TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar

Die Bedeutung der c-Myc – Skp2/Cks1 – p27^{Kip1}-Signaltransduktionskaskade für die Prognose von diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen

Stephanie Haug

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. - Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ. -Prof. Dr. Ch. Peschel
2. Univ. -Prof. Dr. J. Ruland

Die Dissertation wurde am 11. 04. 2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26. 09. 2012 angenommen.

meiner Oma Maria

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis III

Abkürzungsverzeichnis VII

1 **Einleitung** 1

1.1 Diffus großzellige B-Zell-Lymphome 1

1.1.1 Epidemiologie und Klassifikation 1

1.1.2 Pathogenese 3

1.1.3 Klinik 4

1.1.4 Diagnose und Therapie 5

1.1.5 Prognose und Probleme in der Behandlung 7

1.1.6 Immunphänotyp und prognostische Marker 8

1.1.6.1 Die Prognose verschiedener DLBCL-Subtypen nach Genexpressionsmerkmalen 10

1.1.6.2 Die Prognose bei Translokation t(14;18)und 8q24/c-Myc-Rearrangement 14

1.1.6.3 Der schlechte Verlauf in einer Untergruppe mit unbestimmten genetischen Merkmalen 14

1.2 Die c-Myc- Skp2/Cks1- p27^{Kip1} Signaltransduktionskaskade 14

1.2.1 c-Myc 14

1.2.1.1 Myc`s Funktion als globaler Transkriptionsregulator 14

1.2.1.2 Überexpression von Myc in Tumoren 15

1.2.2 Das Tumorsuppressor-Gen p27^{Kip1} 16

1.2.2.1 Die Funktion in der Zellzyklus Regulation 16

1.2.2.2 Der p27^{Kip1}-Abbau in gesunden und neoplastischen Zellen 16

1.2.3 Die SCF$^{Skp2/Cks1}$ –Ubiquitin-Ligase 16

1.2.4 Skp2 als Adapterprotein der SCF $^{Skp2/Cks1}$-Ubiquitin-Ligase 18

1.2.4.1 Skp2 als Proto-Onkogen 18

1.2.4.2 Skp2-Expression in DLBCLs 18

1.2.5 Cks1b als Komponente der SCF$^{Skp2/Cks1}$ –Ubiquitin-Ligase 18

1.2.5.1 Die Wirkung von Cks1b auf Cdk`s und seine Interaktion mit Skp2 18

1.2.5.2 Cks1b-Expression in verschiedenen Tumoren 19

1.2.6 Der c-Myc-Skp2/Cks1-Signaltransduktionsweg und Hinweise für seine Bedeutung in der Tumorentstehung 19

2. **Fragestellung und Ziele** 20

3. **Material und Methoden** 21

3.1 Der klinische Verlauf *21*

3.2 Material *21*

3.2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien 21

3.2.2 Reagenzien und Kits 22

3.2.3 Puffer und Lösungen 23

3.2.4 Antikörper 24

3.2.5 Patientenproben 24

3.3 Methodik *25*

3.3.1 Die Herstellung von tissue-microarrays (TMA) 25

3.3.2 Das Anfertigen von Schnitten 25

3.3.3 Die immunhistochemische Färbung (IHC) 25

3.3.3.1 IHC der einzelnen Antikörper 25

3.3.3.2 Testung kommerzieller Cks1b-Antikörper für die IHC 26

3.3.4 Auswertung der immunhistochemisch behandelten tissue- microarrays (TMAs) 27

3.3.5 Die Fluoreszenz-in-situ-Hybidisierung zur Bestimmung von c-Myc-Translokationen und -Amplifikationen 28

3.3.6 Statistische Analyse 28

4 **Ergebnisse** 30

4.1 Die klinischen Merkmale der untersuchten Patienten *30*

4.1.1 Das mittlere progressionsfreie Überleben aller Patienten 32

4.1.2 Die prognostische Aussagekraft nach IPI-Score 33

4.2 Festlegung der cut-off-Werte von Cks1b, Skp2 und p27^{Kip1} nach log-rank-Testung *33*

4.3 Die Expression der Komponenten des SCF-c-Myc- Skp2/Cks1- p27^{Kip1} - Signaltransduktionsweges *35*

4.3.1 Immunhistochemische Detektion der Markerexpression 35

4.3.2 Der Anteil von 11% an C-Myc-Amplifikationen und -Translokationen im untersuchten Patientenkollektiv 38

4.3.3 Keine signifikante Korrelation der c-Myc-Amplifikationen und -Translokationen mit der Expression von Ki67, Skp2, Cks1b als auch $p27^{Kip1}$ 39

4.4 Kein signifikanter Einfluss der $p27^{Kip1}$- und Skp2-Expression auf das progressionsfreie Überleben 41

4.5 Cks1b als negativer Faktor in DLBCLs 42

4.5.1 Hohe Cks1b-Expression korreliert mit c-Myc, Skp2 und Ki67 sowie $p27^{Kip1}$ 42

4.5.2 Hohe Cks1b-Expression korreliert mit erniedrigtem progressionsfreien Überleben 43

4.5.3 Die unabhängige Aussagekraft von Cks1b bei Einteilung nach DLBCL-Subtypen 46

4.5.4 Zunahme der krankheitsbedingten Mortalität bei positiver Cks1b-Expression 48

4.5.5. Die Aussagekraft des Cks1b-Status bei Rituximab behandelten Patienten 48

5 **Diskussion** 50

5.1 Die klinischen Charakteristika und Protein-Expressionsdaten im Vergleich zu Literaturangaben..... 50

5.1.1 Das untersuchte Patientenkollektiv und dessen prognostischer Verlauf nach IPI .. 50

5.1.2 Tissue-microarrays als geeignetes Instrument vergleichbarer immunhistochemischer Untersuchungen bei großer Fallzahl 50

5.1.3 Vergleichbare Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen und der c-Myc-FISH zu Gen-Expressionsdaten aus der Literatur 51

5.1.4 Keine prognostische Signifikanz bei Einteilung der Patienten nach Hans-Klassifikation. 52

5.2 Die prognostische Aussagekraft von Cks1b 53

5.2.1 Cks1b als negativ prognostischer Faktor in der Literatur 53

5.2.2 Die Auswirkung von Cks1b auf Cyclin-abhängige-Kinasen und $p27^{Kip1}$ 54

5.2.3 Der Zusammenhang von Cks1b, Skp2 und c-Myc 55

5.2.4 Nicht-signifikanter Einfluss der Skp2-Expression auf den klinischen Verlauf im untersuchten Patienten-Kollektiv 55

5.2.5 Der Einfluss der $p27^{Kip1}$-Expression in Tumoren und sein Zusammenhang mit Cks1b 56

5.2.6 Die prognostische Wertigkeit der Cks1b-Expression 57

5.3 Die Rolle von c-Myc 59

5.4 Zukünftige Ansätze und Überlegungen 61

6 **Zusammenfassung** 62

7 **Anhang** 65

7.1 Protokolle *65*

7.1.1 Immunhistochemie 65

7.1.2 FISH-Protokoll 66

7.2 Literaturverzeichnis *67*

7.3 Abbildungsverzeichnis *79*

7.4 Tabellenverzeichnis: *80*

7.5 Danksagung *81*

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Typ	*Activated B-cell like;* Aktivierter B-Zell-Typ der DLBCLs
a.d.	*Aqua destillée*
AID	*Activation-induced cytidine deaminase*
Am.	Amplifikation
Ät.	*Ätiologie*
AK	Antikörper
Bcl-2	*B-cell-lymphoma protein 2;* Antiapoptotisches Protein der inneren Mitochondrienmembran
Bcl-6	*B-cell-lymphoma protein 6;* Zink Finger Transkriptionsfaktor, häufig transloziert und hypermutiert in DLBCLs
bHLHZip	Basischer Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper
BL	Burkitt-Lymphom
CA	Karzinom
CC	*Correlation coefficient*; Korrelationskoeffizient
CCND2	Cyclin D2
CD	*Cluster of differentiation*
Cd10= MME	*Membrane metalloendopeptidase*
Cdk	*Cyclin-dependent kinase*
CI	Koinfidenzintervall
(R-)CHOP	Chemotherapieregime für Non-Hodgkin-Lymphome: (Rituximab+) Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin (=Oncovin), Prednisolon
Cks1	*Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1;* Zellzykluskontrollprotein
CR	*Complete remission;* keine Erkrankung mehr auffindbar
Cru	*Unconfirmed complete remission; „*unbestätigte“ CR
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CT	Computertomogramm
c-Myc	*Cellular myelocytomatosis oncogene (mus musculus)*
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	Diamidino-2-Phenylindole

DLBCL	*Diffuse large b-cell lymphoma;* Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DNS	Desoxyribonnukleinsäure
ECOG	*Eastern Cooperative Oncology Group*
ECOG Performance Status	Leistungsindex für den Allgemeinzustand von Patienten; Skala von 0 (normale Leistungsfähigkeit) bis 5 (Tod)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFS	*Event-free survival;* Ereignis-freies Überleben
Eμ-Myc Maus	Transgenes Mausmodell (mit Myc-Translokation)
E1, Ubc3, Roc1, Cul1, Skp1, Skp2, Cks1, Rbx1, Ubiquitin	Komponenten des $SCF^{Skp2/Cks1}$-Ubiquitin-Ligase-Komplex
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FL	Follikuläres Lymphom
FN1	Fibronectin 1
G	Gramm
GCB-Typ	Germinal-center- B-cell like; Keimzentrumstyp der DLBCLs
GRB10	Growth factor receptor-bound protein 10
G1-Phase	*Gap1-Phase;* Zellzyklusphase G1
HCl	Hydrogenchlorid
HCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
IgG	Immunglobulin Klasse G
IgM	Immunglobulin Klasse M
IHC	Immunhistochemie
IKK	IκB kinase complex
IPI	Internationaler prognostischer Index
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KM	Knochenmark
LDH	Laktatdehydrogenase
LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)
M	Mol
MALT	*Mucosa associated lymphoid tissue*

MCL	Mantelzell-Lymphom
MHC II	*Major histocompatibility complex class II*
Mib= Ki67	*Mindbomb homolog 1;* Proliferationsmarker
Min	Minute
Ml	Milliliter
Mm	Millimeter
(m-) RNA	*(Messenger-)* Ribonukleinsäure; Boten-RNA
Mum1	*Multiple myeloma oncogene-1;* Zellzykluskontrollprotein mit Transkriptionsregulationsfunktion
Myc	*Myelocytomatose* (Leukämie, die durch das MC29 avian Tumorvirus hervorgerufen wird); Onkogen
N	Nano
N	Anzahl
NF-κB	*Nuclear factor- κB*
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
Neg.	Negativ
Odc	*Ornithine decarboxylase;* Ornithindecarboxylase; Zielgen von Myc; Aktivierung ist ein typisches Kennzeichen von B-Zell-Lymphomen
OS	*Overall survival*
OT	Objektträger
PET	Positronenemissionstomographie
PFS	*Progression-free survival;* Progressions-freies-Überleben
pH-Wert	*Pondus Hydrogenii;* Maß der Säure/Base einer wässrigen Lösung
PMBL	Primär mediastinales B-Zell-Lymphom
Pos.	Positiv
PR	Partielle Remission: Remission des Tumors um mind.50%
$P27^{Kip1}$	Tumorsuppressorprotein; Zellzyklusinhibitor
P53	Tumorsuppressorprotein; Zellzyklusinhibitor
RT	Raumtemperatur
s.	Siehe

SCF	Skp1-Cullin1-F-box protein
SCYA3	small inducible cytokine A3
Skp2	*S-phase kinase-associated protein 2;* Protoonkogen
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
SSC	Standard Saline Citrate (?)
VEGF	Vascular endothelial growth factor
TEK	Tyrosine kinase, endothelial
Tr.	Translokation
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T187	Threonin 187
Vgl.	Vergleiche
W	Wochen
WHO	*World health organisation;* Weltgesundheitsorganisation
(5-) J-Ü/EFS	(5)- Jahres-Überleben/Ereignisfreies-Überleben

1 Einleitung

1.1 Diffus großzellige B-Zell-Lymphome

1.1.1 Epidemiologie und Klassifikation

Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), ausgehend von der B-, oder weitaus seltener von der T-Zellreihe, stellen eine der seltenen Erkrankungsidentitäten mit einem Anteil von 2-3% aller Malignome dar, die, im Gegensatz zu Hodgkin-Lymphomen, in den letzten dreißig Jahren einen stetigen Anstieg der Inzidenz, aktuell bei 10-12 pro 100.000 Einwohner und Jahr, verzeichnet. Diese Zunahme kann hierbei nicht alleine auf die sich wandelnde Alterungsstruktur der Gesellschaft zurückgeführt werden (Pfreundschuh, Trumper et al. 2006; Lenz and Staudt 2010).

Von der Gesamtheit der B-Zell-Lymphome fällt ein Hauptanteil (35-40 Prozent) auf die aggressiven (hochmalignen) diffus großzelligen B-Zell-Lymphome (DLBCL), noch vor dem niedrig malignen follikulären Lymphom als zweithäufigster Entität. Mit einem Anteil von 55% der Patienten sind vergleichbar viele Männer wie Frauen betroffen (1997; Morton, Wang et al. 2006). Der altersbezogene Häufigkeitsgipfel liegt in der Gruppe der 40- bis 80-Jährigen, jedoch kann sich die Erkrankung auch bei sehr jungen Patienten manifestieren (Morton, Wang et al. 2006). Durch die Anwendung kombinierter Chemotherapie-Schemata mit Rituximab kann in bis zu 75-80% der Fälle eine komplette Remission (CR) erreicht werden (Pfreundschuh, Trumper et al. 2006; Lenz and Staudt 2010).

Nach Verwendung verschiedener Lymphom-Klassifikationen wie der Kiel-Klassifikation von 1974, der REAL-Klassifikation (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms), veröffentlicht 1994 in Blood (Harris, Jaffe et al. 1994) und der WHO-Klassifikation von 2001 , werden aktuell die revidierten Kriterien der WHO-Klassifikation, veröffentlicht 09/2008, verwendet (Harris, Jaffe et al. 1994; 1997; Jaffe, Harris et al. 2008; Campo, Swerdlow et al. 2011). Hier steht als Grundlage die Einteilung nach Linienzugehörigkeit (B-, und T-Zelllinie) und pathologischen sowie genetischen Gesichtspunkten mit Anwendung der Immunphänotypisierung. Dabei wird weiter nach Differenzierungs- und Reifegrad der Lymphomzellen (Vorläufer- oder periphere Lymphome) unterschieden.

Historisch gesehen wurden lymphatische Neoplasien ursprünglich in Lymphome und Leukämien unterteilt. Erkrankungen, ausgehend von der Plasmazellreihe, wurden hierbei separat behandelt. Eine deutliche Neuerung hinsichtlich der Einteilung ergab sich mit der REAL-Klassifikation. Alle lymphoiden Neubildungen wurden eingeschlossen: Hodgkin-Lymphome, Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), lymphatische Leukämien sowie Plasma-Zell-

Erkrankungen. Die Einteilung erfolgte nach Linienzugehörigkeit (B- oder T-/NK- Zellen) und unterschied nach den zugrunde liegenden Stadien (Vorläufer vs. ausgereifte neoplastische Zellen) und Hodgkin-Lymphomen (Jaffe, Harris et al. 2008). Die Definition der Entitäten nach Morphologie, Immunphänotyp, genetischen Merkmalen und klinischen Besonderheiten lag der neuen Einteilung zugrunde. Durch Bestimmung des genetischen Expressions-Profils wurde erstmals zwischen dem Germinal-Center (GC)-Subtyp und dem aktivierten B-Zell (ABC)-Typ des DLBCL unterschieden. Auch die Betrachtung des primär mediastinalen DLBCL als eigene Entität ging auf die REAL-Klassifikation zurück. Lymphome wurden als heterogene Gruppe betrachtet und nicht mehr, wie nach der Kiel-Klassifikation, als eine einzige Erkrankung verschiedener Malignitätsgrade mit jeweils unterschiedlichem klinischen Verhalten (Jaffe, Harris et al. 2008). Es folgte 2001 die WHO-Klassifikation, ausgerichtet an klinischen, wissenschaftlichen und pathologischen Gesichtspunkten.

Die WHO-Klassifikation von 2001 wurde 2008 revidiert. Eine der Neuerungen beinhaltete der Einschluss von „Borderline“-Entitäten. Nach morphologischen und immunophänotypischen Gesichtspunkten wurden bestimmte Graubereiche von Tumoren mit überschneidenden Genexpressions-Merkmalen, insbesondere zwischen dem primär-mediastinalen-DLBCL und dem mediastinal-nodulär-sklerosierenden-Subtyp des Hodgkin-Lymphoms, ebenso berücksichtigt. Dieser provisorische Zwischentyp, der typischerweise junge Männer betrifft und einen klinisch aggressiven Charakter aufweist, wird in der neuen WHO-Klassifikation eigens aufgeführt („B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma“) (Jaffe, Harris et al. 2008). Ein weiterer, neu bezeichneter Übergangstyp betrifft den Grenzbereich zwischen klassischem Burkitt-Lymphom und DLBCL mit Nachweis einer c-Myc-Translokation („B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma“). Viele dieser Lymphome besitzen Translokationen sowohl im c-Myc als auch im Bcl2 Lokus („double hit“) und weisen einen sehr aggressiven klinischen Verlauf auf.

Nach der WHO-Klassifikation von 2008 werden zudem eigene Kategorien definiert, die Entitäten einer bestimmten anatomischen Lokalisation oder klinischer Merkmale wie Alter charakterisieren, wie unter anderem das primäre DLBCL des ZNS, das primär kutane DLBCL vom Beintyp oder das EBV-assoziierte DLBCL des älteren Menschen, das typischerweise bei reduzierter Immunfunktion auftritt. Eine sehr gute Prognose haben dagegen das Marginalzelllymphom oder follikuläre Lymphom des Kindesalters, die sich in ihrer Pathogenese von morphologisch ähnlichen Lymphomen unterscheiden und durch einen Mangel an Bcl2-Expression als auch der Translokation t(14;18)(q32;q21) gekennzeichnet sind (Bastard, Deweindt et al. 1994; 1997; Kramer, Hermans et al. 1998;

Rosenwald, Wright et al. 2002; Jaffe, Harris et al. 2008; Lenz and Staudt 2010; Ott, Ziepert et al. 2010).

Selbst kleine DLBCL-Anteile in follikulären Lymphomen werden nach der aktuellen WHO-Klassifikation unter der eigenen Diagnose als DLBCL bezeichnet und wie diese Erkrankung behandelt (Jaffe, Harris et al. 2008).

1.1.2 Pathogenese

Diffus großzellige B-Zell-Lymphome entwickeln sich zum einen *de novo* aus unreifen B-Zellen (Zentro- oder Immunoblasten) als auch über Transformation aus verschiedenen Typen niedrig-maligner B-Zell-Lymphome wie chronisch lymphatischer B-Zell-Leukämie (CLL), lymphoplasmatischen, follikulären (FL) oder MALT-Lymphomen. Die Patienten mit immunoblastischen oder über Transformation entstandenen Lymphomen sprechen hierbei meist schlechter auf die Therapie an und sind durch eine negativere Prognose als primär zentroblastische diffus großzellige B-Zell-Lymphome gekennzeichnet (De Paepe, Achten et al. 2005; Armitage 2007).

Ursprungsort der meisten Lymphome wie Burkitt-Lymphom, follikuläres Lymphom, Marginalzonenlymphom, GCB- / ABC- DLBCL ist das Keimzentrum. Die verschiedenen Untertypen der diffus großzellige B-Zell-Lymphome entstehen hierbei aus jeweils verschiedenen Differenzierungs-Stadien der B-Zellreihe.

Nach Antigen-Stimulus in Verbindung mit T-Zell-Signalen erfolgt im Keimzentrum die Aktivierung vorgereifter B-Zellen. Es resultiert eine schnelle Expansion von Zentroblasten, sich schnell teilenden B-Zellen mit ungekerbtem Kern, in der dunklen Zone des Keimzentrums. Diese Zentroblasten stellen die Ursprungszellen von Burkitt-Lymphomen und DLBCL vom GCB-Typ dar. GCB-Lymphom-Zellen exprimieren somit Hunderte von Genen, die die B-Zellen des Keimzentrums definieren und führen eine weitere Immunglobulin-Klassen-Rekombination durch (Lenz and Staudt 2010).

Neben einer möglichen Apoptose kommt es auch zu einem Ausstoßen der B-Zellen in die helle Zone des Keimzentrums, in der die Umwandlung zu unteilbaren Zentrozyten mit gelapptem Kern erfolgt. Bei maligner Transformation dieser Zentrozyten kommt es zur Entstehung von follikulären Lymphomen.

Eine Rückbildung zu Zentroblasten ist möglich, oder auch eine weitere Differenzierung zu B-Gedächtniszellen, und, durch Stimulation von NF-κB, zu Plasmablasten mit einer folgenden Umwandlung zu Plasmazellen. DLBCL vom ABC-Typ gehen auf diese Plasmablasten zurück, die sich durch einen durch verschiedene genetische Läsionen hervorgerufenen Differenzierungsblock nicht weiter vollständig zu Plasmazellen entwickeln können. Typischerweise besitzen die Lymphom-Zellen vom ABC-Typ somit das

Expressionsprogramm von Plasmazellen, einschließlich des Transkriptionsfaktors XBP1, der die Immunglobulin-Sekretion reguliert (Lenz and Staudt 2010).

Seltener geht der Ursprung von DLBCL auf B-Zellen des Thymus mit einem dem Hodgkin-Lymphom verwandten Genexpressionsmuster zurück. Dieses weist jedoch im Gegensatz zu Hodgkin-Lymphom-Zellen, die von den B-Zellen des Thymus ausgehen, genetische Expressionsmerkmale ausgereifter B-Zellen auf. Dieser Subtyp, das primär mediastinale B-Zell-Lymphom, betrifft typischerweise junge Frauen in einem mittleren Alter von 30 bis 35 Jahren. Die Ausbreitung erfolgt direkt an thorakalen Strukturen entlang.

Sowohl für die physiologische Immunantwort als auch die Lymphom-Entstehung sind somit verschiedenste genetische Modifikationswege mit einer Reihe an notwendigen Effektoren des Keimzentrums entscheidend. Zahlreiche Regulationsmechanismen für die V(D)J-Rekombination, die somatische Hypermutation, als auch die Rekombination der verschiedenen Immunglobulin-Klassen sind hierbei notwendig. Diese ziehen jedoch infolge derer Komplexität die Anfälligkeit zur Entstehung unterschiedlichster Malignome nach sich.

1.1.3 Klinik

Die fast gleichermaßen betroffenen weiblichen wie auch männlichen Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 64 Jahren bei Diagnosestellung zeigen sich schnell entwickelnde Symptome wie Lymphknotenschwellungen, Müdigkeit, Schwäche, Blässe und Neigung zu Infektionen (1997; Morton, Wang et al. 2006). Meist sind die zervikalen oder abdominalen Lymphknoten betroffen, jede andere Lokalisation kann aber ebenso befallen sein (Armitage and Weisenburger 1998).

Die Stadien-Einteilung erfolgt nach der Ann-Arbor-Klassifikation. Das Vorhandensein von B-Symptomen (B) wie Fieber, Nachtschweiß oder Gewichtsverlust von mehr als 10% innerhalb der letzten sechs Monate, im Gegensatz zu deren Fehlen (entsprechend A), wird in der klinischen Einteilung zusätzlich berücksichtigt [11].

Tabelle 1: Ann-Arbor Klassifikation (Carbone, Kaplan et al. 1971)

I	Eine einzelne Lymphknotenregion (I), ein einzelnes extranodales Organ oder Lokalisation (IE) ist betroffen
II	Auf derselben Zwerchfellseite sind zwei oder mehr Lymphknoten oder Lymphatische Strukturen betroffen (II) oder es besteht eine eingeschränkte Beteiligung eines extranodalen Organ oder Gewebe (IIE)
III	Einbezug von Lymphknotenregionen beidseits des Zwerchfells (III), eventuell mit Einbezug der Milz (IIIS) oder beschränktem extralymphatischen Organbefall (IIIE) oder beidem (IIIES)
IV	Diffuser oder disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe oder Gewebe, mit oder ohne assoziiertem lymphatischen Befall

A *Abwesenheit von systemischen („B“) Symptomen*

B *B-Symptome wie Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust >10% innerhalb von sechs Monaten vor Diagnosestellung*

Diffus großzellige B-Zell-Lymphome werden zu ungefähr 40% in einem lokalisierten frühen Stadium, zu 60% in den Stadien III oder IV diagnostiziert. Als systemische Erkrankung ist in bis zu 30% das Knochenmark betroffen und in 40% liegt ein Extranodalbefall, insbesondere des Gastrointestinaltraktes, vor (Bunn, Schein et al. 1976; Rudders, Ross et al. 1978; van Besien, Ha et al. 1998). B-Symptome sind bei c.a. 30% der Patienten zum Diagnosezeitpunkt vorhanden. Die Laktatdehydrogenase (LDH), eingehend in den internationalen prognostischen Index (IPI; s.Tab.2), ist bei über der Hälfte der Betroffenen erhöht (Armitage and Weisenburger 1998).

1.1.4 Diagnose und Therapie

Durch Gewebebiopsie, meist eines Lymphknotens, wird anhand der Morphologie und des Immunphänotyps die Diagnose DLBCL gestellt. Zudem wird mithilfe der Anamnese, des Labors, der CT- und fakultativ der PET-Diagnostik, dem Lymphknoten-Ultraschall und der Knochenmark-Untersuchung das Stadium der Erkrankung bestimmt.

Diffus großzellige B-Zell-Lymphome zählen zu den aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen, deren durchschnittliches Überleben ohne Therapie in einem Bereich von Monaten liegt. Die Therapie erfolgt in kurativer Zielsetzung mit Chemo- und Immuntherapie, gegebenenfalls wird zusätzlich Radiotherapie eingesetzt. Die bevorzugte Standardtherapie stellt die Kombination von Cyclosphosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon (CHOP) plus Rituximab über 6-8 Zyklen dar (Armitage 2007), wobei verschiedene Therapie-Schemata, z.B. CHOP-21, CHOP-14 oder Varianten wie R-CHOEP / DA-EPOCH angewandt werden. Die bevorzugte Therapie älterer Patienten aller Risikogruppen besteht in sechs Zyklen CHOP-14 plus zweimaliger Rituximab-Gabe, wobei das ereignis- und progressionsfreie Überleben (EFS, PFS) als auch das gesamte Überleben (OS) verbessert wird (Pfreundschuh, Schubert et al. 2008).

Durch den standardmäßigen, zusätzlichen Einsatz von Rituximab, einem chimären (Maus/Human) monoklonalen IgG-Antikörper, gerichtet gegen das Antigen CD20, das in allen, ausgenommen plasmablastischen DLBCL exprimiert wird, wird die Effektivität der Therapie signifikant erhöht und das Überleben in allen Risikogruppen um zusätzlich 10-15% gesteigert. In 75% bis 80% der Patienten wird durch die Kombination mit Rituximab eine vollständige Krankheits-Remission (CR) erreicht (Plosker and Figgitt 2003; Marcus and Hagenbeek 2007; Pfreundschuh, Ho et al. 2008; Pfreundschuh, Schubert et al. 2008; Gisselbrecht, Glass et al. 2010).

Bei primär refraktärem oder rezidivierendem Verlauf bei Patienten, die eine vollständige Remission (CR) erreicht hatten bzw. weiterhin auf die Behandlung ansprechen, ist die Salvage-Behandlung, gefolgt von einer Hochdosis-Chemotherapie und autologer Stammzell-Transplantation, Standard (Blay, Sebban et al. 1998; Gisselbrecht, Glass et al. 2010). Nach den PARMA-Daten (Philip, Guglielmi et al. 1995) als auch der aktuellen CORAL (Collaborativ Trial in Relapsed Aggressive Lymphoma)-Studie von 2010 bleibt die Prognose bei frühem Rückfall (<12 Monate) nach erfolgter, Rituximab-beinhaltender Chemotherapie schlecht, ohne Unterschied bei Anwendung unterschiedlicher Chemotherapie-Regimes wie R-ICE oder R-DHAP. Die Prognose ist vergleichbar mit derjenigen von Patienten mit primär ausbleibendem, oder ungenügendem Ansprechen auf die Therapie (Philip, Guglielmi et al. 1995; Gisselbrecht, Glass et al. 2010). Als unabhängige Faktoren mit negativem Einfluss auf die Prognose und das Ansprechen nach Salvage-Therapie stellen sich die klinischen Merkmale wie erhöhter IPI Score, früher Rückfall innerhalb von 12 Monaten nach Diagnosestellung und vorangegangener Rituximab-Therapie dar. Patienten, die ein spätes Rezidiv zeigen, können hingegen deutlich von der Integration von Rituximab in das Salvage-Regime profitieren und ein 80%iges Ansprechen verzeichnen. Das 3-Jahres-Überleben dieser Patienten liegt bei 40- bis 50%. Im Gegensatz dazu liegt das Ansprechen bei frühem Eintritt eines Rezidivs trotz erfolgter Rituximab-Therapie der betroffenen Patienten bei einem Anteil von nur 50% und ist mit einem 3-Jahres-Überleben von 20% deutlich reduziert (Gisselbrecht, Glass et al. 2010).

Die autologe hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HCT) besitzt als Therapieoption derzeit keinen klinischen Stellenwert in der Primärbehandlung, da durch therapieinduzierte Komplikationen und eine signifikant erhöhte Morbidität keine Verbesserung des Überlebens im Vergleich zu einem primär chemotherapeutischen Vorgehen mit eventuell nachfolgender Stammzelltransplantation erreicht werden kann (Armitage 2007).

1.1.5 Prognose und Probleme in der Behandlung

Die klinischen Verläufe der betroffenen Patienten zeichnen sich durch einen sehr unterschiedlichen Fortgang aus. Als typischer Endpunkt wird zwischen einer (diagnostisch ungesicherten) Vollremission (CRu/ CR), einer partiellen Remission (PR) mit Tumorrückgang von mehr als 50% oder einer stabilen Erkrankung (Änderung des Tumor-Volumens um weniger als 25%) unterschieden. Eine Krankheitsprogression ist durch ein Tumorwachstum von mindestens 25% definiert. Um die Prognose der Patienten mit DLBCL abzuschätzen und die Therapie besser anzupassen, wird, 1993 publiziert, der internationale prognostische Index (IPI) als klinischer und biologischer Score für aggressive Non-Hodgkin-Lymphome angewandt. Die Patienten werden hierbei in vier Gruppen je nach Risikoprofil eingeteilt (1993). Die Parameter setzten sich aus dem Alter, dem Allgemeinzustand (nach ECOG-Performance-Status oder Karnofsky-Index), dem Extranodalbefall, der Laktatdehydrogenase (LDH) und dem Ann-Arbor-Stadium zusammen. Zudem wird der altersadjustierte internationale prognostische Index verwendet, in den die LDH-Expression, das Ann-Arbor-Stadium und der Allgemeinzustand eingehen.

Tabelle 2: IPI (Shipp 1997)

Parameter	***Ungünstig*** *(ergiebt je einen Punkt)*
Alter	>60 Jahre
Serum-Laktatdehydrogenase	Erhöht
ECOG-Performance-Status/ Karnofsky-Index	≥2/ <60%
Ann-Arbor-Stadium	III, IV
Extranodalbefall	>1

Vor dem standardmäßigen Einsatz von Rituximab lag die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate in der Gruppe mit niedrigem Risikoprofil (0-1 Punkte) bei 73%, in der Hochrisikogruppe (4-5 Punkte) nur noch bei 26% (1993). Mit der Einführung von Rituximab als neuem Therapiestandard nahm die prognostische Aussagekraft des IPIs ab (Sehn, Berry et al. 2007; Bari, Marcheselli et al. 2009). Die klinischen Parameter alleine sind für die Prognose weniger entscheidend und selbst in der Hochrisikogruppe liegt das durchschnittliche 5-Jahres-Überleben nun bei gut mehr als 50%. Eine eventuell aussagekräftigere Einteilung in nur drei Risikogruppen ist noch zu überprüfen (Sehn, Berry et al. 2007).

Die Remissionsrate und das (progressionsfreie-) Überleben stiegen durch den zusätzlichen Einsatz von Rituximab von zuvor um die 50% um mehr als 10% an, ohne eine zusätzliche Toxizität in Kauf nehmen zu müssen (Armitage 1993; Coiffier 2002; Coiffier, Lepage et al. 2002). Das progressionsfreie Überleben, über einen Zeitraum von 10 Jahren betrachtet, liegt bei Anwendung von R-CHOP nach Coiffier et. al., 2010, bei 36,5%, im Gegensatz zu nur 20% bei einer Therapie mit CHOP alleine. Das Risiko, an sekundären Tumoren zu erkranken oder andere Erkrankungen als auch Rückfälle zu erleiden, war unter Rituximab nicht erhöht (Coiffier, Thieblemont et al. 2010; Pfreundschuh 2010; Zwick, Murawski et al. 2010). Die aktuelle durchschnittliche Heilungsrate befindet sich bei einem Anteil von bis zu 70%.

1.1.6 Immunphänotyp und prognostische Marker

Die großen Tumorzellen mit prominenten Zellkernen, basophilem Zytoplasma und einer hohen Proliferationsrate (Ki67 >40%) exprimieren B-Zell-Antigene wie CD19, CD20, CD22, CD79a, CD45 und monoklonale Immunglobulin-M Oberflächenmoleküle (Stein, Lennert et al. 1984). Dabei sind verschiedenste genetische Veränderungen typisch, jedoch gibt es keine einzelne, die Diagnose definierende, zytogenetische Läsion (Kuppers, Rajewsky et al. 1997; Klein, Goossens et al. 1998).

Nach morphologischer Einteilung zeigen immunoblastische diffus großzellige B-Zell-Lymphome, im Gegensatz zu Zentroblastischen, unabhängig von der Behandlung mit als auch ohne Rituximab, eine signifikant erniedrigte Vollremissionsrate mit einer schlechteren klinischen Prognose. Dieser morphologische, für die Prognose signifikante und von Rituximab unabhängige Parameter kann allein durch standardmäßige HE-Färbung hämatopathologisch differenziert werden (Engelhard, Brittinger et al. 1997; Ott, Ziepert et al. 2010).

Durch die Anwendung von R-CHOP als neuen therapeutischen Goldstandard müssen ebenfalls die prädiktiven Werte der genetischen Marker erneut validiert werden. So nimmt einigen Studien zufolge die prognostische Aussagekraft individueller Biomarker wie Bcl2 und Bcl6 durch den zusätzlichen Einsatz von Rituximab in der Behandlung von DLBCLs ab (Lossos, Czerwinski et al. 2004; Malumbres, Chen et al. 2008).

Typische genetische Veränderungen des GCB-Typs sind die t(14;18) Translokation, die Deletion des Tumorsuppressor-Gens PTEN, die Amplifikation von microRNA Cluster miR-17-92 und p53-Mutationen. Die meisten ABC-Lymphome hingegen weisen Amplifikationen im Bcl2-Lokus auf. Ein Verlust an Tumor-Repressoren, z.B. durch eine Deletion des INK4A-ARF Lokus hervorgerufen, der für den Wachstumsinhibitor p16 als auch $p14^{ARF}$ kodiert, sowie der konstitutionell aktivierte NF-κB-Signalweg scheint an dem schlechten Ansprechen auf Chemotherapeutika bei Vorliegen des ABC-Typs mit verantwortlich zu sein (Lenz and Staudt 2010).

Das primär mediastinale B-Zell-Lymphom, das einen Anteil von ungefähr 5% der aggressiven Lymphome einnimmt, besitzt in über der Hälfte der Patienten die Amplifikation einer bestimmten Region des Chromosoms 9p24, die für die Tyrosinkinase JAK2 kodiert. Diese Tumorzellen sind durch eine diffuse Proliferation großer Zellen mit hellem Zytoplasma gekennzeichnet und gehen mit einem unterschiedlichen Sklerose-Grad einher, was die typische lokale Abgrenzbarkeit bedingt (Lossos 2005). Diese Amplifikation sowie weitere klinische und pathologische Merkmale treten auch bei nodulär sklerosierenden Hodgkin-Lymphomen auf. Oftmals ist auch eine Mutation oder Deletion von SOCS1, einem Suppressor des JAK-Signalweges, vorliegend (Lossos 2005; Lenz and Staudt 2010).

Tabelle 3: Genetische Veränderungen in DLBCLs

Genetische Veränderung	*Positivität*	*Kennzeichen/ Prognose*
Cd10	8-35%	Eher günstig, kein signifikanter Einfluss auf das Überleben (Stein, Lennert et al. 1984)
Bcl6	70%, Translokation von 3q27 in 30-40% (Lossos 2005)	Eher positiver prognostischer Wert in Bezug auf das Überleben, GCB-Typ definierender Faktor (Bastard, Deweindt et al. 1994; Ye, Cattoretti et al. 1997; Kramer, Hermans et al. 1998; Barrans, O'Connor et al. 2002). Reguliert TP53 herab und verhindert die Apoptose bei Auftreten von Zellschäden
Bcl2	25-80%	In 30% amplifiziert, in 17-20% transloziert (t(14;18)). Negativer prognostischer Faktor (Huang, Sanger et al. 2002; Barrans, Evans et al. 2003)
c-Myc Translokation, c-Myc Amplifikation	5-15%	Ungünstiger Prognosefaktor (Yunis, Mayer et al. 1989; Kramer, Hermans et al. 1998; Meyer and Penn 2008)
Ki67=Mib	30-100%	Proliferationsmarker; zum Teil als neg. prognostischer Faktor angesehen (El-Bolkainy, El-Bolkainy et al. 2007)
Mum1	50-75%	Bedeutung unklar (Tzankov, Went et al. 2007)
TP53	Bis zu 20%	Mit aggressivem klinischen Verlauf assoziiert (Lossos 2005). Kein Vorkommen bei Bcl6 Translokationen (wird von Bcl6 inaktiviert).

1.1.6.1 Die Prognose verschiedener DLBCL-Subtypen nach Genexpressionsmerkmalen

Nach ontogenetischem Ursprung wird zwischen dem GC-Typ des DLBCL und dem Non-GC-Typ unterschieden. Non-GC-DLBCL beinhalten den „aktivierten B-Zell Typ“ (ABC-Typ) und den „Typ 3“ des DLBCL, der heterogen weder eine typische Marker-Konstellation des GCB- noch des ABC-Typs aufweist (s.Abb.1) (Lossos 2005). Patienten mit einem Keimzentrumstyp (GCB) haben im Durchschnitt eine höhere Überlebensrate als diejenigen mit Non-GCB-Typ wie dem aktivierten B-Zell-Typ (ABC) (Rosenwald, Wright et al. 2002; Armitage 2007). Durch den zusätzlichen Einsatz von Rituximab hat sich jedoch insbesondere der klinische Verlauf des ABC-DLBCL verbessert und der prognostische Unterschied nach Einteilung in GCB- und Non-GCB DLBCL hierdurch verringert. Somit sollte diese Einteilung nicht als Basis für Therapieentscheidungen aufgrund der geringen Relevanz in Hinsicht auf aktuell angewandte Therapieregimes verwendet werden (Lenz and Staudt 2010; Ott, Ziepert et al. 2010).

Genetische Merkmale wie die Translokation t(14;18)(q32;q21), die das Bcl2-Gen betrifft, oder Amplifikationen von c-rel auf Chromosom 2q finden sich ausschließlich bei GC-DLBCL. Dagegen findet sich bei dem aktivierten B-Zell-Typ, charakterisiert durch Merkmale aktivierter B-Zellen, eine hohe Expression von NF-κB Zielgenen und eine konstitutionelle Aktivierung des IκB-Kinase-Komplexes (IKK), der Mitglieder der IκB-Familie phosphoryliert und durch eine transkriptions- und proliferationsauslösende Wirkung das Zellüberleben steigert (Lossos 2005). Typisch für den ABC-Typ ist ebenfalls die Expression von PDE4B, einer cyclischen AMP-Phosphodiesterase (cAMP), die cAMP inaktiviert und somit verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege blockiert, die ihrerseits einen Zell Zyklus Arrest und eine B-Zell Apoptose induzieren (Lossos 2005).

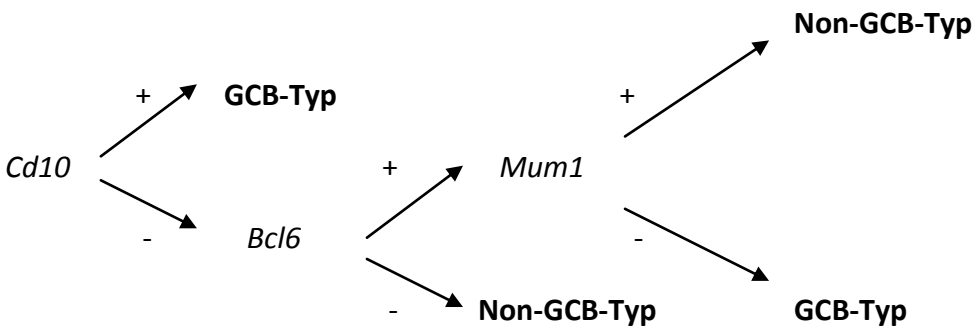
Durch das Mutationen induzierende Enzym AID (Aktivierungs-induzierende Cytidin-Deaminase) wird zum einen die somatische Immunglobulin-Hypermutation als auch das Switching der schweren Immunglobulin-Ketten induziert. Durch diese Funktion spielt es ebenfalls für die Lymphom-Entstehung eine entscheidende Rolle und kann z.B. in Mausmodellen bei transgen induzierter Überexpression B-Zell-Lymphome hervorrufen (Lenz and Staudt 2010). In diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen kommt es zu einer Anhäufung von AID abhängigen Mutationen, die auch Zielgene wie c-Myc betreffen. Eine sehr hohe Expression von AID, die in IgH Switch-Regionen als auch der c-MYC Region DNA Doppelbrüche induziert, findet sich insbesondere beim ABC-Typ des DLBCL.

Weiterhin werden Faktoren wie BCL-6, MTA3, SPIB, BACH2, OCT2, OCAB und IRF8 benötigt. Bei der gerichteten B-Zell-Differenzierung kommt es zu einem balancierten Zusammenwirken dieser Faktoren. Werden jedoch bestimmte Faktoren wie zum Beispiel BCL2 und NF-kB durch Translokation übermäßig aktiviert, wird aufgrund deren anti-apoptotischer Effekte der normale Zelltod umgangen (Lenz and Staudt 2010).

Tabelle 4: Molekulare, pathogenetische und klinische Merkmale des GCB-Typ versus ABC-Typ des DLBCL (Lossos 2005)

	GCB- Typ	ABC- Typ
Ursprungszelle	Germinale Center B-Zelle	Postgerminale Center B-Zelle
Immunglobulin Mutation	Ja	Nein
Oncogenetische Mechanismen	-Bcl 2 Translokation -Chromosom 2p Amplifikation des REL Lokus	-Konstitutive Aktivierung von NF-κB
Intrazelluläre Signalwege	-cAMP moduliert AKT und pBAD: Heraufregulation von pSTAT6, Akkulumation im Zellkern, Genexpressionssteigerung und Proliferationszunahme	-PDE4B inaktiviert cAMP -IL-4 induziert eine Herabregulation der AKT Aktivierung und des Zellzyklusarrest in G0/G1

Abbildung 1: Einteilung der DLBCLs in GCB/ Non-GCB-Typ nach Cd10, Bcl6 und Mum1 Status nach Hans-Klassifikation (Hans, Weisenburger et al. 2004)



Die initiale Einteilung von DLBCL in GCB- und ABC-Typ wurde aufgrund der ausgeprägten Heterogenität der Erkrankung um den „Typ 3“ erweitert. Die Einteilung in diese prognostischen Untergruppen GCB- und Non-GCB-Typ kann über die Bestimmung von cDNA microarrays erfolgen. Dies ist jedoch in der klinischen Routine-Diagnostik oftmals nicht durchführbar und sowohl zeit- als auch kostenaufwändig. Nach Hans et. al. (Hans, Weisenburger et al. 2004) ist allein durch die immunhistochemische Bestimmung der Protein-Expression von nur drei Markern, Cd 10, Bcl6 sowie Mum1, eine Einteilung in GCB- und Non-GCB Typ mit einer hohen Signifikanz durchführbar. Die prognostische Aussagekraft liegt hierbei in vergleichbarer Weise vor. So zeigte sich in der GCB-Gruppe ein 5-Jahres Überleben von 76%, im Vergleich zu nur 34% beim Non-GCB-Typ (p<0,001). Die prognostische Unabhängigkeit der Prognose von dem klinischen IPI-Score war statistisch nachweisbar (p<0,0001) (Hans, Weisenburger et al. 2004).

Abbildung 2: Überlebenskurven von GCB- , Type 3 und ABC-Typ im Vergleich, p<0,01 ((Rosenwald, Wright et al. 2002))

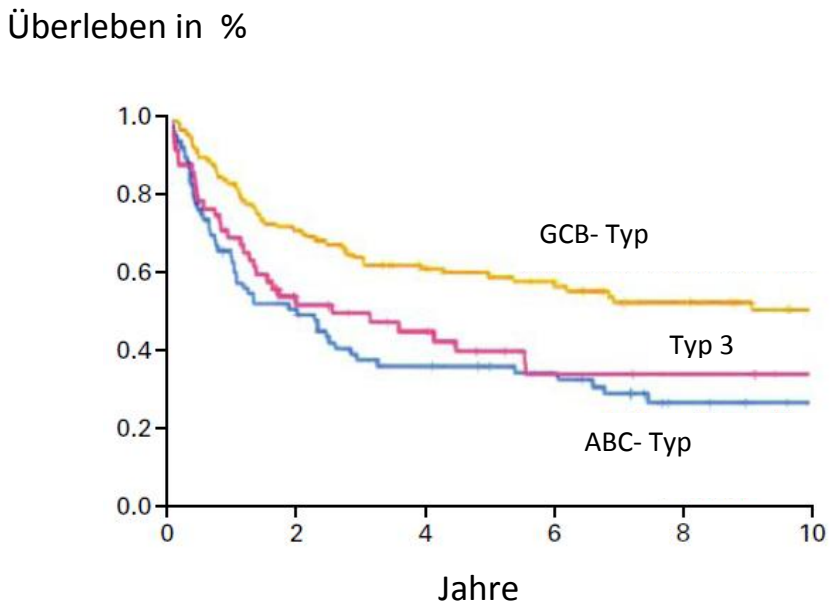


Abb. 2: Überlebenskurven nach DLBCL-Subtyp. Der Verlauf der Patienten mit genetischen Charakteristika von aktivierten B-Zellen zeigt einen signifikant (P<0,001) schlechteren Verlauf in Hinsicht auf das Überleben im Vergleich zu dem Keimzentrumstyp des DLBCL und einem dritten Subtyp, der bei heterogenem Genprofil keine typische Genkonstellation der anderen beiden Subtypen aufweist (Rosenwald, Wright et al. 2002).

Diese Einteilung nach GCB-, und Non-GCB-Typ stellt jedoch nicht die einzige aussagekräftige Einteilung der unterschiedlichen DLBCL-Fälle dar. Betrachtet man das Genexpressionsmuster, so kann man weiter zwischen vier Untergruppen mit eigenen, charakteristischen Merkmalen differenzieren: dem „Germinal center B-Zell-“, dem „stromal 1“ -, dem „stromal 2“- Typ und der „Major-Histokompatibilitäts-Klasse II (MHCII)“ (Rosenwald, Wright et al. 2002; Rimsza, Roberts et al. 2004). Klinisch ergibt sich zwischen diesen Gruppen mit multivariaten Genexpressions-Merkmalen eine prognostische Signifikanz. So ist das Therapieansprechen und die Prognose der Patienten mit Zutreffen der definierenden Merkmale des „stromal-1“ oder des „GCB-Zell“ Typs unabhängig von einer Therapie mit oder ohne Rituximab deutlich günstiger, im Gegensatz zu der durch Proliferation und gesteigerten Angiogenese gekennzeichneten „stromal-2“ -Signatur (Lenz, Wright et al. 2008). Das beste Ansprechen auf R-CHOP wird in der Gruppe des Stromal-1-Typ in Verbindung mit GCB-Tumor-Merkmalen erreicht und korreliert direkt mit erhöhtem Überleben. Die den Stromal-1-Typ definierenden Gene beziehen sich auf Komponenten der extrazellulären Matrix, wie unter anderem Fibronektin, Osteonektin, Kollagenen und dem anti-angiogenetischen Faktor Thrombospondin. Die ausgeprägte Ablagerung von extrazellulärer Matrix mit Infiltration von Zellen der monozytären Linie charakterisiert diese prognostisch günstig verlaufende Untergruppe.

Der „Stromal-2“-Typ hingegen exprimiert Gene, die für Merkmale von Endothelzellen oder angiogenetisch wirksame Regulatoren kodieren. So werden Schlüsselproteine wie VEGF, GRB10, TEG und weitere Angiogenese-fördernde Faktoren induziert. Eine hohe Expression der „stromal-2“-Marker geht mit einer erhöhten Dichte an tumoreigenen Blutgefäßen einher.

Der Charakter des umgebenden Gewebes beeinflusst nach vorliegenden Kenntnissen somit die Prognose und das Therapieansprechen und ist hierbei, unabhängig von einer Rituximab-Behandlung, aussagekräftig. Die Bedeutung der Angiogenese mit Bildung neuer Blut-Gefäß-Formationen des „Stromal-2“-Typs birgt die Möglichkeit therapeutischen Eingreifens. Aktuell wird der Einfluss von Bevacizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF, bei Patienten mit DLBCL untersucht. Hier könnten insbesondere die Patienten mit Expression der „stromal-2“-Marker mit hoher Gefäßdichte im Tumor profitieren (Ganjoo, An et al. 2006; Lenz, Wright et al. 2008).

Bei Einteilung nach immunoblastischem versus zentroblastischem Ursprung bleibt der immunoblastische Subtyp als unabhängiger Risikofaktor auch bei Rituximab-Therapie weiterhin bestehen. Der anaplastische Subtyp zeichnet sich generell durch den aggressivsten klinischen Verlauf aus.

1.1.6.2 Die Prognose bei Translokation t(14;18)und 8q24/c-Myc-Rearrangement

Ein refraktärer Krankheitsverlauf mit kurzem Überleben, meist weniger als einem Jahr trotz intensiver Therapie, ist für Patienten mit der Translokation t(14;18)(q32;q21) oder dem 8q24/MYC-Rearrangement kennzeichnend (Klein, Goossens et al. 1998; Colomo, Lopez-Guillermo et al. 2003). Dieser schnelle Verlauf scheint von anderen prognostischen Indikatoren unabhängig zu sein und die Therapie dieser Patienten ist trotz des sonst klinisch besser verlaufenden GC-Immunphänotyps sehr problematisch (Le Gouill, Talmant et al. 2007; Lin and Medeiros 2007). In den seltenen Fällen, in denen t(14;18) und das 8q24-Rearrangement gemeinsam auftreten, zeigen sich durchweg klinisch und biologisch aggressivste Merkmale mit einem progressionsfreien Überleben von durchschnittlich nur vier bis fünf Monaten (Le Gouill, Talmant et al. 2007; Niitsu, Okamoto et al. 2009).

1.1.6.3 Der schlechte Verlauf in einer Untergruppe mit unbestimmten genetischen Merkmalen

Außer diesen Fällen bleibt weiter eine Untergruppe an Patienten mit noch nicht sicher bestimmten ungünstigen genetischen Merkmalen, die trotz verbesserter Therapie auf diese schlecht anspricht und eine negative Prognose besitzt. Hierbei scheint oftmals das c-Myc-Gen mit betroffen zu sein (Hummel, Bentink et al. 2006; Mossafa, Damotte et al. 2006).

1.2 Die c-Myc- Skp2/Cks1- p27^{Kip1} Signaltransduktionskaskade

1.2.1 c-Myc

1.2.1.1 Myc`s Funktion als globaler Transkriptionsregulator

1979 wurde erstmalig v-gag-Myc als Gensequenz eine Leukämie auslösenden MC29-Vogelvirus identifiziert. Die Myc-Familie, bestehend aus N-, C-, und L-Myc, abgeleitet von „myelocytomatosis“, der von diesem Virus ausgelösten Leukämie, stellt einen Transkriptionsfaktor dar, der in mehr als 70% aller Tumoren übermäßig exprimiert wird (Oster, Ho et al. 2002). Als Mitglied der bHLHZip (basische Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper)-Transkriptionsfamilie (Varmus 1984; Murre, McCaw et al. 1989) kann Myc nach Dimerisierung mit dem kleinen bHLH-Zip-Transkriptionsfaktor Max an ungefähr 10-15% des Genoms binden und vielfältige Funktionen ausüben (Patel, Loboda et al. 2004; Dang, O'Donnell et al. 2006). Diese Heterodimerisierung ist für eine mögliche Transformation entscheidend (Blackwood and Eisenman 1991; Amati, Brooks et al. 1993; Eberhardy and Farnham 2001). Als globaler Transkriptionsregulator spielt es mit mehr als 647 Zielgenen auf verschiedensten Ebenen der Zellregulation wie der Differenzierung, der Zellgrösse, dem Zellwachstum (Iritani, Alberola-Ila et al. 1999) und der Angiogenese (Pelengaris, Littlewood et al. 1999; Baudino, McKay et al. 2002) eine wichtige Rolle. Ebenso ist es an der Stammzellerneuerung und Transformation beteiligt (Dang 1999; Iritani and Eisenman

1999; Schuhmacher, Staege et al. 1999; Ngo, Gee et al. 2000; Nilsson, Keller et al. 2005; Meyer and Penn 2008). Durch die Fähigkeit, Cdk-Inhibitoren wie $p27^{Kip1}$ herab zu regulieren, steigert es unter anderem die Zellproliferation (Vlach, Hennecke et al. 1996; Muller, Bouchard et al. 1997).

Myc unterdrückt ebenso viele Gene wie es auch andererseits aktiviert. Über fein regulierte negative Rückkopplungsmechanismen werden in gesunden Zellen bei Myc-Überexpression und dadurch erhöhter Proliferation durch indirekte Wege Apoptose-induzierende Faktoren wie der ARF-p53-Signalweg aktiviert (Cleveland, Huleihel et al. 1988; Penn, Brooks et al. 1990; Nilsson and Cleveland 2003; Meyer and Penn 2008). In der Lymphomagenese geht diese Balance zwischen proliferationssteigernden und apoptotisch wirkenden Effekten verloren (Grignani, Lombardi et al. 1990; Nilsson and Cleveland 2003). Mit den multifunktionellen Einflüssen auf die Zelle und der essentiellen regulierenden Funktion auf verschiedenste Signaltransduktionswege stellt Myc somit ein bedeutendes Onkogen dar (Oster, Ho et al. 2002; Herkert and Eilers 2010).

1.2.1.2 Überexpression von Myc in Tumoren

In ungefähr 70% aller Tumoren findet man eine gestörte Expression von Myc. Hierbei spielen verschiedene Arten der Dysregulation bei der Tumorentstehung eine Rolle. Genetische Veränderungen wie Insertion, chromosomale Translokation oder Genamplifikation sowie die Aktivierung über Hormone oder Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren, Second Messenger oder Transkriptionseffektoren, wirken auf die Expression der RNA- und Proteinspiegel (Crews, Barth et al. 1982; Shen-Ong, Keath et al. 1982; Meyer and Penn 2008). Die Translokation von c-Myc auf Chromosom 8 mit Immunglobulin-Genen, t(8;14)(q24;q32), t(2;8)(q13;q24) und t(8;22)(q24;q11), wird charakteristischerweise in Burkitt-Lymphomen gefunden (Magrath 1991; Hecht and Aster 2000). Ein diese Translokation enthaltendes Mausmodell, das klonale B-Zell-Lymphome entwickelt, ist von J.Adams et al. zum ersten Mal 1985 mit der transgenen Eμ-Myc-Maus verwirklicht worden (Adams, Harris et al. 1985).

Die verschiedenen Myc-Gene, c-Myc und seine Verwandten, L- und N-Myc, spielen in soliden Tumoren wie Neuroblastomen, Brust-, Kolon- oder Ovarialtumoren, und c-Myc in ungefähr 10-15% der DLBCLs eine prognostische Rolle. Die Aktivierung von Myc ist dabei hauptsächlich auf Amplifikationen zurückzuführen. Diese sind mit einem fortgeschrittenen Stadium bei Erstdiagnose und einer schlechteren Prognose assoziiert (Brodeur, Seeger et al. 1984; Schwab, Ellison et al. 1984; Wu, Lin et al. 2003; Klapper, Stoecklein et al. 2008; Herkert and Eilers 2010).

1.2.2 Das Tumorsuppressor-Gen $p27^{Kip1}$

1.2.2.1 Die Funktion in der Zellzyklus Regulation

$p27^{Kip1}$, ein kurzlebiges Protein der Cip/Kip-Familie, spielt eine wichtige Rolle in der Zellzykluskontrolle. Indem es an Cdk2 und weitere Cyclin-abhängige Kinasen bindet und Cdk4/Cyclin-D1-Komplexe stabilisiert, wirkt es stark inhibierend auf Cyclin-E/A-Cdk2-Komplexe, die für den Eintritt und die Progression von der G1- in die S-Phase notwendig sind (Sherr 1993; Grana and Reddy 1995; Morgan 1995; Bartek and Lukas 2001; Kaldis 2007; Tzankov, Went et al. 2007). Zudem kann $p27^{Kip1}$ indirekt über Effektoren wie Caspase-3 Apoptose induzieren (Nickeleit, Zender et al. 2008).

$P27^{Kip1}$ ist eines der am häufigsten deregulierten Zellzyklus-Inhibitoren in menschlichen Tumorzellen, wobei nur selten eine $p27^{Kip1}$ -Deletion, -Genmutation oder ein -Rearrangement vorliegt. Dies spricht dafür, dass (post-)transkriptionale Mechanismen für die erniedrigten Proteinspiegel verantwortlich sind, die eine überschießende Proliferation nach sich ziehen (Loda, Cukor et al. 1997; Philipp-Staheli, Payne et al. 2001; Slotky, Shapira et al. 2005).

1.2.2.2 Der $p27^{Kip1}$-Abbau in gesunden und neoplastischen Zellen

Die physiologische Regulation der $p27^{Kip1}$-Spiegel geschieht transkriptionell, translational (Hengst and Reed 1996), aber insbesondere über den post-transkriptionalen Abbau mithilfe der $SCF^{Skp2/Cks1}$-Ubiquitin-Ligase (Pagano, Tam et al. 1995; Hershko and Ciechanover 1998; Chappuis, Kapusta et al. 2000; Bartek and Lukas 2001; Bornstein, Bloom et al. 2003).

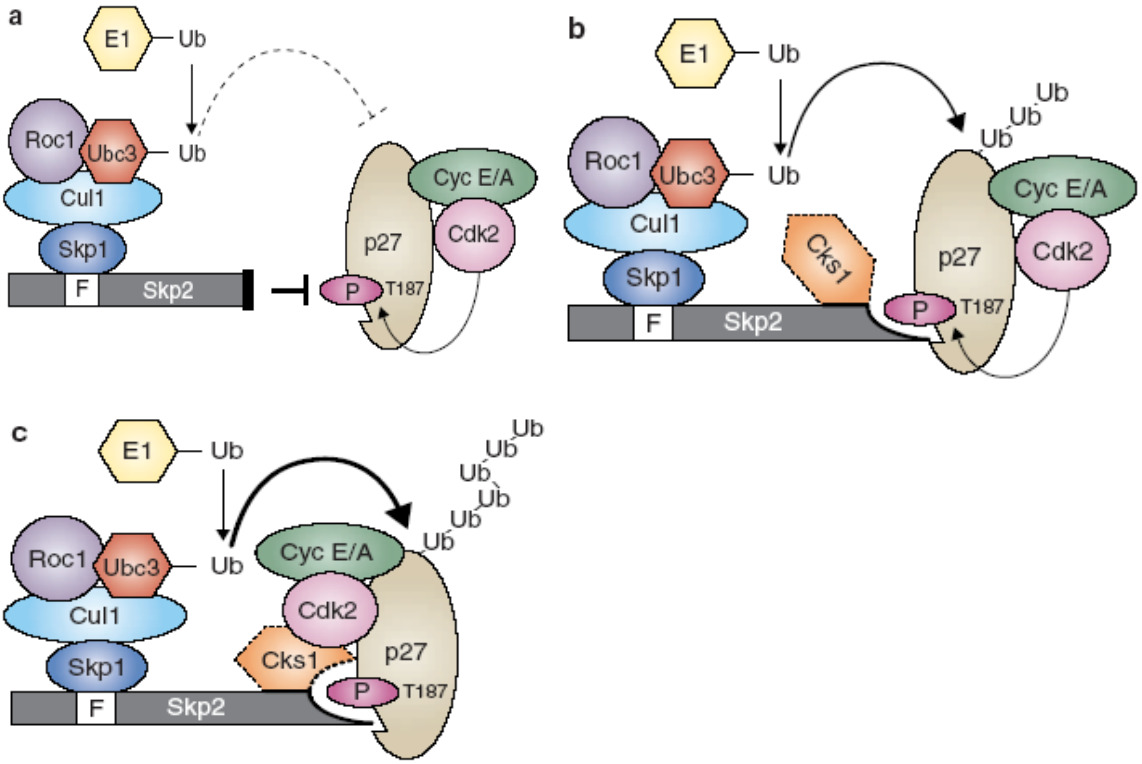
In ruhenden Zellen sind die Spiegel von freiem $p27^{Kip1}$ relativ hoch und führen zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Dieser Arrest fehlt bei gestörtem und erhöhtem Abbau von $p27^{Kip1}$, was direkt mit einem ungünstigen Verlauf und einer schlechteren Überlebensrate bei Patienten mit z. B. Mamma-, Ösophagus-, Bronchial- oder kolorektalem Karzinom einhergeht. Diese aggressiven Tumore zeigen einen vermehrten Abbau von $p27^{Kip1}$ und eine sekundär gesteigerte Proliferationsrate (Esposito, Baldi et al. 1997; Fredersdorf, Burns et al. 1997; Loda, Cukor et al. 1997; Chappuis, Kapusta et al. 2000; Sgambato, Migaldi et al. 2000; Slingerland and Pagano 2000; Hershko and Shapira 2006).

1.2.3 Die $SCF^{Skp2/Cks1}$ –Ubiquitin-Ligase

Der entscheidende Abbau von $p27^{Kip1}$ geschieht über die Ubiquitin-abhängige Degradation durch das Proteasom. Primär wird $p27^{Kip1}$ über die Phosphorylierung an Threonin-187 durch Cyclin-E/A- Cdk2-Komplexe markiert und kann dann während der S-, und G2-Phase des Zellzyklus durch den $SCF^{Skp2/Cks1}$-Ubiquitin-Ligase-Komplex erkannt werden (Tsvetkov, Yeh et al. 1999; Malek, Sundberg et al. 2001). Dieser Komplex enthält

Skp1, Cks1b, Cul1, Rbx1 und Skp2. Hierbei fungiert das F-Box-Protein Skp2 als Adapter, der jedoch erst nach einer allosterischen Konfigurationsänderung, hervorgerufen durch die Bindung von Cks1b an den Komplex, an zuvor phosphoryliertes $p27^{Kip1}$ binden kann (Carrano, Eytan et al. 1999; Sutterluty, Chatelain et al. 1999). Ohne Cks1b ist diese Bindungsfähigkeit deutlich reduziert (Ganoth, Bornstein et al. 2001; Spruck, Strohmaier et al. 2001). Nach Bindung von $p27^{Kip1}$ an Skp2 können daraufhin Ubiquitinketten auf $p27^{Kip1}$ übertragen und dieses dann vom Proteasom erkannt und abgebaut werden (Bartek and Lukas 2001) (s. Abb.3).

Abbildung 3: Die $SCF^{Skp2/Cks1}$ –Ubiquitin-Ligase und ihre Bindung von phosphoryliertem $p27^{Kip1}$ (Bartek and Lukas 2001)



a: *in der Abwesenheit von Cks1b kann die SCF-Ubiquitin-Ligase nicht effektiv an $p27^{Kip1}$, das für seine Bindung an T-187 durch Cyclin-E/A-Cdk2-Komplexe phosphoryliert worden ist, binden.*

b: *Die Bindung von Cks1b an den Komplex ruft eine allosterische Änderung in Skp2 hervor, wodurch phosphoryliertes $p27^{Kip1}$ effektiv gebunden werden kann und Ubiquitin-Reste auf $p27^{Kip1}$ übertragen werden.*

c: *Cks1b induziert eine weitere Stabilisierung der Bindung von $p27^{Kip1}$ an Skp2 durch seine Fähigkeit, Phosphatreste binden zu können.*

1.2.4 Skp2 als Adapterprotein der SCF $^{Skp2/Cks1}$-Ubiquitin-Ligase

1.2.4.1 Skp2 als Proto-Onkogen

Skp2, ein F-box-, Kinase- assoziiertes Protoonkogen, wirkt auf verschiedene Zellzyklus-Regulatoren wie Cyklin-E, Cyclin-D1 und $p27^{Kip1}$ über eine Ubiquitin abhängige Degradation und somit auf die Regulation des Übergangs der G1- zur S-Phase des Zellzyklus. Skp2 fungiert als Adapterprotein der SCF-Ubiquitin-Ligase, über das $p27^{Kip1}$, zuvor an Threonin-187 phosphoryliert, an den Komplex gebunden wird (s. Abb.3) (Carrano, Eytan et al. 1999; Bartek and Lukas 2001; Bornstein, Bloom et al. 2003).

1.2.4.2 Skp2-Expression in DLBCLs

Die Funktion von Skp2 am Abbau von $p27^{Kip1}$ konnte in niedrig-malignen Lymphomen bestätigt werden. Die niedrigen $p27^{Kip1}$-Spiegel gehen außer auf Skp2 auf zusätzliche, weitere deregulierende Faktoren zurück (Lim, Adamson et al. 2002). Nach S. Uddin et al., 2008, findet sich in gut 40% der DLBCLs eine Skp2-Überexpression, die sich invers zu den $p27^{Kip1}$-Proteinspiegeln verhält und mit einer hohen Proliferation, verstärkten Dissemination, zunehmendem Extranodalbefall und einer stärkeren Assoziation mit dem GCB-Typ einhergeht (Lim, Adamson et al. 2002; Uddin, Hussain et al. 2008). In anderen Studien wurde in DLBCLs eine positive Korrelation von Skp2 mit dem Proliferations-Index, jedoch kein Zusammenhang zu $p27^{Kip1}$ gefunden (Lim, Adamson et al. 2002).

Bei Behandlung von DLBCL-Zelllinien mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib oder Skp2-spezifischer siRNA, die eine Downregulation von Skp2 hervorrufen, wird durch Induktion der Apoptose über Mediatoren wie Cytochrom-C und verschiedene Caspasen das Wachstum diffus großzelliger B-Zellen unterdrückt (Uddin, Hussain et al. 2008).

1.2.5 Cks1b als Komponente der SCF$^{Skp2/Cks1}$ –Ubiquitin-Ligase

1.2.5.1 Die Wirkung von Cks1b auf Cdk`s und seine Interaktion mit Skp2

Mitte der 1980er entdeckt, gehört Cks1b zu der hochkonservierten Cks/Suc-Familie an Zellzyklusregulatoren, lokalisiert auf der Chromosomenbande 1q21 (Hadwiger, Wittenberg et al. 1989). Der eigentliche Funktionsort von Cks1b ist die SCF$^{Skp2/Cks1}$-Ubiquitin-Ligase, für die Cks1b einen notwendigen löslichen Faktor darstellt, der in der Interaktion mit Skp2 eine entscheidende Rolle an dem Ubiquitin-abhängigen Abbau von $p27^{Kip1}$ spielt (Ganoth, Bornstein et al. 2001; Harper 2001).
Cks1b bindet und aktiviert zudem Cyclin-abhängige Kinasen (Cdks). Die genaue Rolle der Cks-Proteine im Zellzyklus ist jedoch noch weitgehend ungeklärt (Bartek and Lukas 2001; Uddin, Hussain et al. 2008).

1.2.5.2 Cks1b-Expression in verschiedenen Tumoren

Hoch exprimiertes Cks1b ist in verschiedenen Tumoren wie Mamma-Karzinom, Kolorektalem-Karzinom, Multiplen-Myelom (MM) oder entdifferenzierten Tumoren feststellbar (Masuda, Inoue et al. 2003; Kitajima, Kudo et al. 2004; Shaughnessy 2005; Slotky, Shapira et al. 2005; Hershko and Shapira 2006). Auch in präkanzerösen Eμ-Myc-Lymphomen und in humanen Burkitt-Lymphomen ist eine erhöhte Expression dieser Proteine charakteristisch, wobei der Anstieg auf Transkriptionsebene über erhöhte RNA- und Proteinspiegel erklärt wird. In Zellen von Multiplen Myelomen korrelieren Cks1b mRNA- und Proteinspiegel invers mit den Spiegeln von $p27^{Kip1}$ (Shaughnessy 2005). Eine Erhöhung von Cks1b führt in diesen Zellen zu einem vermehrten Abbau von $p27^{Kip1}$, der nicht durch seinen nahen Verwandten Cks2 erklärt werden kann. C-Myc scheint für die Transkriptionsinduktion auf indirektem Wege ursächlich zu sein (Keller, Old et al. 2007; Uddin, Hussain et al. 2008).

1.2.6 Der c-Myc-Skp2/Cks1-Signaltransduktionsweg und Hinweise für seine Bedeutung in der Tumorentstehung

Für den Zusammenhang von erhöhten c-Myc-, Cks1b- und Skp2-Level und hieraus resultierender, sekundär erniedrigter $p27^{Kip1}$ -Expression gibt es einige Hinweise. Der durch c-Myc induzierte, verstärkte Abbau von $p27^{Kip1}$ erfolgt neben dem transkriptionellen Weg (Yang, Shen et al. 2001) und der Induktion von Cyclin-D2 über die Ubiquitin-abhängige Degradation von $p27^{Kip1}$ durch die SCF-Ubiquitin-Ligase (s. Abb.3, (Bartek and Lukas 2001)). Dies geschieht indirekt über die Beeinflussung der RNA- und Proteinspiegel der Komponenten des SCF-Komplexes, wobei die Effekte von c-Myc auf Cks1b und mäßig auf Skp2, jedoch kaum auf die Spiegel von Cullin1, Skp1 oder Rbx1 erkennbar sind. In Immunoblot-Analysen gehen c-Myc-Translokationen in Eμ-Myc-Mäusen oder Burkitt-Lymphomen mit einer erhöhten Expression von Cks1b und Skp2 als auch erniedrigtem $p27^{Kip1}$ einher (Keller, Old et al. 2007).

Abbildung 4: Immunoblot-Analyse (Cks1, Skp2, p27)

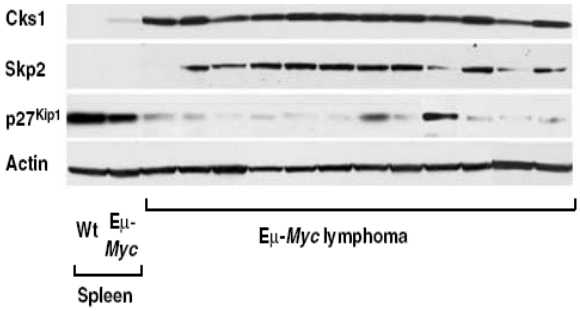


Abb.4: Vergleich der Cks1-, Skp2- und $p27^{Kip1}$ -Expression in gesunden Wildtyp-Zellen der Milz und c-Myc induzierten Lymphomzellen (Keller, Old et al. 2007).

Für eine Induktion von Cks1b und Skp2 durch c-Myc sprechen ebenso die Array-Daten von A. Rosenwald et al. In 177 Fällen mit DLBCL, in denen die mRNA-Expression verschiedener c-Myc-Zielgene, Komponenten des $SCF^{Skp2/Cks1}$-Ubiquitin-Ligase-Komplexes und c-Myc selbst untersucht wurden, erkennt man eine Koexpression von hoher c-Myc- und Cks1b-mRNA (s. Abb.5) (Rosenwald, Wright et al. 2002). In einer kleinen Fallgruppe waren dabei auffallend hohe Skp2-, und insbesondere Cks1b-mRNA-Mengen vorliegend, trotz niedriger cMyc-Expression. Dies lässt auf weitere Mechanismen der Regulation der SCF-Ligase-Komponenten schließen.

Abbildung 5: Zur Verfügung gestellte Array-Daten von A. Rosenwald et al., NEJM 2002 (Rosenwald, Wright et al. 2002)

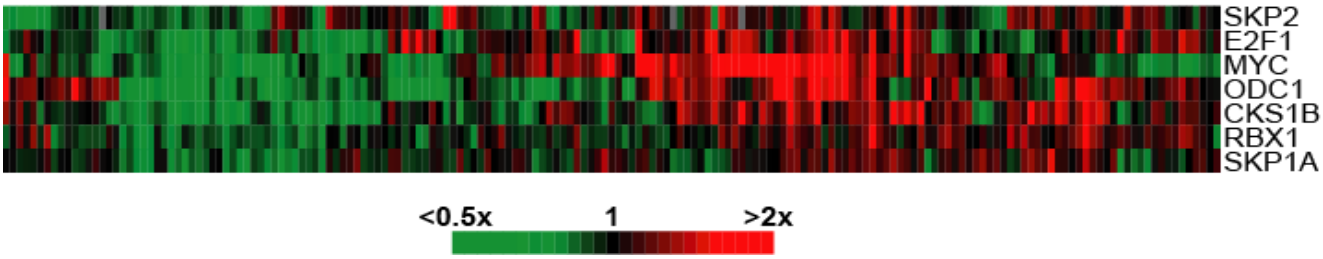


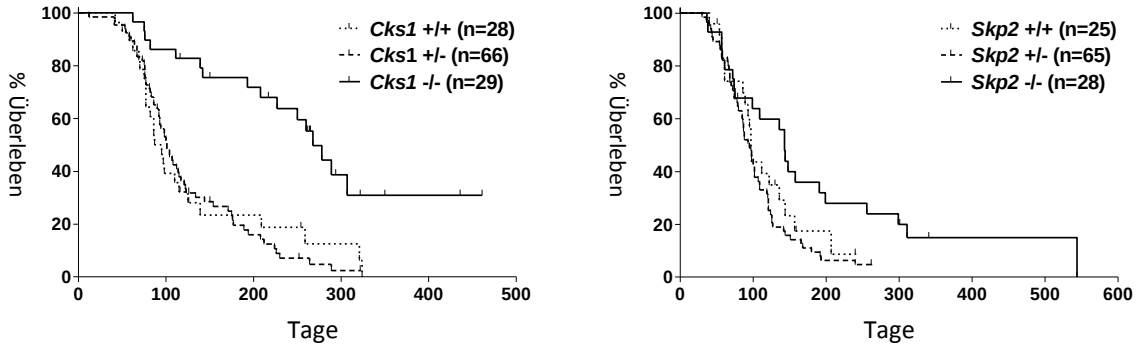
Abb. 5: *mRNA-Expression von c-Myc sowie c-Myc-Zielgenen und Komponenten der SCF-Ubiquitin-Ligase.*

Kann Cks1b wie in Lymphomen bei Cks1 $^{-/-}$-Eμ- Myc-transgenen Mäusen nicht mehr exprimiert werden, so nimmt trotz transloziertem c-Myc die Proliferation, extranodale Dissemination und Lymphom-Entstehung deutlich ab (Keller, Old et al. 2007). Dabei bleibt die intrazelluläre Konzentration von $p27^{Kip1}$ hoch (Fero, Rivkin et al. 1996; Nakayama, Ishida et al. 1996; Spruck, Strohmaier et al. 2001; Meyer and Penn 2008; Uddin, Hussain et al. 2008).

Ein positiver Zusammenhang zwischen c-Myc und den Komponenten Cks1b und Skp2 sowie invers zu $p27^{Kip1}$ ist hiermit auf RNA-Ebene nachweisbar, lässt jedoch bei einer hauptsächlich auf Protein-Ebene stattfindender Regulation von $p27^{Kip1}$ noch keinen Rückschluss auf die effektiven Protein-Spiegel zu (Muller, Bouchard et al. 1997; Herkert and Eilers 2010).

Betrachtet man die Überlebenskurven abhängig von Cks1b- und Skp2-induzierten Genotypen in Eμ-Myc-transgenen Mäusen, so ergeben sich signifikant unterschiedliche Verläufe, wobei die Cks1b- und Skp2- negativen Mäuse die beste Prognose trotz c-Myc-Überexpression besitzen (s. Abb.6) (Keller, Old et al. 2007).

Abbildung 6: Kaplan-Meier-Überlebenskurven von Eu-Myc-transgenen Mäusen und verschiedenen Cks1-und Skp2-Genotypen (Keller, Old et al. 2007)



a. *Überlebenskurven in Eμ-Myc transgenen Mäusen nach Cks1-Genotyp. Bei Cks1-knockout-Mäusen (Cks1$^{-/-}$) zeigte sich ein signifikant verlängertes Überleben (p<0,0001).*

b. *Überlebenskurven in Eμ-Myc transgenen Mäusen nach Skp2-Genotyp. Das Überleben der Skp2$^{-/--}$ Mäuse war durch einen signifikant besseren Verlauf gekennzeichnet (p<0,05)*

2. Fragestellung und Ziele

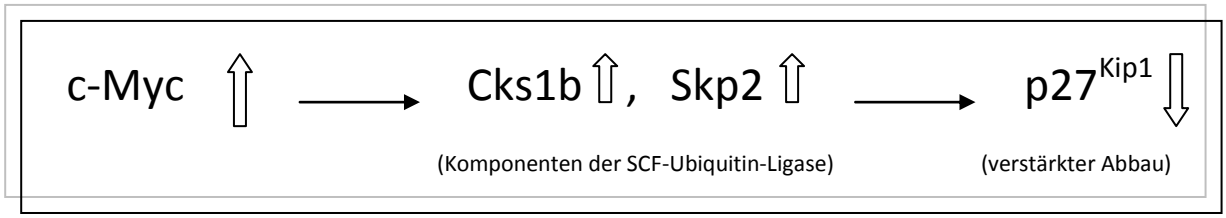
In diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen, charakterisiert durch sehr unterschiedliche Verläufe und Therapieansprechen, sind in den letzten Jahren verschiedenste biologische Marker und Genexpressionsmuster auf deren prognostische Wertigkeit hin untersucht worden. Viele neue Erkenntnisse zeigen jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Die klinische Anwendbarkeit ist dabei dem internationalen prognostischen Index (IPI) als etabliertem klinischen Score unterlegen, wobei dieser hinsichtlich einer Stratifizierung der Patienten für ein unterschiedlich aggressives, therapeutisches Vorgehen nicht ausreichend ist (Rosenwald, Wright et al. 2002; Sehn, Berry et al. 2007).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht der c-Myc-Skp2/Cks1-p27^{Kip1}-Signaltransduktionsweg, wobei insbesondere der Einfluss der SCF-Komponente Cks1b noch weitgehend ungeklärt ist. Durch Bestimmung der Proteinexpression in einer großen Serie von diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen (n=222) wird der mögliche Einfluss von Cks1b auf das Überleben der Patienten mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven nach dem klinischen Verlauf betrachtet. Als vergleichbarer Endpunkt wird das progressionsfreie Überleben (PFS) verwendet. In Korrelationsstudien werden die Zusammenhänge der einzelnen Marker-Expression (c-Myc, Skp2, Cks1b und p27^{Kip1}) untersucht.

Als Material werden in Paraffin fixierte Gewebeproben von Lymphknoten der Patienten mit DLBCL aus drei verschiedenen Zentren (Pathologie des Klinikums rechts der Isar, München; Pathologie des Universitätsspitals Basel, Schweiz; Pathologie des Unispitals Innsbruck, Österreich) verwendet. Durch immunhistochemische Analyse wird die Expression der zellulären Marker bestimmt. Das Vorliegen von c-Myc Amplifikationen und Translokationen wird durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung geklärt.

Nach den Ergebnissen verschiedener Studien (s. Einleitung) wird vermutet, dass der negative prognostische Einfluss von c-Myc in DLBCL auf eine erhöhte Expression der SCF-Komponenten Cks1b und Skp2 zurückzuführen ist, was wiederum sekundär erniedrigte Spiegel von p27^{Kip1} bedingen dürfte. Es ergibt sich die Fragestellung, ob das nukleär lokalisierte Protein Cks1b bei Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom eine prognostische Aussagekraft hinsichtlich des klinischen Verlaufes besitzt und ob sich eine entsprechende Korrelation der Markerexpression des c-Myc-Skp2/Cks1-p27^{Kip1}-Signaltransduktionsweges in menschlichen Gewebeproben bestätigen lässt (s. Abb.7).

Abbildung 7: Hypothese: Zusammenhang von c-Myc, Cks1b, Skp2, p27^{Kip1}



3. Material und Methoden

3.1 Der klinische Verlauf

Die klinischen Akten von 34 Patienten des Klinikums rechts der Isar, München, mit im Zeitraum zwischen 1998 und 2006 diagnostiziertem DLBCL wurden nach folgenden Informationen untersucht: Geschlecht, Geburtsdatum, Erstdiagnose, Diagnosedatum, Alter zum Diagnosezeitpunkt, Stadium der Erkrankung bei Erstdiagnose, Allgemeinzustand, ECOG-Status, LDH, extranodale Manifestationen, IPI, Therapieregime, Therapiebeginn, Therapiezyklen, Remission, Rezidive, ereignisfreies Überleben (EFS), progressionsfreies Überleben (PFS), durchgeführte Therapien, Rezidive, Hochdosis-Therapie, Transplantationsdatum, Todesdatum, Todesursache und der Überlebenszeitraum (OS).

Aufbewahrt werden die Akten im Tumortherapiezentrum, dem Zentralarchiv, den Archiven der hämatoonkologischen Tagesklinik und des Tumortherapiezentrums des Klinikums rechts der Isar. Zudem wurden für die statistische Auswertung die klinischen Daten von 108 Innsbrucker- und 79 Basler-Patienten mit DLBCL, gewonnen und freigestellt von der Pathologie des Universitätsspitals Innsbruck und Basel unter S. Dirnhofer, verwendet.

3.2 Material

3.2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte/Materialien	*Name*	*Firma*
Dampfgarer	Steam Cuisine	TEFAL, Offenbach, Deutschland
4,6-diamino-2-Phenyllindole Dihydrochloride	DAPI	Sigma-Aldrich, Heidelberg, Deutschland
Deckblatt	Automat Star	
Ethanol	Ethanol absolut zur Analyse	Merck, Darmstadt
Gefrierschrank		Siemens
Hämalaun	Saures Hämalaun nach Mayer	Apotheke Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
Kühlschrank	Santo	AEG,Nürnberg, Deutschland
Mikroskop	OLYMPUS BH-2	OLYMPUS, Japan

Objektträger	Menzel Gläser SUPERFROST	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Paraffin Tape Transfer System Adhesive caated slides	Paraffin Tape Transfer System Adhesive caated slides	Medite, Burgdorf, Deutschland
Pipetboy	accu-jet ® pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetten	FALCON	Becton Dickinson Labware, USA
Proteinase K 0,1%		Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tischshaker	MS1 Minishaker IKA	IKA GmBH, Staufen, Deutschland
Tissue Arrayer	Manual Tissue Arrayer (MTA1)	Beecher Instruments, Sun Prairie, USA

3.2.2 Reagenzien und Kits

Tabelle 6: Reagenzien und Kits

Avidin/ Biotin Blocking Kit	Linaris Biologische Produkte
	Vector Laboratories, Inc
DAKO REAL™ Detection System;	DAKO, Dänemark
Peroxidase/ DAB+, Rabbit/ Mouse	
Bottle A: Link, Biotinylated secondary antibodies	
Bottle B: Streptavidin Peroxidase	
Bottle C: DAB (Diaminobenzidin) und Chromogen	
Bottle D: HRP Substrat Puffer	
Ethanol absolute zur Analyse	Merck, Darmstadt, Deutschland
GOAT Serum (DAKO REAL Antibody Dilutent)	DAKO, Dänemark
Platinum Bright 550 und 495	Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Niederlande
Wasserstoffperoxid 30% H_2O_2	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

3.2.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Puffer und Lösungen

Puffer	*Reagenzien*
Citratpuffer pH 6,0	18ml (0,1M Citronensäure ($C_6H_8O_7H_2O$) = 21,01g Citronensäure,1l Aqua dest.)+ 82ml(0,1M Trinatriumdihydrat ($C_6H_5Na_3O_7H_2O$)= 29,41 Trinatriumdihydrat +1l Aqua dest.)+900ml a.d.
c-Myc Sonde	7µl Puffer, 2µl a.d., 1µl Sonde
DAPI Gebrauchslösung	15µl DAPI Stammlösung (1mg Dapi= Diamidino-2-Phenylinole) +1ml Aqua dest.+ 100ml 2XSSC
EDTA pH 8,0	
TRIS Puffer	60,5g TRIZMA Base, 700ml a.d., 2N HCL (pH 7,6), 90g NaCl
Paraformaldehyd 4%	2g Paraformaldehyd +50ml Sörensenpuffer
PBS Stammlösung pH 7,0	78,5g Natriumchlorid + 2,25g Kaliumchlorid + 14,2g DI-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na_2HPO_4) + 2g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)in 900ml a.d.,mit KOH auf pH 7,0 einstellen Gebrauchslösung: 100ml Stammlösung +900ml A.d.
Pronase E 0,05%	25mg Pronase E in 50ml PBS
Sörensenpuffer pH 7,0	30,6ml Na_2HPO + 19,4ml KH_2PO
SSC (20fach) pH 6,7	66g SSC Pulver (Kit)+ 250 ml A.d.
70% Formamid/2xSSC	35ml Formamid+ 5ml 20xSSC+ 10ml A.d.
2xSSC/0,3% NP40	5ml 20xSSC +42,4ml ad+ 150µl NP40

3.2.4 Antikörper

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

Antikörper	Isotyp	Spezies	Firma
Anti-Bcl2	IgG1	Maus	Dako, Hamburg, Deutschland
Anti-Cd10	IgG1	Maus	Novocastra, Newcastle, UK
Anti-c-Myc Klon 9E10	IgG1	Maus	SIGMA-ALDRICH, Saint Louis,Missouri,USA
Anti-Cks1* monoclonal Klon 4G12G7	IgG1	Maus	ZYMED^{R} Laboratories, Carlsbad, CA, USA
Anti-Cks1* monoklonal	IgG	Kaninchen	ZYMED^{R} Laboratories, Carlsbad, CA, USA
Anti-Cks1B MaxPab(B01), polyklonal	IgG	Maus	Abnova Corporation, Walnut, CA, USA
Anti-Cks1B* monoclonal Klon 3G8	IgG1	Maus	SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, Missouri, USA
Anti-Mib	IgG1	Maus	Dako, Hamburg, Deutschland
Anti-Mum1	IgG1	Maus	Dako, Hamburg, Deutschland
Anti-Odc monoclonal Klon ODC-29	IgG2b	Maus	SIGMA-ALDRICH, Saint Louis,Missouri,USA
Anti-p27	IgG1	Maus	Santa Cruz, CA, USA
Anti-Skp2 Klon 2C8D9	IgG1	Maus	ZYMED^{R} Laboratories, Carlsbad, CA, USA

**getestet, aber nicht verwendet*

3.2.5 Patientenproben

Aus 34 in Formalin-fixierten und Paraffin-gebetteten Gewebeproben von diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen aus dem Archiv der Pathologie des Klinikums rechts der Isar wurde ein tissue-microarray (TMA) hergestellt und für die folgenden immunhistochemischen Färbungen verwendet. Die Diagnose der DLBCLs erfolgte zwischen 1998 und 2006 gemäß WHO-Kriterien. Zudem wurden zwei tissue-microarrays mit 187 auswertbaren DLBCL-Fällen aus Basel und Innsbruck in die Studie mit eingeschlossen.

3.3 Methodik

3.3.1 Die Herstellung von tissue-microarrays (TMA)

Für die Herstellung des TMAs wurde auf den Paraffinblöcken mit diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen an jeweils zwei morphologisch repräsentativen Tumorstellen ein Gewebezylinder von einem Durchmesser 1,0 mm mithilfe des tissue-arrayer, Beecher Instruments, gestanzt und in einem frischen Paraffinblock entsprechend Tabelle 3.3.3 angeordnet. Als positive Kontrolle und zur Übersichtlichkeit wurden Stanzen von Tonsillen zwischen je zwei Fälle (entsprechend vier Zylindern) gesetzt. Die fertigen TMAs aus Basel und Innsbruck enthielten Gewebezylinder mit einem Core-Durchmesser von 0,5mm ohne zwischengestellte Tonsillen.

3.3.2 Das Anfertigen von Schnitten

Aus den TMAs wurden mit einem Standard-Microtom 4µm dicke Schnitte hergestellt. Mithilfe von klebe-beschichteten Glasplättchen (transfer-typ) konnte ein Gewebeverlust vermieden werden. Nach einer Trockenzeit von mindestens zwei Tagen konnten die Schnitte für die Immunhistochemie verwendet werden.

3.3.3 Die immunhistochemische Färbung (IHC)

Dem Protokoll entsprechend wurden die Schnitte der TMAs aus München, Innsbruck und Basel nach Entparaffinierung in absteigender Ethanol-Reihe für 30 Minuten im Dampfgarer, von 0,1M Citratpuffer (pH 6,0) umgeben, erhitzt. Nach Hersteller-Angaben erfolgte daraufhin die Anwendung der Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Technik (Vectastain). Die Schnitte wurden aufbereitet und eine Stunde mit den monoklonalen Primärantikörpern belassen. Diese waren gegen Mib, Mum1, Bcl2, Cd10, c-Myc, Odc, $p27^{Kip1}$, Cks1 und Skp2 gerichtet. Die Gegenfärbung erfolgte mit Chemate LSAB-DAB Zweitantikörper und Komplex (DAKO) als auch des DAB Immunoperoxidase-Detektions-Kit als Chromogen. Nach einer Minute in Hämalaun wurden die Schnitte in aufsteigender Ethanol-Reihe gereinigt und mit einem Pertex-fixierten Deckblatt versehen. Zeitgleich wurden jeweils spezifische positiv (s. Tab. 9) und negativ Kontrollen nach demselben Protokoll behandelt.

Die Objektträger mit den TMAs aus Innsbruck und Basel (Paraffin-Tape-Transfer System Adhesive-cated-slides [Medite]), wurden aufgrund eines zusätzlichen Klebestreifens vor der identisch durchgeführten IHC für mindestens 7 Stunden in Xylol belassen.

3.3.3.1 IHC der einzelnen Antikörper

Die Immunhistochemie von Mib, Mum1, Cd10, p27 und Bcl2 erfolgte nach standardisierten, vorbekannten Verdünnungsverhältnissen in der Pathologie des Klinikums rechts der Isar. Die Verdünnungen und Färbemuster sind in der Tabelle 10 aufgeführt.

Das optimale Verdünnungsverhältnis der Antikörper gegen Skp2, Cks1b, c-Myc und Odc wurde mithilfe von positiven Kontrollen (s.Tab.9) ermittelt. Für c-Myc und Odc wurden Schnitte von Burkitt-Lymphomen, bei Odc zusätzlich auch von Kolon-Karzinom-Zellen, für Skp2 ein TMA mit Her2neu-Fällen und für Cks1b Tonsillen und HeLa-Zellen verwendet. Die differenzierteste Graduierung und Auswertbarkeit wurde bei c-Myc in einer Verdünnung 1:5000, bei Skp2 1:30, bei Cks1b 1:100 und bei Odc in einer Verdünnung 1:700 erreicht.

Tabelle 9: Antikörper und positiv Kontrollen

Antikörper	*Positiv Kontrolle*
Cks1b	Tonsille, HeLa-Zellen
c-Myc	Burkitt-Lymphom
Odc	Burkitt-Lymphom, Colon-CA
Skp2	Her2neu

Tabelle 10: Antikörpereigenschaften und Verdünnungsverhältnis

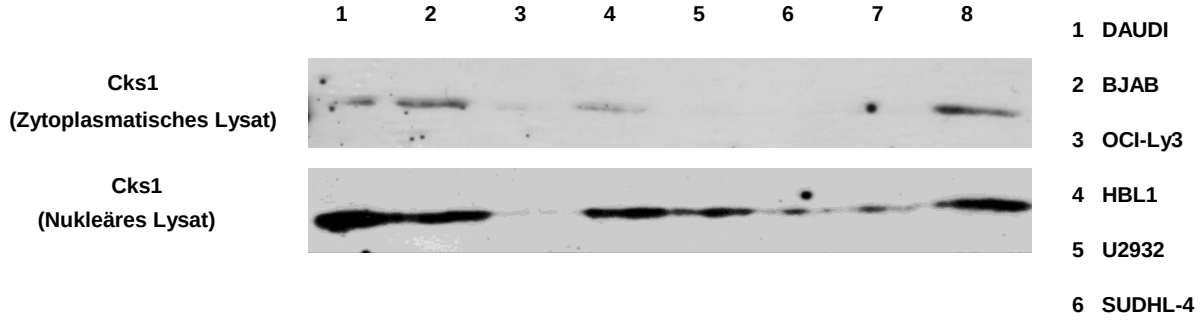
AK	*Verdünnung*	*Färbungsmuster*	*Modell*
MIB	1:100	Nukleär	DAKO
Mum1	1:50	Nukleär	DAKO
Bcl2	1:50	Cytoplasmatisch	DAKO
CD10	1:10	Membranös	Novocastra
P27	1:10	Nukleär, cytoplasmatisch	Santa Cruz
Skp2	1:30	Nukleär	ZYMED
Cks1	1:100	Nukleär	Abnova
C-Myc	1:5000	Nukleär	SIGMA-Aldrich
Odc	1: 700	Cytoplasmatisch	SIGMA-Aldrich

3.3.3.2 Testung kommerzieller Cks1b-Antikörper für die IHC

Cks1b führt seine Funktionen hauptsächlich oder sogar komplett im Zellkern aus. Zur Lokalisationsbestimmung von Cks1b wurden aus verschiedenen Zelllinien mit DLBCL cytoplasmatische und nukleäre Zelllysate im Labor der Hämatoonkologie des Klinikums

rechts der Isar gewonnen und analysiert. Abb.8 zeigt die hauptsächlich nukleäre Lokalisation von Cks1b sowohl in Burkitt-Lymphom- (DAUDI, BJAB) als auch DLBCL-Zelllinien (OCI-Ly3, HBL1, U2932, SUDHL-4) in einem Bereich von 10kDa. In der Immunoblot-Analyse wurde in den Zelllinien mit Burkitt-Lymphom (1, 2) und DLBCL (3-8) die Cks1b-Expression in 40µg cytoplasmatischem und in 40µg nukleärem Zelllysat gegenübergestellt. Hierbei bestätigte sich die primäre Lokalisation von Cks1b im Zellkern. Eine unspezifische Bande bei 25kDa in der cytoplasmatischen Fraktion trat hierbei ebenso auf, die mitunter für die Probleme unspezifischer Reaktionen bestimmter Antikörper in der Immunhistochemie ursächlich sein könnte. Es ist nicht sicher, ob Cks1b nicht zusätzlich auch zytoplasmatische Funktionen besitzt. Für seine Funktion im SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplex, verantwortlich für den Abbau von $p27^{Kip1}$, ist jedoch die nukleäre Expression entscheidend.

Abbildung 8: Immunoblot-Analyse von Cks1b in BL- und DLBCL- Zelllinien



Bei der Austestung der Cks1b-Antikörper konnte aus vier verschiedenen Antikörpern nur mit dem Cks1b-MaxPab-Maus-Antikörper von Abnova eine aussagekräftige nukleäre Positivität erreicht werden.

3.3.4 Auswertung der immunhistochemisch behandelten tissue-microarrays (TMAs)

Nach immunhistochemischer Färbung der tissue-microarrays mit den Antikörpern gegen MIB, Bcl-2, CD10, MUM1, p27, Cks1, Skp2, ODC und c-Myc wurde der prozentuale Anteil der positiven Fälle je nach Färbungsverhalten ausgezählt. Dies geschah pro Fall an je drei unterschiedlichen, tumorrepräsentativen Stellen beider Zylinder mithilfe einer Zählhilfe unter dem Mikroskop, in einer Vergrößerung 1:200. Durch mehrmaliges Durchgehen zweier unabhängiger Prüfer wurde die Reliabilität der Ergebnisse weiter gesichert.

Abbildung 9: TMA der Münchner DLBCL Fälle

Tonsille	**Tonsille**											
A1	A2	A3	A4	Tonsille	A6	A7	A8	A9	Tonsille	A11	A12	Tonsille
B1	B2	B3	B4	Tonsille	B6	B7	B8	B9	Tonsille	B11	B12	Tonsille
C1	C2	C3	C4	Tonsille	C6	C7	C8	C9	Tonsille	C11	C12	Tonsille
D1	D2	D3	D4	Tonsille	D6	D7	D8	D9	Tonsille	D11	D12	Tonsille
E1	E2	E3	E4	Tonsille	E6	E7	E8	E9	Tonsille	E11	E12	Tonsille
F1	F2	F3	F4	Tonsille	F6	F7	F8	F9	Tonsille	F11	F12	Tonsille
G1	G2	G3	G4	Tonsille	G6	G7	G8	G9	Tonsille	G11	G12	Tonsille
H1	H2	H3	H4	Tonsille	H6	H7	H8	H9	Tonsille			
Tonsille	Tonsille											

3.3.5 Die Fluoreszenz-in-situ-Hybidisierung zur Bestimmung von c-Myc-Translokationen und -Amplifikationen

Für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurden zweifarbige Aurka und Aurkb Proben, PlatinumBright550 und PlatinumBright495 (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Niederlande), verwendet. 8 µm dicke Paraffin-Schnitte wurden nach Entparaffinierung mit 0,1%iger Proteinase K (Invitrogen) für 15-18 Minuten bei 37°C vorbehandelt. Die Proben wurden in 0,1% NP-40/2×SSC ausgehärtet und die DNA durch Behandlung in 70%igem Formamide/2×SSC denaturiert. Nach Dehydration wurden die Schnitte mit 8µl der Aurka/b Proben über Nacht bei 37°C hybridisiert und gewaschen. Die Zellkerne wurden mit 4,6-diamino-2-Phenylindole Dihydrochloride (DAPI, Sigma-Aldrich, Heidelberg, Deutschland) gegengefärbt. Die Analyse der FISH erfolgte mit einem Fluoreszenz-Mikroskop, ausgestattet mit einem dreifachem Bandfilter Set. In morphologisch intakten und nicht-überlappenden Zellkernen wurden die Signale von Hand (×100 Öl-Immersions Objektiv) in dreimal je 100 Zellen pro Gewebestanze ausgezählt (s. FISH Protokoll im Anhang).

3.3.6 Statistische Analyse

Die statistische Datenanalyse erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie des Klinikums rechts der Isar, Tibor Schuster, und wurde mit Hilfe von Excel 2007 (Microsoft), der Software R – version 2.7.2 (Ref: Development Core Team (2008). A language and environment for statistical computing. Ref: Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0) und dem Programm SPSS 15 (SPSS Inc. Chicage, Illinois, USA) durchgeführt. Als statistisch

signifikant wurden zweiseitig ermittelte p-Werte kleiner 0,05 gewertet. Es wurden Kaplan-Meier-Kurven, Korrelationsstudien und Boxplot-Analysen erstellt. Hierfür wurde zudem das Programm „Graph Pad Prism, Version 5.01“ (Graph Pad Software Inc.), verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Die klinischen Merkmale der untersuchten Patienten

Von den 222 Patienten mit DLBCL, 34 diagnostiziert und behandelt im Klinikum rechts der Isar, München, 108 im Unispital Innsbruck und 79 im Unispital Basel, wurden retrospektiv folgende klinische Daten erfasst, wobei bei den externen Patienten die nicht erhältlichen klinischen Daten unter „unbekannt“ aufgeführt werden:

Tabelle 11: Patienten Charakteristik

Alter: 18-93

		n	%
Geschlecht	Weiblich	98	44%
	Männlich	104	47%
	unbekannt	20	9%
Diagnose	primär DLBCL	206	93%
	Transformation	13	6%
	unbekannt	3	1%
Subtyp	GCB-Typ	106	48%
	Non-GCB-Typ	115	52%
	Unbekannt	1	<1%
Stadium bei ED	I	16	8%
	II	36	18%
	III	19	10%
	IV	29	14%
	Unbekannt	102	50%
IPI	0	3	1%
	1	37	17%
	2	26	12%
	3	31	14%
	4	20	9%
	5	3	1%

	Unbekannt	102	46%
B-Symptome	Vorhanden	56	25%
	nicht vorhanden	52	24%
	Unbekannt	114	51%
LDH	Normal	59	27%
	Erhöht	51	23%
	Unbekannt	112	50%
Extranodalbefall	0-2	180	81%
	Multipel	29	13%
	Unbekannt	13	6%
Therapie	CHOP	102	46%
	R-CHOP	13	6%
	Radiatio	4	2%
	unbekannt	103	46%
Therapieversagen	Nein	70	31%
	Ja	99	45%
	Unbekannt	53	24%
Todesereignis	Nein	61	27%
	Ja	113	51%
	Unbekannt	48	22%

In über 90% (n=208) der Patienten wurde ein primäres DLBCL diagnostiziert, in 13 Fällen entwickelte es sich über Transformation aus follikulärem Lymphom oder chronisch lymphatischer Leukämie. Die Geschlechter waren fast gleichstark vertreten (51% männlich, 49% weiblich) bei einem mittleren Alter von 63 Jahren zum Diagnose-Zeitpunkt, wobei die Spannweite zwischen 18 und 93 Jahren lag.

Hinsichtlich angewandter Therapieschemata und Ansprechen wurde bei vorliegenden Kenntnissen in mehr als 90% das CHOP- Regime angewandt, in mindestens 11% mit dem zusätzlichen Einsatz von Rituximab. In 30% kam es durch die Therapie zu einer vollständigen Heilung ohne Auftreten von Rückfällen. Das mittlere progressionsfreie Überleben aller Patienten lag bei 37 Monaten, wobei fast 40% der Patienten im Langzeit-Verlauf einem krankheitsbezogenen Tod erlagen. In 20% der Fälle lagen keine Daten zum

Todesereignis bzw. der Ursache vor. Diese Fälle waren für die Erstellung von Kaplan-Meier-Überlebenskurven nicht verwendbar.

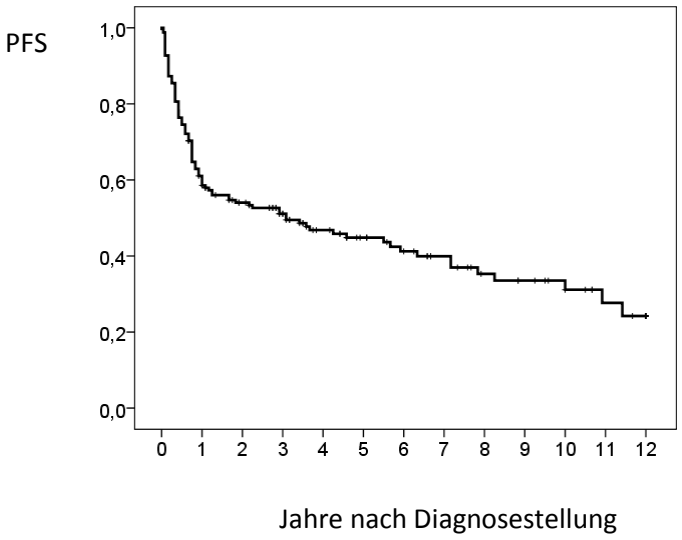
106 der Patienten konnten nach der Hans-Klassifikation (Hans, Weisenburger et al. 2004) dem GCB-Typ, 115 dem Non-GCB-Typ zugeordnet werden. Waren Daten zum Extranodalbefall vorliegend, betraf dieser in über 80% der Patienten 0-2 Lokalisationen, in 13% bestand ein multilokulärer Befall.

4.1.1 Das mittlere progressionsfreie Überleben aller Patienten

Die Gesamtheit der untersuchten Patienten zeigte ein mittleres progressionsfreies Überleben von 37 Monaten. Hierbei trat in 95% der Fälle ein Ereignis wie Rezidiv, Progress oder Tod in einem Zeitraum zwischen 8,9 und 65,1 Monaten nach Erstdiagnose auf. Nach einem Jahr war in 59% +/- 3,8% des Gesamtkollektivs noch keinerlei Ereignis aufgetreten. Das 5-Jahres-PFS aller Patienten betrug 45% und bewegte sich innerhalb eines 95-prozentigen Koinfidenzintervalles (CI) von 37% bis 54%.

Die vollständigen Daten zu dem (progressionsfreien) Überleben als auch der zellulären Expression von Cks1b, c-Myc, Skp2 und $p27^{Kip1}$ waren in 163 Fällen vorliegend. Dieser Anteil der Patienten wurde für die statistische Analyse mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven auf einen Zusammenhang zwischen der Proteinexpression von Cks1b und dem klinischen Verlauf hin untersucht.

Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve: PFS aller Patienten, n= 163



4.1.2 Die prognostische Aussagekraft nach IPI-Score

Bei 130 Patienten war bei Kenntnis der Parameter des klinisch prognostischen Scores, IPI, der Verlauf hinsichtlich des PFS vergleichbar. Es zeigten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich des PFS zwischen den verschiedenen Risikogruppen (p<0,0001, chi square log-rank [Mantel-Cox]= 30,69). Die mittlere Zeit bis zum Eintreten einer Krankheitsprogression lag bei niedrigem Risikoprofil (IPI 1/0) bei 99 Monaten, bei mittlerem Risiko (IPI=2) bei 14 Monaten, bei IPI=3 bei 10 Monaten und bei einem hohen oder höchstem Risiko (IPI 4/5) bei nur durchschnittlich 4 Monaten progressionsfreiem Überleben.

Abbildung 11: PFS nach IPI der Patienten aus Innsbruck und München.

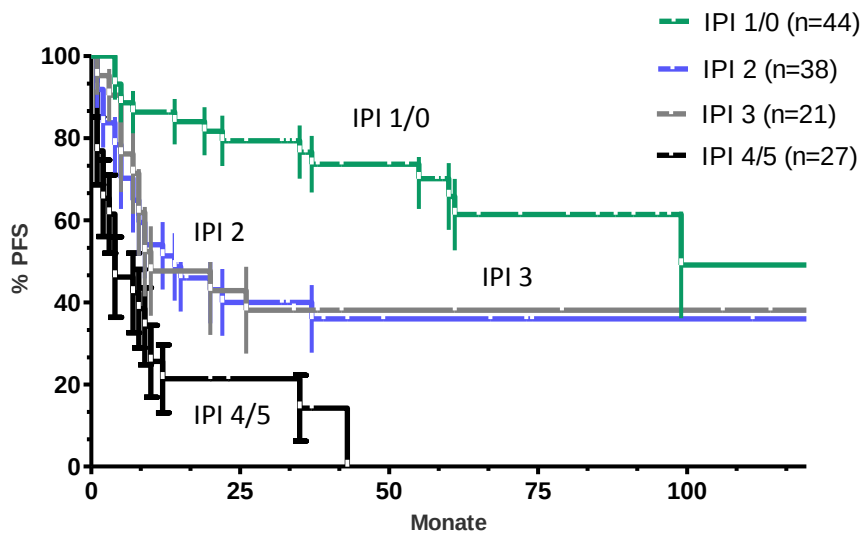


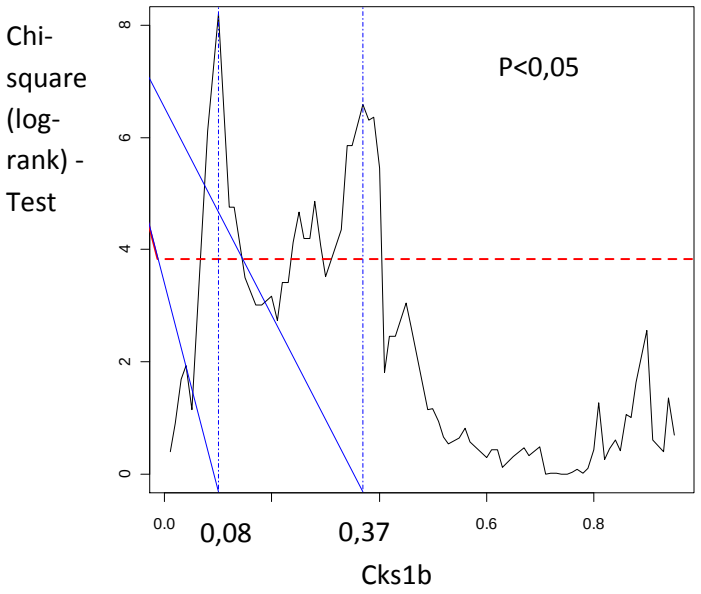
Abb. 11: *Das mittlere progressionsfreie Überleben der Patienten mit IPI=0 oder 1 lag bei 99 Monaten, mit IPI=2 bei 14 Monaten, mit IPI=3 bei 10 Monaten und mit IPI=4 oder 5 bei nur noch 4 Monaten. P< 0,0001*

4.2 Festlegung der cut-off-Werte von Cks1b, Skp2 und p27^{Kip1} nach log-rank-Testung

Für Cks1b ließen sich mithilfe des statistischen Chi-Quadrat-Test (log-rank-Test) zwei verschiedene, signifikante Grenzwerte ermitteln. Betrachtet wurden die progressionsfreien Verläufe negativer im Gegensatz zu positiver Cks1b-Expression bei Einteilung der Patienten nach den Cks1b-Grenzwerten 0,08 und 0,37 (Referenz: Development Core Team (2008). A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL

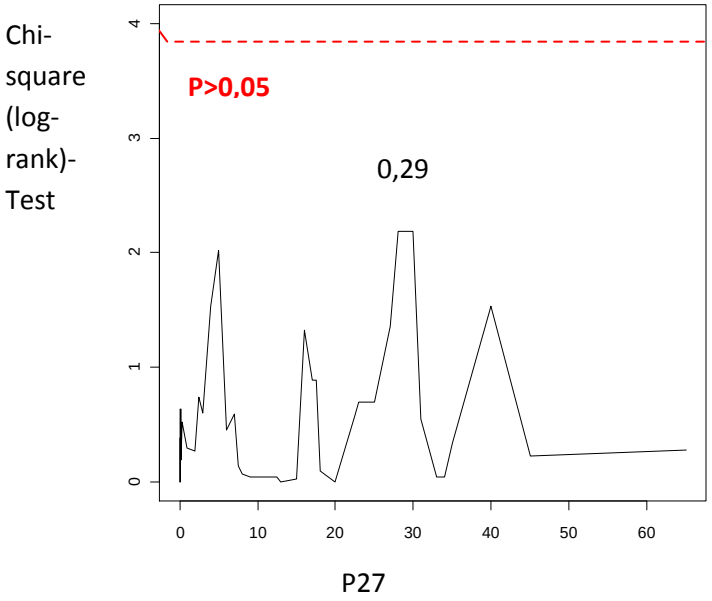
http://www.R-project.org. In Zusammenarbeit mit Tibor Schuster, Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie).

Abbildung 12: Signifikante Cks1b-cut-off-Werte bei 0,08 und 0,37. P<0,05



Für p27^{Kip1} war nach Chi-Quadrat-Testung (log rank Mantel Cox) kein signifikanter cut-off-Wert evaluierbar (p>0,05). Viele ähnlich hohe Peaks lagen unterhalb des signifikanten Niveaus. Für die Betrachtung der p27^{Kip1}-Protein-Expression hinsichtlich des PFS mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven wurde der Wert 0,29 als Grenzwert festgelegt, der einen, wenn auch nicht signifikanten, Trend im klinischen Verlauf bei niedriger versus hoher p27^{Kip1} -Expression aufzeigte.

Abbildung 13: p27^{Kip1}: möglicher, jedoch nicht signifikanter cut-off-Wert bei 0,29. P>0,05



4.3 Die Expression der Komponenten des SCF-c-Myc- Skp2/Cks1-p27^{Kip1} -Signaltransduktionsweges

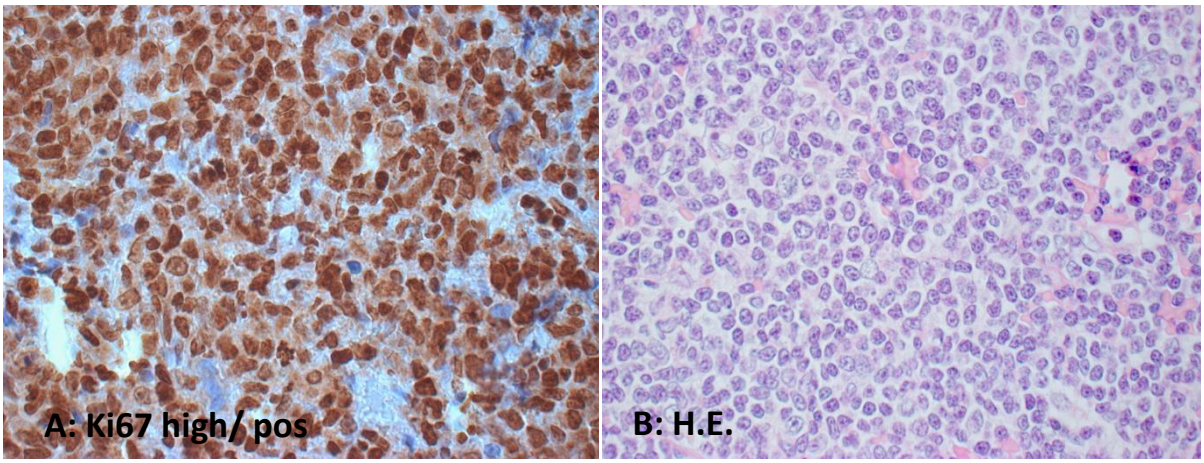
4.3.1 Immunhistochemische Detektion der Markerexpression

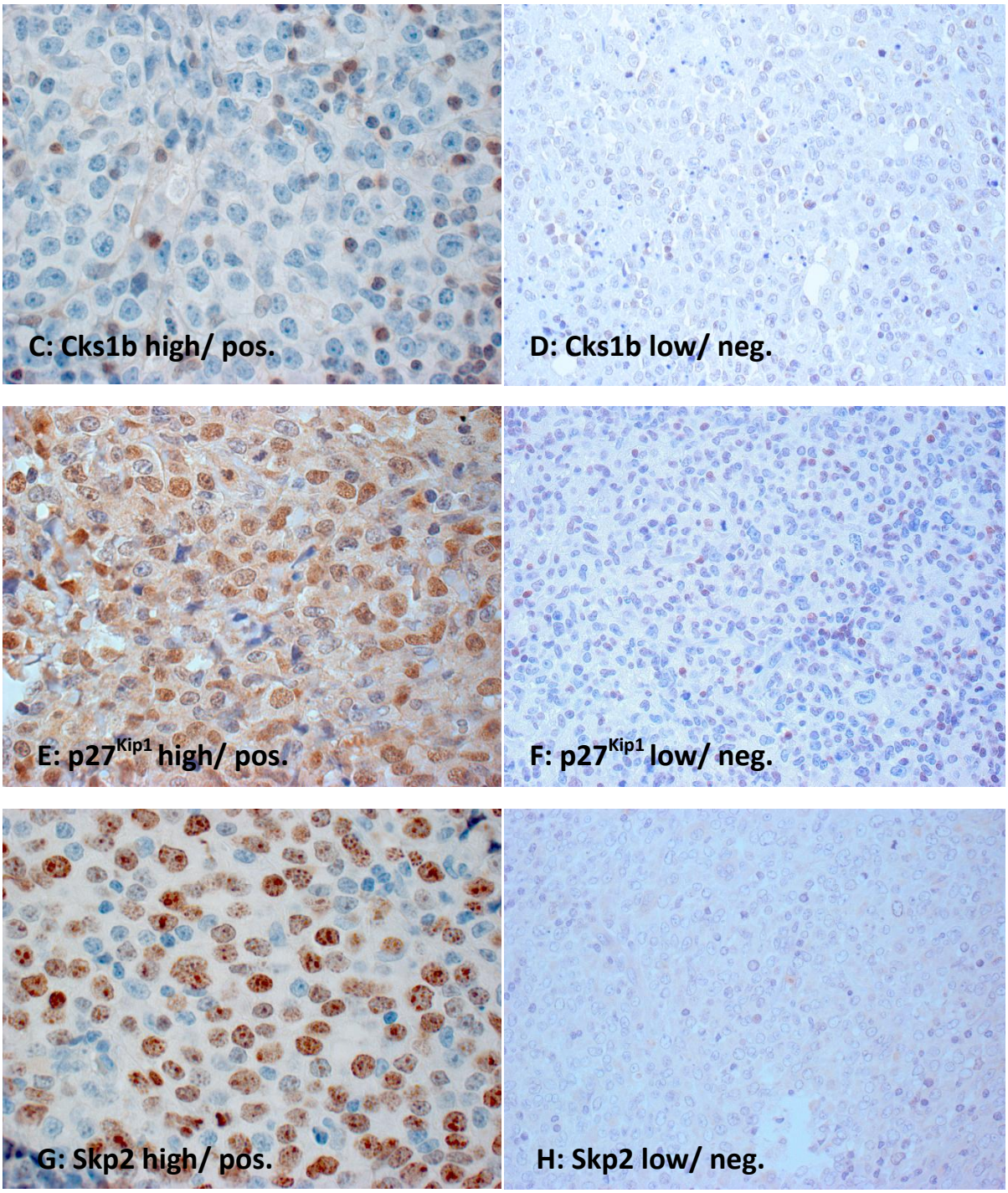
Nach immunhistochemischer Färbung waren für p27^{Kip1} in n=208, für Skp2 in n=206, für Cks1b in n=216, und für c-Myc in n= 206 klare Positivitäten bestimmbar. Durch die FISH-Analyse wurde das Vorliegen von c-Myc-Translokationen und -Amplifikationen bestimmt.

115 Fälle der 222 Patienten konnten nach der Hans-Klassifikation (Hans, Weisenburger et al. 2004) dem Non-GCB-Typ, 106 Fälle dem GCB-Typ zugeordnet werden (s. 1.1.6.1). Diese beiden Untergruppen zeigten eine vergleichbare Expressionsrate von p27^{Kip1} (9,5% vs. 9,8%). Der Anteil an c-Myc-Translokationen lag bei GC-DLBCL bei 19% (n=3) der Fälle, in der Gruppe der Non-GC-DLBCL bei 3% (n=3). Amplifikationen waren beim GCB-Typ in 11% vs. 4% bei den Non-GCB-Fällen vorliegend. Die Proliferationsaktivität wurde durch Ki67 bestimmt, wobei sich der Anteil positiver Zellen hierbei zwischen 30% und 80% bewegte, und der GCB-Typ im Mittel durch höhere Werte charakterisiert war. So lag bei hier die mittlere Ki67-Expression bei 70%, beim Non-GCB-Typ hingegen nur bei 53%.

Bezüglich der Expression von Cks1b fand sich bei Einteilung der Patienten nach dem cut-off-Wert 0,37 in 67,3% des GCB-Typs und in 71,7% des Non-GCB-Typs eine erhöhte Expression. Eine mehr als 50%ige Expression an Skp2 war in 51,4% der GCB-Fälle und in 47,8% der Non-GCB Fälle vorliegend.

Abbildung 14: IHC von Ki67, Cks1b, Skp2 und p27^{Kip1} mit negativer (blauer) und positiver (brauner) Protein-Expression





A: Ki67 pos. B: H.E. C: Cks1b pos. D. Cks1b neg.

E: $p27^{Kip1}$ pos. F: $p27^{Kip1}$ neg. G: Skp2 pos. H: Skp2 neg.

Abb.14: *200-fache mikroskopische Vergrößerung. Zellen hoher Marker-Expression stellen sich braun dar. Zellen mit geringer oder fehlender Protein-Expression zeigen sich, vergleichbar der H.E. Färbung, blau. Es stehen sich DLBCL-Schnitte mit jeweils hoher im Gegensatz zu niedriger Expression der Marker Cks1b (C vs. D), $p27^{Kip1}$ (E vs. F) und Skp2 (G vs. H) gegenüber.*

Hinsichtlich der Marker-Expression des c-Myc- Skp2/Cks1-p27^{Kip1-} Signaltransduktionsweges fanden sich somit nach Aufteilung der Patienten in GCB- und Non-GCB-Typ (nach Hans-Klassifikation) keine signifikanten Unterschiede bei der Bestimmung von Cks1b, Skp2 und p27^{Kip1} (s.Tab. 12).

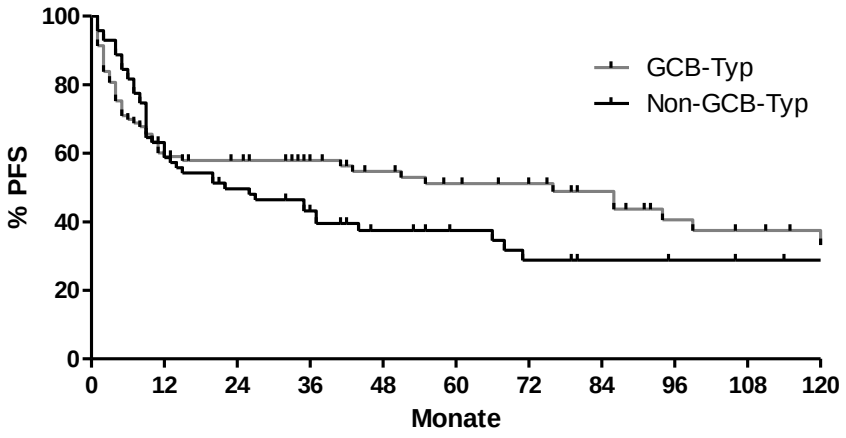
Tabelle 12: Gen-Expression nach GCB- versus Non-GCB-Typ des untersuchten Patienten-Kollektivs

	GCB-Typ (n=106)	Non-GCB-Typ (n=115)
Mittleres Alter bei ED (J)	**62**	**63**
Medianes PFS	**76 Monate**	**22 Monate**
C-Myc Translokationen	**3 (19%)**	**3 (3%)**
C-Myc Amplifikationen	**12 (11%)**	**5 (4%)**
Mittlere Expression von p27	**9,5%**	**9,8%**
Mittlere Expression von Ki67	**70%**	**53%**
Cks1b <0,37	**34 (32,7%)**	**32 (28,3%)**
Cks1b >0,37	**70 (67,3%)**	**81 (71,7%)**
Skp2 <0,5	**51 (48,6%)**	**59 (52,2%)**
Skp2 >0,5	**54 (51,4%)**	**54 (47,8%)**

Vergleicht man das progressionsfreie Überleben (s. Abb. 15), so ist die Prognose des GCB-Typs mit einem medianen PFS von 76 Monaten deutlich besser als diejenige des Non-GCB-Typs mit einem PFS von 22 Monaten. Dennoch ist der Unterschied der Kaplan-Meier-Kurven bezüglich des PFS mit einem p= 0,4647 (log-rank Mantel Cox Test) im untersuchten Kollektiv nicht signifikant.

Die Patienten mit Non-GCB-Typ weisen eine höhere Rate an Therapieversagen (63% vs. 55% beim GC-Typ) und eine negativere klinische Prognose auf, wobei die Proliferationsaktivität, gemessen an der Ki67-Expression, im Durchschnitt niedriger als bei den GCB-Fällen liegt (53% vs. 70% des GC-Typs).

Abbildung 15: PFS nach GCB- versus Non-GCB-Typ, p=0,4647 (Graph Pad Prism 5).



4.3.2 Der Anteil von 11% an C-Myc-Amplifikationen und -Translokationen im untersuchten Patientenkollektiv

Durch Fluorescence-in-situ-Hybridisierung ergaben sich in sechs Fällen (3%) der diffus großzelligen B-Zell-Lymphome c-Myc-Translokationen, in 17 Fällen (8%) c-Myc-Amplifikationen. Dieser Anteil der FISH-positiven DLBCL deckt sich mit Angaben in der Literatur, nach denen das c-Myc-Gen in 5-15% der DLBCLs alteriert ist. Hierbei liegt in ungefähr 6% eine Translokation von c-Myc mit dem IgH Lokus vor (t(8;14)) (Lossos 2005).

Abbildung 16: Nachweis von c-Myc-Translokation mittels FISH

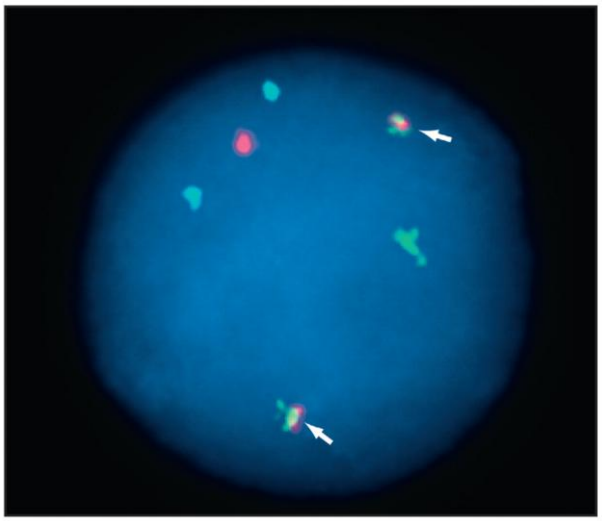


Abb. 16: *c-Myc (rotes Signal), IgH (grünes Signal), Zentromer des Chromosom 8 (blaues Signal). Das gelbe Signal zeigt die reziproke Translokation zwischen c-Myc und IgH-Lokalisationen in neoplastischen Zellen an.*

4.3.3 Keine signifikante Korrelation der c-Myc-Amplifikationen und -Translokationen mit der Expression von Ki67, Skp2, Cks1b als auch $p27^{Kip1}$

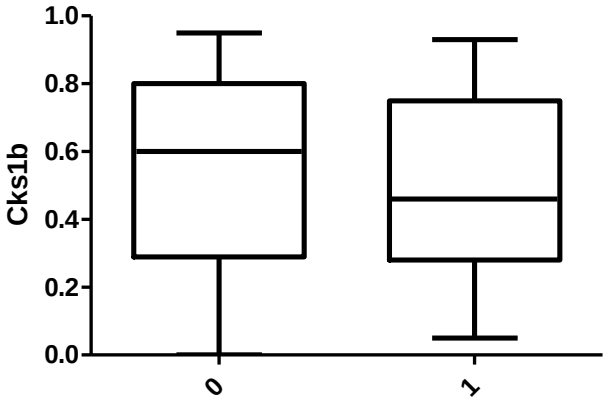
Tabelle 13: Expressions-Ergebnisse von Ki67, Skp2, Cks1b und p27 bei Vorliegen von c-Myc -Translokationen und -Amplifikationen

c-Myc	Ki67	Skp2	Cks1b	p27
Translokation	0,80	**0,04**	**0,20**	0,01
Translokation	0,70	0,32	0,86	0,07
Translokation	0,81	0,79	0,70	0,10
Translokation	0,77	0,83	0,65	0,10
Translokation	0,70	0,40	**0,05**	0,07
Translokation		0,89	0,93	
Amplifikation	0,60	0,72	0,78	**0,30**
Amplifikation	0,80	0,63	0,28	0,05
Amplifikation	0,40	0,32	0,75	0,07
Amplifikation	0,50	0,66	0,70	0,00
Amplifikation	0,75	0,20	0,26	0,18
Amplifikation	0,75	0,63	0,75	0,04
Amplifikation	0,40	0,47	0,33	0,05
Amplifikation	0,75	**0,10**	0,28	**0,33**
Amplifikation	0,70	**0,10**	0,37	0,03
Amplifikation	0,70	0,50	0,42	
Amplifikation	0,70	0,29	0,45	0,28
Amplifikation	0,70	0,30	**0,17**	0,23
Amplifikation	0,66	0,08	0,67	0,02
Amplifikation	0,66	0,59	0,79	0,25
Amplifikation	0,66	0,56	0,46	0,03
Amplifikation	0,50	0,20	0,30	0,02
Amplifikation	0,50	0,65	0,49	0,10

Die Tabelle 13 führt die Ergebnisse der zellulären Expression von Ki67, Skp2, Cks1b und $p27^{Kip1}$ bei Vorliegen einer c-Myc-Translokation bzw. -Amplifikation auf. Trotz der übermäßigen c-Myc-Expression zeigte sich in den Korrelationsstudien kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Cks1b- (p=0,68) und Skp2- (p=0,64) Expression im Vergleich zu nicht-c-Myc-translozierten bzw. -amplifizierten Lymphomen (nach Graph Pad Prism 5). So wird in einzelnen Fällen trotz Vorliegen einer c-Myc-Translokation nur geringfügig Skp2 bzw. Cks1b exprimiert, wobei dennoch der $p27^{Kip1}$-Spiegel erniedrigt bleibt. Andererseits ist trotz c-Myc-Amplifikation, hoher Expression von Skp2 (z.B. 72%) und Cks1b (z.B.78%) in einzelnen Fällen eine vergleichbar hohe p27-Expression (um 30%) messbar. Zusammenfassend kann aufgrund dieser Ergebnisse nicht von einem direkten Zusammenhang von c-Myc-Translokationen bzw. -Amplifikationen und der Expressionshöhe von Skp2, Cks1b und $p27^{Kip1}$ ausgegangen werden.

Vergleicht man insbesondere die Expressions-Werte von Cks1b bei Vorliegen einer c-Myc-Translokation oder -Amplifikation mit den Fällen ohne positiven FISH-Nachweis, so ergeben sich eine unspezifische Verteilung der Cks1b-Werte mit einem Signifikanz-Niveau von p= 0,6857.

Abbildung 17: Box Plot Analyse der Cks1b-Expression nach c-Myc-Status, p > 0,05



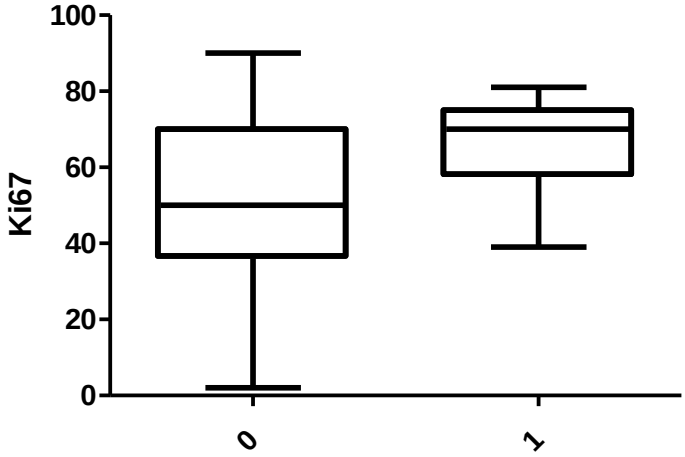
0: kein Vorliegen einer c-Myc-Translokation oder -Amplifikation (n=194)

1: DLBCL mit Nachweis einer c-Myc-Translokation oder -Amplifikation in der FISH (n=23)

Die $p27^{Kip1}$ -Level lagen in einem Bereich zwischen 0% und 33%, was sich mit den Fällen ohne Nachweis einer c-Myc-Amplifikation oder -Translokation deckt. Es zeigt sich keine signifikant erniedrigte $p27^{Kip1}$ –Expression (p>0,05) der FISH-positiven Patienten.

Im Vergleich zu den nicht-c-Myc translozierten Fällen (n=179), war bei Vorliegen einer Translokation oder Amplifikation (n=22) der Anteil der Ki67-Expression, und somit die Proliferationsrate, signifikant erhöht (t-Test; p=0,0029). Hier lag die mittlere Ki67-Expression bei 65,91%, im Gegensatz zu 52,74% bei FISH-negativen Fällen.

Abbildung 17: Box Plot Analyse der Ki67-Expression nach c-Myc Status, p=0,0029



0: Keine c-Myc-Translokation bzw. -Amplifikation vorhanden (n=179). Ki67-Mittelwert 52,74+/-1,494%

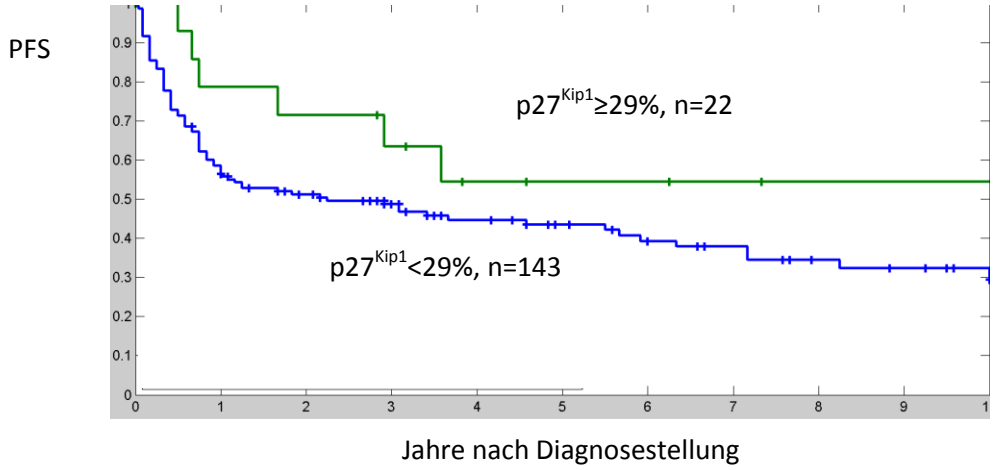
1: C-Myc-Translokation bzw. -Amplifikation in der FISH-Analyse nachweisbar (n=22). Ki67-Mittelwert 65,91+/-2,66%

Zusammenfassend betrachtet fanden sich trotz erhöhter c-Myc-Expression aufgrund einer Translokation oder Amplifikation in einzelnen Fällen deutlich erniedrigte Spiegel an Cks1b oder Skp2 als auch hohe Werte an $p27^{Kip1}$. Diese betroffenen Fälle, die sich entgegen des postulierten Zusammenhanges verhalten, sind in Tabelle 13 hervorgehoben (s. Diskussion, 5.3).

4.4 Kein signifikanter Einfluss der $p27^{Kip1}$- und Skp2-Expression auf das progressionsfreie Überleben

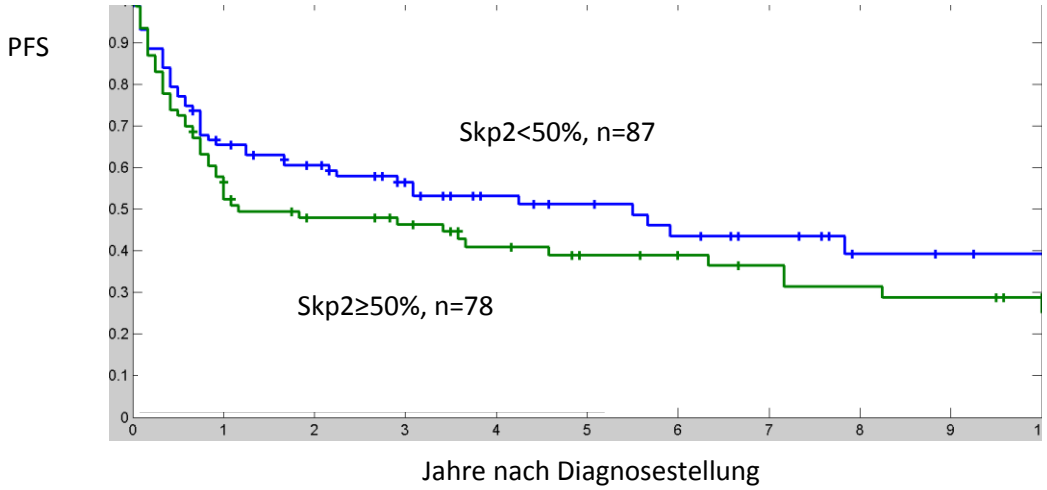
Betrachtet man isoliert den klinischen Verlauf nach der $p27^{Kip1}$ -Expression, so zeigte die Patientengruppe mit niedrigen $p27^{Kip1}$ -Spiegel (<29% Positivität, s. 4.2) bezüglich des PFS einen nicht signifikanten, aber dennoch verifizierbaren Trend zu einem klinisch ungünstigeren Verlauf als diejenigen Patienten mit einer höheren $p27^{Kip1}$ -Positivität (p= 0,078) (s. Abb.18) .

Abbildung 18: PFS nach $p27^{Kip1}$. Cut-off= 0,29, n=165. P=0,078



Auch bei Einteilung der Patienten nach Skp2-Status fand sich bei dem Grenzwert 0,49 ein bei höherer Skp2-Expression tendenziell verringertes PFS im Vergleich zu niedrigeren Skp2-Werten. Dieser Unterschied lag jedoch unterhalb des statistischen Signifikanz-Niveaus (p=0,051).

Abbildung 19: PFS nach Skp2. Cut-off= 0,49, n=165, p=0,051



4.5 Cks1b als negativer Faktor in DLBCLs

4.5.1 Hohe Cks1b-Expression korreliert mit c-Myc, Skp2 und Ki67 sowie $p27^{Kip1}$

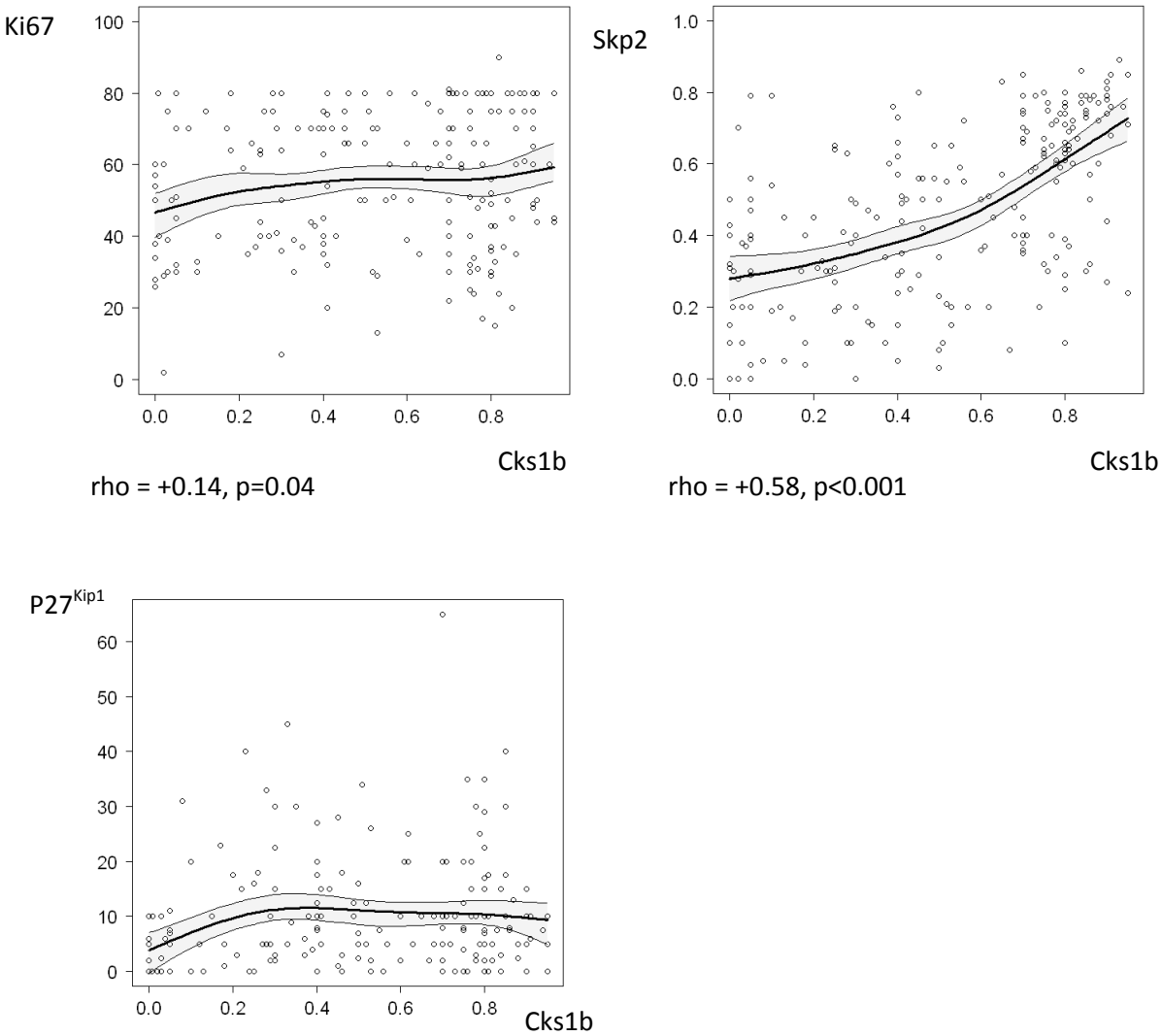
Um die Zusammenhänge der Marker-Expression des SCF- Skp2/Cks1- $p27^{Kip1}$ -Signaltransduktionsweges weiter zu verifizieren, wurden Korrelationsstudien mit der Fragestellung nach gleichsinnigen oder auch inversen Zusammenhängen durchgeführt.

Eine positive Korrelation lag zum einen zwischen den beiden SCF- Komplex-Liganden Cks1b und Skp2 mit einem Signifikanz-Niveau von p=0,00 (CC: 0,58) vor. Eine hohe Expression an Cks1b ging zudem mit einer höheren Expression des Proliferationsmarkers Ki67 einher (p= 0,044, CC:0,143). Zwischen Cks1b und $p27^{Kip1}$ ergab sich kein, wie vermutet inverser, sondern sogar ein leicht ausgeprägter, jedoch signifikanter, positiver Zusammenhang in den Korrelationsstudien (p=0,008; CC:0,19).

Tabelle 14: Signifikanz der Korrelationen von Cks1b mit c-Myc, Skp2, p27, Ki67

Korrelation von	mit	p-Wert	Korrelations-Koeffizient	N
Cks1b	**Skp2**	0,000	0,584	217
	P27	0,008	0,185	205
	Ki67	0,044	0,143	199

Abbildung 20: Korrelation von Cks1b mit Ki67, Skp2 und p27^{Kip1}



4.5.2 Hohe Cks1b-Expression korreliert mit erniedrigtem progressionsfreien Überleben

Das progressionsfreie Überleben, d.h. der Zeitraum bis zum Eintreten von Krankheitsprogress, Rezidiv oder Tod, wurde als prognostischer Endpunkt für die Erstellung von Kaplan-Meier-Kurven verwendet. Hierbei ergaben sich nach Einteilung der Patienten in eine Cks1b-negative und eine Cks1b-positive Untergruppe je nach Grenzwert signifikant unterschiedliche Verläufe.

Wie durch vorhergehende Studien vermutet, zeigte sich nach Einteilung der klinischen Verläufe anhand des Cks1b-Status ein signifikant schlechterer Verlauf der Patienten mit höherer Cks1b-Expression.

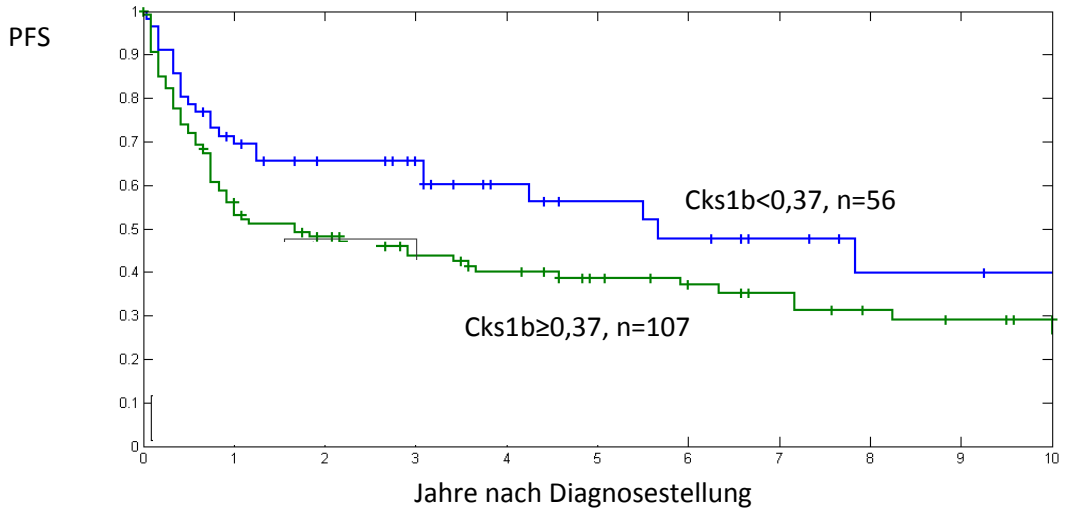
Bei Betrachtung des cut-off-Wertes 0,37 war die Kaplan-Meier-Kurve der Cks1b-negativen Gruppe (Cks1b<0,37) mit n= 54 Patienten durch einen wesentlich besseren Verlauf gekennzeichnet als die der Fälle mit Cks1b ≥0,37, n=74 (p= 0,01). Hierbei lag das mediane progressionsfreie Überleben in der Cks1b-positiven Gruppe bei 20 Monaten, in der Cks1b-negativen Gruppe deutlich höher bei 94 Monaten. 12 Monate nach Diagnosestellung war in der Cks1b-negativen Gruppe in 72 +/- 8,1% der Fälle weder Rezidiv noch Progress oder Tod eingetreten. In der Cks1b-positiven Gruppe war im Gegensatz dazu nur bei 53 +/- 4,8% der Patienten noch kein entsprechendes Ereignis verzeichnet. Nach fünf Jahren betrug bei den gering Cks1b exprimierenden Fällen der Anteil der progressionsfreien Patienten 59% (95% CI= 45%-75%), in der Cks1b-positiven Gruppe lag dieser hingegen nur bei 39% (95%CI= 30%-50%) (s.Abb.21).

Das relative Risiko der Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom, einen Krankheitsprogress zu erleiden, lag nach dem cut-off-Wert von 0,37 bei den Patienten mit einem positiven-Cks1b Status um 83% höher mit einem 95%igem Koinfidenzintervall von 1,14 bis maximal 2,9, als bei den Patienten mit <0,37 Cks1b-positiven Tumorzellen.

Tabelle 15 Unterschiede des PFS bei Verwendung des Cks1b-cut-off-Wertes 0,37

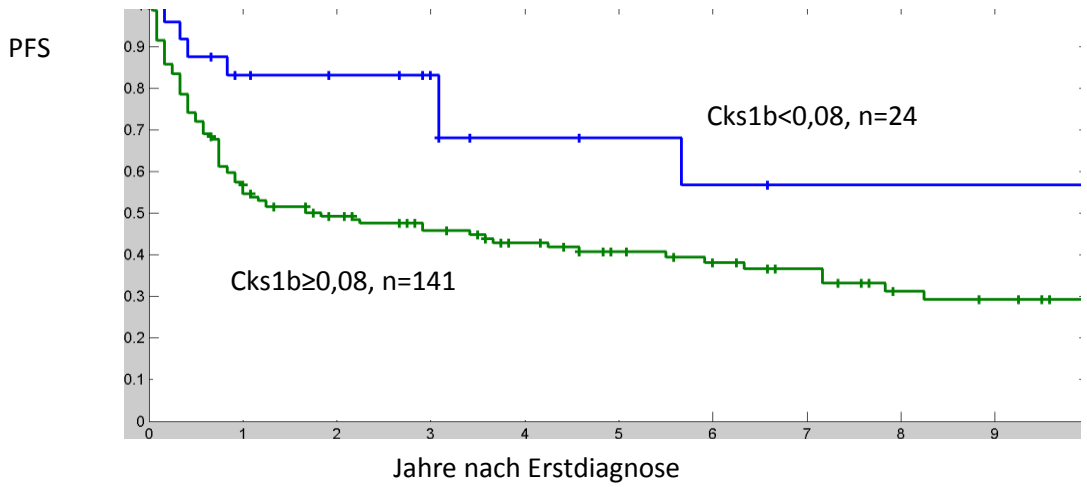
	Cks1b neg. (Cks<0,37)	**Cks1b pos.(Cks1≥0,37)**	**p-Wert**
Medianes PFS	94 Monate	20 Monate	0,009
1-Jahres-PFS	72%	53%	
5-Jahres-PFS	59%	39%	

Abbildung 21: PFS nach Cks1b-Expression, cut-off=0,37 (n=163). P=0,01



Bei einzelner Betrachtung des alternativen, sehr niedrigen Cks1b-cut-off Wertes 0,08 (s. Abb. 24) liegen ebenfalls signifikante Unterschiede im klinischen Verlauf mit schlechterer Prognose der höher Cks1b-exprimierenden Patienten (p=0,001) vor.

Abbildung 22: PFS nach Cks1b-Expression, cut-off-Wert = 0,08. P=0,001

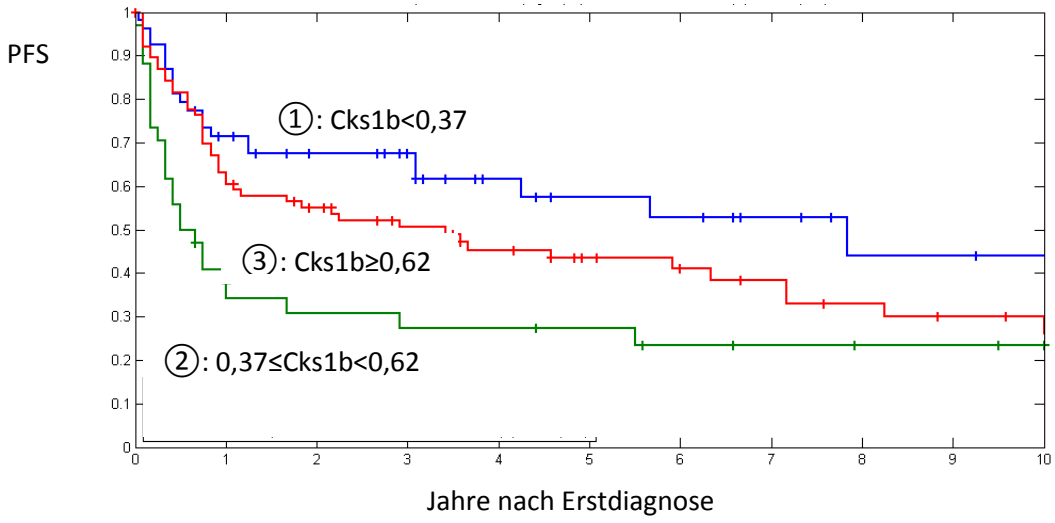


Vergleicht man jedoch den klinischen Verlauf nach Cks1b-Expressions-Intervallen, so zeigt sich der prognostisch schlechteste klinische Verlauf in der Gruppe mit mittleren Cks1b-Protein-Spiegeln (37- 62%). Mit zunehmend höherer Cks1b-Positivität (>62%) kam es weitaus seltener zu einer Krankheitsprogression als bei den Patienten mit einer mittleren (37- bis 62-prozentigen) Cks1b-Positivität, auch wenn der klinische Verlauf bei sehr

niedriger (<27%) Cks1b-Expression weiterhin die günstigste Prognose aufwies. Somit wird der Unterschied im progressionsfreien Überleben zwischen den niedrig Cks1b-exprimierenden Fällen und denjenigen mit sehr hohem Cks1b-Level relativiert.

Ein klarer, linearer Zusammenhang zwischen der Höhe der Cks1b-Spiegel und dem klinischen Verlauf kann nach diesen Ergebnissen daher nicht bestätigt werden (s. Diskussion, 5.2.6).

Abbildung 23: PFS nach Cks1b-Expressions-Intervallen, n=163



①: **Cks1b<0,37,** n=53. ②: **0,37≤Cks1b<0,62,** n=34 ③: **Cks1b≥0,62**, n=76.

4.5.3 Die unabhängige Aussagekraft von Cks1b bei Einteilung nach DLBCL-Subtypen

Vergleichbare Ergebnisse der statistischen Untersuchungen zeigten sich isoliert nach Einteilung in die DLBCL-Subtypen nach Hans Klassifikation (Hans, Weisenburger et al. 2004). Die Expression der Marker Cks1b, Skp2, Ki67, c-Myc und $p27^{Kip1}$ waren hierbei in vergleichbarer Ausprägung sowohl bei GCB- als auch bei Non-GCB-Typ vorliegend.

Die Patienten mit GCB-Typ waren bei Erstdiagnose im Mittel 62 Jahre, die Patienten mit Non-GCB-Typ durchschnittlich 63 Jahre alt. Das mediane PFS lag bei den GCB-DLBCL bei 76 Monaten und in 55% kam es zu einem Therapieversagen. Diese Patienten besaßen eine bessere Prognose als die Non-GCB-DLBCL mit einem medianen PFS von 22 Monaten und einem 63-prozentigen Therapieversagen.

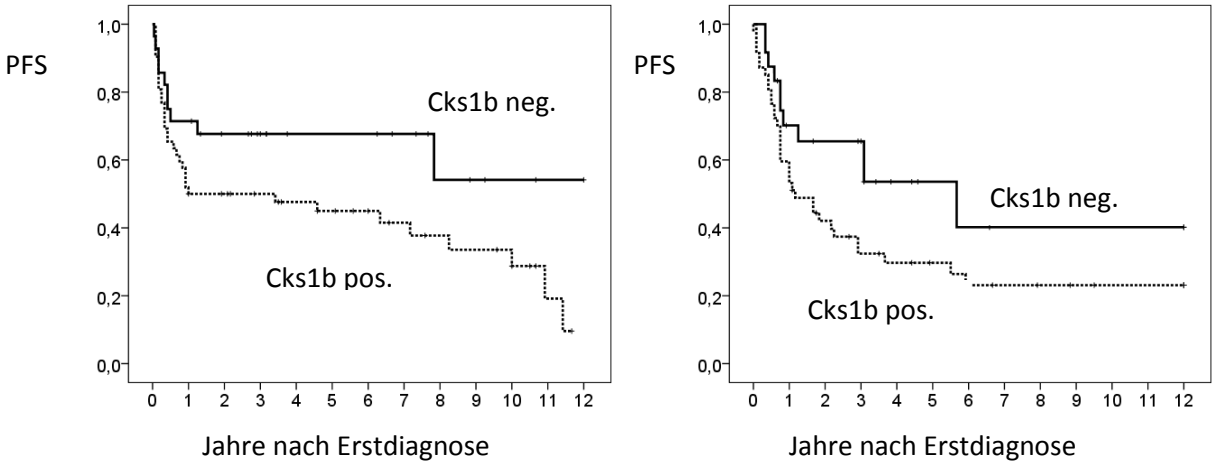
Nach Aufteilung in Cks1b-positive und -negative Fälle bei einem cut-off-Wert von 0,37 zeigten sich sowohl in der GCB- als auch in der Non-GCB-Subgruppe unabhängig

voneinander klare Unterschiede hinsichtlich des klinischen Verlaufes. Beim GCB-Typ betrug das mediane PFS in der Cks1b-negativen Gruppe 94 Monate, in der Cks1b-positiven Gruppe hingegen nur 20 Monate. In der Non-GCB-Gruppe lag das mediane PFS der Cks1b-negativen Patienten bei 86 Monaten, das der Cks1b-positiven bei 14 Monaten. Dieser Unterschied war mit p=0,058 bei GCB- und mit p= 0,069 bei Non-GCB-Typ nicht mehr signifikant und somit weniger aussagekräftig als bei der Betrachtung des gesamten Patientenkollektives. Jedoch bestätigte sich hier ebenfalls der Trend zu einem schlechteren klinischen Verlauf bei erhöhter Cks1b-Expression.

Tabelle 16: PFS nach Cks1b-Status und Aufteilung in GCB- und Non-GCB-Typ

		Cks1b < 0,37	**Cks1b ≥ 0,37**
GCB-Typ	***Medianes PFS (Mon.)***	94	20
	5-Jahres-PFS	68%	45%
	95% CI (5-J-PFS)	52-68%	33-61%
Non-GCB-Typ	***Medianes PFS (Mon.)***	86	14
	5-Jahres-PFS	54%	30%
	95% CI (5-J-PFS)	36-60%	19-47%

Abbildung 24: PFS nach Cks1b-Status in GC-DLBCL und Non-GC-DLBCL (Cut-Off=0,37)

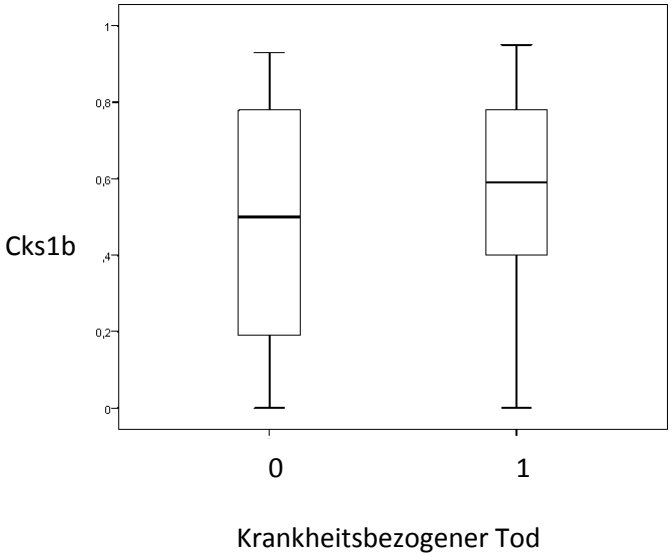


A: GCB-Typ B: Non-GCB-Typ

4.5.4 Zunahme der krankheitsbedingten Mortalität bei positiver Cks1b-Expression

Stellt man in Box-Plot-Analysen die krankheitsbezogenen Todesfälle den Überlebenden gegenüber und betrachtet dabei die Verteilung der Gruppen hinsichtlich ihrer Cks1b-Spiegel, so lagen bei den Patienten, die an DLBCL verstarben, durchschnittlich höhere und weniger weit gestreute Cks1b-Werte vor. Der Zeitraum bis zum Eintritt des Todes wird in dieser Analyse nicht mit berücksichtigt.

Abbildung 25: Cks1b-Positivität und krankheitsbezogener Tod (Box-Plot-Darstellung)



(0= kein KH-bezogener Tod, n=87; 1= KH-bezogener Tod, n=82)

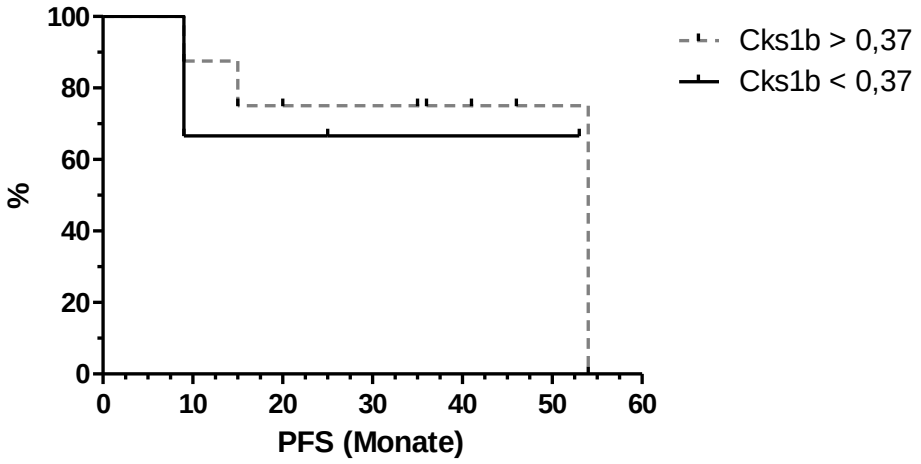
Ein vergleichbares Ergebnis mit durchschnittlich höheren Cks1b-Werten zeigte sich bei der Betrachtung des Therapieversagens. Somit ist auch in Hinsicht auf das zeitunabhängige Überleben das Risiko, an einem krankheitsbedingtem Tod zu versterben, bei den Patienten mit einer gesteigerten Cks1b-Expression erhöht. Durch das Vorliegen einer großen Spannweite der Cks1b-Expression der Patienten ohne Nachweis einer krankheitsbedingten Mortalität kann jedoch auch hieraus nur ein Trend ersichtlich sein und nicht allein nach der Cks1b-Expression auf den langfristigen Verlauf geschlossen werden.

4.5.5. Die Aussagekraft des Cks1b-Status bei Rituximab behandelten Patienten

Abhängig von den angewandten Therapie Schemata, Rituximab- versus nicht-Rituximab-beinhaltender Therapie, stellt sich die Frage, ob sich ein vergleichbares Ergebnis hinsichtlich der progressionsfreien Zeit je nach Cks1b-Expression darstellt. In dieser Arbeit

waren genaue Angaben zu den angewandten Therapien nur in dem Münchner Kollektiv sicher nachzuweisen. Die Fallzahl der mit RItuximab behandelten Patienten lag hier nur bei n=13. Vergleicht man das progressionsfreie Überleben nach Cks1b-Status (Cut-off-Wert= 0,37), so ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich des PFS in dieser Untergruppe (p=0,74). An einer größeren Fallzahl von Patienten mit DLBCL ist dieses Ergebnis jedoch weiter zu überprüfen, da im untersuchten Kollektiv bei geringer Fallzahl der mit Rituximab behandelten Patienten bei nur vier Fällen mit negativer Cks1b-Expression, von keiner ausreichenden Aussagekraft dieser Überlebenskurven ausgegangen werden kann.

Abbildung 26: PFS nach Cks1b-Status bei Rituximab beinhaltenden Therapie Schemata (p=0,74; n=13)



5 Diskussion

5.1 Die klinischen Charakteristika und Protein-Expressionsdaten im Vergleich zu Literaturangaben

5.1.1 Das untersuchte Patientenkollektiv und dessen prognostischer Verlauf nach IPI

In diese retrospektive Studie wurden 222 Patienten mit aggressivem B-Zell-Lymphom (94% primäres DLBCL, 6% nach Transformation aus niedrig malignen B-Zell-Lymphomen) eingeschlossen. Die Diagnosestellung und Therapie erfolgte am Klinikum rechts der Isar, München (n=34), dem Universitätsspital Basel (n=79) und dem Universitätsspital Innsbruck (n=108) im Zeitraum von 1998 bis 2006. Neben der Erfassung der angewandten Therapie, des Ansprechens und Risikofaktoren wie IPI wurde besondere Aufmerksamkeit auf den Zeitraum bis zum ersten Eintreffen eines negativen Ereignisses wie Krankheits-Progress, -Rezidiv oder Todeseintritt aufgrund der Erkrankung gerichtet. Dieser klinische Endpunkt war bei 169 Patienten sicher feststellbar. Bei den Münchner Patienten (n=34) waren alle klinischen Daten vollständig zu gewinnen. Ein Problem stellten die teilweise nicht vorliegenden Angaben bei Patienten aus Basel (n=79) und Innsbruck (n=108) dar. Insbesondere fehlten Daten zu verschiedenen Risikofaktoren wie LDH, Extranodalbefall oder IPI. Aus diesem Grund kam der Betrachtung dieser klinischen Merkmale keine besondere Rolle zu.

Die Patienten entsprachen mit dem durchschnittlichen Alter bei Erstdiagnose (63 Jahre), der Geschlechtsverteilung (51% männlich), der Rate an Therapieversagen (49%) und krankheitsbezogener Todesrate (49%) den in der Literatur beschriebenen Durchschnittswerten (1997; Morton, Wang et al. 2006). Alle Stadien bei Erstdiagnose wurden eingeschlossen. Soweit bekannt erhielten >90% der Patienten (R-)CHOP-Therapie-Regimes. Ein signifikanter Unterschied ($p<0,0001$) hinsichtlich der Prognose zeigte sich bei Betrachtung des PFS nach Einteilung in die verschiedenen Risikogruppen nach IPI. Mit einem mittleren PFS von 99 Monaten bei niedrigem Risikoprofil vs. nur 4 Monaten bei hohem bzw. höchstem Risiko waren die Unterschiede hier deutlich ausgeprägt (s.Abb.11). Somit entsprachen die untersuchten Patienten anderen untersuchten DLBCL Kollektiven. Ein Selektions-Bias ist nicht anzunehmen.

5.1.2 Tissue-microarrays als geeignetes Instrument vergleichbarer immunhistochemischer Untersuchungen bei großer Fallzahl

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erlangen, ist eine möglichst große Fallzahl von DLBCLs bei einer prognostischen Fragestellung notwendig. Um eine Vielzahl an Gewebeproben, in diesem Fall menschliche Lymphknoten, unter vergleichbaren Bedingungen

immunhistochemisch färben und auswerten zu können, bietet die Herstellung und Arbeit mit tissue-microarrays einige Vorteile. Diese Methode erlaubt eine schnelle und simultane immunhistochemische Detektion der Protein-Expression verschiedener zellulärer Marker in einem großen Patienten-Kollektiv und ist dabei sowohl zeit- als auch kosteneffizient. Zudem bleiben die Gewebeblöcke ohne relevante Schädigung zurück und können für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen. Bei der Auswahl der Stanz-Lokalisation ist wichtig, ein tumorrepräsentatives Feld zu treffen. Bei diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen stellt dies aufgrund der gleichmäßigen Verteilung der Tumorzellen im Gewebe kein relevantes Problem dar. Eine einheitliche Dicke der in Paraffin gebetteten Gewebeproben innerhalb des TMAs sollte vorliegen, um nach dem Schneiden nicht-informative, leere Fälle auf den Schnitten zu vermeiden.

Pro Paraffinblock eines Patienten wurden je zwei Stanzen gewonnen, in einem TMA angeordnet und von diesem mehrere Schnitte von jeweils 4µm-Dicke angefertigt. Bei der Analyse durch zwei unabhängige Betrachter und dreimaliger Auszählung jeder der zwei Stanzproben pro Patient erlangt man nach Tzankov, A., et al., in gut 95% übereinstimmende Ergebnisse und einen aussagekräftigen Wert bei Bildung des Mittelwertes (Tzankov, Went et al. 2005).

5.1.3 Vergleichbare Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen und der c-Myc-FISH zu Gen-Expressionsdaten aus der Literatur

Neben den etablierten Standardfärbungen der TMAs mit Bcl-2, Bcl-6, CD10, MUM1 und $p27^{Kip1}$ -Antikörpern mussten die optimalen Verdünnungsverhältnisse der c-Myc-, Cks1b-, Skp2- und Odc-Antikörper mit Hilfe von Positiv- und Negativkontrollen ausgetestet werden. Hier waren in der Literatur keine etablierten Antikörper für die Immunhistochemie dieser vier Marker beschrieben. Ein Problem stellte in der Praxis der Cks1b-Antikörper dar. Die eigentlich für die Immunhistochemie als geeignet bezeichneten Maus- und Kaninchen-Cks1b-Antikörper von ZYMED-Laboratories zeigten eine sich stark unspezifisch und zytoplasmatisch darstellende, undifferenzierte Positivität. Der Cks1b-Maus-Antikörper von SIGMA, getestet für ELISA und Western-Blot, ergab immunhistochemisch kein differenzierbares Ergebnis. Zur Sicherheit wurde hierauf in Zelllysaten von BL- und DLBCL- Zelllinien durch Immunoblot-Analyse nochmals die nukleäre Lokalisation von Cks1b verifiziert (s.Abb.8). Eine klar nukleäre und graduierbare Positivität in der IHC konnte dann mit dem Cks1b-MaxPab-Maus-Antikörper von Abnova erreicht werden.

Nach Erhebung verschiedener relevanter klinischer Merkmale und Endpunkte von den Patienten mit DLBCL dreier unabhängiger Zentren (Klinikum rechts der Isar, München; Universitätsspital Basel; Universitätsklinikum Innsbruck) wurden immunhistochemisch die zellulären Protein-Spiegel von c-Myc, Cks1b, Skp2, p27, Ki67, Bcl2, Mum1, Odc, Bcl6, und

Cd10 erfasst. Neben der Bestimmung des DLBCL-Subtypes wurden mithilfe der IHC-Daten die Korrelation von Cks1b mit c-Myc, dem SCF- Ligase-Komponenten Skp2, dem Tumorsuppressor $p27^{Kip1}$ und dem Proliferationsmarker Ki67 untersucht. Um eine Aussage bezüglich des Zusammenhanges von Cks1b und dem klinischen Verlauf der Patienten treffen zu können, wurde als klinischer Endpunkt für die Erstellung von Kaplan-Meier-Kurven die Zeit bis zum Eintreten eines Krankheitsprogresses wie Rezidiv oder Todeseintritt gewählt. Das durchschnittlich ermittelte progressionsfreie Überleben lag in diesem Gesamtkollektiv bei 37 Monaten (8,9- 65,1 Monate 95% CI, Abb. 10).

Mit Hilfe der FISH-Analyse wurden jeweils 3 c-Myc-Translokationen in der GCB- als auch der Non-GCB-Subgruppe detektiert. 5 Amplifikationen lagen in der Non-GCB-Gruppe und 12 Amplifikationen in der GCB-Gruppe vor. Dieses prozentuale Auftreten (3% Translokationen, 8% Amplifikationen) deckt sich mit den Ergebnissen aus DLBCL- Studien, nach denen das c-Myc-Gen in 5-15% alteriert ist (Yunis, Mayer et al. 1989; Kramer, Hermans et al. 1998). Der Anteil der Translokationen war in dem untersuchten Kollektiv etwas geringer als in anderen Studien, nach denen in ungefähr 6% der DLBCL eine Translokation t(8;14) feststellbar war (Lossos 2005). Die Fälle mit Nachweis einer c-Myc-Translokation oder -Amplifikation zeigten eine signifikant (p=0,0029) erhöhte Ki67-Expression mit einer mittleren Ki67-Positivität von 65,9%, im Gegensatz zu 52,7% bei den Patienten ohne c-Myc-Alterationsnachweis (s. Abb. 16). Ein kausaler Zusammenhang bei nachgewiesener proliferationsinduzierender Wirkung von c-Myc ist anzunehmen und steht in Einklang mit den Kenntnissen über die zellullären Funktionen von c-Myc (s. 1.2.1).

5.1.4 Keine prognostische Signifikanz bei Einteilung der Patienten nach Hans-Klassifikation

Die Ergebnisse der Überlebenskurven wurden zudem nach Einteilung in die DLBCL-Subtypen weiter verifiziert. In 48% (n=106) lag nach Hans-Klassifikation (Hans, Weisenburger et al. 2004) ein GCB-Subtyp vor, mit einem mittleren PFS von 76 Monaten, im Gegensatz zu einem mittleren PFS von 36 Monate bei nachgewiesenem Non-GCB-Typ (n=115). Diese Untergruppen zeigten wie auch bei Hans et al., 2004, keinen relevanten Unterschied hinsichtlich der klinischen Merkmale. Die Gruppen waren vergleichbar alt (mittleres Alter 63 vs. 62 Jahre) und es lag kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von $p27^{Kip1}$, Cks1b und Skp2 vor. Eine erhöhte Proliferationsrate fand sich in der GCB-Gruppe mit einer durchschnittlichen Ki67-Expression von 70% im Gegensatz zu 53% in der Non-GCB-Gruppe. In 55% (GC) vs. 63% (Non-GC) kam es zu einem Versagen der primären Therapie.

In unserem untersuchten Patientenkollektiv unterschieden sich die Kaplan-Meier-Kurven bei Vergleich des progressionsfreien Überlebens nach Subtyp jedoch nicht signifikant voneinander, was sich mit einigen Studien deckt, nach denen kein nachweisbar signifikant

negativer klinischer Verlauf des Non-GCB-Typs vorlag (Colomo, Lopez-Guillermo et al. 2003; Linderoth, Jerkeman et al. 2003). Ein prognostisch ungünstiger Verlauf des Non-GC-DLBCL, wie nach Hans et al. postuliert (Barrans, Carter et al. 2002; Hans, Weisenburger et al. 2004), war in dieser Arbeit nur als Trend erkennbar.

Das untersuchte Patientenkollektiv war nicht bezüglich einer Rituximab-Anwendung selektioniert worden. Die fehlende prognostische Aussagekraft nach Einteilung in GCB- und Non-GCB-Typ kann durch die Anwendung der Therapieschemata mit Einschluss von Rituximab resultieren. Da der standardmäßige Einsatz von Rituximab den Unterschied im klinischen Verlauf nach GCB- bzw. Non-GCB-Typ weiter verringert hat, reicht die Einteilung nach Hans-Klassifikation auch nach diesen Ergebnissen nicht alleine für eine klinisch praktikable prognostische Aussagekraft mit therapeutischer Konsequenz aus.

Zudem wurde separat in der GCB-, als auch der Non-GCB Gruppe die prognostische Aussagekraft der Cks1b-Expression bezüglich der Zeit bis zum Auftreten einer Krankheitsprogression untersucht. Wie im Gesamtkollektiv ergaben sich in den Untergruppen nach Cks1b Status und bei Betrachtung verschiedener cut-off-Werte ungünstiger verlaufende Kurven des PFS bei Vorliegen jeweils höherer Cks1b-Expressionswerte. Hieraus konnte ein wesentlicher Einfluss des Subtyps als beeinflussender Störfaktor bezüglich der Cks1b-Expression als auch des klinischen Verlaufs nach Cks1b-Status ausgeschlossen werden.

5.2 Die prognostische Aussagekraft von Cks1b

5.2.1 Cks1b als negativ prognostischer Faktor in der Literatur

Translokationen sowie erhöhte Transkriptionsspiegel von c-Myc sind mit einer schlechten Prognose in DLBCLs assoziiert (Kramer, Hermans et al. 1998; Le Gouill, Talmant et al. 2007; Johnson, Savage et al. 2009; Niitsu, Okamoto et al. 2009; Savage, Johnson et al. 2009; Tibiletti, Martin et al. 2009; Tomita, Tokunaka et al. 2009) . Dies scheint unter anderem auf sekundär erniedrigte $p27^{Kip1}$ -Spiegel zurückzugehen, was in verschiedenen Tumoren wie Mamma-Karzinom oder Kolorektalen-Tumoren isoliert als negativ-prognostischer Faktor angesehen wird (Philipp-Staheli, Payne et al. 2001; Shapira, Ben-Izhak et al. 2005; Slotky, Shapira et al. 2005; Kaldis 2007; Wang, Tian et al. 2009). Die Verbindung zwischen c-Myc und $p27^{Kip1}$ stellen die SCF-Ubiquitin-Ligase-Komponenten Cks1b und Skp2 dar, ohne deren Vorhandensein keine Bindung von phosphoryliertem $p27^{Kip1}$ an den Komplex möglich ist (1993; Bartek and Lukas 2001). Somit kann sich eine c-Myc-Überexpression ohne Cks1b und Skp2 nicht über den SCF-Ubiquitin-abhängigen Abbauweg auf die $p27^{Kip1}$-Spiegel auswirken, wie in Eμ-Myc-transgenen Mäusen gezeigt werden konnte (Keller, Old et al. 2007; Meyer and Penn 2008). Bei Burkitt-Lymphom, Multiplem Myelom und Eμ-Myc-Lymphomen zählen Cks1b und Skp2 unabhängig von

$p27^{Kip1}$ zu den negativ prognostischen Faktoren (Masuda, Inoue et al. 2003; Shapira, Ben-Izhak et al. 2004; Shapira, Ben-Izhak et al. 2005). Die Rolle von Cks1b in humanen diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen ist dabei jedoch noch weitgehend unklar [80, 81].

Übermäßig hoch exprimiertes Cks1b war in verschiedenen Tumoren wie Mamma-Karzinom, Kolorektalem Karzinom, Multiplem Myelom (MM) oder entdifferenzierten Tumoren mit einer schlechten Prognose assoziiert (Masuda, Inoue et al. 2003; Kitajima, Kudo et al. 2004; Shaughnessy 2005; Slotky, Shapira et al. 2005; Hershko and Shapira 2006). Auch in präkanzerösen Eμ-Myc-Lymphomen (Martins and Berns 2002) und in humanen Burkitt-Lymphomen ist eine erhöhte Expression dieser Proteine charakteristisch, wobei der Anstieg auf Transkriptionsebene über erhöhte RNA- und Proteinspiegel erklärt wird. In Multiplen Myelomen korrelieren Cks1b-mRNA- und Proteinspiegel invers mit den Spiegeln von $p27^{Kip1}$ (Shaughnessy 2005). Eine Erhöhung an Cks1b führt in diesen Zellen zu einem vermehrten Abbau von $p27^{Kip1}$, der nicht durch seinen nahen Verwandten Cks2 erklärt werden kann. C-Myc scheint für die Transkriptionsinduktion auf indirektem Wege ursächlich zu sein (Keller, Old et al. 2007; Uddin, Hussain et al. 2008).

5.2.2 Die Auswirkung von Cks1b auf Cyclin-abhängige-Kinasen und $p27^{Kip1}$

Cks1b stellt einen wichtigen Faktor der Zell-Zyklus-Regulation, insbesondere des Überganges von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus, dar und führt über mehrere Wege zu einer Reduktion freier $p27^{Kip1}$-Spiegel.

Als Mitglied der Familie der Suc/Cks-Proteine, einer gut konservierten Gruppe an Regulator-Proteinen, kann Cks1b an Cdk1/2 und in einer geringeren Affinität an Cdk3, binden und Einfluss auf die Zellproliferation und die Funktion von Zellzyklus-Inhibitoren wie $p27^{Kip1}$ nehmen (Bartek and Lukas 2001; Uddin, Hussain et al. 2008). Durch Bindung an das amino-terminale Ende des Proteins folgt eine Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen, die wiederum als Inhibitoren der Cip/Kip-Familie fungieren (Sherr and Roberts 1999).

In ruhenden Zellen sind die freien Spiegel von $p27^{Kip1}$ relativ hoch und führen zu einer Bindung und Inaktivierung von CyclinE-Cdk2-Komplexen. Kommt es jedoch zu einer Verschiebung des Gleichgewichts, so können aktive CyclinE-Cdk2-Komplexe dann ihrerseits $p27^{Kip1}$ durch Phosphorylierung an Threonin-187 für den Ubiquitin-abhängigen Abbau markieren und so vermehrt proliferationsinduzierend wirksam werden (Sheaff, Groudine et al. 1997). Über den Weg der Aktivierung von Cdk2-Proteinen führt Cks1b so indirekt zu einer weiteren Inhibition bzw. einem gesteigerten Abbau von $p27^{Kip1}$.

Auch führen in proliferierenden Zellen CyclinD-Cdk4-Komplexe zu einer Bindung von Inhibitor-Proteinen wie $p27^{Kip1}$ und $p21^{Cip1}$ (Polyak, Kato et al. 1994; Sherr and Roberts 1999). In mitotisch aktiven Zellen ist der Großteil an vorhandenem $p27^{Kip1}$ als Komplex an Cyclin-D-abhängige Kinasen (Cyclin D2- Cdk4) gebunden, wodurch eine Inhibition des Zellzyklus-Überganges von der G1- zur S-Phase verhindert wird und $p27^{Kip1}$ nicht mehr mit CyclinE-Cdk2-Komplexen interagieren kann (Polyak, Kato et al. 1994).

Mit seiner essentiellen Funktion bei der Degradation von $p27^{Kip1}$ agiert Cks1b jedoch insbesondere als notwendiger Ko-Faktor des Sp1-Cul1-F-box-Skp2-Komplexes der SCF-Ubiqutitin-Ligase. Die Funktion am $p27^{Kip1}$-Abbau über die SCF-Ubiquitin-Ligase-abhängige Ubiquitinierung ist hierbei unabhängig von der Wirkung und Aktivierung von Cdk-Proteinen (Ganoth, Bornstein et al. 2001; Harper 2001), steht aber in einer direkten Verbindung mit Skp2 und c-Myc.

5.2.3 Der Zusammenhang von Cks1b, Skp2 und c-Myc

In den durchgeführten Korrelationsstudien (Spearman`s rho) zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Cks1b und Skp2 (CC:0,58; p<0,00). Höheres Cks1b ging zudem signifikant in gleichsinniger Weise mit erhöhten Spiegeln von c-Myc einher (CC:0,41; p<0,00). Diese Ergebnisse bestätigen die aufgeführten Kenntnisse über die Zusammenhänge der SCF-Ligase-Komponenten als Teil des c-Myc-Regelkreises (Bartek and Lukas 2001). Die Regulation des hauptsächlich nukleär-exprimierten Proteins Cks1b, sowie von Skp2, geschieht hierbei über transkriptionale (Keller, Old et al. 2007) als auch über post-translationale Mechanismen (Bashir, Dorrello et al. 2004). Des Weiteren war eine erhöhte Cks1b-Expression mit einer zunehmenden Proliferationsrate (Ki67 Expression) assoziiert (CC:0,14; p=0,04).

Dennoch waren sowohl nach den immunhistochemischen Ergebnissen als auch in einer Untergruppe des von A. Rosenwald bestimmten Kollektives (s. Abb.5) einige Fälle mit entgegengesetzter Genexpression ohne gleichsinnige Korrelation der Marker Cks1b, Skp2 und c-Myc zu finden, weshalb das Modell eines einzigen Regulationsweges nicht ausreichend scheint und Hinweise auf weitere Mechanismen nahe legt.

5.2.4 Nicht-signifikanter Einfluss der Skp2-Expression auf den klinischen Verlauf im untersuchten Patienten-Kollektiv

Nach Genexpressionsdaten in der Literatur liegt in gut 40% der diffus großzelligen B-Zell-Lymphome eine übermäßige Expression der SCF-Ubiquitin-Ligase-Komponente Skp2 vor (Uddin, Hussain et al. 2008). Als Zielstrukturen von Skp2 sind Zellzyklusproteine wie freies Cyclin E, Cyclin D1, und $p27^{Kip1}$ bekannt (Carrano, Eytan et al. 1999; Nakayama, Nagahama et al. 2000; Ganiatsas, Dow et al. 2001). Ein inverser Zusammenhang zu $p27^{Kip}$ und eine erhöhte Proliferation bei zunehmender Skp2-Expression wurden hierbei in verschiedenen Tumoren nachgewiesen.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist der prognostisch negative Einfluss erhöhter Skp2-Expression nur als Trend erkennbar, und nicht, wie z.B. nach S.Uddin et al., 2008, beschrieben, direkt mit einer schlechten Prognose assoziiert (Uddin, Hussain et al. 2008). Dies steht in Einklang mit Studien, nach denen in niedrig malignen B-Zell-Lymphomen zwar eine direkte inverse Korrelation von Skp2 und $p27^{Kip1}$ nachgewiesen werden konnte (Carrano, Eytan et al. 1999; Chiarle, Fan et al. 2002; Lim, Adamson et al. 2002), diese jedoch bei aggressiven B-Zell-Lymphomen wie DLBCLs nicht mehr feststellbar war.

Skp2 selbst scheint damit keinen direkten Einfluss auf das Zellüberleben zu besitzen. Über den gesteigerten Abbau von Zielstrukturen der SCF-Ubiquitin-Ligase, wie $p21^{Cip1/Waf1}$, $p57^{Kip2}$ oder p130, die vergleichbar zu $p27^{Kip1}$ nach Phosphorylierung in Anwesenheit von Skp2 an die SCF-Ubiquitin-Ligase gebunden und für den weiteren Abbau mit Ubiquitin-Resten markiert werden, begründet sich die onkogene Wirkung von Skp2. Diese Wirkung ist dabei unabhängig von dem p19Arf-p53-Regulationsweg (Bornstein, Bloom et al. 2003; Nakayama and Nakayama 2005; Lin, Chen et al. 2010).

Skp2 ist damit in höhergradigen B-Zell-Lymphomen nicht als unabhängiger Marker an der Transformation beteiligt und kann nicht verlässlich zur Einschätzung der klinischen Prognose angesehen werden (Lim, Adamson et al. 2002). In seiner Wirkung auf das Zellüberleben muss dessen indirekte Wirkung auf multifunktionelle, tumorsuppressive Proteine wie $p21^{Cip1/Waf1}$, $p27^{Kip1}$ oder $p57^{Kip2}$ berücksichtigt werden (Guo, Tian et al. 2010; Lin, Chen et al. 2010).

5.2.5 Der Einfluss der $p27^{Kip1}$-Expression in Tumoren und sein Zusammenhang mit Cks1b

In aggressiven menschlichen Tumoren ist ein erhöhter Abbau von $p27^{Kip1}$ ein prognostischer Marker für eine negative Prognose. So ist in Mamma-, Ösophagus-, Lungen-, oder Kolorektalen Karzinomen der Verlust an $p27^{Kip1}$ mit einem deutlich schlechteren klinischen Verlauf assoziiert (Slingerland and Pagano 2000; Bartek and Lukas 2001). Bei der Untersuchung des progressionsfreien Überlebens der Patienten mit DLBCL nach $p27^{Kip1}$-Status ergab sich in den Kaplan-Meier-Kurven ein Trend der Gruppe mit $p27^{Kip1} < 29\%$ zu einem schlechteren klinischen Verlauf (Tsihlias, Kapusta et al. 1999; Bartek and Lukas 2001; Keller, Old et al. 2007).

Überraschenderweise war keine inverse Korrelation zwischen Cks1b und $p27^{Kip1}$ nachweisbar. Es fand sich im Gegenteil ein leicht ausgeprägter, dennoch signifikanter positiver Zusammenhang zwischen den beiden Markern (CC:0,19; p=0,008). Vorsichtig müssen hierbei jedoch die Ergebnisse der $p27^{Kip1}$-Expression betrachtet werden, da aufgrund der engen Spannweite der Werte (0-40% Positivität) und minimaler Unterschiede in der Immunhistochemie schon kleine Differenzen statistisch signifikant ausfallen.

In Eμ-Myc-Mausmodell-Studien zeigte sich, dass die Induktion von Cks1b durch c-Myc auf Transkriptionsebene für den Myc-induzierten Abbau von $p27^{Ki1}$ essentiell ist. Dieser wird über eine Ubiquitinierung vermittelt und führt zu einem reduzierten Spiegel an $p27^{Kip1}$ (s.1.2.3), was wiederum mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Keller, Old et al. 2007). Dass dieser Zusammenhang auf menschlicher Proteinebene nicht nachweisbar war, gibt Hinweise auf kompliziertere Mechanismen mit weiteren Faktoren, die auf die einzelnen Komponenten c-Myc- Cks1b – $p27^{Kip1}$ Einfluss nehmen. Ein Eingriff in die Kette an Effektoren müsste hier genauer untersucht werden.

Der Einfluss von Cks1b auf $p27^{Kip1}$ als notwendiger Faktor der SCF –Ubiquitin-Ligase scheint dabei unabhängig von Cdk`s zu sein, deren Aktivität jedoch für den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus notwendig ist und die durch indirekte Wege über Cks1b induziert werden. Nicht vollständig geklärt ist, ob der Einfluss von Cks1b auf den $p27^{Kip1}$-Abbau wirklich unabhängig von seiner Bindung an Cyclin-Cdk-Komplexe ist. So interagierten Cykline wie z.B. Cyklin A mit Skp2, was wiederum die Bindung von Cks1b an den SCF^{Skp2}Komplex erleichtert (Bartek and Lukas 2001).

Der Einfluss der Komponenten des untersuchten Signaltransduktionsweges auf den $p27^{Kip1}$ -Status bleibt weiterhin nicht vollständig geklärt und die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf unbekannte Mechanismen hin, die an der Regulation der betroffenen Marker beteiligt sein könnten. Der negativere prognostische Verlauf bei Vorliegen von erhöhten Cks1b-Level bleibt trotz fehlender Korrelation zu erniedrigten $p27^{Kip1}$ -Spiegeln bestehen, was auf einen $p27^{Kip1}$-unabhängigen Einfluss von Cks1b auf die klinische Prognose hinweist (s. 5.2.5).

5.2.6 Die prognostische Wertigkeit der Cks1b-Expression

Ein eindeutig linearer Zusammenhang zwischen der Cks1b-Expression und dem klinischen Verlauf konnte nach unseren Studien und bei verschiedenen Cut-off-Werten nicht verifiziert werden. Die Grenzwerte von Cks1b wurden statistisch mithilfe von chi-square (log-rank) Tests festgelegt. Eine Validierung dieser Cut-off-Werte müsste nun durch weitere Vergleichskollektive erfolgen, um deren Verwendbarkeit hinsichtlich eines möglichen Nutzens für weitere prognostische Studien zu überprüfen.

Bei isolierter Betrachtung verschieden hoher, signifikanter Cks1b-Cut-Off-Werte (8,5% und 37%) ergab sich jeweils ein erniedrigtes progressionsfreies Überleben bei der durch höhere Cks1b-Expression charakterisierten Patientengruppe. Bei einem mittleren Cut-Off-Wert von 0,37 fand sich bei ≥ 37% Cks1b positiver Zellen ein signifikant schlechterer Verlauf mit einem medianen PFS von 20 Monaten vs. 94 Monaten bei niedrigerem Proteinspiegel (p=0,01). Das 5-Jahres-PFS der Cks1b-negativen Gruppe lag mit 59% deutlich höher als das der Cks1b-Positiven mit nur 39% (s. Abb. 16, 17). Diese Ergebnisse

sprechen für einen negativen Einfluss erhöhter Cks1b-Expression bezüglich des Zeitraumes bis zum Erleiden eines Rezidiv, Progress oder Tod.

Es ergab sich jedoch bei Einteilung der Patienten und Vergleich der PFS-Kurven nach Cks1b-Intervallen (0 bis 37%, 37 bis 62% und mehr als 62% Positivität) ein neuer Aspekt, der auf weitaus kompliziertere Regelmechanismen der SCF-Skp2/Cks1- $p27^{Kip1}$-Signaltransduktionskaskade hinweist und keine klare prognostische Aussagekraft allein nach Cks1b-Spiegel zulässt.

So waren bei Betrachtung der Cks1b-Intervalle mittlere Protein-Spiegel von Cks1b (37-62%) mit einer eindeutig negativeren klinischen Prognose im Vergleich zu niedrigerer Expression assoziiert. Lag die Cks1b-Expression dagegen bei einer Positivität von mehr als 62%, so zeigte sich ein Wechsel zu einem signifikant günstigeren klinischen Verlauf im Vergleich zu mittleren Cks1b-Werten ($p<0,05$).

Man kann nach diesen Ergebnissen nicht von einem linearen Einfluss der Cks1b-Spiegel auf die klinische Prognose ausgehen. Es stellt sich die Frage, welche Mechanismen bei einer starken Cks1b-Positivität für eine möglicherweise negative Rückkopplung und somit Hemmung der eigentlichen Funktion, nämlich dem Abbau des Tumor-Suppressor-Proteins $p27^{Kip1}$, ursächlich sind.

Auch waren einige Patientenfälle durch auffallend reduzierte Cks1b-Level trotz hoher c-Myc-Expression gekennzeichnet. Es zeigten sich ebenso umgekehrte Konstellationen mit hohem Cks1b trotz niedrigem c-Myc-Spiegel (s.5.2.2). Hinweise auf diese Untergruppen und somit weitere unbekannte Ursachen der konträren Marker-Expression gaben schon die Array-Daten (s. Abb.5) von A. Rosenwald (Rosenwald, Wright et al. 2002). Eine sichere prognostische Einschätzung allein aufgrund der Cks1b-Proteinexpression ist nach all diesen Ergebnissen nicht zu treffen.

Trotz eines jeweils negativeren klinischen Verlaufs bei den Patienten mit erhöhter Cks1b-Expression bei isolierter Betrachtung verschieden hoher Cut-Off-Werte scheint nach all diesen Untersuchungen eine mittlere Cks1b-Expression (37-62%) für eine besonders schlechte Prognose kennzeichnend zu sein. Übertrifft die Cks1b-Positivität eine Grenze von gut 60 Prozent, so steigen durch noch unbekannte Mechanismen die $p27^{Kip1}$-Level wieder an. Dies spiegelt sich konform in einem besseren klinischen Verlauf der sehr hoch-Cks1b-positiven Patienten wieder. Viele Faktoren der Regulationswege sind hier noch unbekannt. Somit kann trotz vieler Indikatoren für einen negativen Einfluss eines erhöhten Cks1b-Protein-Levels auf den Krankheitsverlauf nicht von einer klinischen Anwendbarkeit von Cks1b als prognostischem Marker ausgegangen werden. Die Cut-off-Werte bedürfen zudem einer weiteren Validierung in einem unabhängigen Patientenkollektiv bei Anwendung aktueller Therapieregimes inklusive Rituximab.

Weiterhin müssen die ansteigenden $p27^{Kip1}$-Spiegel bei sehr hohen Cks1b-Werten genauer untersucht werden, um deren Ursache und mögliche, verborgene Regulationsmechanismen aufzudecken.

5.3 Die Rolle von c-Myc

Eine entscheidende Schlüsselfunktion spielt in den gesamten Regulationsvorgängen das c-Myc-Protein. Aufgrund der vielfältigen Einflussmöglichkeiten und Autoregulationswege ist dieses Onkoprotein kein einfacher, fassbarer Angriffspunkt für gezielte Therapien und bei weitem in seinen gesamten Funktionen noch nicht voll verstanden. Auch der Einfluss auf Faktoren wie Cks1b und Skp2 scheint nicht direkt und linear auf eine einzige Art und Weise erklärbar zu sein.

Die erste entdeckte Zielstruktur von c-Myc stellte c-Myc selbst dar, wobei der genaue Ablauf der Autoregulation immer noch unklar bleibt (Herkert and Eilers 2010). Viele der Myc-Zielgene betreffen Zellzyklusinhibitoren wie $p18^{Ink4c}$, $p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$ oder $p57^{Kip2}$. Über die Unterdrückung solcher Wachstums-supprimierender Gene scheint Myc seine proliferative Wirkung und sein onkogenes Potential zu entwickeln. Eine weitere wichtige Gruppe an Zielgenen betreffen Proteine, die an der Zelladhäsion beteiligt sind (Inghirami, Grignani et al. 1990). Die Unterdrückung dieser Gene ist in einer Vielzahl von Zellen wie bei N-Myc in Neuroblastomen oder c-Myc in hämatopoetischen Stammzellen beobachtet worden und stellt somit eine zentrale Funktion von Myc dar (Judware and Culp 1995; Gandarillas and Watt 1997). Durch die Vielzahl an Zielgenen, aktivierenden als auch supprimierenden Wirkungen von Myc, die in ihrem Ablauf bei weitem noch nicht erfasst werden konnten, ist eine Annäherung und therapeutischer Zielansatz über die einzelnen Komponenten der Signalstransduktionswege von c-Myc eine mögliche Option.

Jedoch fällt dies auch nach unseren Ergebnissen bei Betrachtung der Effektoren Cks1b und Skp2, durch fehlenden Nachweis einer direkten Korrelation der untersuchten Proteine, schwer. Nach den Ergebnissen der FISH-Analyse waren bei Vorliegen einer c-Myc-Translokation oder -Amplifikation einige Fälle vorhanden, die durch eine niedrige Expression von Cks1b und Skp2, als auch in Einzelfällen von hohem $p27^{Kip1}$, gekennzeichnet waren. Die Proliferationsrate hingegen war signifikant erhöht. Hier könnten die Autoregulationsmechanismen von c-Myc bei Vorliegen einer Überexpression eine Rolle spielen, weshalb sich eine Translokation bzw. Amplifikation nicht vollständig auf die Myc-Zielgene auswirken konnte. Die wirkliche Ursache bleibt jedoch weiter spekulativ. Zudem ist bei einem Anteil von 3% (n=6) an c-Myc-Translokationen und von 8% (n=17) an c-Myc-Amplifikationen, was sich mit Angaben in der Literatur deckt, nach der sich in 5-15% der DLBCL eine c-Myc-Translokation/Amplifikation nachweisen lässt, die Fallzahl sehr niedrig. Aus diesem Grund muss mit einer statistischen Wertung hinsichtlich der Korrelation zu Cks1b bzw. Skp2 zurückhaltend umgegangen werden. Eine größere

Fallzahl wäre notwendig, um beweisen zu können, ob die einzelnen Fälle, die aus der Reihe fallen, eine signifikante Untergruppe mit eigenen Regulationswegen darstellen oder bei fehlender Signifikanz als Einzelfälle zu betrachten sind.

In diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen ist keine einzelne zytogenetische Läsion für die Tumorgenese definierend. C-Myc kommt jedoch auch hier eine entscheidende Rolle zu, und so zeigt sich insbesondere in Verbindung mit bestimmten weiteren genetischen Veränderungen, wie der Translokation t(14;18) des Bcl2 Lokus, die in 10-40% der DLBCL auftritt, und einem in 7-15% der GC-DLBCL identifizierbaren 8q24/c-Myc-Rearrangement ein klinisch äußerst aggressiver Verlauf trotz dem prognostisch günstigeren GCB-Typ (Le Gouill, Talmant et al. 2007). Das Überleben in diesem Patientenkollektiv liegt bei einem PFS und OS von 5-4 Monaten, trotz intensiver, Rituximab beinhaltender, Chemotherapie. Somit stellen Translokationen von c-Myc, insbesondere in Kombination mit bestimmten, noch nicht vollständig umfassten, weiteren genetischen Alterationen, ein hohes Risiko für fehlendes Therapieansprechen und einen aggressivsten klinischen Verlauf dar (Macpherson, Lesack et al. 1999; Kanungo, Medeiros et al. 2006; Le Gouill, Talmant et al. 2007). Das Auftreten von heterogenen c-Myc-Translokationen mit Immunglobulin-Genen ist hierbei unabhängig von GCB- oder Non-GCB-Typ. Diese Einteilung nach Hans-Klassifikation (Hans, Weisenburger et al. 2004) nimmt in seiner prognostischen Wertigkeit bei zunehmenden Kenntnissen und Anwendung neuer Therapiestandards zunehmend in seiner Aussagekraft ab. Aber auch die Betrachtung eines einzigen Effektors von c-Myc wie Cks1b hat nach unseren Ergebnissen nur eine begrenzte prognostische Aussagefähigkeit und kommt bei der Komplexität der Wirkungen und Gegenwirkungen des c-Myc-Regelkreises nur in einer multifaktoriellen Betrachtung als aussagekräftiger Marker in Frage.

Myc ist in nahezu 70% aller Tumoren an der Onkogenese beteiligt (Nilsson and Cleveland 2003), und so erweitern sich konstant die Kenntnisse über dessen Zielgene, apoptotische, proliferative und Angiogenese fördernde Funktionen. Die Identifikation von mindestens 647 Zielgenen (einsehbar unter http://www.myc-cancer-gene.org) und Zusammenführung der Forschungsergebnisse aus verschiedenen onkologischen Bereichen ist ein wichtiger Schritt für ein zunehmendes Verständnis und zukünftige therapeutische Ansatzpunkte.

5.4 Zukünftige Ansätze und Überlegungen

Eine verbesserte Einteilung der Patienten nach Risikoprofil kann kaum an einem einzelnen Marker festgemacht werden, sondern es bedarf eines aussagekräftigen Gen-Expressionsprofils, in Zusammenschau mit vielfach bestätigten klinischen Prognose-Faktoren. Dies muss an einem Patientenkollektiv mit aktuellen Therapieregimes inklusive standardmäßiger Anwendung von Rituximab verifiziert und auf den prognostischen Nutzen hin überprüft werden.

Für notwendige Untersuchungen an großen Patientenkollektiven erleichtert die Verwendung von TMAs und die immunhistochemische Detektion zellulärer Marker den experimentellen Vergleich vieler Merkmale und kann auch für die klinische Anwendbarkeit, um schnelle, vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, von Nutzen sein.

Cks1b kann aufgrund von noch unbekannten, komplexen Regulationsmechanismen nicht als eindeutiger, prognostisch aussagekräftiger zellulärer Marker in DLBCLs angesehen werden, auch wenn bei einem Großteil der Patienten eine höhere Cks1b-Expression mit einem verringerten progressionsfreien Überleben einhergeht. Jedoch zeigt sich hierbei kein linearer Zusammenhang zwischen der Höhe der Cks1b-Proteinspiegel und der klinischen Prognose. Insbesondere mittlere Expressionswerte von Cks1b sind nach den Ergebnissen dieser Arbeit für einen besonders negativen Verlauf der Patienten mit aggressiven B-Zell-Lymphomen charakteristisch. Bei Cks1b-Werten von über 60% verbessert sich die klinische Prognose wieder und die $p27^{Kip1}$-Spiegel steigen gering an. Weitere Untersuchungen wären notwendig, um unbekannte Mechanismen aufzudecken, die insbesondere trotz hoher Cks1b-Expression einem verstärkten Abbau von $p27^{Kip1}$ entgegenwirken und konsekutiv zu einer besseren klinischen Prognose führen.

6 Zusammenfassung

Diffus großzellige B-Zell-Lymphome stellen als heterogene Entität mit einer zunehmend steigenden Inzidenz einen Hauptanteil von bis zu 40 % aller B-Zell-Lymphome dar (Lenz and Staudt 2010). Durch Kombination verschiedener Chemotherapie-Schemata, insbesondere CHOP, mit dem monoklonalen Cd20-Antikörper Rituximab wird in bis zu 80 % eine komplette Krankheitsremission erreicht (Coiffier, Lepage et al. 2002; Le Gouill, Talmant et al. 2007; Marcus and Hagenbeek 2007). Die aktuelle WHO-Klassifikation von 2008 definiert nach pathogenetischen, klinischen, lokalisationsbezogenen Gesichtspunkten und mit Berücksichtigung der Übergangsformen die entsprechenden Subtypen des DLBCL (1993; Jaffe, Harris et al. 2008; Campo, Swerdlow et al. 2011).

Eine Reihe an Mutationen in unterschiedlichen Differenzierungs-Stadien der B-Zellen führt zur Transformationsentstehung. Die klinische Aggressivität und das Ansprechen auf Therapie können sich hierbei bei den verschiedenen DLBCL-Subtypen deutlich unterscheiden. Wichtig für weitere Therapieentscheidungen sind deshalb möglichst genaue Kenntnisse der vorliegenden Pathogenese und eine genauere Stratifizierung der Patienten mit Entwicklung angepasster Therapie-Schemata. Eine wichtige Funktion spielt das c-Myc-Gen mitsamt seinen vielfältigen Einflüssen auf multiple Effektorgene, insbesondere auf die Kompontenten der SCF-Ubiquitin-Ligase wie Skp2 und Cks1b (Iritani and Eisenman 1999; Nilsson and Cleveland 2003; Dang, O'Donnell et al. 2006; Meyer and Penn 2008; Herkert and Eilers 2010).

In Zelllinien und Eμ-Myc-Lymphom-Modellen konnte gezeigt werden, dass c-Myc die SCF-Ubiquitin-Ligase-Komponenten Cks1b und Skp2 induziert, und damit über einen verstärkten post-translationalen Abbau zu sekundär erniedrigten Spiegeln des Tumorsuppressors $p27^{Kip1}$ führt (Lim, Adamson et al. 2002; Keller, Old et al. 2007; Old, Kratzat et al. 2010).

Eine Überexpression von c-Myc, insbesondere bei Vorliegen von Translokationen, Amplifikationen als auch erhöhten Transkriptionsspiegeln, stellt in verschiedenen Tumoren wie auch in aggressiven B-Zell-Lymphomen einen negativ prognostischen Faktor dar (Kramer, Hermans et al. 1998; Le Gouill, Talmant et al. 2007; Johnson, Savage et al. 2009; Niitsu, Okamoto et al. 2009; Savage, Johnson et al. 2009; Tibiletti, Martin et al. 2009; Tomita, Tokunaka et al. 2009). Die Rolle von $p27^{Kip1}$ als auch Skp2 und Cks1b in aggressiven B-Zell-Lymphomen ist jedoch noch weitgehend unklar. Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen vermehrter c-Myc-Transkription und damit ansteigender Cks1b-Expression in DLBCLs fanden sich in einer Subgruppe von Patienten bei der Analyse der von A. Rosenwald veröffentlichten mRNA-Genexpressionsdaten (Rosenwald, Wright et al.

2002). Hier zeigte sich eine hoch signifikante Korrelation zwischen erhöhter c-Myc- und Cks1b-mRNA-Expression.

Das Ziel dieser Arbeit lag darin, nicht auf RNA, sondern auf Protein-Ebene den effektiven Einfluss von Cks1b in menschlichen DLBCLs auf den klinischen Verlauf mit Betrachtung des progressionsfreien Überlebens mithilfe verschiedener, valider Cut-Off-Werte zu untersuchen. Durch Korrelationsstudien sollte ein postulierter Zusammenhang der entscheidenden zellulären Marker des c-Myc- Skp2/Cks1- $p27^{Kip1}$-Signaltransduktionsweges verifiziert werden.

Nach der Herstellung von tissue-microarrays aus in Paraffin fixierten Gewebeproben von 222 Patienten mit DLBCL dreier Zentren (München, Basel und Innsbruck) wurde die Expression charakteristischer zellulärer Marker durch immunhistochemische Analyse bestimmt. Der GCB-Anteil lag in diesem Patientenkollektiv bei 49% und war durch einen nicht-signifikanten, besseren klinischen Verlauf als der des Non-GCB-Subtyp gekennzeichnet. Für die weiteren Untersuchungen, die Frage nach einem Zusammenhang zwischen dem klinischen Verlauf der Patienten und deren Proteinexpression, im Mittelpunkt Cks1b, wurden statistisch valide Cut-Off-Werte bestimmt.

Wie vermutet zeigte sich bei der Korrelation der Marker des SCF-SIgnaltransduktionsweges einerseits eine positive Korrelation zwischen dem hauptsächlich nukleär exprimierten Protein Cks1b und c-Myc (rho=+0,41, p<0,001), als auch zwischen Cks1b und Skp2 (rho=+0,58, p<0,001). Eine signifikante, positive Korrelation bestand weiterhin zu dem Proliferationsmarker Ki67 (rho=+0,14, p=0,044). Ein vermuteter inverser Zusammenhang zwischen Cks1b und $p27^{Kip1}$ ließ sich nicht bestätigen, wohingegen eine geringe, jedoch signifikante positive Korrelation von Cks1b zu den $p27^{Kip1}$-Protein-Spiegel (rho=+0,19, p=0,008) vorlag. Die Ursache der fehlenden Auswirkung hoher Cks1b- bzw. Skp2-Expression auf $p27^{Kip1}$ bleibt hierbei unklar.

Bei der Untersuchung des klinischen Verlaufes nach Cks1b-Status und bei isolierter Betrachtung der einzelnen signifikanten Cut-Off-Werte 0,08 (p=0,001) und 0,37 (p=0,01) ergab sich ein negativer prognostischer Verlauf der Patienten mit erhöhter Cks1b-Expression. Bei diesen Patienten kam es deutlich früher zu Ereignissen wie Krankheitsprogress, Rezidiv oder Tod. Mit einem durchschnittlichen progressionsfreien Überleben von 20 Monaten bei ≥37% Cks1b-Positivität vs. 94 Monaten bei <37%Cks1b positiven Zellen zeichnete sich ein deutlich schlechterer klinischer Verlauf bei den Patienten mit höherer Cks1b-Positivität ab (p=0,01). Das 2- (5-) PFS lag nach dem Grenzwert 0,37 bei der Cks1b-positiven Gruppe bei nur 48% (39%) im Gegensatz zu 68% (59%) in der Cks1b-negativen Gruppe. Dieser Unterschied blieb nach Einteilung der Patienten in GCB- und Non-GCB-Subtyp weiter innerhalb der einzelnen Subtypen bestehen.

Ein wichtiger weiterer Aspekt ergab sich jedoch erst bei dem Vergleich verschiedener Cks1b-Expressions-Intervalle. Ein signifikant negativer klinischer Verlauf war insbesondere für eine mittlere Cks1b-Expression im Bereich von 37% bis 62% kennzeichnend. Hingegen war eine noch weiter erhöhte Cks1b-Expression (>62%) mit einer vergleichbar besseren Prognose assoziiert. Dieser Unterschied war statistisch signifikant, der Zusammenhang bleibt aktuell jedoch unklar.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man nicht von einem linearen Zusammenhang zwischen Cks1b und dem klinischen Verlauf ausgehen. Die Bedeutung von Cks1b als negativer prognostischer Faktor wird relativiert und der bessere Verlauf bei sehr hohen Cks1b-Werten spricht für weitere, noch unbekannte Mechanismen, die auf den komplexen Regulationsweg der Komponenten c-Myc, Cks1b und Skp2 bis hin zu $p27^{Kip1}$ Einfluss nehmen. Die Komplexität des c-Myc-Regelkreises mitsamt dessen Effektoren wie Cks1b wirft bei zunehmenden Kenntnissen erneut vielfältige Fragen auf und bietet lange vor einer therapeutischen Annäherung trotz rasanter Forschungsergebnisse ein weites Feld noch zu lösender Problemstellungen. Dennoch kann man nach den Ergebnissen dieser Arbeit nun auch auf menschlicher Proteinebene von einem signifikanten Zusammenhang erhöhter Cks1b-Expression mit einer negativen klinischen Prognose ausgehen.

7 Anhang

7.1 Protokolle

7.1.1 Immunhistochemie

- *Entparaffinisierung* in absteigender Alkoholreihe (2×10 min Xylol,2×5 min in 95%igem, 90%igem, 80%igem und 70%igem Alkohol)
- Spülen mit aqua destillé (a.d.)
- *Demaskierung*: Dampfgarer 20 min vorwärmen. Mit Alufolie abgedeckte und in Zitratpuffer gestellte Objektträger mit den TMAs für 30 min im Dampfgarer kochen, 10 min auskühlen lassen
- Spülen mit TRIS-Puffer
- 15 min (Raumtemperatur) in 3%igem H_2O_2
- *Avidin/ Biotin Block* (VECTASTAIN), je 15 min
- 5%iges Ziegenserum in DAKO-Verdünnungslösung 30 min (RT)
- *Primär Antikörper*, verdünnt in DAKO-Verdünnungslösung, 1h
- Spülen mit TRIS
- *CHEMATE LSAB-DAB (Dako) Zweit-Antikörper* Bottle A 30 min (RT)
- Spülen mit TRIS
- *CHEMATE LSAB-DAB (Dako) Komplex* Bottle B 30 min (RT)
- Spülen mit TRIS
- DAB (Diaminobenzidin) 3-7 min
- Spülen mit TRIS
- Hämalaun 1 min
- Spülen mit H_2O und a.d.
- Aufsteigende Alkoholreihe
- Pertex, Deckblatt, Trocknen

7.1.2 FISH-Protokoll

- Vortag: Schnitte auf Super Frost Plus Objektträger 8µm; über Nacht bei 58,5°C im Brutschrank
- Entparaffinierung bis Aqua dest., Schnitte in 1l kochenden Citratpuffer 3min (bei vollem Druck im Kochtopf), in kaltem Leitungswasser ca.5min kühlen, Spülen in PBS Puffer
- Pronase E 0,05% vorbereiten
- Wasserbad auf 37°C heizen, Küvette mit 50ml PBS erwärmen; bei 37°C Pronase E (25mg) und Schnitte in PBS hineingeben, 2min inkubieren (37°C); Spülen in PBS
- Schnitte 5min bei RT in 4% Paraformaldehyd fixieren; Spülen in PBS
- Denaturierung
- 70%Formamid/2xSSC in Wasserbad bis 75°C erwärmen
- Schnitte 15min in 70%Formamid/2xSSC
- Schnitte 3min in 70%igem Alkohol, dann in 96%igem und 100%igem Alk. je 3min
- Sonde von -20°C auf RT bringen, mischen und denaturieren
- OT lufttrocknen, ca.5min
- Sonde auf Deckglas geben, auf den Schnitt legen (ohne Luftblasen), Verschluss mit Fixogumm
- Hybridisierung
- Schnitte über Nacht in VYSIS HYBrite™ legen
- Detektion im Dunkeln
- 2xSSC/0,3%NP40 in Wasserbad auf 73°C erwärmen; Kleber entfernen
- Schnitte in 2xSSC/0,3%NP40 schwenken- Lösung der Deckgläser
- Schnitte 2min bei 73°C in Wasserbad kochen (mit 2xSSC/0,3%NP40)
- Im dunkeln Schnitte ablaufen lassen
- 5min in DAPI-Lsg. bei RT
- OT im Dunkeln lufttrocknen, mit Vectashield eindeckeln
- Schnitte in geschlossenem OT-Mäppchen im Kühlschrank lagern, bis zum Abschluss der Auswertung. Aufbewahrung bei -20°C

7.2 Literaturverzeichnis

Adams, J. M., A. W. Harris, C. A. Pinkert, L. M. Corcoran, W. S. Alexander, S. Cory, R. D. Palmiter, R. L. Brinster (1985). "The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice." Nature **318**(6046): 533-538.

Amati, B., M. W. Brooks, N. Levy, T. D. Littlewood, G. I. Evan, H. Land (1993). "Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max." Cell **72**(2): 233-245.

Armitage, J. O. (1993). "Treatment of non-Hodgkin's lymphoma." N Engl J Med **328**(14): 1023-1030.

Armitage, J. O. (2007). "How I treat patients with diffuse large B-cell lymphoma." Blood **110**(1): 29-36.

Armitage, J. O. and D. D. Weisenburger (1998). "New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project." J Clin Oncol **16**(8): 2780-2795.

Bari, A., L. Marcheselli, S. Sacchi, R. Marcheselli, S. Pozzi, P. Ferri, E. Balleari, P. Musto, S. Neri, M. A. Aloe Spiriti, M. C. Cox (2009). "Prognostic models for diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: a never-ending story." Ann Oncol.

Barrans, S. L., I. Carter, R. G. Owen, F. E. Davies, R. D. Patmore, A. P. Haynes, G. J. Morgan, A. S Jack (2002). "Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma." Blood **99**(4): 1136-1143.

Barrans, S. L., P. A. Evans, S. J. O`Connor, R. G. Owen, G. J. Morgan, A. S. Jack (2003). "The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome." Clin Cancer Res **9**(6): 2133-2139.

Barrans, S. L., S. J. O'Connor, P. A. Evans, F. E. Davies, R. G. Owen, A. P. Haynes, G. J. Morgan, A. S. Jack (2002). "Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma." Br J Haematol **117**(2): 322-332.

Bartek, J. and J. Lukas (2001). "Are all cancer genes equal?" Nature **411**(6841): 1001-1002.

Bartek, J. and J. Lukas (2001). "p27 destruction: Cks1 pulls the trigger." Nat Cell Biol **3**(4): E95-98.

Bashir, T., N. V. Dorrello, V. Amador, D. Guardavaccaro, M. Pagano (2004). "Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase." Nature **428**(6979): 190-193.

Bastard, C., C. Deweindt, J. P. Kerckaert, B. Lenormand, A. Rossi,F. Pezzella, C. Fruchart, C. Duval, M. Monconduit, H. Tilly (1994). "LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients." Blood **83**(9): 2423-2427.

Baudino, T. A., C. McKay, H. Pendeville-Samain, J. A. Nilsson, K. H. Maclean, E. L. White, A. C. Davis, J. N. Ihle, J.L. Cleveland (2002). "c-Myc is essential for vasculogenesis and

angiogenesis during development and tumor progression." Genes Dev **16**(19): 2530-2543.

Blackwood, E. M. and R. N. Eisenman (1991). "Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc." Science **251**(4998): 1211-1217.

Blay, J. Y., C. Sebban, C. Surbiguet, M. Ouachée, I. Philip, T. Philip, P. Biron (1998). "High-dose chemotherapy with hematopoietic stem cell transplantation in patients with mantle cell or diffuse centrocytic non-Hodgkin's lymphomas: a single center experience on 18 patients." Bone Marrow Transplant **21**(1): 51-54.

Bornstein, G., J. Bloom, D. Sitry-Shevah, K. Nakayama, M. Pagano, A. Hershko (2003). "Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase." J Biol Chem **278**(28): 25752-25757.

Brodeur, G. M., R. C. Seeger, M. Schwab, H. E. Vamus, J. M. Bishop (1984). "Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage." Science **224**(4653): 1121-1124.

Campo, E., S. H. Swerdlow, N. L. Harris, S. Pileri, H. Stein, E. S. Jaffe (2011). "The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications." Blood **117**(19): 5019-5032.

Carbone, P. P., H. S. Kaplan, K. Musshoff, D. W. Smithers, M. Tubiana (1971). "Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification." Cancer Res **31**(11): 1860-1861.

Carrano, A. C., E. Eytan, A. Hershko, M. Pagano (1999). "SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27." Nat Cell Biol **1**(4): 193-199.

Chappuis, P. O., L. Kapusta, L. R. Bégin, N. Wong, J. S. Brunet, S. A. Narod, J. Slingerland, W. D. Foulkes (2000). "Germline BRCA1/2 mutations and p27(Kip1) protein levels independently predict outcome after breast cancer." J Clin Oncol **18**(24): 4045-4052.

Chiarle, R., Y. Fan, R. Piva, H. Boggino, J. Skolnik, D. Novero, G. Palestro, C. De Wolf-Peeters, M. Chilosi, M. Pagano, G. Inghirami (2002). "S-phase kinase-associated protein 2 expression in non-Hodgkin's lymphoma inversely correlates with p27 expression and defines cells in S phase." Am J Pathol **160**(4): 1457-1466.

Cleveland, J. L., M. Huleihel, P.Bressler, U. Siebenlist, L. Akiyama, R. N. Eisenman, U. R. Rapp (1988). "Negative regulation of c-myc transcription involves myc family proteins." Oncogene Res **3**(4): 357-375.

Coiffier, B. (2002). "Rituximab in the treatment of diffuse large B-cell lymphomas." Semin Oncol **29**(1 Suppl 2): 30-35.

Coiffier, B., E. Lepage, J. Briere, R. Herbrecht, H. Tilly, R. Bouabdallah, P. Morel, E. Van Den Neste, G. Salles, P. Gaulard, F. Reyes, P. Lederlin, C. Gisselbrecht (2002). "CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma." N Engl J Med **346**(4): 235-242.

Coiffier, B., C. Thieblemont, E. van den Neste, G. Lepeu, I.Plantier, S. Castaine, S. Lefort, G. Marit, M. Macro, C. Sebban, K.Belhadj, D. Bordessoule, C. Fermé, H. Tilly (2010). "Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a

study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte." Blood **116**(12): 2040-2045.

Colomo, L., A. Lopez-Guillermo, M. Perales, S. Rives, A. Martinez, F. Bosch, D. Colomer, B. Falini, E. Montserrat, E. Campo (2003). "Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma." Blood **101**(1): 78-84.

Crews, S., R. Barth, L. Hood, J. Prehn, K. Calame (1982). "Mouse c-myc oncogene is located on chromosome 15 and translocated to chromosome 12 in plasmacytomas." Science **218**(4579): 1319-1321.

Dang, C. V. (1999). "c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism." Mol Cell Biol **19**(1): 1-11.

Dang, C. V., K. A. O'Donnell, K. I. Zeller, T. Nguyen, R. C. Osthus, F. Li (2006). "The c-Myc target gene network." Semin Cancer Biol **16**(4): 253-264.

De Paepe, P., R. Achten, G. Verhoef, I. Wlodarska, M. Stul, V. Vanhentenrijk, M. Praet, C. De Wolf-Peeters (2005). "Large cleaved and immunoblastic lymphoma may represent two distinct clinicopathologic entities within the group of diffuse large B-cell lymphomas." J Clin Oncol **23**(28): 7060-7068.

Eberhardy, S. R. and P. J. Farnham (2001). "c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism." J Biol Chem **276**(51): 48562-48571.

El-Bolkainy, T. N., M. N. El-Bolkainy, H. M. Khaled, N. M. Mokhtar, S. S. Eissa, H. M. Gouda, O. H. El-Hattab (2007). "Evaluation of MIB-1 and p53 overexpression as risk factors in large cell non-Hodgkin lymphoma in adults." J Egypt Natl Canc Inst **19**(4): 231-238.

Engelhard, M., G. Brittinger, D. Huhn, H. H. Gerhartz, P. Meusers, W. Siegert, E. Thiel, W. Wilmanns, U. Aydemir, S. Bierwolf, H. Griesser, M. Tiemann, K. Lennert (1997). "Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor." Blood **89**(7): 2291-2297.

Esposito, V., A. Baldi, A. De Luca, A. M. Groger, M. Loda, G. G. Giordano, M. Caputi, F. Baldi, M. Pagano, A. Giordano (1997). "Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer." Cancer Res **57**(16): 3381-3385.

Fero, M. L., M. Rivkin, M. Tasch, P. Porter, C.E. Carow, E. Firpo, K. Polyak, L.-H. Tsai, V. Broudy, R.M. Perlmutter, K. Kaushansky, J.M. Roberts (1996). "A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice." Cell **85**(5): 733-744.

Fredersdorf, S., J. Burns, A. M. Milne, G. Packham, L. Fallis, C. E. Gillett, J. A. Royds, D. Peston, P. A. hall, A. M. Hanby, D. M. Barnes, S. Shousha, M. J. O´Hare, X. Lu (1997). "High level expression of p27(kip1) and cyclin D1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27(kip1) and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6380-6385.

Gandarillas, A. and F. M. Watt (1997). "c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells." Genes Dev **11**(21): 2869-2882.

Ganiatsas, S., R. Dow, A. Thompson, B. Schulman, D. Germain (2001). "A splice variant of Skp2 is retained in the cytoplasm and fails to direct cyclin D1 ubiquitination in the uterine cancer cell line SK-UT." Oncogene **20**(28): 3641-3650.

Ganjoo, K. N., C. S. An, M. J. Robertson, L. I. Gordon, J. A. Sen, J. Weisenbach, S. Li, E. A. Weller, A. Orazi, S. J. Horning (2006). "Rituximab, bevacizumab and CHOP (RA-CHOP) in untreated diffuse large B-cell lymphoma: safety, biomarker and pharmacokinetic analysis." Leuk Lymphoma **47**(6): 998-1005.

Ganoth, D., G. Bornstein, T. K. Ko, B.larsen, M. Tyers, M. Pagano, A. Hershko (2001). "The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27." Nat Cell Biol **3**(3): 321-324.

Gisselbrecht, C., B. Glass, N. Mounier, D. S. Gill, D. C. Linch, M. Trneny, A. Bosly, N. Ketterer, O. Shpilberg, H. Hagberg, D. Ma, J. Brière, C. H. Moskowitz, N. Schmitz (2010). "Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era." J Clin Oncol **28**(27): 4184-4190.

Grana, X. and E. P. Reddy (1995). "Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)." Oncogene **11**(2): 211-219.

Grignani, F., L. Lombardi, G.Inghirami, L. Sternas, K. Cechova, R. Dalla-Favera (1990). "Negative autoregulation of c-myc gene expression is inactivated in transformed cells." EMBO J **9**(12): 3913-3922.

Hadwiger, J. A., C. Wittenberg, M. D. Mendenhall, S. I. Reed (1989). "The Saccharomyces cerevisiae CKS1 gene, a homolog of the Schizosaccharomyces pombe suc1+ gene, encodes a subunit of the Cdc28 protein kinase complex." Mol Cell Biol **9**(5): 2034-2041.

Hans, C. P., D. D. Weisenburger, T. C. Greiner, R. D. Gascoyne, J. Delabie, G. Ott, H. K. Müller-Hermelink, E. Campo, R. M. Braziel, E. S. Jaffe, Z. Pan, P. F. L. M. Smith, B. Falini, A. H. Banham, A. Rosenwald, L. M. Staudt, J. M. Connors, J. O. Armitage, W. C. Chan (2004). "Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray." Blood **103**(1): 275-282.

Harper, J. W. (2001). "Protein destruction: adapting roles for Cks proteins." Curr Biol **11**(11): R431-435.

Harris, N. L., E. S. Jaffe, H. Stein, P. M. Banks, J.K. Chan, M. L. Cleary, G. Delsol, C. De Wolf-Peeters, B. Falini, K. C. Gatter (1994). "A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group." Blood **84**(5): 1361-1392.

Hecht, J. L. and J. C. Aster (2000). "Molecular biology of Burkitt's lymphoma." J Clin Oncol **18**(21): 3707-3721.

Hengst, L. and S. I. Reed (1996). "Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle." Science **271**(5257): 1861-1864.

Herkert, B. and M. Eilers (2010). "Transcriptional repression: the dark side of myc." Genes Cancer **1**(6): 580-586.

Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-479.

Hershko, D. D. and M. Shapira (2006). "Prognostic role of p27Kip1 deregulation in colorectal cancer." Cancer **107**(4): 668-675.

Huang, J. Z., W. G. Sanger, T. C. Greiner, L.M. Staudt, D. D. Weisenburger, D. L. Pickering, J. C. Lynch, J.O. Armitage, R. A. Warnke, A. A. Alizadeh, I. S. Lossos, R. levy, W. C. Chan (2002). "The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile." Blood **99**(7): 2285-2290.

Hummel, M., S. Bentink, H. Berger, W. Klapper, S. Wessendorf, T. F. E. Barth, H.-W. Bernd, S. B. Cogliatti, J. Dierlamm, A. C. Feller, M.-L. Hansmann, E. Haralambieva, L. Harder, D. Hasenclever, M. Kühn, D.Lenze, P. Lichter, J. I. Martin-Subero, P. Möller, H.-K. Müller-Hermelink, G.Ott, R. M. Parwaresch, C.Pott, A. Rosenwald, M.Rosolowsky, C. Schwaenen, B. Stürzenhofecker, M. Szczepanowski, H. Trautmann, H.-H. Wacker, R. Spang, M. Loeffler, L. Trümper, H. Stein, R. Siebert (2006). "A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling." N Engl J Med **354**(23): 2419-2430.

Inghirami, G., F. Grignani, L. Sternas, L. Lombardi, D. M. Knowles, R. Dalla-Favera (1990). "Down-regulation of LFA-1 adhesion receptors by C-myc oncogene in human B lymphoblastoid cells." Science **250**(4981): 682-686.

Iritani, B. M., J. Alberola-Ila, K. A. Forbush, R. M. Perimutter (1999). "Distinct signals mediate maturation and allelic exclusion in lymphocyte progenitors." Immunity **10**(6): 713-722.

Iritani, B. M. and R. N. Eisenman (1999). "c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13180-13185.

Jaffe, E. S., N. L. Harris, H. Stein, P. G. Isaacson (2008). "Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery." Blood **112**(12): 4384-4399.

Johnson, N. A., K. J. Savage, O. Ludkovski, S. Ben-Neriah, R. Woods, C. Steidl, M.J. Dyer, R. Siebert, J. Kuruvilla, R. Klasa, J. M. Connors, R. D. Gascoyne, D. E. Horsman (2009). "Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival." Blood **114**(11): 2273-2279.

Judware, R. and L. A. Culp (1995). "Over-expression of transfected N-myc oncogene in human SKNSH neuroblastoma cells down-regulates expression of beta 1 integrin subunit." Oncogene **11**(12): 2599-2607.

Kaldis, P. (2007). "Another piece of the p27Kip1 puzzle." Cell **128**(2): 241-244.

Kanungo, A., L. J. Medeiros, L. V. Abruzzo, P. Lin (2006). "Lymphoid neoplasms associated with concurrent t(14;18) and 8q24/c-MYC translocation generally have a poor prognosis." Mod Pathol **19**(1): 25-33.

Keller, U. B., J. B. Old, F. C. Dorsey, J. A. Nilsson, L. Nilsson, K. H. MacLean, L. Chung, C. Yang, C. Spruck, K. Boyd, S. I. Reed, J. L. Cleveland (2007). "Myc targets Cks1 to provoke the suppression of p27Kip1, proliferation and lymphomagenesis." EMBO J **26**(10): 2562-2574.

Kitajima, S., Y. Kudo, I. Ogawa, T. Bashir, M. Kitagawa, M. Miyauchi, M. Pagano, T. Takata (2004). "Role of Cks1 overexpression in oral squamous cell carcinomas: cooperation with Skp2 in promoting p27 degradation." Am J Pathol **165**(6): 2147-2155.

Klapper, W., H. Stoecklein, S. Zeynalova, G. Ott, F. Kosari, A. Rosenwald, M. Loeffler, L. Trümper, M. Pfreundschuh, R. Siebert (2008). "Structural aberrations affecting the MYC locus indicate a poor prognosis independent of clinical risk factors in diffuse large B-cell lymphomas treated within randomized trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL)." Leukemia **22**(12): 2226-2229.

Klein, U., T. Goossens, M. Fischer, H. Kanzler, A. Braeuninger, K. Rajewsky, R. Küppers (1998). "Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells." Immunol Rev **162**: 261-280.

Kramer, M. H., J. Hermans, E. Wijburg, K. Philippo, E. Geelen, J. H. van Krieken, D. de Jong, E. Maartense, E. Schuuring, P. M. Kluin (1998). "Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma." Blood **92**(9): 3152-3162.

Kuppers, R., K. Rajewsky, M. L. Hansmann (1997). "Diffuse large cell lymphomas are derived from mature B cells carrying V region genes with a high load of somatic mutation and evidence of selection for antibody expression." Eur J Immunol **27**(6): 1398-1405.

Le Gouill, S., P. Talmant, C. Touzeau, A. Moreau, R. Garand, N. Juge-Morineau, F. Gaillard, T. Gastinne, N. Milpied, P. Moreau, J. L. Harousseau, H. Avet-Loiseau (2007). "The clinical presentation and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC rearrangement." Haematologica **92**(10): 1335-1342.

Lenz, G. and L. M. Staudt (2010). "Aggressive lymphomas." N Engl J Med **362**(15): 1417-1429.

Lenz, G., G. Wright, S. S. Dave, W. Xiao, J. Powell, H. Zhao, W. Xu, B. Tan, N. Goldschmidt, J. Iqbal, J. Vose, M. Bast, K. Fu, D. D. Weissenburger, T. C. Greiner, J. O. Armitage, A. Kyle, L. May, R. D. Gascoyne, J. M. Connors, G. Troen, H. Holte, S. Kvaloy, D. Dierickx, G. Verhoef, J. Delabie, E. B. Smeland, P. Jares, A. Martinez, A. Lopez-Guillermo, E. Montserrat, E. Campo, R. M. Braziel, T. P. Miller, L. M. Rimsza, J. R. Cook, B. Pohlman, J. Sweetenham, R. R. Tubbs, R. I. Fisher, E. Hartmann, A. Rosenwald, G. Ott, H.-K. Muller-Hermelink, D. Wrench, T. A. Lister, E. S. Jaffe, W. H. Wilson, W. C. Chan, L. M. Staudt (2008). "Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas." N Engl J Med **359**(22): 2313-2323.

Lim, M. S., A. Adamson, Z. Lin, B. Perez-Ordonez, R. C. K. Jordan, S. Tripp, S. L. Perkins, K. S. J. Elenitoba-Johnson (2002). "Expression of Skp2, a p27(Kip1) ubiquitin ligase, in malignant lymphoma: correlation with p27(Kip1) and proliferation index." Blood **100**(8): 2950-2956.

Lin, H. K., Z. Chen, G. Wang, C. Nardella, S.-W. Lee, C.-H. Chan, W.-L. Yang, J. Wang, A. Egia, K. L. Nakayama, C. Cordon-Cardo, J. Teruya-Feldstein, P. P. Pandolfi (2010). "Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence." Nature **464**(7287): 374-379.

Lin, P. and L. J. Medeiros (2007). "High-grade B-cell lymphoma/leukemia associated with t(14;18) and 8q24/MYC rearrangement: a neoplasm of germinal center immunophenotype with poor prognosis." Haematologica **92**(10): 1297-1301.

Linderoth, J., M. Jerkeman, E. Cavallin- Stahl, S. Kvaloy, E. Torlakovic (2003). "Immunohistochemical expression of CD23 and CD40 may identify prognostically

favorable subgroups of diffuse large B-cell lymphoma: a Nordic Lymphoma Group Study." Clin Cancer Res **9**(2): 722-728.

Loda, M., B. Cukor, S. W. Tam, P. Lavin, M. Fiorentino, G. F. Draetta, J. M. Jessup, M.Pagano (1997). "Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas." Nat Med **3**(2): 231-234.

Lossos, I. S. (2005). "Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma." J Clin Oncol **23**(26): 6351-6357.

Lossos, I. S., D. K. Czerwinski, A. A. Alizadeh, M. A. Wechser, R. Tibshirani, D. Botstein, R. Levy (2004). "Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes." N Engl J Med **350**(18): 1828-1837.

Macpherson, N., D. Lesack, R. Klasa, D. Horsman, J. M. Connors, R. D. Gascoyne (1999). "Small noncleaved, non-Burkitt's (Burkit-Like) lymphoma: cytogenetics predict outcome and reflect clinical presentation." J Clin Oncol **17**(5): 1558-1567.

Magrath, I. T. (1991). "African Burkitt's lymphoma. History, biology, clinical features, and treatment." Am J Pediatr Hematol Oncol **13**(2): 222-246.

Malek, N. P., H. Sundberg, S. McGrew, K. Nakayama, T. R. Kyriakides, J. M. Roberts (2001). "A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase." Nature **413**(6853): 323-327.

Malumbres, R., J. Chen, R. Tibshirani, N. A. Johnson, L. H. Sehn, Y. Natkunam, J. Briones, R. Avani, J. M. Connors, G. E. Byrne, R.Levy, R.D. Gascoyne, I.S. Lossos (2008). "Paraffin-based 6-gene model predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP." Blood **111**(12): 5509-5514.

Marcus, R. and A. Hagenbeek (2007). "The therapeutic use of rituximab in non-Hodgkin's lymphoma." Eur J Haematol Suppl(67): 5-14.

Martins, C. P. and A. Berns (2002). "Loss of p27(Kip1) but not p21(Cip1) decreases survival and synergizes with MYC in murine lymphomagenesis." EMBO J **21**(14): 3739-3748.

Masuda, T. A., H. Inoue, K.Nishida, H. Sonoda, Y. Yoshikawa, Y. Kakeji, M. Mori (2003). "Cyclin-dependent kinase 1 gene expression is associated with poor prognosis in gastric carcinoma." Clin Cancer Res **9**(15): 5693-5698.

Meyer, N. and L. Z. Penn (2008). "Reflecting on 25 years with MYC." Nat Rev Cancer **8**(12): 976-990.

Morgan, D. O. (1995). "Principles of CDK regulation." Nature **374**(6518): 131-134.

Morton, L. M., S. S. Wang, S. S. Devesa, P. Hartge, D. D. Weisenburger, M. S. Linet (2006). "Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001." Blood **107**(1): 265-276.

Mossafa, H., D. Damotte, A. Jenabian, R. Delarue, A.Vincenneau, I. Amouroux, R. Jeandel, E. Khoury, J. M. Martelli, T. Samson, S. Tapia, G. Flandrin, X. Troussard (2006). "Non-Hodgkin's lymphomas with Burkitt-like cells are associated with c-Myc amplification and poor prognosis." Leuk Lymphoma **47**(9): 1885-1893.

Muller, D., C. Bouchard, B. Rudolph, P. Steiner, I. Stuckmann, R. Saffrich, W. Ansorge, W. Huttner, M. Eilers (1997). "Cdk2-dependent phosphorylation of p27 facilitates its Myc-induced release from cyclin E/cdk2 complexes." Oncogene **15**(21): 2561-2576.

Murre, C., P. S. McCaw, D. Baltimore (1989). "A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins." Cell **56**(5): 777-783.

Nakayama, K., N. Ishida, M. Shirane, A. Inomata, T. Inoue, N. Shishido, I. Horii, D. Y. Loh, K. Nakayama (1996). "Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors." Cell **85**(5): 707-720.

Nakayama, K., H. Nagahama, Y. A. Minamishima, M. Matsumoto, I. Nakamichi, K. Kitagawa, M. Shirane, R. Tsunematsu, T. Tsukiyama, N. Ishida, M. Kitagawa, K. Nakayama, S. Hatakeyama (2000). "Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication." EMBO J **19**(9): 2069-2081.

Nakayama, K. I. and K. Nakayama (2005). "Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases." Semin Cell Dev Biol **16**(3): 323-333.

Ngo, C. V., M. Gee, N. Akhtar, D. Yu, O. Volpert, R. Auerbach, A. Thomas-Tikhonenko (2000). "An in vivo function for the transforming Myc protein: elicitation of the angiogenic phenotype." Cell Growth Differ **11**(4): 201-210.

Nickeleit, I., S. Zender, F. Sasse, R. Geffers, G. Brandes, I. Sörensen, H. Steinmetz, S. Kubicka, T. Carlomagno, D. Menche, I. Gütgemann, J. Buer, A. Gossler, M. P. Manns, M. Kalesse, R. Frank, N. P. Malek (2008). "Argyrin a reveals a critical role for the tumor suppressor protein p27(kip1) in mediating antitumor activities in response to proteasome inhibition." Cancer Cell **14**(1): 23-35.

Niitsu, N., M. Okamoto, I. Miura, M. Hirano (2009). "Clinical features and prognosis of de novo diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC translocations." Leukemia **23**(4): 777-783.

Nilsson, J. A. and J. L. Cleveland (2003). "Myc pathways provoking cell suicide and cancer." Oncogene **22**(56): 9007-9021.

Nilsson, J. A., U. B. Keller, T. A. Baudino, C. Yang, S. Norton, J. A. Old, L. M. Nilsson, G. Neale, D. L. Kramer, C. W. Porter, J. L. Cleveland (2005). "Targeting ornithine decarboxylase in Myc-induced lymphomagenesis prevents tumor formation." Cancer Cell **7**(5): 433-444.

Old, J. B., S. Kratzat, A. Hoellein, S. Graf, J. A. Nilsson, L. Nilsson, K. I. Nakayama, C. Peschel, J. L. Cleveland, U. B. Keller (2010). "Skp2 directs Myc-mediated suppression of p27Kip1 yet has modest effects on Myc-driven lymphomagenesis." Mol Cancer Res **8**(3): 353-362.

Oster, S. K., C. S. Ho, E. L. Soucie, L. Z. Penn (2002). "The myc oncogene: MarvelouslY Complex." Adv Cancer Res **84**: 81-154.

Ott, G., M. Ziepert, W. Klapper, H. Horn, M. Szczepanowski, H. W. Bernd, C. Thorns, A. C. Feller, D. Lenze, M. Hummel, H. Stein, H. K. Müller-Hermelink, M. Frank, H. L. Hansmann, T.F. Barth, P. Möller, S. Cogliatti, M. Pfreundschuh, N. Schmitz, L.Trümper, M.Loeffler, A. Rosenwald. "Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL." Blood **116**(23): 4916-4925.

Pagano, M., S. W. Tam, A. M. Theodoras, P. Beer-Romero, G. Del Sal, V. Chau, P. R. Yew, G. F. Draetta, M. Rolfe (1995). "Role of the ubiquitin-proteasome pathway in

regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27." Science **269**(5224): 682-685.

Patel, J. H., A. P. Loboda, M. K. Showe, L. C. Showe, S. B. McMahon (2004). "Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC." Nat Rev Cancer **4**(7): 562-568.

Pelengaris, S., T. Littlewood, M. Khan, G. Elia, G. Evan (1999). "Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion." Mol Cell **3**(5): 565-577.

Penn, L. J., M. W. Brooks, E. M. Laufer, H. Land (1990). "Negative autoregulation of c-myc transcription." EMBO J **9**(4): 1113-1121.

Pfreundschuh, M. (2010). "How I treat elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma." Blood **116**(24): 5103-5110.

Pfreundschuh, M., A. D. Ho, E. Cavallin-Stahl, M. Wolf, R. Pettengell, I. Vasova, A. Belch, J. Walewski, P. L. Zinzani, W. Mingrone, S. Kvaloy, O. Shpilberg, U. Jaeger, M. Hansen, C. Corrado, A. Scheliga, M. Loeffler, E. Kuhnt (2008). "Prognostic significance of maximum tumour (bulk) diameter in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: an exploratory analysis of the MabThera International Trial Group (MInT) study." Lancet Oncol **9**(5): 435-444.

Pfreundschuh, M., J. Schubert, M. Ziepert, R. Schmits, M. Mohren, E. Lengfelder, M. Reiser, C. Nickenig, M. Clemens, N. Peter, C. Bokemeyer, H. Eimermacher, A. Ho, M. Hoffmann, R. Mertelsmann, L. Trümper, L. Balleisen, R. Liersch, B. Metzner, F. hartmann, B. Glass, V. Poeschel, N. Schmitz, C. Ruebe, A. C. Feller, M. Loeffler (2008). "Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60)." Lancet Oncol **9**(2): 105-116.

Pfreundschuh, M., L. Trumper, A. Osterborg, R. Pettengrell, M. Trneny, K. Imrie, D. Ma, D. Gill, J. Walewski, P. L. Zinzani, R. Stahel, S. Kvaloy, O. Shpilberg, U. Jaeger, M. Hansen, T. Lehtinen, A. López-Guillermo, C. Corrado, A. Scheliga, N. Milpied, M. Mendila, M. Rashford, E.kuhnt, M. Loeffler (2006). "CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group." Lancet Oncol **7**(5): 379-391.

Philip, T., C. Guglielmi, A. Hagenbeek, R. Somers, H. Van der Lelie, D. Bron, P. Sonneveld, C. Gisselbrecht, J. Y. Cahn, J. L. Harousseau (1995). "Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma." N Engl J Med **333**(23): 1540-1545.

Philipp-Staheli, J., S. R. Payne, C. J. Kemp (2001). "p27(Kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer." Exp Cell Res **264**(1): 148-168.

Plosker, G. L. and D. P. Figgitt (2003). "Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia." Drugs **63**(8): 803-843.

Polyak, K., J. Y. Kato, M. J. Solomon, S. J. Sherr, J. Massague, J. M. Roberts, A. Koff (1994). "p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest." Genes Dev **8**(1): 9-22.

Rimsza, L. M., R. A. Roberts, T. P. Miller, J. M. Unger, M. LeBlanc, R. M. Braziel, D. D. Weisenberger, W. C. Chan, H. K. Müller-Hermelink, E. S. Jaffe, R. D. Gascoyne, E. Campo, D. A. Fuchs, C. M. Spier, R. I. Fisher, J. Delabie, A. Rosenwald, L. M. Staudt, T. M. Grogan (2004). "Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project." Blood **103**(11): 4251-4258.

Rosenwald, A., G. Wright, W. C. Chan, J. M. Connors, E. Campo, R. I. Fisher, R. D. Gascoyne, H. K. Müller-Hermelink, E. B. Smeland, J. M. Giltnane, E. M. Hurt, H. Zhao, L. Averett, L. Yang, W. H. Wilson, E. S. Jaffe, R. Simon, R. D. Klausner, J. Powell, P. L. Duffey, D. L. Longo, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, W. G. Sanger, B. J. Dave, J. C. Lynch, J. Vose, J. O. Armitage, E. Montserrat, A. López-Guillermo, T. M. Grogan, T. P. Miller, M. LeBlanc, G. Ott, S. Kvaloy, J. Delabie, H. Holte, P. Kraici, T. Stokke, L. M. Staudt (2002). "The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma." N Engl J Med **346**(25): 1937-1947.

Rudders, R. A., M. E. Ross, R. A. DeLellis (1978). "Primary extranodal lymphoma: response to treatment and factors influencing prognosis." Cancer **42**(2): 406-416.

Savage, K. J., N. A. Johnson, S. Ben-Neriah, J. M. Connors, L. H. Sehn, P. Farinha, D. E. Horsman, R. D. Gascoyne (2009). "MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy." Blood **114**(17): 3533-3537.

Schuhmacher, M., M. S. Staege, A.Pajic, A. Polack, U. H. Weidle, G. W. Bornkamm, D. Eick, F. Kohlhuber (1999). "Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division." Curr Biol **9**(21): 1255-1258.

Schwab, M., J. Ellison, M.Busch, W. Rosenau, H. E. Varmus, J. M. Bishop (1984). "Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(15): 4940-4944.

Sehn, L. H., B. Berry, M. Chhanabhai, C.Fitzgerald, K. Gill, P. Hoskins, R. Klasa, K. J. Savage, T. Shenkler, J. Sutherland, R. D. Gascoyne, J. M. Connors (2007). "The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP." Blood **109**(5): 1857-1861.

Sgambato, A., M. Migaldi, P. Leocata, L. Ventura, M. Criscuolo, C. Di Giacomo, G. Capelli, A. Cittadini, C. De Gaetani (2000). "Loss of p27Kip1 expression is a strong independent prognostic factor of reduced survival in N0 gastric carcinomas." Cancer **89**(11): 2247-2257.

Shapira, M., O. Ben-Izhak, B. Bishara, B. Futerman, I. Minkov, M. M. Krausz, M. Pagano, D. D. Hershko (2004). "Alterations in the expression of the cell cycle regulatory protein cyclin kinase subunit 1 in colorectal carcinoma." Cancer **100**(8): 1615-1621.

Shapira, M., O. Ben-Izhak, S. Linn, B. Futerman, I. Minkov, D. D. Hershko (2005). "The prognostic impact of the ubiquitin ligase subunits Skp2 and Cks1 in colorectal carcinoma." Cancer **103**(7): 1336-1346.

Shaughnessy, J. (2005). "Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p27Kip1 and an aggressive clinical course in multiple myeloma." Hematology **10 Suppl 1**: 117-126.

Sheaff, R. J., M. Groudine, M. Gordon, J. M. Roberts, B. E. Clurman (1997). "Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1." Genes Dev **11**(11): 1464-1478.

Shen-Ong, G. L., E. J. Keath, S. P. Piccoli, M. D. Cole (1982). "Novel myc oncogene RNA from abortive immunoglobulin-gene recombination in mouse plasmacytomas." Cell **31**(2 Pt 1): 443-452.

Sherr, C. J. (1993). "Mammalian G1 cyclins." Cell **73**(6): 1059-1065.

Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes Dev **13**(12): 1501-1512.

Shipp, M. A. (1997). "Can we improve upon the International Index?" Ann Oncol **8 Suppl 1**: 43-47.

Slingerland, J. and M. Pagano (2000). "Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer." J Cell Physiol **183**(1): 10-17.

Slotky, M., M. Shapira, O. Ben-Izhak, S. Linn, B. Futerman, M. Tsalic, D.D. Hershko (2005). "The expression of the ubiquitin ligase subunit Cks1 in human breast cancer." Breast Cancer Res **7**(5): R737-744.

Spruck, C., H. Strohmaier, M. Watson, A.P. Smith, A. Ryan, T. W. Krek, S. I. Reed (2001). "A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1." Mol Cell **7**(3): 639-650.

Stein, H., K. Lennert, A. C. Feller, D. Y. Mason (1984). "Immunohistological analysis of human lymphoma: correlation of histological and immunological categories." Adv Cancer Res **42**: 67-147.

Sutterluty, H., E. Chatelain, A. Marti, C. Wirbelauer, M. Senften, U. Müller, W. Krek (1999). "p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells." Nat Cell Biol **1**(4): 207-214.

Tibiletti, M. G., V. Martin, B. Bernasconi, B. Del Curto, L. Pecciarini, S. Uccella, G. Pruneri, M. Ponzoni, L. Mazzucchelli, G. Martinelli, A. J. Ferreri, G. Pinotti, A. Assanelli, M. Scandurra, C. Doglioni, E. Zucca, C. Capella, F. Bertoni (2009). "BCL2, BCL6, MYC, MALT 1, and BCL10 rearrangements in nodal diffuse large B-cell lymphomas: a multicenter evaluation of a new set of fluorescent in situ hybridization probes and correlation with clinical outcome." Hum Pathol **40**(5): 645-652.

Tomita, N., M. Tokunaka, N. Nakamura, K. Takeuchi, J. Koike, S. Motomura, K. Miyamoto, A. Kikuchi, R. Hyo, Y. Yakushijin, Y. Masaki, S. Fujii, T. Hayashi, Y. Ishigatsubo, I. Miura (2009). "Clinicopathological features of lymphoma/leukemia patients carrying both BCL2 and MYC translocations." Haematologica **94**(7): 935-943.

Tsihlias, J., L. Kapusta, J. Slingerland (1999). "The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer." Annu Rev Med **50**: 401-423.

Tsvetkov, L. M., K. H. Yeh, S. J. Lee, H. Sun, H. Zhang (1999). "p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27." Curr Biol **9**(12): 661-664.

Tzankov, A., P. Went, S. Dirnhofer (2007). "Prognostic Significance of in situ Phenotypic Marker Expression in Diffuse Large B-cell Lymphomas." Biomark Insights **2**: 403-417.

Tzankov, A., P. Went, A. Zimpfer, S. Dirnhofer (2005). "Tissue microarray technology: principles, pitfalls and perspectives--lessons learned from hematological malignancies." Exp Gerontol **40**(8-9): 737-744.

Uddin, S., A. Hussain, M. Ahmed, A. Belfaumi, F. Al-Dayel, D. Ajarim, P. Bavi, K.S. Al-Kuraya (2008). "S-phase kinase protein 2 is an attractive therapeutic target in a subset of diffuse large B-cell lymphoma." J Pathol **216**(4): 483-494.

van Besien, K., C. S. Ha, S. Murphy, P. McLaughlin, A. Rodriguez, K. Amin, A. Forman, J. Romaguera, F. Hagemeister, A. Younes, C. Bachier, A. Sarris, K. S. Sobocinski, J. D. Cox, F. Cabanillas (1998). "Risk factors, treatment, and outcome of central nervous system recurrence in adults with intermediate-grade and immunoblastic lymphoma." Blood **91**(4): 1178-1184.

Varmus, H. E. (1984). "The molecular genetics of cellular oncogenes." Annu Rev Genet **18**: 553-612.

Vlach, J., S. Hennecke, K. Alevizopoulos, D. Conti, B. Amati (1996). "Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc." EMBO J **15**(23): 6595-6604.

Wang, X. C., J. Tian, L.-L. Tian, H.-L. Wu, A.-M. Meng, T.-H. Ma, J. Xiao, X.-L. Xiao, C.-H. Li (2009). "Role of Cks1 amplification and overexpression in breast cancer." Biochem Biophys Res Commun **379**(4): 1107-1113.

Yang, W., J. Shen, M. Wu, M. Arsura, M. Fitz-Gerald, Z. Suldan, D. W. Kim, C. S. Hofmann, S. Pianetti, R. Romieu-Mourez, L. P. Freedman, G. E. Sonenshein (2001). "Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc." Oncogene **20**(14): 1688-1702.

Ye, B. H., G. Cattoretti, Q. Shen, J. Zhang, N. Hawe, R. De Waard, C. Leung, M. Nouri-Shirazi, A. Orazi, R. S. Chaganti, P. Rothman, A. M. Stall, P. P. Pandolfi, R. Dalla-Favera (1997). "The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation." Nat Genet **16**(2): 161-170.

Yunis, J. J., M. G. Mayer, M. A. Arnelsen, D. P. Aeppli, M. M. Oken, G. Frizzera (1989). "bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphoma." N Engl J Med **320**(16): 1047-1054.

Zwick, C., N. Murawski, M.Pfreundschuh. German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (2010). "Rituximab in high-grade lymphoma." Semin Hematol **47**(2): 148-155.

(1993). "A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project." N Engl J Med **329**(14): 987-994. (No authors listed)

(1997). "A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project." Blood **89**(11): 3909-3918. (No authors listed)

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der DLBCLs in GCB/ Non-GCB-Typ nach Cd10, Bcl6 und Mum1 Status nach Hans-Klassifikation (Hans, Weisenburger et al. 2004) 11
Abbildung 2: Überlebenskurven von GCB- , Type 3 und ABC-Typ im Vergleich, p<0,01 ((Rosenwald, Wright et al. 2002)) 12
Abbildung 3: Die $SCF^{Skp2/Cks1}$ –Ubiquitin-Ligase und ihre Bindung von phosphoryliertem $p27^{Kip1}$ (Bartek and Lukas 2001) 17
Abbildung 4: Immunoblot-Analyse (Cks1, Skp2, p27) 19
Abbildung 5: Zur Verfügung gestellte Array-Daten von A. Rosenwald et al., NEJM 2002 (Rosenwald, Wright et al. 2002) 20
Abbildung 6: Kaplan-Meier-Überlebenskurven von Eu-Myc-transgenen Mäusen und verschiedenen Cks1-und Skp2-Genotypen (Keller, Old et al. 2007) 21
Abbildung 7: Hypothese: Zusammenhang von c-Myc, Cks1b, Skp2, $p27^{Kip1}$ 20
Abbildung 8: Immunoblot-Analyse von Cks1b in BL- und DLBCL- Zelllinien 27
Abbildung 9: TMA der Münchner DLBCL Fälle 28
Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve: PFS aller Patienten, n= 163 32
Abbildung 11: PFS nach IPI der Patienten aus Innsbruck und München. 33
Abbildung 12: Signifikante Cks1b-cut-off-Werte bei 0,08 und 0,37. P<0,05 34
Abbildung 13: $p27^{Kip1}$: möglicher, jedoch nicht signifikanter cut-off-Wert bei 0,29. P>0,05 34
Abbildung 14: IHC von Ki67, Cks1b, Skp2 und $p27^{Kip1}$ mit negativer (blauer) und positiver (brauner) Protein-Expression 35
Abbildung 15: PFS nach GCB- versus Non-GCB-Typ, p=0,4647 (Graph Pad Prism 5). 38
Abbildung 16: Nachweis von c-Myc-Translokation mittels FISH 38
Abbildung 17: Box Plot Analyse der Ki67-Expression nach c-Myc Status, p=0,0029 40
Abbildung 18: PFS nach $p27^{Kip1}$. Cut-off= 0,29, n=165. P=0,078 41
Abbildung 19: PFS nach Skp2. Cut-off= 0,49, n=165, p=0,051 42
Abbildung 20: Korrelation von Cks1b mit Ki67, Skp2 und $p27^{Kip1}$ 43
Abbildung 21: PFS nach Cks1b-Expression, cut-off=0,37 (n=163). P=0,01 45
Abbildung 22: PFS nach Cks1b-Expression, cut-off-Wert = 0,08. P=0,001 45
Abbildung 23: PFS nach Cks1b-Expressions-Intervallen, n=163 46
Abbildung 24: PFS nach Cks1b-Status in GC-DLBCL und Non-GC-DLBCL (Cut-Off=0,37) 47
Abbildung 25: Cks1b-Positivität und krankheitsbezogener Tod (Box-Plot-Darstellung) 48
Abbildung 26: PFS nach Cks1b-Status bei Rituximab beinhaltenden Therapie Schemata (p=0,74; n=13) 49

7.4 Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Ann-Arbor Klassifikation (Carbone, Kaplan et al. 1971) 5
Tabelle 2: IPI (Shipp 1997)..... 7
Tabelle 3: Genetische Veränderungen in DLBCLs 9
Tabelle 4: Molekulare, pathogenetische und klinische Merkmale des GCB-Typ versus ABC-Typ des DLBCL (Lossos 2005)..... 11
Tabelle 5: Geräte und Verbrauchsmaterialien..... 21
Tabelle 6: Reagenzien und Kits..... 22
Tabelle 7: Puffer und Lösungen..... 23
Tabelle 8: Verwendete Antikörper..... 24
Tabelle 9: Antikörper und positiv Kontrollen..... 26
Tabelle 10: Antikörpereigenschaften und Verdünnungsverhältnis 26
Tabelle 11: Patienten Charakteristik..... 30
Tabelle 12: Gen-Expression nach GCB- versus Non-GCB-Typ des untersuchten Patienten-Kollektivs 37
Tabelle 13: Expressions-Ergebnisse von Ki67, Skp2, Cks1b und p27 bei Vorliegen von c-Myc - Translokationen und -Amplifikationen 39
Tabelle 14: Signifikanz der Korrelationen von Cks1b mit c-Myc, Skp2, p27, Ki67 42
Tabelle 15 Unterschiede des PFS bei Verwendung des Cks1b-cut-off-Wertes 0,37..... 44
Tabelle 16: PFS nach Cks1b-Status und Aufteilung in GCB- und Non-GCB-Typ 47

7.5 Danksagung

Herzlichen Dank Herrn PD Dr.med. Ulrich Keller, für die umfassende Betreuung, den konstruktiven Austausch und die kritische Lektüre der Arbeit. Besonders danken möchte ich für die jederzeit erfolgte, sofortige Hilfestellung, Antwort und Unterstützung. Herrn PD Dr. med. Marcus Kremer, Leitung des Instituts für Pathologie des Klinikums Harlaching, danke ich sehr für die zeitintensiven Besprechungen, Erörterungen am Mikroskop, die Einarbeitung und Bereitstellung des Labors in der Pathologie des Klinikums rechts der Isar, München. Vielen Dank Herrn Professor Dr. med. Christian Peschel, für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in der Medizinischen Klinik III am Klinikum rechts der Isar, München. Einen besonderen Dank für die Überlassung der tissue-microarrays sowie der klinischen Daten der Patienten aus Innsbruck und Basel an Herrn Prof. Dr. med. Stephan Dirnhofer, Leiter der Pathologie des Universitätsspitals Basel. Für die statistischen Überlegungen, Auswertung und Hilfestellung großen Dank an Herrn Tibor Schuster, Institut für Statistik und Epidemiologie, Klinikum rechts der Isar, München.

Spezieller Dank geht an meine Eltern, Albert und Irmtraut, sowie meiner Schwester Johanna für die jederzeitige Unterstützung, das Vertrauen, Verständnis und die vielfältigen Aufmunterungen!