges lymphozytisches Lymphom/chronische lymphatische Leukämie (SLL/CLL)	9
1.8.1 Morphologie und immunphänotypisches Erscheinungsbild des SLL	10
1.8.2 Verlauf und Therapie des SLL.....	11
1.9 Zielsetzung	11
2. Material	13
2.1 Untersuchungsmaterial	13
2.2 Puffer, Lösungen und Medien	14
2.3 Antikörper, Enzyme, Chemikalien	15
2.4 Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte	15
3. Methoden	17
3.1 Herstellung von Paraffinschnitten	17
3.2 Immunhistochemie	17
3.3 Technik der Immunhistochemie	18
3.4 Färbeprotokoll	18
3.4.1 Vorbereitung der Probe.....	18
3.4.2 Die Färbung	19
3.5 Positivkontrolle	20
3.6 Tissue Microarrays (TMA)	20
3.7 Auswertung	20
3.8 Statistische Auswertung	21
4. Ergebnisse	22
4.1 IMP3-Expression auf der Proteinebene in primären MCL	24

4.2 IMP3-Expression in MCL zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und zum Zeitpunkt eines Rezidivs	31
4.3 IMP3-Protein-Expression in SLL	31
5. Diskussion.....	34
5.1 IMP3-Protein-Expression in MCL	34
5.2 IMP3-Protein-Expression als mögliche therapeutische Option.....	36
6. Zusammenfassung	40
7. Tabellenverzeichnis	41
8. Abbildungsverzeichnis	42
9. Abkürzungsverzeichnis	43
10. Literaturverzeichnis	45
11. Danksagung.....	50
12. Lebenslauf	51

1. Einleitung

1.1 Definition und Epidemiologie des Mantelzelllymphoms (MCL)

Das Mantelzelllymphom (MCL) ist ein malignes B-Zell-Lymphom und stellt eine eigene Untergruppe innerhalb der Non-Hodgkin-Lymphome dar. Mit einer Inzidenz von 2/100.000/Jahr (in Deutschland)⁵ und einer Frequenz von etwa 5-10 der Non-Hodgkin-Lymphome gehört das MCL zu den eher seltenen Erkrankungen.⁶ Der Altersmedian liegt bei 63 Jahren. Männer sind häufiger betroffen als Frauen, das Verhältnis männlicher zu weiblicher Patienten beträgt etwa 3:1.^{5,6}

1.2 Klinisches Erscheinungsbild des MCL

Klinisch tritt das MCL durch Lymphknotenvergrößerungen und/oder durch extranodalen Befall des Knochenmarks sowie durch Splenomegalie und/oder Hepatomegalie in Erscheinung.^{6,7} Verglichen mit dem folliculären Lymphom treten beim MCL extranodale Manifestationen häufiger auf.⁵ Charakteristische Manifestationsstellen sind der Waldeyer-Rachenring und der Gastrointestinaltrakt (meist in Form von multiplen kleinen Polypen, der sogenannten malignen lymphomatösen Polypose). Etwa 67 % der Patienten weisen bereits zum Zeitpunkt der Diagnose eine Knochenmarkinfiltration auf.⁸ In mehr als 50 % der Fälle wurden Lymphomzellen im Blut nachgewiesen (periphere Leukozytose), bei einer durchschnittlichen Leukozytenzahl von $39,7 \times 10^9/L$.⁶

MCL haben eine sehr ungünstige Langzeitprognose. Da das MCL meist aggressiv verläuft, liegt die mediane Überlebenszeit der Patienten nach Diagnosestellung bei ca. 49 Monaten. Mehr als 70 % der Patienten werden bereits in höheren Erkrankungsstadien (Stadium 3 und 4 nach Ann-Arbor-Klassifikation) diagnostiziert.⁶

Die klinische Einteilung der Mantelzelllymphome erfolgt wie bei den anderen Non-Hodgkin-Lymphomen - mit Ausnahme der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) - sowie auch beim Hodgkin-Lymphom anhand der Ann-Arbor-Klassifikation (siehe Tab. 1). Es wird zwischen einem primär nodalen Befall (N) und einem primär extranodalen Befall (E) unterscheiden.⁵

Tabelle 1: Ann-Arbor-Klassifikation (nach⁵)

I	Vorliegen eines einzigen oder lokalisierten extranodalen Herdes (I/E) oder Befall einer einzigen Lymphknotenregion (I/N).
II	Vorliegen lokalisierter extranodaler Herde (II/E) oder mehrerer Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells (II/N/E) oder Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells (II/N).
III	Befall von lokalisierten extranodalen Herden und Lymphknotenbefall (III/E oder III/N/E) oder Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells (III/N).
III1	Subphrenische Lokalisation, beschränkt auf die Milz, portale und oder zöliakale Lymphknoten, gemeinsam oder einzeln.
III2	Subphrenische Lokalisation mit Beteiligung paraaortaler, iliakaler, inguinaler und /oder mesenterialer Lymphknoten, einzeln oder gemeinsam.
IV	Disseminierter Befall mehrerer Organe oder eines extralymphatischen Organs mit oder ohne Befall von Lymphknoten.

Zum lymphatischen Gewebe gehören: Thymus, Milz, Lymphknoten, Waldeyerscher-Rachenring und die Appendix.

Zervikale, axilläre und inguinale Lymphknotenvergrößerungen sowie Leber- und Milzvergrößerung gelten als je eine Region.

Die Stadien erhalten zusätzlich den Buchstaben „A“ bei Fehlen, „B“ bei Vorliegen folgender Symptome:

- Nicht erklärbares Fieber > 38 °C.
- Nicht erklärbarer Nachtschweiß.
- Nicht erklärbarer Gewichtsverlust (> 10 % des Körpergewichts innerhalb von 6 Monaten).

1.3 Verlauf und Therapie

Der klinische Verlauf ist sehr variabel. Das Spektrum reicht von sehr aggressiv verlaufenden Formen mit Überlebenszeiten von unter 12 Monaten, bis zu relativ indolent verlaufenden Formen mit einer Überlebenszeit von über 10 Jahren.^{6,7}

Auf die konventionellen Chemotherapie-Protokolle, wie CHOP (Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin = Doxorubicin, Oncovin = Vincristin, Prednisolon), COP (Cyclophosphamid, Oncovin = Vincristin, Prednisolon) oder DHAP (Dexamethason, Hoch-Dosis Cytarabin, Cisplatin, Prednisolon) sprechen MCL zunächst gut an. Allerdings kommt es häufig zu Rezidiven. Selbst bei neueren Therapieformen, bei denen die Chemotherapie mit Rituximab, Lenalidomid oder mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib kombiniert wird, kommt es zu Rezidiven.^{6,9,10}

Rituximab gehört zu den wirksamsten Medikamenten gegen Non-Hodgkin Lymphome der B-Zell-Reihe. Rituximab ist ein chimärer IgG₁ anti-CD20 monoklonaler Antikörper, der komplement- und antikörperabhängig Zytotoxizität induziert. Besonders in Kombination mit konventionellen Chemotherapie-Protokollen wie z.B. R-CHOP oder R-DHAP bewirkt Rituximab bereits nach wenigen Tagen eine Apoptose der Tumorzellen.¹¹ Eine Kombinationstherapie wie z.B. R-CHOP-HA (HA = hochdosiertes Cytarabin) führt zu einer länger andauernden kompletten Remission.¹² Vielversprechend war auch eine Kombinationstherapie aus Fludarabin, Cyclophosphamid und Mitoxantron (FCM).¹²

1.4 Morphologie und Immunphänotyp

Zytomorphologisch unterteilt man das MCL in den klassischen Subtyp und aggressivere Varianten, den blastoiden und pleomorphen Subtyp. Kennzeichnend für das klassische MCL sind kleine bis mittelgroße Lymphozyten mit irregulär geformten, teils eingebuchteten Nucleoli und schmalen Zytoplasma.

Die blastoide Variante kann de novo entstehen, oder ist als Ergebnis einer Progression vom klassischen Typ zu werten.¹³ Der blastoide Typ weist ein weites morphologisches Spektrum auf, welches von mittelgroßen, Lymphoblasten-ähnlichen Zellen, bis zu sehr großen Zellen mit aufgelockertem Chromatin und prominenten Kernen reicht.

Bei der pleomorphen Variante findet man neben der Zellpleomorphie Zellkerne mit

irregulären Konturen und aufgehelltem Kernchromatin mit teils prominenten Nukleolen.⁹

Das Wachstumsmuster der Infiltrate ist meistens diffus (75 %), kann aber auch als noduläre (18 %) oder mantelzonenartige (7 %) Verteilungsform auftreten. Im histologischen Bild zeigt sich meist bei einer diffusen Infiltration des Gewebes eine Destruktion der Lymphknotenarchitektur.⁹

Immunphänotypisch exprimiert das MCL die B-Zell-Marker CD19, CD20, CD22 sowie CD79a. In nahezu allen Fällen wird der T-Zell-Marker CD5 koexprimiert, im Gegensatz zu der CLL kommt es im Allgemeinen zu keiner Expression von CD23. Hoch charakteristisch für das MCL ist der immunhistochemische Nachweis einer nukleären Cyclin D1 Überexpression.⁹

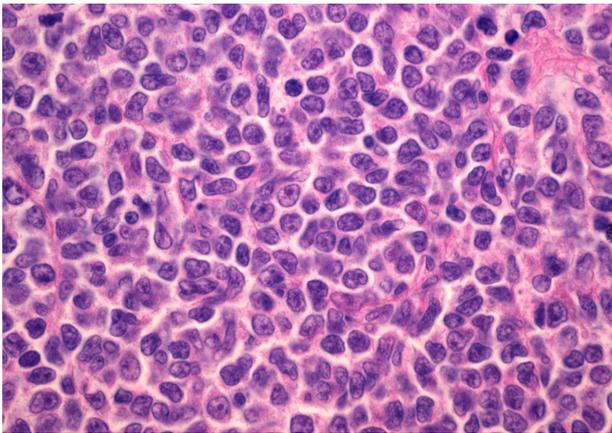


Abb. 1A Klassisches MCL bei 1000-facher Vergrößerung.

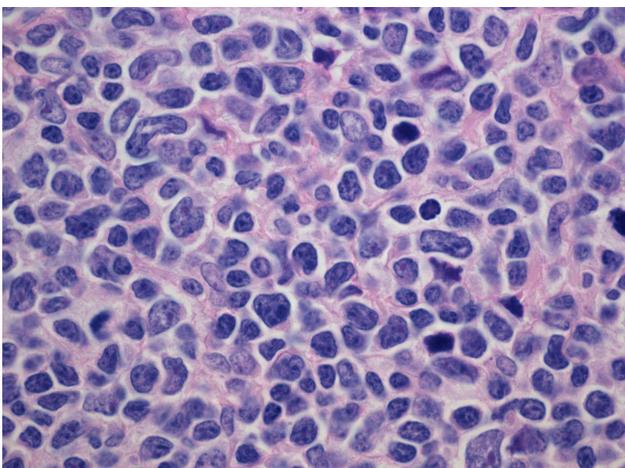


Abb. 1B Blastoide Variante des MCL bei 1000-facher Vergrößerung.

1.5 Ki67 als wesentlicher prognostischer Marker in MCL

Wegen des sehr variablen klinischen Verlaufs der an MCL erkrankten Patienten wurde in zahlreichen Studien versucht, prognostische Marker für diese Lymphomgruppe zu definieren. Es zeigte sich, dass die Morphologie und insbesondere die Proliferationsaktivität der Tumorzellen einen wesentlichen Einfluss auf das Überleben haben. [6-8,14](#)

Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem blastoiden Phänotyp eine erhöhte Proliferation³¹ und eine schlechtere Prognose hatten als Patienten, die am klassischen Subtyp erkrankt waren.⁸ Weiterhin konnte in mehreren Studien ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem erhöhten Proliferationsindex und einer verkürzten Überlebenszeit der Patienten festgestellt werden^{3, 15}, wobei die Proliferationsfraktion in den meisten Studien mittels Immunhistochemie gegen Ki67, einem proliferationsassoziierten Marker, ermittelt wurde. [6-8,14](#) In einer Microarray-basierten Analyse der Genexpression in MCL konnte einerseits eine für das MCL charakteristische Genexpressionssignatur identifiziert werden, und darüber hinaus auch eine objektiv quantifizierbare weitere Genexpressionssignatur als molekularer prognostischer Marker identifiziert werden. Letztere umfasste eine Expressionsstärke von 20 Genen, die an Prozessen des Zellzyklus und der DNA-Replikation beteiligt sind, und es zeigte sich eine Assoziation zwischen einer erhöhten Expression dieser Gene mit einer ungünstigeren klinischen Prognose.¹⁶

1.6 Molekulargenetik des MCL

Auf molekulargenetischer Ebene zeigt das MCL z.T. charakterische Alterationen, wobei ein Großteil der bislang nachgewiesenen Alterationen überwiegend DNA-Reparatur-Mechanismen sowie die Zellzyklusregulation betreffen.

1.6.1 Zellzyklusdysregulation in MCL

Die chromosomale Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ ist das genetische Charakteristikum des MCL und in nahezu allen Fällen auffindbar. Die chromosomale Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ führt zur Dysregulation und Überexpression von Cyclin D1, einem wichtigen Regulator in der G1 Phase des Zellzyklus.¹⁷ Indem die *Cyclin D1/CCND1*-Region auf Chromosom 11 in die Nachbarschaft des Immunglobulin-Schwerketten-Gens (*IgH*) auf Chromosom 14 verlagert wird, gelangt *CCND1* unter die Kontrolle des Enhancers für die *IgH*-Region, was zu einer vermehrten Transkription dieses Bereiches führt.¹⁸ In Abbildung 2 findet sich die schematische Darstellung dieser Translokation $t(11;14)$.

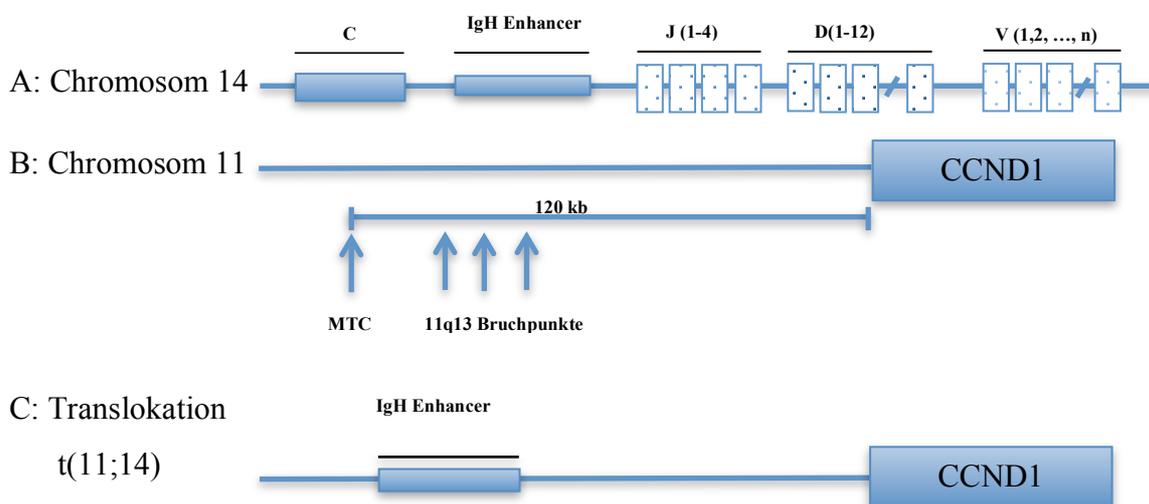


Abbildung 2: Translokation $t(11;14)$ in MCL. **A:** Genomische Struktur des Immunglobulin Schwerketten Genlocus auf dem Chromosom 14q32 mit den V (variable)-, D (diversity)-, J (joining) und C (constant)- Region. Der *IgH* Enhancer liegt zwischen der J- und C-Region. **B:** Genomische Struktur des *Cyclin D1 Locus (CCND1)* auf Chromosom 11q13. Im MTC (major translocation cluster)- Bereich treten die meisten Bruchpunkte bei der Umlagerung in MCL auf, es kommen jedoch auch Bruchpunkte weiter distal vor. **C:** Durch die Translokation $t(11;14)$ befindet sich das *Cyclin D1-Gen* nun unter der Kontrolle des *IgH* Enhancers. (nach ²)

Die verstärkte Transkription des *CCND1*-Gens führt zu einer Überexpression seines Genproduktes Cyclin D1, welches eine zentrale Rolle in der Regulation der G1 Phase und dem Übergang von der G1 in die S-Phase des Zellzyklus besitzt. Cyclin D1 bindet an Cyclin-abhängige Kinasen (cdk; cyclin-dependent Kinase) cdk4 und cdk6. In der Mitte der G1-Phase wird das Retinoblastom1 (RB1)-Genprodukt durch Cyclin D1/cdk4 oder Cyclin D1/cdk6 phosphoryliert. Dies führt zu der Freisetzung des im hypophosphorylierten Zustand gebundenen Transkriptionsfaktors E2F. E2F bindet nun zusammen mit einem weiteren Faktor DP1 an die Promotorregionen der DNA, wodurch die Transkription weiterer Gene wie Cyclin E/CDK2 aktiviert wird, deren Produkte für die Zellzyklusprogression benötigt werden.^{17,18,19, 20}

Zahlreiche weitere molekulargenetische Veränderungen in MCL betreffen häufiger die Zellzyklusregulation oder die Reparaturmechanismen der Zelle nach einer Schädigung der DNA.¹⁸ Hier zu gehört z.B. eine erhöhte Expression von *c-MYC*, welche mit einer blastoiden MCL-Variante und einer schlechteren Prognose der Erkrankung einhergeht.^{21,22} Ein anderes Beispiel, welches den DNA-Reparatur-Signalweg in MCL betrifft, ist die Inaktivierung des *ATM*-Gens.² Allerdings scheint eine Alteration des *ATM*-Gens keinen signifikanten Einfluss auf die mediane Überlebenszeit der an MCL erkrankten Patienten und die Proliferationsaktivität des Tumors zu haben.^{23, 24}

1.6.2 Chromosomale Alteration in MCL

Neben der charakteristischen Translokation t(11;14) ist eine hohe Anzahl von Chromosomenverlusten und -zugewinnen für das MCL-Genom typisch, die über Alterationen von zum großen Teil noch nicht sicher identifizierten Zielgenen auch eine mögliche Rolle in der Heterogenität der Überlebenszeiten bei MCL-Patienten spielen. Verschiedene Studien zeigten, dass die häufigsten Alterationen im MCL Verluste auf den Chromosomen 1p, 6p, 8p, 9p, 11p, 13p und 17p sowie Zugewinne von chromosomalem Material auf den Genen 3q, 8q, 7q und 7p betreffen. Des Weiteren gibt es immer mehr Hinweise, dass viele dieser chromosomalen Veränderungen letztlich Gene betreffen, die ebenfalls in der Zellzyklusregulation und bei den DNA-Reparatur-Mechanismen eine Rolle spielen.^{25,26,27,28}

Der Zugewinn des kurzen Armes von Chromosom 7 (7p) gehört zu den häufigsten chromosomalen Alteration im MCL (13 %) ²⁹; und es fand sich eine Assoziation dieser

genetischen Alteration mit einer blastoiden Morphologie und einer erhöhten Proliferation der Tumorzellen.^{29, 30} In einer kombinierten Analyse von chromosomalen Alterationen und konsekutiven Änderungen der Genexpression fand sich eine ausgeprägte (mehr als 8-fache) Hochregulation des Gens IMP3 (nach aktueller Nomenklatur IGF2BP3) in MCL bei einem Zugewinn von 7p.³⁰

1.7 IMP3

IMP3/IGF2BP3 ist auf 7p genetisch lokalisiert und gehört gemeinsam mit IMP1 und 2 zu der Familie der IGF2-mRNA-bindenden Proteinen (der VICKZ Familie). Die IGF2-mRNA-bindenden Proteine beeinflussen die Stabilität der RNA und das Zellwachstum, darüber hinaus sind sie an der Migration während der embryonalen Entwicklung beteiligt.^{31, 32}

Die IGF2-mRNA-bindenden Proteine gehören zu einer großen Gruppe von Regulatorproteinen des IGF-Signalwegs, die eine Schlüsselrolle im Ablauf der zellulären Proliferation haben.^{33, 34} IGF1 und 2 werden von Bindungsproteinen³⁴ und mRNA-bindenden Proteinen wie IMP3 reguliert. IMP3 wurde ursprünglich im Zusammenhang mit einer Überexpression beim Pankreaskarzinom mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) auf Chromosom 7p11.5 entdeckt.³⁵

In anderen soliden Tumoren ließ sich ebenfalls eine erhöhte Expression von IMP3 nachweisen. Dabei zeigte sich, dass eine vermehrte Expression von IMP3 auf transkriptionalem und/oder posttranskriptionalem Weg mit einer erhöhten Tumorprogression, einer erhöhten Metastasierungsneigung^{36, 37} sowie möglicherweise mit einem höheren histologischen Grad³⁸ der Tumore und mit einer ungünstigeren Prognose verbunden war.^{36, 39-42}

Eine weitere Studie beschrieb eine variable Protein-Expression in einer Reihe von malignen Lymphomen speziell in den Lymphomgruppen, die mit dem Phänotyp des B-Zell-Keimzentrums assoziiert sind.¹

Die vorliegende Datenlage weist darauf hin, dass IMP3 möglicherweise die Tumorproliferation und Tumorprogression durch Signalverstärkung per IGF-Signalweg fördert. Ferner konnte gezeigt werden, dass IMP3 in lymphatischen Zellen physiologisch in den B-Zellen des Keimzentrums exprimiert wird.¹

Interessanterweise wurde IMP3 bereits zuvor in der sog. Genexpressionssignatur des MCL beschrieben.¹⁶

1.8 Kleinzelliges lymphozytisches Lymphom/chronische lymphatische Leukämie (SLL/CLL)

Die chronische lymphatische B-Zell-Leukämie (CLL) bzw. das kleinzellige lymphozytäre Lymphom (engl. small lymphocytic lymphoma (SLL)) gehören ebenfalls zu den malignen B-Zell-Lymphomen. Die CLL ist eine der am häufigsten im Erwachsenenalter auftretenden Leukämieformen in den westlichen Ländern. Die Inzidenz liegt im Schnitt bei zwei bis sechs Fällen pro 100.000 Personen pro Jahr mit einem Gipfel um das 65ste Lebensjahr (Inzidenz hier 12,8/100.000).⁴³ Das SLL als lokalisierte Form der CLL ist im Gegensatz dazu ein seltenes Krankheitsbild und macht ca. 4 % bis 7 % aller Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) aus.⁹

Die Bezeichnung SLL wird für nicht-leukämische Formen mit Gewebsinfiltrationen verwendet, die morphologisch und immunphänotypisch einer CLL entsprechen. Die iwCLL (International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia)- Definition eines SLL fordert eine Lymphadenopathie, Fehlen einer Cytopenie auf Grund einer Knochenmarksinfiltration durch SLL/CLL und weniger als $5 \times 10^9/L$ B-Lymphozyten im peripheren Blut.⁴³ Das periphere Blut und das Knochenmark sind beim SLL seltener betroffen als bei der CLL. Eine Knochenmarkinfiltration kommt beim SLL in unter 30 % der Fälle vor.⁹

Die Einteilung der CLL anhand der RAI-Klassifikation von 1975 (siehe Tab. 3) wurde 1981 durch die Klassifikation nach Binet (siehe Tab. 2) vereinfacht.⁵

Tabelle 2: Stadieneinteilung der CLL nach Binet (1981) (nach ⁵)

Stadium Merkmale	Überlebenszeit (Jahre)
A < 3 vergrößerte Lymphknotenregionen*	> 10
B > 3 vergrößerte Lymphknotenregionen *	5-7
C Hb < 10,0 g/dl und/oder Thrombozytopenie < 100.000/ μ l Lymphknotenstatus irrelevant	< 3

*Hb >10,0 g/dl und Thrombozyten > 100.000/ μ l

Tabelle 3: Die RAI-Klassifikation unterscheidet die Stadien 0 bis IV (1975) (nach ⁵)

Stadium 0:	Nur Lymphozyten
Stadium I:	Zusätzlich Lymphknotenvergrößerung
Stadium II:	Zusätzlich Hepato- und/oder Splenomegalie
Stadium III:	Zusätzlich Anämie mit Hb < 11 g/dl
Stadium IV:	Zusätzlich Thrombozytopenie < 100.000/ μ l

1.8.1 Morphologie und immunphänotypisches Erscheinungsbild des SLL

Morphologisch imponiert das SLL im Lymphknoten als Ansammlung kleiner Lymphozyten mit runden Zellkernen, verklumptem Chromatin und schmalen Zytoplasma (siehe Abb. 3).⁴³ Typisch für das SLL sind sogenannte Pseudofollikel/Proliferationszentren, bei denen es sich um eine kleine, nestartige Ansammlung von proliferierenden Prolymphozyten und Paraimmunoblasten handelt.⁴⁴ Die Proliferationsrate ist in der Regel sehr niedrig.⁴³ Gelegentlich zeigt das SLL eine plasmazytoide Differenzierung. Bei Patienten mit einer plasmazytoiden Differenzierung kann man monoklonale Paraproteine wie IgM im Serum nachweisen.^{44, 45}

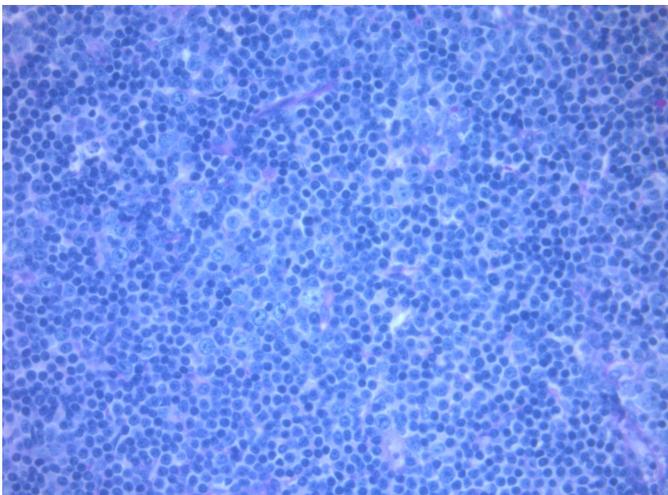


Abb. 3: Klassisches Bild eines SLL bei 400-facher Vergrößerung

SLL Zellen exprimieren die B-Zell Marker CD20 und CD79a, zusätzlich CD5 und CD23 sowie schwach CD22. Darüberhinaus werden die Kappa- und Lambda-Immunglobulin-Leichtketten exprimiert.⁴⁶

Die SLL/CLL und das MCL haben eine teilweise ähnliche Morphologie und zum Teil vergleichbare genetische Veränderungen.¹⁹ 10 % der MCL weisen beispielsweise die CLL-typische stereotype heavy complementarity-determining region 3 (VH CDR3) Sequenz ⁴⁷ auf.¹⁹ Etwa 15 % - 40 % der MCL tragen eine Hypermutation des IGHV, wie es für die CLL typisch ist.^{48, 49}

1.8.2 Verlauf und Therapie des SLL

Die lokalisierte Form des SLL wird bei einem kurativen Ansatz durch Radiotherapie behandelt. Die häufigere, disseminierte Form wird wie eine CLL entweder abwartend (watchfull waiting), medikamentös (Chlorambucil, Rituximab, Lenalidomid), mittels intensiver Chemotherapie (Fludarabin, Cyclophosphamid und Rituximab) oder durch eine Stammzelltransplantation behandelt.⁹

1.9 Zielsetzung

Das MCL ist auf molekularer Ebene neben der Translokation t(11;14)(q13;q23) durch zahlreiche weitere genetische Alterationen charakterisiert, welche überwiegend die DNA-Reparatur-Mechanismen sowie die Zellzyklusregulation betreffen. Beispielsweise gehört die erhöhte Expression von c-MYC, welche mit einer blastoiden MCL-Variante und einer schlechteren Prognose einhergeht, ebenfalls zu den genetischen Alterationen des MCL. In vorherigen Arbeiten fand sich, dass die häufigsten Alterationen im MCL Verluste auf den Chromosomen 1p, 6p, 8p, 9p, 11p, 13p und 17p sowie Zugewinne von chromosomalem Material auf den Genen 3q, 8q, 7q und 7p betreffen. Es gibt immer mehr Hinweise, dass viele dieser chromosomalen Veränderungen Gene betreffen, die ebenfalls in der Zellzyklusregulation und bei den DNA-Reparatur-Mechanismen eine Rolle spielen und vermutlich auch an einer schlechteren Prognose/einem aggressiveren Verhalten des MCL mitbeteiligt sind.^{25,26,27,28} Zu den häufigeren chromosomalen Alterationen im MCL gehört der Zugewinn des kurzen Armes von Chromosom 7 (7p) mit IMP3 unter den hoch regulierten Genen.^{29, 30}

Die bisherigen Daten stammen jedoch ausschließlich aus DNA- oder RNA-Untersuchungen aus der Zellkultur bzw. an einem kleineren Kollektiv primärer MCL. In der vorliegenden Arbeit erfolgte daher die Charakterisierung der IMP3-Expression an einem großen, unabhängigen Kollektiv von primären MCL auf Proteinebene mittels immunhistochemischer Färbungen an Großschnitten und an Gewebe-Mikroarrays

(TMA). Dadurch konnte neben dem Expressionsniveau die zelluläre Lokalisation (nukleär vs. cytoplasmatisch oder membranär) des IMP3-Proteins bestimmt werden. Außerdem sollte die Expression von IMP3 mit einem chromosomalen Zugewinn von 7p korreliert werden. Weiterhin wurde ein möglicher Zusammenhang zur Tumorzellproliferation und zum klinischen Verhalten dieses Lymphomtyps anhand der Überlebenszeit untersucht. Ferner war es möglich, an einer kleineren Gruppe von Fällen die IMP3-Protein-Expression im Verlauf bei Erstdiagnose der Erkrankung und bei Auftreten eines Rezidives zu analysieren.

Aufgrund der partiellen morphologischen Verwandtschaft von MCL und des SLL/CLL wurde schließlich die IMP3-Protein-Expression zusätzlich an einem kleineren Vergleichskollektiv von SLL/CLL-Fällen bestimmt.

2. Material

2.1 Untersuchungsmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden 172 Fälle von Mantelzelllymphomen (MCL) retrospektiv untersucht. Das formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebematerial stammte aus dem Referenzzentrum für Lymphknotenpathologie des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg und aus dem Hospital Clínic i Provincial de Barcelona.

Die initial untersuchte Serie (Pilotserie) bestand aus 66 zufällig ausgewählten Fällen von MCL-befallenen Lymphknoten aus dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg aus den Jahren zwischen 2008 und 2010.

Von den insgesamt 66 untersuchten MCL-Fällen der Pilotserie zeigten 51 eine klassische Histologie, elf wiesen einen blastoiden Subtyp auf und vier waren vom pleomorphen Subtyp. Aufgrund der Annahme, dass die blastoide und die pleomorphe Variante eine ähnlich ungünstige Prognose haben, wurden die blastoiden und die pleomorphen Typen zusammengefasst.

Das durchschnittliche Alter der Patienten aus der Pilotserie lag bei 70 Jahren. Der Median der Überlebenszeit betrug 42,95 Monate. Der Median der Proliferationsfraktion (immunhistochemisch ermittelt durch den Proliferationsmarker Ki67) lag bei 30 % (Überblick über die klinischen Daten der Patienten dieser Serie in Tabelle 4).

Die zweite Serie beinhaltete 106 Fälle aus dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg und dem Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. Für diese Fälle waren zusätzliche genetische und klinische Informationen vorhanden (Überblick der Daten in Tabelle 5). Von den insgesamt 106 Fällen wurden 45 MCL anhand von ganzen Schnittpräparaten und 61 MCL mittels Tissue Microarray (TMA) untersucht.

Bei den TMAs handelt es sich um verschiedene, ca. 0,6 mm große Gewebeproben, die in einen Paraffinblock gebracht werden, um in einem Multiplexverfahren mehrere (bis zu > 100) Gewebeproben anhand eines Schnittes zu färben und histologisch auszuwerten.⁵⁰

Bei insgesamt 34 MCL der zweiten Serie lagen Informationen des genetischen Status von Chromosom 7 hinsichtlich chromosomaler Alterationen vor. Diese wurden im Vorfeld im Rahmen anderer Studien ermittelt. [27](#), [29](#), [30](#)

Die histologische Begutachtung aller Primärfälle erfolgte durch mehrere erfahrene Pathologen und die Diagnose eines Mantelzelllymphoms wurde an Hand der gängigen Kriterien der World Health Organisation [43](#) gestellt.

Das Vergleichskollektiv bestand aus einer Serie von 20 Lymphknoten mit Infiltration durch ein SLL. Die Paraffinblöcke der mit SLL infiltrierten Lymphknoten stammten aus dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg.

2.2 Puffer, Lösungen und Medien

Folgende Lösungen wurden verwendet und anhand der beschriebenen Zusammensetzung angesetzt:

PBS-Puffer:	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 0,2 g KH ₂ PO ₄ 1 l Aqua dest.
Zitronensäure:	2 l Aqua dest. 8,4 g Zitronensäure 3,4 g NaOH-Plätzchen mit NaOH auf pH 5,5 eingestellt
DAB-Reagenz:	10 ml DAB Substrate Buffer von DAKO 200 µl DAB + Chromogen von DAKO
Antibody-Diluent:	Fertiglösung von DAKO
Hämalaun:	Fertiglösung von Merck (München)

Xylol: Jäkle Chemie (Nürnberg)

2.3 Antikörper, Enzyme, Chemikalien

Die folgenden Antikörper, Enzyme und Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Primärantikörper:

Monoklonaler IMP3-Mensch-Anti-Maus-Antikörper in flüssiger Form als Zellkulturüberstand (mit fetalem Rinderserum), gegen 0,02 mol/L PBS, pH 6,0 und 0,015 mol/L Natriumazid dialysiert. (Von DAKO, Hamburg, Deutschland)

Klon: 69,1 (4). Isotyp: IgG_{2a}, Kappa.

Konzentration Maus-IgG mg/L: 34,8 mg/l

Sekundärantikörper:

ADVANCE (TM) HRP LINK

Dual Link Rabbit/Mouse (link antibody, DAKO HRP Kit, ready to use)

Enzym:

ADVANCE (TM) HRP Enzym

Dako EnVision™ + System/HRP, Mouse (Rabbit anti-Mouse IgG, HRP)

(DAB System von DAKO)

2.4 Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Die Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen geliefert:

Pipettenspitzen Greiner, Frickenhausen; A. Hartenstein
(Würzburg)

Eindeckfilm KP-TAPE Klinipath Duiven (Niederlande)

Objektträger Superfrost Menzel (Braunschweig)

Mikrotomklingen R 35 Produkte für die Medizin AG (Köln)

Die Laborgeräte stammen aus folgenden Firmen:

Automatische Eindeckstraße	Tissue-Tek ^R Diagnostische System-Technik
Brutschrank Heracell	Heraeus (Hanau)
Kühl- und Gefrierschrank	Quelle (Fürth)
Mikroskop Olympus BH- 6	Olympus Optical Co. (Europa) GmbH (Würzburg)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Vortex-Genie	Bender & Hoblein (Zürich/Schweiz)
Schnellkochtopf	WMF perfect 6,5 l (Geislingen)
Mikrotom 2050 Supercut	Reichert-Jung Cambridge Instr. GmbH (Nussloch)
Wasserbad	MEDAX Nagel KG (Kiel)
Shandon Coverplate TM (QTY:25, REF 72110017)	Thermo (scientific) Thermo Shandon Limited Subsidiary of Thermo Fisher Scientific Tudor Road, Manorpark, Runcorn, Cheshire W471TA, (UK)
Beecher Instruments Sun Prairie	WI (USA)

3. Methoden

3.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Die nativen Lymphknoten wurden mit 4 %-igem Formaldehyd fixiert.^{51,52}

Die Entwässerung in der aufsteigenden Äthylalkoholreihe und Xylol erfolgte maschinell (Tissue Tek VIP, Firma Sakura). Anschließend wurde das Gewebe in flüssiges Paraffin überführt und mittels eines Histocentre-Gerätes (Firma SHANDON) eingebettet.

Zum Erhärten wurden die Paraffinblöcke für 30 min in einen Gefrierschrank bei -20 °C gelegt. Nach Erhärten des Paraffins konnte mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms 3 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt werden. Die Schnittpräparate wurden zunächst in ein Wasserbad bei Raumtemperatur zur „Glättung“ des Schnittes gegeben und dann zum Strecken in ein Wasserbad bei 30 °C gelegt. Anschließend konnten die geglätteten Schnitte auf einen Objektträger aufgebracht werden. Um ein Abschwimmen des Gewebes bei der Färbung zu verhindern wurden die Objektträger mit den Schnittpräparaten über Nacht zum Trocknen in einen Brutschrank bei 37°C gebracht oder für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

3.2 Immunhistochemie

In immunhistochemischen Färbungen werden mittels Antikörper verschiedene Antigene nachgewiesen. Je nach Spezifität des verwendeten Antikörpers kann man verschiedene Antigene identifizieren und topographisch zuordnen.⁵³

Neben der Zelltypisierung kann man auch die Zellfunktion immunhistochemisch detektieren. Eine große Rolle bei der Zellfunktion spielt das im Zellkern nachweisbare Antigen Ki67. Bei dem Antigen Ki67 handelt es sich um einen Marker der Proliferationsaktivität.⁵³ Ki67 ist nicht nur ein wichtiger Marker für die Zellproliferation, sondern auch ein wichtiger Prognosefaktor für das klinische Risiko der an MCL erkrankten Patienten.³ Daher wurde bei jedem untersuchten IMP3 und SLL Fall die Proliferationsaktivität anhand von Ki67 immunhistochemisch ermittelt.

3.3 Technik der Immunhistochemie

Mit Hilfe von Retrievalverfahren sind heutzutage auch Paraffinschnitte für die Immunhistochemie zugänglich. Die durch Fixation quervernetzte antigenen Determinanten können durch Retrievalverfahren demaskiert werden. Eine Demaskierung kann entweder durch kurze Andauung mit Pronase, ein Gemisch welches Endo- und Exoproteasen enthält, oder durch zeitlich limitierte Hitzeeinwirkung in einem Dampfdruckinkubator erreicht werden.⁵³

Der Primär-Antikörper bindet mit seinem Fab₂-Fragment an das gesuchte Antigen. Sein Fc-Fragment bleibt frei und dient dem Sekundär-Antikörper als Bindungsstelle. Der Sekundär-Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt. Die am häufigsten verwendeten Enzyme sind Meerrettich-Peroxidase (auch als HR = horseradish peroxidase bekannt), alkalische Phosphatase, β -Galactosidase und Glucose-Oxidase in Verbindung mit Peroxidase.²⁰

3.4 Färbeprotokoll

3.4.1 Vorbereitung der Probe

Vor dem immunhistochemischen Färbeverfahren müssen die Gewebeschnitte entparaffiniert, rehydriert und mit Wärme behandelt werden.

Benötigte Reagenzien:

- Xylol (oder Xylol Ersatzstoffe)
- 100 % Ethanol oder Isopropanol
- Aqua. dest.

Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte auf Objektträger durch folgende Reagenzien geführt:

100 % Xylol 2 x 5 min

100 % Ethanol 2 x 5 min

90 % Ethanol 2 x 3 min

80 % Ethanol 2 x 3 min

70 % Ethanol 1 x 3 min

50 % Ethanol 1 x 3 min

Anschließend wurden die Schnitte mit Aqua dest. gewaschen und im Anschluss zur hitzeinduzierten Epitopdemaskierung (heat-induced epitope retrieval, HIER) in eine vorgewärmte Pufferlösung, Zitronensäure (pH 6,0) eingetaucht und zur Wärmeerhaltung in einem Schnellkochtopf bei 95-99 °C gekocht. Hierzu wurden 1 l von 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) im Wasserkocher zum kochen gebracht.

Der Dampftopf wurde mit 300 ml Aqua dest. befüllt und erhitzt. Ein Einsatz mit den Gewebeschnitten wurde mit 1 l kochendem Citratpuffer befüllt und für 13 min gekocht.

Nach der Hitzebehandlung wurden die Schnitte gewässert und für 20 min bei Raumtemperatur in PBS (phosphate buffer saline) Puffer (pH 7,4) überführt und in Coverplates eingelegt. Anschließend wurden die Schnitte für 8 min mit PBS gespült.

Da es bei unzureichender oder fehlerhafter Entparaffinierung zu Störungen im Färbemuster kommen kann, wurden die Schnitte nach der Hitzevorbehandlung bis zum Beginn der Inkubation mit dem Primär-Antikörper in detergenzienhaltigem Wasserpuffer PBS aufbewahrt. ⁵⁴

3.4.2 Die Färbung

Der monoklonale Primär-Antikörper IMP3-Mensch-Anti-Maus-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:100 auf die vorbehandelten Gewebeschnitte aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Der Antikörper wurde mit DAKO Antibody Diluent verdünnt. Nach der Inkubation mit dem Primär-Antikörper wurden die Schnitte dreimal für 8 min mit PBS gewaschen und danach mit 100 µl des entsprechenden Sekundär-Antikörpers Dual Link Rabbit/Mouse für 30 min bei RT inkubiert und wiederum für 8 min mit PBS gespült. Danach wurde 100 µl des HRP Enzyms (Dako EnVision™ + System/HRP, Mouse) dazu gegeben. Hierauf wurde erneut für 8 min mit PBS gespült.

Anschließend wurden die Gewebsschnitte für 10 min mit 200 µl DAB (3,3 Diaminobenzidin) für 10 min bei RT inkubiert und mit PBS gespült. Nach Abstoppen der Reaktion mit Aqua dest. und Gegenfärbung mit Hämalaun (3 min) wurden die

Objektträger 10 min lang unter fließendem Leitungswasser gewässert, danach in Ethanol (100 %) eingetaucht und schließlich für 25 min im Brutschrank getrocknet. Abschließend folgte die vollautomatisch Eindeckung der Schnitte.

3.5 Positivkontrolle

Als Positivkontrolle dienten Schnitte von tumorfreiem, normalem Tonsillengewebe, die bei jedem Färbedurchgang mitgeführt wurden. Da IMP3 physiologisch in den B-Zellen des Keimzentrums exprimiert ¹ wird, wurde bei jedem Durchgang auf die regelrechte Färbung der B-Lymphozyten im Keimzentrum der Tonsillen geachtet.

3.6 Tissue Microarrays (TMA)

Die Tissue Microarrays (TMA) wurden aus archivierten Paraffinblöcken mittels eines manuellen Beecher Instruments hergestellt. Bei diesem Verfahren wird mittels einer Hohl-Nadel ein Stanzzylinder von Tumorgewebe aus einem in Paraffin eingebetteten Gewebsblock entnommen und in einen „leeren“ Empfänger-Paraffinblock eingebracht. Repräsentative Tumorareale wurden durch zwei erfahrene Pathologen ausgewählt und auf dem gefärbten Schnittpräparat markiert, dann wurden jeweils fünf Stanzzylinder von jedem Tumor in den Empfängerblock eingebracht. Die aus den TMA hergestellten Schnittpräparate wurden, wie bereits beschrieben, vorbehandelt und immunhistochemisch gefärbt.

3.7 Auswertung

Die Auswertung der IMP3 Immunhistochemie erfolgte anhand zweier Algorithmen die sich von den Algorithmen nach King et al. ¹ und Schaeffer et al. ⁴⁰ ableiten ließen. Angelehnt an das Scoring-System von King et al. ¹ wurde der prozentuelle Anteil der IMP3 positiven Tumorzellen in jedem einzelnen MCL-Fall erhoben. Als positiv galten die Fälle bei denen sich > 50 % der Tumorzellen mit dem IMP3 Antikörper anfärben ließen. Fälle, bei denen sich 10 bis 49 % der Tumorzellen anfärben ließen, galten als intermediär und Fälle mit < 10 % positiver Tumorzellen wurden als negativ eingestuft.

In einem zweiten Scoring-Ansatz in Anlehnung an Schaeffer et al. ⁴⁰ wurde der Grad der Färbeintensität von IMP3 wie folgt eingeteilt: Negativ, 1+ (schwach), 2+ (mittel) und 3+ (stark). Der Anteil der angefärbten Tumorzellen wurde eingeteilt in 1+ (<10 % positiver Zellen), 2+ (10-49 %), 3+ (50-80 %) und 4+ (>80 %). Die endgültige

Auswertung wurde durch die Multiplikation beider Variablen berechnet. Ergebnisse von 0-3 wurden als negativ eingestuft, 4-7 als „mittel“ und ≥ 8 als positiv. Alle MCL-Fälle, die keine Positivität für IMP3 zeigten, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Zu jedem Fall wurden immunhistochemische Färbungen von CD20, CD5, Ki67 und Cyclin D1 nach standardisierten Protokollen aus der Routinediagnostik angefertigt.

3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit SPSS Version 14 durchgeführt (SPSS, Chicago, IL, USA), unter Benutzung von χ^2 und ANOVA Tests. Die Überlebenszeiten wurden mit der Kaplan-Meier-Methode abgeschätzt und mittels logrank Tests verglichen. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

Die IMP3-Expression auf der Proteinebene wurde an insgesamt 172 primären MCL-Fällen durch immunhistochemische Färbungen untersucht. Alle relevanten klinischen und pathologischen Daten der ersten (Pilotserie) und zweiten Serie von MCL sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengefasst.

Tabelle 4: Klinische und pathologische Daten der ersten Serie (Pilotserie) von MCL (Analyse an vollständigen Schnittpräparaten; n=66) (nach Hartmann et al.⁴)

Geschlecht	
Männlich	44 (67 %)
Weiblich	21 (32 %)
Unbekannt	1 (1 %)
Morphologie	
Klassisch	55 (83 %)
Blastoid	11 (17 %)
Alter bei Diagnose (Jahre)	
Mittelwert (Bereich)	70 (44-93)
Median	71
Ki67 (IHC % nukleär pos. Zellen)	
Mittelwert (Bereich)	32 (8-80)
Median	30

Tabelle 5: Klinische und pathologische Daten der zweiten Serie (Analyse an vollständigen Schnittpräparaten n=45, an TMAs n=61; insgesamt n=106) (nach Hartmann et al.⁴)

Geschlecht	
Männlich	77 (72 %)
Weiblich	23 (22 %)
Unbekannt	6 (6 %)
Morphologie	
Klassisch	80 (75 %)
Blastoid	24 (23 %)
Unbekannt	2 (2 %)
Alter bei Diagnose (Jahre)	
Mittelwert (Bereich)	66 (29-85)
Median	67
Ki67 (IHC % nukleär pos. Zellen)	
Mittelwert (Bereich)	39 (5-92)
Median	37,5
Überlebenszeit (Monaten)	
Mittelwert (Bereich)	38,4 (0,2-149,8)
Median	25,8

Die Patienten erhielten keine einheitliche Therapie. Es gab CHOP oder CHOP-ähnlichen Therapieformen mit oder ohne Anti-CD20 Antikörpern wie z.B. Rituximab sowie andere intensiviertere Therapieformen.

4.1 IMP3-Expression auf der Proteinebene in primären MCL

In den Färbungen für IMP3 an primären MCL-Fällen fanden sich deutliche Unterschiede in der Expression dieses Markers. Als Positivkontrolle dienten Schnitte von tumorfreien Tonsillen, da im Zytoplasma von normalen B-Zellen des Keimzentrums das IMP3-Protein exprimiert wird.¹ Während manche MCL-Fälle eine sehr kräftige zytoplasmatische IMP3-Expression in einem hohen Prozentsatz der Tumorzellen zeigten, fanden sich andere Fälle ohne IMP3-Expression in den Tumorzellen, bei denen sich zum Teil jedoch noch eine IMP3-Expression in residuellen Keimzentren, im Sinne einer internen Positivkontrolle, darstellte. Die IMP3-Expression in den am stärksten gefärbten MCL überstieg z.T. die Expression in den residuellen Keimzentren und den Keimzentren der Tonsillen (Positivkontrolle).

Die Abbildung 4 zeigt repräsentative immunhistochemische Färbeergebnisse für IMP3 der ersten Serie mit niedrigen, mäßigen und hohen Expressionsniveaus.

Die Auswertung erfolgte anhand eines modifizierten Scoring-Systems, angelehnt an die Scoring-Systeme von King et al.¹ und Schaeffer et al.⁴⁰, wie oben in Kapitel 3.7 beschrieben.

Bei der Anwendung dieses modifizierten Scoring-Systems zeigte sich in der großen Mehrheit der MCL-Fälle eine deutliche Assoziation zwischen der Intensität der IMP3-Expression und der prozentualen Anzahl der positiv gefärbten Tumorzellen. Die MCL Fälle mit der höchsten IMP3-Expression zeigten auch in nahezu allen Tumorzellen eine starke Anfärbbarkeit für IMP3, so dass sich sehr ähnliche Ergebnisse für die beiden Scoring-Systeme ergaben.

In der ersten MCL-Fall-Serie (Pilotserie) zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der hohen IMP3-Expression (unter Benutzung beider Scoring-Systeme) und der erhöhten Proliferationsrate der Tumorzellen ($p < 0,0001$), welche über Ki67-Immunhistochemie ermittelt wurde. Abbildung 5 zeigt ein Beispiel für die immunhistochemischen Färbeergebnisse, Abbildung 6 visualisiert die statistischen Ergebnisse.

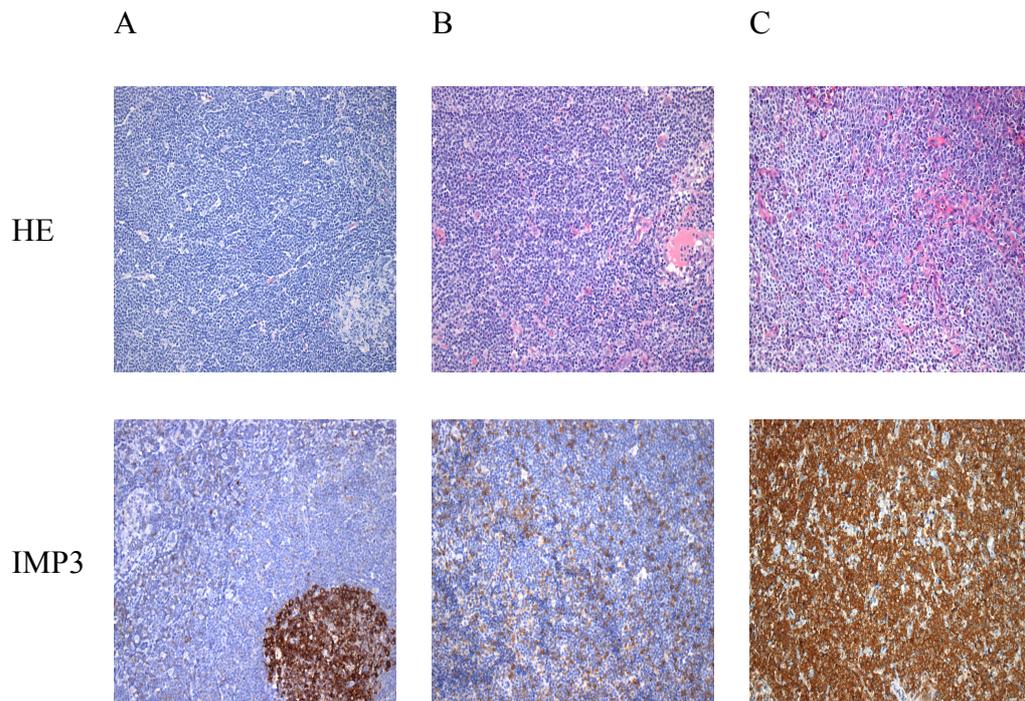


Abb. 4 HE-gefärbte Schnittpräparate und repräsentative immunhistochemische Färberegebnisse für IMP3 der ersten Serie (Pilotserie) mit (A) schwacher, (B) mittlerer und (C) hoher IMP3-Proteinexpression. Im unteren Bild der Spalte A zeigt sich ein residuelles Keimzentrum mit kräftiger IMP3-Expression (interne Positivkontrolle). (mit Erlaubnis aus Hartmann et al.⁴)

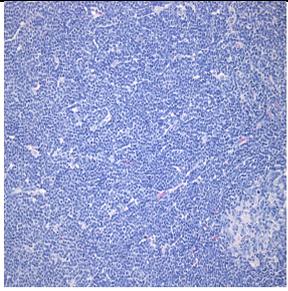
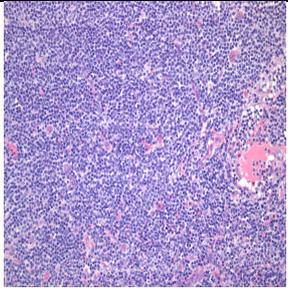
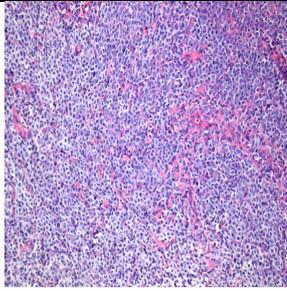
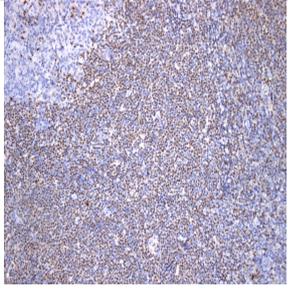
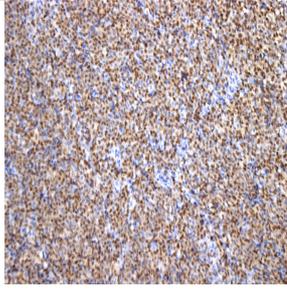
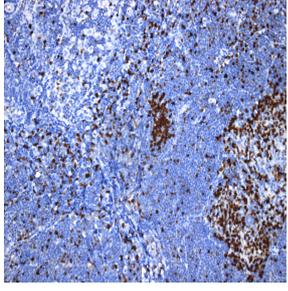
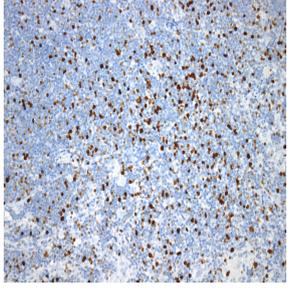
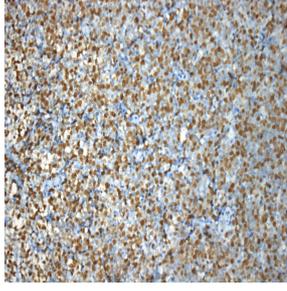
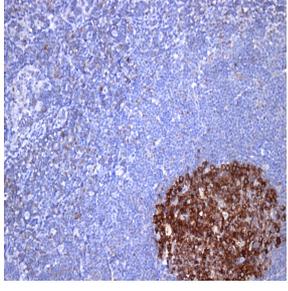
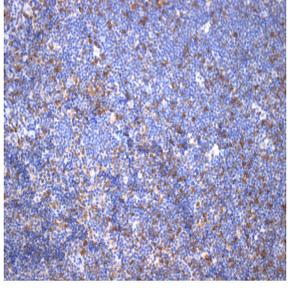
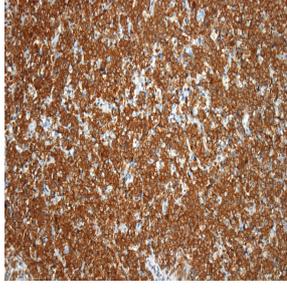
	A	B	C
HE			
Cyclin D1			
Ki67			
IMP3			

Abb. 5: IMP3-Expression der ersten MCL-Fallserie, die anhand immunhistochemischer Färbetechnik ermittelt wurde. Die Zeilen zeigen neben der HE-Färbung die immunhistochemischen Färberegebnisse für Cyclin D1, Ki67 und IMP3. Die Spalten zeigen die Fälle sortiert nach (A) schwacher, (B) mittlerer und (C) hoher IMP3-Protein-Expression. Deutlich zu erkennen ist hier eine Assoziation der IMP3-Expression mit der Anzahl der Ki67 positiven Tumorzellen. (mit Erlaubnis aus Hartmann et al.⁴)

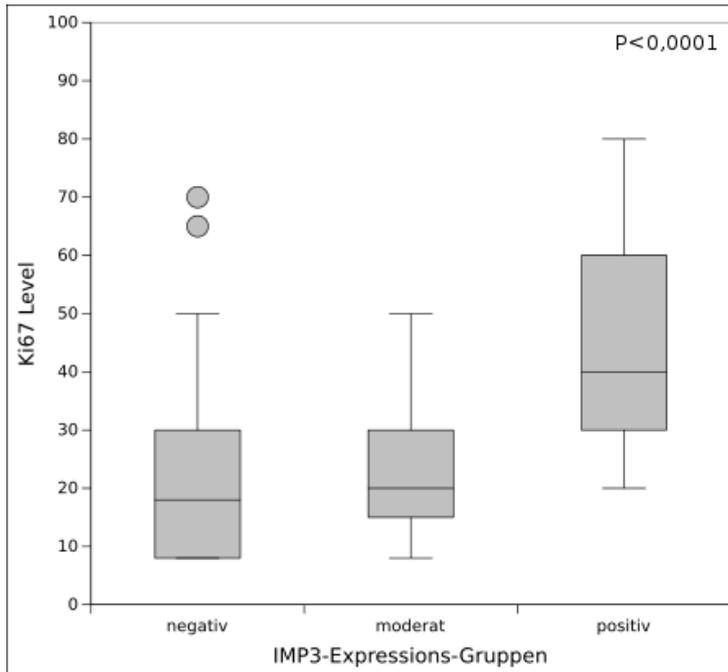


Abb. 6: Die Boxplots stellen das Ki67 Level entsprechend der IMP3-Expressions - Gruppen der Pilot-Serie dar. (nach Hartmann et al.⁴)

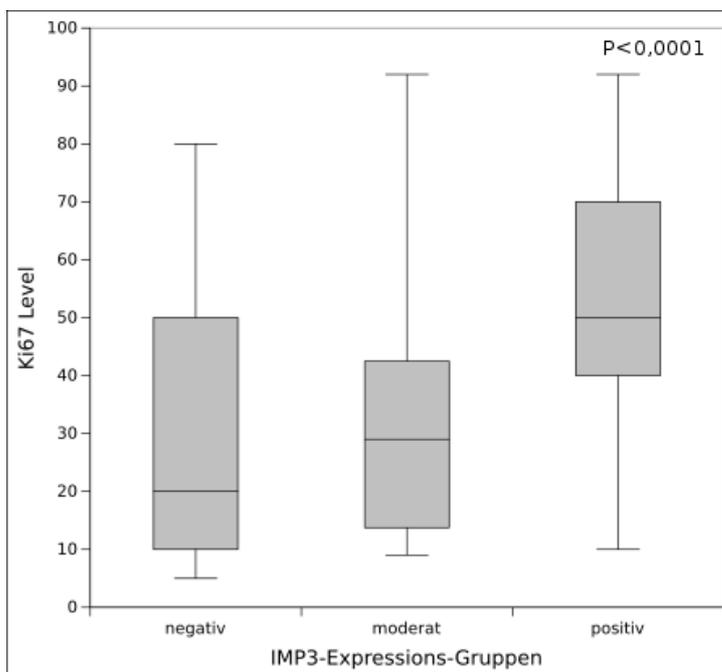


Abb. 7: Die Boxplots stellen das Ki67 Level entsprechend der IMP3-Expressions - Gruppen der Barcelona-Serie dar. (nach Hartmann et al.⁴)

In diversen Studien wurde beschrieben, dass eine erhöhte Proliferation des Tumors mit einer schlechteren Prognose der an MCL erkrankten Patienten, einhergeht.^{12,16,15} Aufgrund dieser Annahme wurde untersucht, ob es bei den 106 MCL-Fällen der zweiten Serie eine Korrelation zwischen der IMP3-Expression und der Tumormorphologie, dem Genstatus auf 7p und dem klinischen Überleben gibt.

Bei der Analyse der zweiten Serie zeigte sich, wie auch schon in der ersten Serie, ein heterogenes Expressions-Muster von IMP3 und eine hoch signifikante Assoziation der immunhistochemisch ermittelten IMP3-Protein-Expression mit der Proliferationsfraktion, gemessen mittels Ki67-Immunhistochmie ($p < 0,0001$, Abb. 7).

Darüber hinaus fand sich eine statistisch signifikante Korrelation einer hohen IMP3-Expression mit einer blastoiden Morphologie des MCL ($p = 0,003$). Bei 34 MCL der zweiten Serie lagen Informationen des genetischen Status von Chromosom 7 vor, die im Vorfeld in anderen Studien ermittelt wurden.^{30,27, 29} Auf Chromosom 7p ist das *IMP3-Gen* lokalisiert. MCL, die einen chromosomalen Zugewinn von 7p besaßen, wiesen tendenziell auch eine höhere IMP3-Expression auf, allerdings zeigten sich auch Fälle ohne chromosomalen Zugewinn mit hoher IMP3-Expression. Die Assoziation zwischen der IMP3-Expression und dem chromosomalen Zugewinn von 7p war statistisch nicht signifikant ($p = 0,192$; Abb. 8).

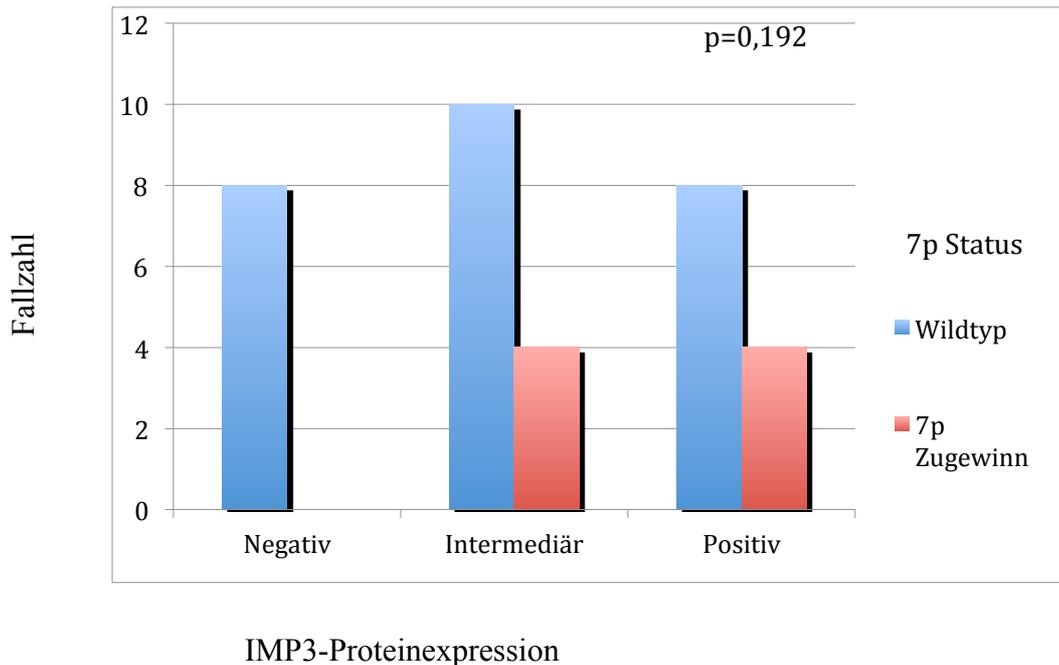


Abb.8: Assoziation der IMP3-Expression auf der Proteinebene mit dem Chromosomenstatus auf 7p. Protein-Expression von IMP3 in 34 primären Mantelzelllymphomen der zweiten Serie (mit vorliegender Information zum Chromosomenstatus auf 7p) in Zusammenschau mit Vorliegen eines chromosomalen Zugewinns von 7p oder dem Wildtyp (IMP3-Scoring-System nach King et al.¹). Eine teilweise Assoziation zwischen der IMP3-Protein-Expression und dem chromosomalen Zugewinn von 7p ist hier zu erkennen. (nach Hartmann et al.⁴)

Es konnte bereits in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass bei MCL eine erhöhte Proliferation mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. [6.](#) [7.14](#) Auch in der hier untersuchten Serie fand sich, dass eine erhöhte Ki67 Expression signifikant mit einer verkürzten Überlebenszeit der Patienten einherging ($p < 0,0001$, Abb. 9A). Daher war es überraschend, dass sich kein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,335$, Abb. 9B) zwischen der IMP3-Expression und der Überlebenszeit der Patienten zeigte.

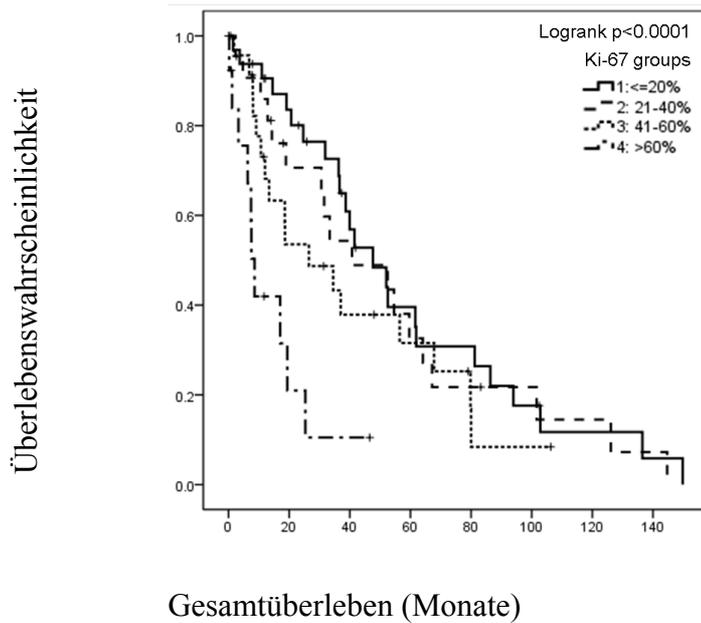


Abb.9A

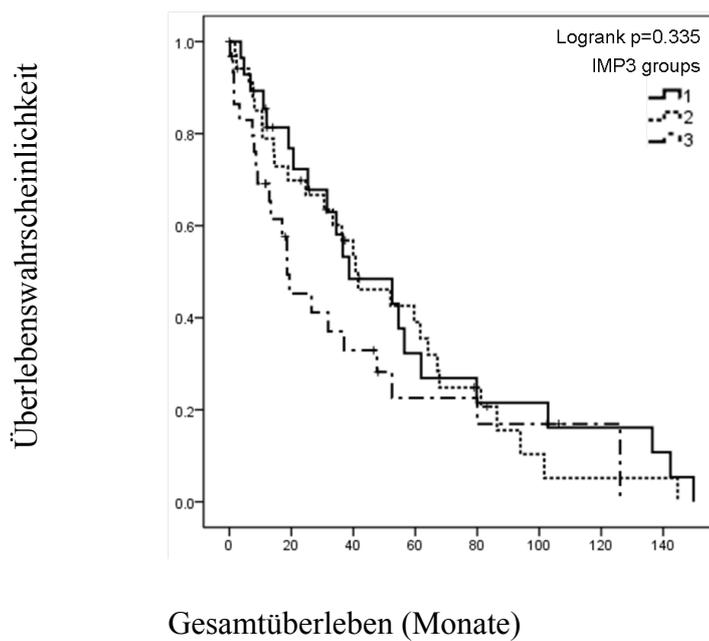


Abb. 9B

Abb. 9: Assoziation der IMP3-Protein-Expression mit dem Überleben. Anhand der Kaplan-Meier-plots wurde die Überlebenszeit entsprechend der Proliferation (A), die mittels Ki67 Immunhistochemie ermittelt wurde (Scoring nach Katzenberger et al. ³) und (B) der IMP3-Protein-Expression, die mittels Immunhistochemie (Scoring nach King et al. ¹) ermittelt wurde, erhoben. (mit Erlaubnis aus Hartmann et al. ⁴)

4.2 IMP3-Expression in MCL zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und zum Zeitpunkt eines Rezidivs

Die Expression von Proteinmarkern kann sich im Verlauf einer Erkrankung verändern. Daher wurden in dieser Arbeit sieben Fälle, bei denen Material vom Zeitpunkt der Primärdiagnose und des Rezidivs vorlagen, hinsichtlich der IMP3-Expression immunhistochemisch untersucht. Von den insgesamt sieben Fällen waren drei vom klassischen Typ und drei vom blastoiden Typ. Ein MCL-Fall wies bei der Primärdiagnose eine klassische und zum Zeitpunkt des Rückfalls eine blastoide Morphologie auf.

Jedes Paar wies zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt des Rezidivs einen ähnlichen Prozentsatz an IMP3 positiven Tumorzellen auf. Die IMP3-Expression war somit im Verlauf stabil und lag zwischen 10-80 % der Tumorzellen. Interessanterweise war die IMP3-Expression bei dem letzten Paar ebenfalls nahezu gleich, obwohl sich die Morphologie änderte.

4.3 IMP3-Protein-Expression in SLL

Aufgrund von einiger morphologischer und biologischer Gemeinsamkeiten der SLL und des MCL, wurde auch die IMP3-Protein-Expression bei 20 SLL-Fällen untersucht. Hierbei fand sich, verglichen mit den MCL-Fällen, welche ein breites und heterogenes Färbeverhalten besaßen, eine deutlich geringere IMP3-Expression in allen untersuchten SLL-Fällen (Abb. 10). Nur ein SLL-Fall war als positiv einzustufen und zeigte in über 50 % der Tumorzellen eine IMP3-Expression. Fünf Fälle zeigten eine mittlere (10-50 %) Expression von IMP3 und 14 Fälle waren negativ (<10 %).

Interessanterweise zeigten SLL-Fälle mit prominenten Proliferationszentren oft eine Ansammlung von IMP3 positiven Zellen, die morphologisch den Paraimmunoblasten entsprachen.

In dieser Serie aus 20 SLL-Fällen konnte kein Zusammenhang zwischen dem Level der IMP3-Expression und der Tumorpheriferation, die mittels (Ki67) ermittelt wurde, festgestellt werden.

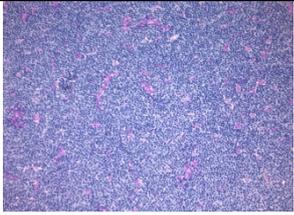
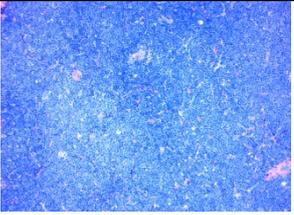
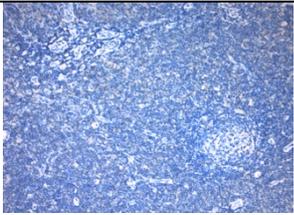
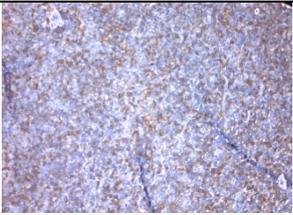
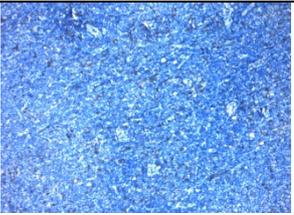
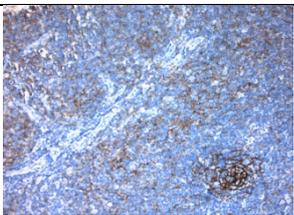
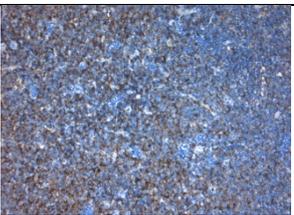
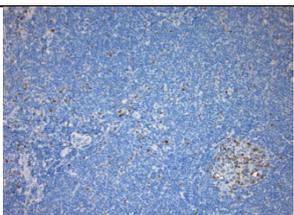
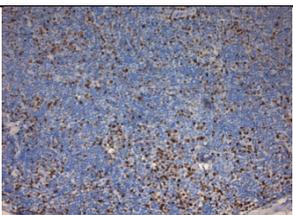
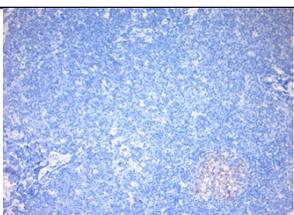
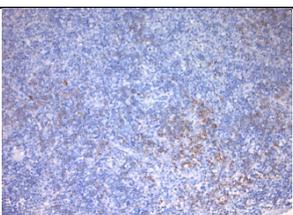
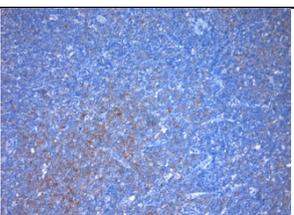
	A	B	C
HE			
CD5			
CD23			
Ki67			
IMP3			

Abb. 10: IMP3-Expression der SLL-Fallserie, die anhand immunhistochemischer Färbetechnik ermittelt wurde. Die Zeilen zeigen neben der HE-Färbung, die immunhistochemischen Färberegebnisse für CD5, CD23, Ki67 und IMP3. Die Spalten zeigen die Fälle sortiert nach (A) schwacher, (B) mittlerer und (C) hoher IMP3-Protein-Expression.

Tabelle 6: Immunhistochemische Expression von IMP3 in MCL und SLL Fällen. IMP3-scoring nach King et al. ¹ (nach Hartmann et al. ⁴)

	Total No.	Total positiv (> 50 % Tumorzellen)	IMP3 Färbeintensität (> 50 % positive Tumorzellen)			Mäßig (10-50 % Tumorzellen)	Negativ (< 10 % Tumorzellen)
			schwach	mäßig	stark		
Erste Serie	66	28 (42 %)	0	8	20	17 (26 %)	21 (32 %)
Zweite Serie	106	38 (36 %)	0	2	36	36 (34 %)	32 (30 %)
SLL-Serie	20	1 (5 %)	0	0	1	5 (25 %)	14 (70 %)

5. Diskussion

Derzeit existiert noch keine kurative Therapie des Mantelzelllymphoms (MCL). Trotz initial gutem Ansprechen auf eine Chemotherapie kommt es meistens nach relativ kurzer Zeit zu einer Progression.⁵⁵ Die Prognose der an MCL erkrankten Patienten ist daher im Allgemeinen sehr ungünstig. Die durchschnittliche Überlebenszeit liegt bei ca. 3-4 Jahren.⁶ Der klinische Verlauf ist allerdings sehr variabel und reicht von wenigen Monaten bis zu mehreren Jahren.^{6, 7}

Neben der MCL-typischen Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ finden sich gehäuft Alterationen, welche die Genomstabilität betreffen, wie z.B. eine Mutation oder Deletion des Tumorsuppressorgen *ATM*.^{2, 56, 57} Ferner kann im Rahmen eines deregulierten *MYC*-Gens, über den zellulären Transformationsweg von Ras/Raf, die Expression von Cyclin D1-mRNA induziert werden.⁵⁸

Es konnten in verschiedenen Studien zahlreiche sekundäre genetische Alterationen gefunden werden, die möglicherweise in Zusammenhang mit der Entstehung und der Progression des MCL stehen. Unter den am häufigsten zugewonnenen Regionen im MCL-Genom wurde der kurze Arm des Chromosom 7 (7p) identifiziert und unter den hier lokalisierten Genen zeigte insbesondere das *IGF2BP3*-Gen in den Fällen mit einem Zugewinn von 7p eine deutliche Hochregulation.

IGF2BP3 (auch bekannt als *IMP3*) gehört zur Familie der *IGF2*-mRNA-Bindeproteine, welche die RNA-Stabilität und das Zellwachstum und -überleben mit beeinflussen.³¹⁻³⁴

Es konnte in mehreren Arbeiten anhand von soliden Tumoren gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression von *IMP3* mit einer schlechteren Differenzierung, einer Tumorprogression und/oder Metastasierung vergesellschaftet ist.³⁵⁻⁴²

5.1 *IMP3*-Protein-Expression in MCL

Wie zuvor beschrieben fand sich in einer SNP- und genexpressionsbasierten Analyse unter den am häufigsten zugewonnenen Regionen im Genom primärer MCL der kurze Arm des Chromosom 7 (7p), und unter den hier lokalisierten Genen das *IGF2BP3/IMP3*-Gen, als eines der am stärksten hochregulierten Gene in den Fällen mit einem Zugewinn von 7p.²⁹ Darüber hinaus konnte auch in MCL-Zelllinien eine erhöhte

IMP3-Expression auf mRNA-Ebene in den Linien mit einem Zugewinn von 7p nachgewiesen werden.³

In der hier vorliegenden Arbeit konnte nun in einer immunhistochemischen Analyse an einer großen Serie von primären MCL-Fällen gezeigt werden, dass IMP3/IGF2BP3 in primären MCL auch auf der Proteinebene deutlich variabel exprimiert wird.

Erst kürzlich wurde das IMP3-Protein als Marker für die B-Zellen im physiologischen Keimzentrum beschrieben,¹ was sich in unseren Untersuchungen bestätigte. Die Keimzentren der tumorinfiltrierten Lymphknoten sowie der Tonsillen (welche als Positivkontrolle dienten) waren stark positiv für IMP3. Dies war auch der Fall wenn die IMP3-Expression in den Tumorzellen negativ war. Interessanterweise zeigten einige der primären MCLs in den Tumorzellen eine stärkere IMP3-Expression als in den miterfassten reaktiven Keimzentren. Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit in dem großen Kollektiv aus 172 primären MCL eine kräftige IMP3-Expression in der Mehrzahl von Tumorzellen in etwa 38 % der Fällen detektiert werden (Abb. 5, 6 und 7). In einer früheren Arbeit postulierten King et al.¹ anhand einer Kohorte von unterschiedlichen B- und T-Zell- Lymphomen eine IMP3-Expression in Keimzentrums-abgeleiteten Lymphomen. Diese Serie beinhaltete auch eine kleine Gruppe von 10 MCL, die jedoch im Unterschied zu den hier untersuchten Daten zumeist keine oder nur eine sehr geringe IMP3-Expression zeigten. Da in der vorliegenden Arbeit der gleiche Antikörper wie in der Publikation von King et al. verwendet wurde, scheidet dieser als mögliche Ursache der Diskrepanz aus. Wahrscheinlicher liegt eine rein zufällige Unterrepräsentanz der IMP3-positiven MCLs in dem kleinen Kollektiv, das in der Arbeit von King et al. untersucht wurde, vor. Obwohl MCL nicht zu den aus dem Keimzentrum hervorgehenden Lymphomen gehören, zeigten mehr als ein Drittel der hier untersuchten Fälle eine starke IMP3-Expression in der Mehrzahl der Tumorzellen, was den in der früheren Publikation postulierten Zusammenhang zwischen IMP3-Expression und einer Keimzentrumsdifferenzierung zumindest fraglich erscheinen lässt.

Zusätzlich fand sich als wesentlicher Befund neben einer deutlich variablen IMP3-Protein-Expression im hier untersuchten Kollektiv von primären MCL eine signifikante Korrelation einer starken IMP3-Protein-Expression mit einer erhöhten Tumorzellproliferation, gemessen mit der Ki67-Immunhistochemie ($p < 0,0001$).

Diese Daten könnten darauf hindeuten, dass die IMP3-Expression in B-Zell Lymphomen weniger an ihre Ursprungszelle, sondern vielmehr generell an die Proliferationskapazität der Tumorzellen gebunden ist. Diese Hypothese wird darüber hinaus durch den Befund unterstützt, dass folliculäre Lymphome und Burkitt-Lymphome als typische Vertreter der Lymphome mit Keimzentrumsursprung eine unterschiedliche IMP3-Expression zeigten. Burkitt Lymphome, in denen annähernd alle neoplastischen Zellen proliferieren, zeigten eine stärkere Markierung, als die folliculären Lymphome, die eine wesentlich geringere Tumorproliferation besitzen.¹

Die Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen der IMP3-Expression und der Proliferation besteht, wird auch durch die Ergebnisse der analysierten 20 SLL/CLL Fälle unterstützt, in denen IMP3 verglichen mit den MCL wesentlich geringer exprimiert war (Abb. 10). Die IMP3-Expression in den untersuchten SLL/CLL Fällen war am stärksten in den sog. Pseudofollikeln/Proliferationszentren, und hier insbesondere in den Paraimmunoblasten.⁵⁹

Um einen möglichen Zusammenhang der IMP3-Protein-Expression mit einem chromosomalen Zugewinn von 7p zu prüfen, wurde eine zweite Serie von 34 MCL mit bekanntem 7p-Status untersucht. In dieser Serie fand sich allerdings kein signifikanter Zusammenhang zwischen der IMP3-Protein-Expression und einer Alteration des kurzen Arms von Chromosom 7 ($p = 0,192$), jedoch eine tendenziell erhöhte IMP3-Expression in MCL mit Zugewinn von 7p. Bei allen MCL-Fällen mit einer niedrigen oder fehlenden IMP3-Protein-Expression fehlte darüber hinaus ein chromosomaler Zugewinn von 7p (Abb. 8). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die IMP3-Expression in MCL nicht ausschließlich von einem Zugewinn von 7p abhängt, sondern dass offensichtlich zusätzliche Mechanismen eine Rolle spielen.

5.2 IMP3-Protein-Expression als mögliche therapeutische Option

In der Literatur gibt es Hinweise, dass der IGF-Signalweg eine wichtige Rolle im biologischen Verhalten von malignen Tumoren spielt.^{34, 60} Eine besondere Rolle scheint dabei das IMP3-Protein zu spielen. Es konnte in einer Reihe von Arbeiten gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression des IMP3-Proteins in soliden Tumoren mit einem höheren histologischen Grad³⁸, einer Tumorprogression oder Metastasierung^{36, 37} sowie einer schlechteren Prognose³⁹⁻⁴² verbunden war, welche mit einer erhöhten

Tumoraggressivität, einer erhöhten Metastasenneigung und mit einem schlechteren prognostischen Verlauf bei soliden Tumoren einhergeht.³⁶⁻⁴²

Seit dem es monoklonale Antikörper und „small molecules targets“ gegen den IGF-1-Rezeptor auf dem Markt gibt, hat sich in unterschiedlichen kleinen Phase I- und Phase II-Studien gezeigt, dass ihre therapeutische Wirkung bei einigen Patienten mit soliden Tumoren sehr vielversprechend war.⁶⁰ Eine Übersichtsarbeit von R. Maki beschrieb die erfolgversprechende Ergebnisse bei der Therapie von juvenilen und adulten Sarkomen mittels IGF-1-Rezeptor-Inhibitoren.⁶⁰ Es gibt einige Hinweise darauf, dass man gute Ergebnisse insbesondere bei der Therapie von alveolären Rhabdomyosarkomen und Ewing-Sarkomen mittels IGF-1-Rezeptor-Inhibitoren erreichen könnte.⁶¹⁻⁶⁶ Ähnliches ist nach Ergebnissen aus Studien an Karzinomzelllinien auch für andere Tumorentitäten zu erwarten, wie zum Beispiel dem Nicht-Kleinzelligen-Lungen-Karzinom (NSCLC).^{60, 64, 67, 68}

Bei einer Reihe von Lymphomen gibt es mittlerweile Hinweise, dass im Zellkulturmodell eine Modulation des IGF-Signalweges durch IGF-1-Rezeptor-Hemmer, wie Picropodophyllin und NVP-AEW541, einen Einfluss auf Proliferation und Überleben der Tumorzellen hat, beispielsweise beim diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom⁶⁹, beim T-Lymphoblastischen Lymphom⁷⁰ oder beim klassischen Hodgkin-Lymphom⁷¹ sowie beim MCL⁷².

In dieser Arbeit konnten auch für primäre MCL gezeigt werden, dass eine starke IMP3-Protein-Expression in einem hohen Prozentsatz der Tumorzellen signifikant mit einer erhöhten Proliferationsrate in der Ki67-Immunhistochemie assoziiert war, wobei diese in zahlreichen Studien als ein wesentlicher Faktor für die klinische Aggressivität und die Prognose des MCLs bestätigt wurde. Darüber hinaus fand sich in dem hier vorliegendem Untersuchungsmaterial auch eine statistisch signifikante Korrelation einer hohen IMP3-Expression mit einer blastoiden Morphologie des MCL ($p=0,003$), wobei auch diese im allgemeinen mit einer schlechteren Prognose einher geht. Allerdings konnte in dem vorliegenden MCL-Kollektiv kein eindeutiger statistischer Zusammenhang zwischen der IMP3-Protein-Expression und der Überlebenszeit nachgewiesen werden ($p=0,335$; Abb. 9A und 9B), wobei diesbezüglich kritisch berücksichtigt werden muss, dass die Patienten allerdings auch mit unterschiedlichsten

Therapieregimen behandelt wurden. Grundsätzlich scheint die Tumorproliferation in MCL, entweder immunhistochemisch gemessen über Ki67 oder über die Expression bestimmter Gensignaturen, offenbar als Integrator verschiedenster, ungünstiger molekularer Alterationen zu fungieren, von denen IMP3 vermutlich nur ein kleiner Baustein ist. Dennoch könnte eine medikamentöse Beeinflussung des IGF-Signalweges, in den IMP3 involviert ist, vermutlich eine therapeutische Interventionsmöglichkeit darstellen.

Die Überlegung einer möglicherweise auch therapeutisch nutzbaren Beeinflussung des IGF-Signalweges in MCL wird gestützt durch Daten von Vishwamitra et al.⁷² und Hartmann et al.⁴ die zeigen, dass in MCL-Zell-Linien die IGF-1 und -2-Rezeptoren auf dem mRNA-Level exprimiert werden.⁴ Vishwamitra et al. konnten in einer Arbeit zusätzlich zeigen, dass eine Inhibition des IGF-1 Rezeptors durch Picropodophyllin oder si-RNA (hemmende RNA-Moleküle) zu einer verminderten Proliferation und einem geringeren Überleben der MCL-Zelllinien und in primären MCL Zellen zur Induktion der Apoptose sowie zum Zellzyklusarrest führt.⁷² Darüber hinaus fand sich, dass es bei einer Herabregulation der IMP3-Expression mittels si-RNA (hemmende RNA-Moleküle) in menschlichen K562 Leukämiezellen zu einer gehemmten Translation der IGF-2 leader -3 mRNA kommt, ohne dass dabei das mRNA-Level verändert war. Mittels ELISA zeigte sich eine Reduktion der intrazellulären und sekretierten IGF-2-Proteine.⁷³ Dies spricht dafür dass IMP3 normalerweise die Translation der IGF-2 leader -3 mRNA fördert und zu einer erhöhten Expression des IGF-2-Proteins führt. Zusätzlich zeigte sich eine deutlich verminderte Zellproliferation der IMP3 herabregulierten Zellen. Eine Zuführung von rekombinierten IGF-2-Proteinen führte zu einer erneuten Zellproliferation.⁷³ Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass IMP3 normalerweise dazu dient, IGF-2 auf einem angemessenen Niveau zu halten und dadurch die Zellproliferation zu unterstützen. Diese Hypothese wurde kürzlich in einer anderen Studie weiter unterstützt, in der sich in Glioblastomen mit einer IMP3-Überexpression ein erhöhtes IGF-2-Protein-Level fand ohne wesentliche Veränderungen im IGF-2-Transkriptions-Level. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulation von IMP3 durch si-RNA zu einer Reduktion der Aktivität von PI3K und MAPK der IGF-Signalkaskade führt und somit zu einer verminderten Proliferation der Tumorzellen.⁷⁴

In der Zusammenschau könnte daher eine Manipulation des IGF-Signalweges, und speziell eine Inhibition von IMP3, eine therapeutische Möglichkeit für das MCL darstellen, wobei hierfür sicherlich noch ausgedehnte weitere Analysen nötig sind. In diesem Kontext ist auch der Befund interessant, dass in den hier untersuchten Fällen die IMP3-Expression zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und am Zeitpunkt eines Rückfalls relativ konstant war, obschon hier kritisch die nur kleine Fallzahl zu berücksichtigen ist. Ein Medikament, das den IGF-1-Signalweg beeinflusst, in dem es z.B. den IGF-1-Rezeptor blockiert, könnte evtl. ein weiterer therapeutischer Ansatz in der Therapie von MCL sein.⁷²

6. Zusammenfassung

Das Mantelzelllymphom (MCL) gehört zu den aggressiven, mit bislang zur Verfügung stehenden Therapien nicht heilbaren, Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). Das MCL weist eine schlechte Prognose auf. Charakteristisch für das MCL ist die t(11,14)-Translokation, die das *Cyclin D1*- Gen betrifft. Darüber hinaus finden sich zahlreiche weitere genetische Alterationen mit Häufung bestimmter Zugewinne und Verluste von genetischem Material. Einer der am häufigsten chromosomal zugewonnene Abschnitte in MCL ist der kurze Arm von Chromosom 7 (7p). In Fällen mit dieser genetischen Veränderung fand sich das *IMP3/IGF2BP3*-Gen (Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3) unter den am stärksten differentiell exprimierten Genen.

In dieser Arbeit konnte in einer immunhistochemischen Analyse eine stark variable IMP3-Protein-Expression in einer Serie von insgesamt 172 primären MCL gezeigt werden. Darüber hinaus fand sich in diesem Kollektiv eine signifikante Korrelation der IMP3-Expression mit der Proliferationsfraktion (Ki67-Immunhistochemie) sowie auch eine Assoziation mit einer blastoiden Morphologie. Es konnte jedoch letztlich keine statistisch signifikante Assoziation der IMP-3-Protein-Expression mit einem chromosomalen Zugewinn von 7p, dem Genort von IMP3, nachgewiesen werden, so dass hier offenbar auch noch andere Mechanismen für die Regulation eine wichtige Rolle spielen. In einer darüber hinaus untersuchten Vergleichsgruppe von 20 Fällen von Lymphknoten mit Infiltraten durch ein small lymphocytic Lymphoma (SLL) zeigte sich insgesamt nur eine geringe IMP3-Expression.

Der Befund einer vermehrten IMP3-Protein-Expression in einer Teilgruppe von MCL mit erhöhter Tumorzellproliferation unterstützt die Idee, dass eine Aktivierung des IGF-Signalweges in MCL möglicherweise die Proliferation und biologische Aggressivität begünstigt. Daher könnte eine therapeutische Manipulation dieses Signalweges vermutlich eine zukünftige therapeutische Option für das MCL darstellen.

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ann-Arbor-Klassifikation ⁵	2
Tabelle 2: Stadieneinteilung der CLL nach Binet (1981) ⁵	9
Tabelle 3: Die RAI-Klassifikation unterscheidet die Stadien 0 bis IV ⁵	10
Tabelle 4: Relevante klinische und pathologische Daten der Pilotserie von MCL (Ganze Schnitte; n=66) (nach Hartmann et al. ⁴).....	22
Tabelle 5: Relevante klinische und pathologische Daten der zweiten Serie (45 Ganze Schnitte und 61 TMA; n=106) (nach Hartmann et al. ⁴).....	23
Tabelle 6: Immunhistochemische Expression von IMP3 in MCL und SLL Fällen (IMP3-scoring nach King et al. ¹) (nach Hartmann et al. ⁴).....	33

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1A Klassisches MCL bei 1000-facher Vergrößerung.....	4
Abb. 1B Blastoide Variante des MCL bei 1000-facher Vergrößerung.....	4
Abb. 2 Translokation t(11;14) in MCL (nach ²).....	6
Abb. 3 Klassisches Bild einer SLL bei 400-facher Vergrößerung.....	10
Abb. 4 Repräsentative immunhistochemische Färbe-Ergebnisse für IMP3 der ersten Serie mit niedrigen, mäßigen und hohen Expressionsniveaus (mit Erlaubnis aus Hartmann et al. ⁴).....	25
Abb. 5: IMP3-Expression der ersten MCL-Fallserie, die anhand immunhistochemischer Färbetechnik ermittelt wurde (mit Erlaubnis aus Hartmann et al. ⁴).....	26
Abb. 6: Die Boxplots stellen das Ki67 Level, entsprechend der IMP3 Expressions-Gruppen der Pilot-Serie dar (nach Hartmann et al. ⁴).....	27
Abb. 7: Die Boxplots stellen das Ki67 Level, entsprechend der IMP3 Expressions-Gruppen der Barcelona-Serie dar (nach Hartmann et al. ⁴).....	27
Abb.8: Assoziation der IMP3-Expression auf der Proteinebene mit dem Chromosomenstatus auf 7p (nach Hartmann et al. ⁴).....	29
Abb. 9: Assoziation der IMP3-Protein-Expression mit dem Überleben (mit Erlaubnis aus Hartmann et al. ⁴).....	30
Abb. 10: IMP3-Expression der SLL-Fallserie anhand immunhistochemischer Färbetechnik ermittelt.....	32

9. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATM-Gen	Ataxia telangiectasia mutated –Gen
BCL-1	B Cell Lymphoma / Leukemia 1 Gen
°C	Grad Celsius
CCND1	Cyclin D1 Gen
CD	Cluster of Differentiation
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase
CdkI	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor
CHOP	Chemotherapie-protokoll bestehen aus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon
CLL	chronische lymphatische Leukämie
COP	Cyclophosphamid, Vincristin und Prednisolon
DAB	3,3 Diaminobenzidin
DHAP	Dexamethason, hoch-Dosis Cytarabin, Cisplatin, Prednisolon
E	Extranodal
Ki67	Ki-Kiel 67
IGF2BP3	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3, Synonym IMP3
IgH	Immunglobulin Schwereketten Gen
IGHV	IGH variable region
IMP3	IGF-2 mRNA binding protein, Synonym IGF2BP3
iwCLL	International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia
L	Liter
MCL	Mantelzelllymphom
min	Minuten
MYC	Protoonkogen
N	Nodal
p	kurzer Chromosomenarm

p53	Genprodukt des Tumorsuppressorgens p53
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PRAD 1	Parathreoid Adenomaosis 1 Gen
q	langer Chromosomenarm
R	Rituximab
SLL	Small lymphocytic lymphoma
t	Translokation
Tab.	Tabelle
TP53	Tumorsuppressorgen p53
VH CDR3	heavy complementarity-determining region 3
μ	mikro (10^{-6})

10. Literaturverzeichnis

1. King RL, Pasha T, Roullet MR, et al: IMP-3 is differentially expressed in normal and neoplastic lymphoid tissue. *Human Pathology* 2009, 40(12):1699-1705
 2. Schaffner C, Idler I, Stilgenbauer S, et al: Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:2773-2778
 3. Katzenberger T, Petzoldt C, Höller S et al: The Ki67 proliferation index is a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma. *Blood* 2006, 107(8):3407
 4. Hartmann EM, Beà S, Navarro A, Trapp V, Campo E, Ott G, Rosenwald A: Increased tumor cell proliferation in mantle cell lymphoma is associated with elevated insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 expression. *Modern Pathology* 2012, 25(9):1227-1235
 5. Gerd Herold et al: *Innere Medizin*. Edited by Köln, Dr. med. Gerd Herold, 2011, p.pp. 72-73
 6. Bosch F, López-Guillermo A, Campo E, et al: Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer* 1998, 82:567-575
 7. Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, et al: Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood* 1997, 89:2067-2078
 8. Duggan MJ, Weisenburger DD, Ye YL: Mantle zone lymphoma. A clinicopathologic study of 22 cases. *Cancer* 1990, 66(3):522-529
 9. Bruce D, Cheson, et al: *Non-Hodgkin's lymphomas: New Insights and Therapeutic Strategies*. Edited by Holand K. Philadelphia, Elsevier, Saunders, 2008, p.pp. 814-823, 953-963
 10. Schmitz N et al: *B-Zell-Lymphome-Biologische Grundlagen und aktuelle Therapiestrategien*. Edited by Bremen. UNI-MED, 2011
 11. Weiss RF, Miller MG, Cronin JF, et al: Parametric Model of Combination Therapy for Non-Hodgkin Lymphoma. *PLOS one* 2012, 7(12)
 12. Link PDH: <http://www.onkodin.de/e2/e68956/e70194/e70209/>. Edited by 2002-2014
 13. Jares P, Colomer D, Campo E: Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nature Review Cancer* 2007, 7(10):750-762
 14. Rätty R, Franssila K, Joensuu H, et al: Ki-67 expression level, histological subtype, and the International Prognostic Index as outcome predictors in mantle cell lymphoma. *European Journal of Haematology* 2002, 69:11-20
 15. Determann O, Hoster E, Ott G, et al: 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* 2008, 111:2385-2387
 16. Rosenwald A, Wright G, Wiestner A et al: The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 2003, 3(2):185-197
 17. Fernández V, Hartmann E, Ott G, et al: Pathogenesis of Mantle-Cell Lymphoma: All Oncogenic Roads Lead to Dysregulation of Cell Cycle and DNA Damage Response Pathways. *Journal of Clinical Oncology* 2005, 23:6364-6369
-

-
18. López-Guillermo A, Salles G, et al: International Hematology Updates: Lymphoma in the XXI Century: Mantle cell lymphoma. Edited by Montserrat E. Barcelona, Permanyer Publications, 2010, p.pp. 101-115
 19. Jares P, Colomer D, Campo E: Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation* 2012, 122:3416-3423
 20. Löffler G, Petrides P: *Biochemie und Pathobiochemie* Edited by Berlin, Springer-Verlag, 2003
 21. Nagy B, Lundán T, Larramendy ML, et al: Abnormal expression of apoptosis-related genes in haematological malignancies: overexpression of MYC is poor prognostic sign in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2003, 120:434-441
 22. Zhu Y, Hollmén J, Rätý R, et al: Investigatory and analytical approaches to differential gene expression profiling in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2002, 119:905-915
 23. Camacho E, Hernández L, Hernández S, et al: ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood* 2002, 99:238-244
 24. Fang NY, Greiner TC, Weisenburger DD, et al: Oligonucleotide microarrays demonstrate the highest frequency of ATM mutations in the mantle cell subtype of lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:5372-5377
 25. Vater I, Wagner F, Kreuz M, et al: GeneChip analyses point to novel pathogenetic mechanisms in mantle cell lymphoma. *bjh british journal of haematology* 2009, 144(3):317-331
 26. Kawamata N, Ogawa S, Gueller S, et al: Identified hidden genomic changes in mantle cell lymphoma using high-resolution single nucleotide polymorphism genomic array. *Exp Hematol* 2009, 37(8):937-946
 27. Beà S, Salaverria I, Armengol L, et al: Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole genome profiling. *Blood* 2009, 113(13):3059-3096
 28. Nielaender I, Martín-Subero JI, Wagner F, et al: Partial uniparental disomy: a recurrent genetic mechanism alternative to chromosomal deletion in malignant lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2006, 904-905
 29. Hartmann EM, Campo E, Wright G, et al: Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling. *Blood* 2010, 116:953-961
 30. Beà S, Ribas M, Hernández JM, et al: Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 1999, 93(12):4365-4374
 31. Yisraeli JK: VICKZ proteins: a multi-talented family of regulatory RNA-binding proteins. *Biol Cell* 2005, 97(1):87-96
 32. Nielsen J, Christiansen J, Lykke-Andersen J, et al: A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol Cell Biol* 1999, 19(2):1262-1270
 33. Yaniv K, Yisraeli JK: The involvement of a conserved family of RNA binding proteins in embryonic development and carcinogenesis. *Gene* 2002, 287(1-2):49-54
 34. Pollak M: Insulin and Insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nature Reviews Cancer* 2008, 8(12):915-928
-

-
35. Müller-Pillasch F, Lacher U, Wallrapp C, et al: Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain containing protein. *Oncogene* 1997, 14 (22):2729-2733
 36. Hoffmann NE, Sheinin Y, Lohse CM, et al: External validation of IMP3 expression as an independent prognostic marker of metastatic progression and death for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 2008, 112(7):1471-1479
 37. Li D, Yan D, Tang H, et al: IMP3 is an novel prognostic marker that correlates with colon cancer progression and pathogenesis. *Annals of Surgical Oncology* 2009, 16 (12):3499-3506
 38. Findeis-Hosey JJ, Yang Q, Spaulding BO, et al: IMP3 expression is correlated with histologic grad of lung adenocarcinoma. *Human Pathology* 2010, 41 (4):477-484
 39. Köbel M, Xu H, Bourne PA, et al: IGF2BP3 (IMP3) expression is a marker of unfavorable prognosis in ovarian carcinoma of clear cell subtype. *Modern Pathology* 2009, 22(3):469-475
 40. Schaeffer DF, Owen DR, Lim HJ, et al: Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 (IGF2BBP3) overexpression in pancreatic ductal adenocarcinoma correlates with poor survival. *BMC Cancer* 2010, 10:59:1-8
 41. Jeng YM, Chang CC, Hu FC, et al: RNA-binding protein insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 expression promotes tumor invasion and predicts early recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008, 48 (4):1118-1127
 42. Chen ST, Jeng YM, Chang CC, et al: Insulin-Like Growth Factor 2 mRNA-Binding Protein 3 expression predicts unfavorable prognosis in patients with neuroblastoma. *Cancer Science* 2011, 12:2191-2198
 43. Steven H, Swerdlow, et al: WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Edited by Cancer In AfRo. Lyon, 2008, p.pp. 180-182
 44. Lindström MS, Wiman KG: Role of genetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol* 2002, 12(5):381-387
 45. García JL, Hernandez JM, Gutiérrez NC, et al: Abnormalities on 1q and 7q are associated with poor outcome in sporadic Burkitt's lymphoma. A cytogenetic and comparative genomic hybridization study. *Leukemia* 2003, 17(10):2016-2024
 46. Dorfman DM, Pinkus GS: Distinction between small lymphocytic and mantle cell lymphoma by immunoreactivity for CD23. *Modern Pathology* 1994, 7(3):326-331
 47. Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N, et al: Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood* 2011, 118(11):3088-3095
 48. Kienle D, Kröber A, Katzenberger T, et al: VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. *Blood* 2003, 102(8):3003-3009
 49. Walsh SH, Thorsélius M, Johnson A et al: Mutated VH genes and preferential VH3-21 use define new subsets of mantle cell lymphoma. *Blood* 2003, 101(10):4047-4054
 50. Battifora H: The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* 1986, 55(2):244-248
 51. Werner M, Chott A, Fabiano A, et al: Effect of Formalin Tissue Fixation and Processing on Immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2000, 24(7):1016-1019
 52. Hayat M.A.: Handbook of Immunohistochemistry and in situ Hybridization of human Carcinomas. Edited by Hayat MA. Oxford, Elsevier Academic Press, 2005, p.pp.
-

-
53. Roessner A, Pfeifer U, Müller-Hermelink HK: Allgemeine Pathologie. Edited by München, Elsevier GmbH, 2004, p.pp. 8-9
54. http://www.dcs-diagnostics.de/data/IHC_Entparaffinierung_web.pdf):
55. Witzig TE: Current treatment approaches for mantle-cell lymphoma. *Journal of clinical Oncology* 2005, 23:6409-6414
56. Hirt C, Schüler F, Dölken L, et al: 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* 2004, 104:904-905
57. Stilgenbauer S, Winkler D, Ott G, et al: Molecular Characterization of 11q Deletions Point to a Pathogenic Role of the ATM Gene in Mantle Cell Lymphoma. *Blood* 1999, 94:3262-3264
58. Bodrug SE, Warner BJ, Bath ML, et al: Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *The EMBO Journal* 1994, 13:2124-2130
59. Ponzoni M1, Doglioni C, Caligaris-Cappio F: Chronic lymphocytic leukemia: the pathologist's view of lymph node microenvironment. *Semin Diagn Pathol* 2011, 28 (2):161-166
60. Maki RG: Small is beautiful: insulin-like growth factors and their role in growth, development, and cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2010, 28(33):4985-4995
61. Ayalon D, Glaser T, Werner H: Transcriptional regulation of IGF-I receptor gene expression by the PAX3-FKHR oncoprotein. *Growth Horm IGF Res* 2001, 11:289-297
62. Crist WM, Anderson JR, Meza JL, et al: Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: Results for patients with nonmetastatic disease. *J Clin Oncol* 2001, 19:3091-3102
63. Petricoin EF, Espina V, Araujo RP, et al: Phosphoprotein pathway mapping: Akt/mammalian target of rapamycin activation is negatively associated with childhood rhabdomyosarcoma survival. *Cancer Res* 2007, 67:3431-3440
64. Cao L, Yu Y, Darko I, et al: Addiction to elevated insulin-like growth factor I receptor and initial modulation of the AKT pathway define the responsiveness of rhabdomyosarcoma to the targeting antibody. *Cancer Res* 2008, 68:8039-8048
65. Martins AS, Mackintosh C, Martín DH, et al: Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin, or vincristine, is a novel therapeutic approach in Ewing tumor. *Clin Cancer Res* 2006, 12:3532-3540
66. Zhu B, Davie JK: New insights into signalling-pathway alterations in rhabdomyosarcoma. *Br J Cancer* 2015, 112(2):227-231
67. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, et al: MTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 2006, 66:1500-1508
68. Yee D, Favoni RE, Lebovic GS, et al: Insulin-like growth factor I expression by tumors of neuroectodermal origin with the t(11;22) chromosomal translocation: A potential autocrine growth factor. *J Clin Invest* 1990, 86:1806-1814
69. Strömberg T, Feng X, Delforush M, et al: Picropodophyllin inhibits proliferation and survival of diffuse large B-cell lymphoma cells. *Med Oncol* 2015, 32(7):
70. Huang Z, Fang Z, Zhen H, et al: Inhibition of type I insulin-like growth factor receptor tyrosine kinase by picropodophyllin induces apoptosis and cell cycle arrest in T lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2014, 55(8):1876-1883
-

-
71. Liang Z, Diepstra A, Xu C et al: Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Is a Prognostic Factor in Classical Hodgkin Lymphoma. PLoS One 2014, 28;9(1):
 72. Vishwamitra D, Shi P, Wilson D, et al: Expression and effects of inhibition of type I insulin-like growth factor receptor tyrosine kinase in mantle cell lymphoma. Haematologica 2011, 96(6):871-880
 73. Liao B, Hu Y, Herrick DJ, et al: The RNA-binding Protein IMP-3 Is a Translational Activator of Insulin-like Growth Factor II Leader-3 mRNA during Proliferation of Human K562 Leukemia Cells. The Journal of Biological Chemistry 2005, 280:18517-18524
 74. Suvasini R, Shruti B, Thota B, et al: Insulin Growth Factor-2 Binding Protein 3 (IGF2BP3) Is a Glioblastoma-specific Marker That Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase/Mitogen-activated Protein Kinase (PI3K/MAPK) Pathway by Modulating IGF-2. J Biol Chem 2011, 286(29):25882-25890
-

11. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Rosenwald danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation im Institut für Pathologie Würzburg anzufertigen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. med. Dr. rer. nat. Elena Maria Hartmann für die hervorragende fachliche und menschliche Betreuung in allen Phasen der Arbeit.

Ich danke den MTAs für die freundliche Zusammenarbeit, insbesondere Frau Roth für die Einarbeitung in die immunhistochemische Färbetechniken und die vielen hilfreichen Ratschläge.

Kamil Oberski danke ich für die Hilfe bei allen technischen Fragen, für das Korrekturlesen und für die Motivation sowie für die tatkräftige Unterstützung in allen Lebenslagen.

Priv.-Doz. Dr. med. Arno Dimmler und Lena Kroenlein danke ich für das Korrekturlesen und für die Motivation.

Bei meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden bedanke ich mich dafür, dass sie mich in allen Lebenslagen unterstützen.

12. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Vanessa Anna-Christin Oberski (geb. Trapp)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsort: [REDACTED]
Geburtsdatum: [REDACTED]
Religion: evangelisch
Familienstand: [REDACTED]

Schulbildung:

1992 – 1996 [REDACTED]
1996 – 2002 [REDACTED]
2002 – 2005 [REDACTED]

Hochschulausbildung:

SS 2006 bis 2012 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians Universität Würzburg

Beruflicher Werdegang:

08/2012-08/2015 Assistenzärztin im Institut für Pathologie [REDACTED]
Seit 09/2015 Assistenzärztin im Institut für Pathologie [REDACTED]

Karlsruhe, den 07.07.2017
