

**Aus dem Pathologischen Institut  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. H. K. Müller-Hermelink**

**Klinische Bedeutung von  
immunhistochemischen und zytogenetischen Risikofaktoren beim  
Mantelzell-Lymphom**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der Bayerischen Julius Maximilians - Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von  
Annemarie Celine Petzoldt  
aus Köln**

**Würzburg, August 2004**

Promotion 17. März 2005

Referent: Privat Dozent Dr. med. G. Ott

Korreferent Prof. Dr. med. H. K. Müller-Hermelink

Dekan: Prof. Dr. med. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Februar 2005

Die Promovendin ist Ärztin

Univ. Bibl.  
Würzburg

# Inhaltsverzeichnis:

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG:</b> .....	<b>1</b>
1.1	DAS MANTELZELL-LYMPHOM:.....	1
1.2	ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT: .....	4
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN:</b> .....	<b>4</b>
2.1	PATIENTENKOLLEKTIV: .....	4
2.2	ZYTOMORPHOLOGIE: .....	4
2.3	WACHSTUMSMUSTER: .....	5
2.4	IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN: .....	5
2.5	MITOTISCHER INDEX: .....	5
2.6	PROLIFERATIONSINDEX UND P53: .....	6
2.7	CYCLIN D1: .....	6
2.8	ZYTOGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN: .....	6
2.9	KLINISCHE DATEN:.....	7
2.10	STATISTISCHE ANALYSEN: .....	7
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE:</b> .....	<b>8</b>
3.1	ZYTOMORPHOLOGIE: .....	8
3.2	WACHSTUMSMUSTER: .....	9
	3.2.1 Vergleich des Wachstumsmusters bei verschiedenem zytomorphologischem Befund: .....	9
3.3	MITOSEINDEX:.....	11
	3.3.1 Vergleich des Wachstumsmusters mit dem Mitoseindex: .....	13
3.4	PROLIFERATIONSINDEX: .....	13
	3.4.1 Vergleich des Wachstumsmusters mit dem Proliferationsindex: .....	14
3.5.	P53-EXPRESSION .....	15
	3.5.1 Proliferationsindex und p53: .....	15
	3.5.2 Mitoseindex und p53:.....	16
3.6	NACHWEIS DER T(11;14) .....	16
3.7	PLOIDIE: .....	17
	3.7.1 Zytomorphologie und Ploidie: .....	17
	3.7.2 Proliferationsindex und Ploidie:.....	17
	3.7.3 Mitoseindex und Ploidie: .....	18
	3.7.4 p53 und Ploidie:.....	18
3.8	KLASSISCHE ZYTOGENETIK:.....	18
	3.8.1. Proliferationsindex und Aberrationen: .....	20
	3.8.2 Mitoseindex und Aberrationen: .....	22
3.9	GENOMISCHE INSTABILITÄT:.....	22

3.9.1 Zytologische Gruppen und genomische Instabilität:.....	22
3.9.2 Proliferationsindex und genomische Instabilität: .....	23
3.9.3 Mitoseindex und genomische Instabilität: .....	24
3.9.4 p53 und genomische Instabilität: .....	25
3.10 KLINISCHE DATEN:.....	25
3.10.1 Patientenkollektiv: .....	25
3.10.2 Fälle ohne nodale Beteiligung:.....	26
3.10.3 Klinische Parameter und Überlebensdauer:.....	28
3.10.4 Langzeitüberlebende:.....	30
3.10.4 Biologische Parameter: .....	32
<b>4. DISKUSSION: .....</b>	<b>39</b>
4.1 WACHSTUMSMUSTER: .....	39
4.2 ZYTOMORPHOLOGIE: .....	40
4.3 MITOSEINDEX, PROLIFERATIONSINDEX:.....	42
4.4 P53: .....	43
4.5 ZYTOGENETIK: .....	43
4.6 T(11;14): .....	47
4.7 PLOIDIE: .....	48
4.8 GENOMISCHE INSTABILITÄT:.....	48
4.9 KLINISCHE DATEN:.....	49
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG: .....</b>	<b>51</b>
<b>6. LITERATUR: .....</b>	<b>54</b>
<b>7. ANHANG .....</b>	<b>60</b>

# **1 Einleitung:**

## **1.1 Das Mantelzell-Lymphom:**

Beim Mantelzell-Lymphom handelt es sich um ein malignes Non-Hodgkin Lymphom der B-Zellreihe, das typischerweise aus CD5 positiven, CD10 negativen und CD23 negativen B-Zellen besteht (Stein et al., 1984), die sich von naiven B-Zellen der perifollikulären Mantelzone ableiten und etwa 5-10% aller malignen Non-Hodgkin Lymphome des Erwachsenen ausmacht (Harris et al., 1994; Weisenburger et al., 1996). Das Mantelzell-Lymphom wurde ursprünglich nach Lennert (1978) als niedrig malignes, zentrozytisches Lymphom (CC) in die Kiel-Klassifikation eingeordnet. Lennert beschrieb ein monotones Bild kleiner bis mittelgroßer Zellen mit spärlichem Zytoplasma, unregelmäßigen, häufig gekerbten Kernen und unauffälligen Nukleoli. Er beobachtete aber außerdem noch eine größerzellige Variante, mit aufgelockerter Chromatinstruktur, die er als „großzelliges“ zentrozytisches Lymphom bezeichnete. Amerikanische Wissenschaftler wie Jaffe et al. (1987) und Lardelli et al. (1990) beschrieben ebenfalls größerzellige Varianten des Mantelzell-Lymphoms und bezeichneten diese als „lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation“. Diese unterschieden sich aber von den durch Lennert beschriebenen großzelligen CC durch ihre blastäre Natur. 1994 wurde zur Vereinheitlichung der europäischen und amerikanischen Klassifikation die REAL-Klassifikation eingeführt. Entscheidend für die Zuordnung war nun die Morphologie, die Unterscheidung zwischen Vorläufer- und peripherer B- oder T-Zelle (Differenzierungsgrad) und der immunologische Phänotyp (Definition der Entität), da sich gezeigt hatte, dass auch innerhalb einer Entität große Unterschiede in der Aggressivität bestanden. Zur Vereinheitlichung der beiden Begriffe „lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation“ und zentroytisches Lymphom wurde der Begriff des Mantelzell-Lymphoms eingeführt. Als „lymphoblastoid“ oder „blastoid“ wurden die von Jaffe und Lardelli beschriebenen größerzelligen Formen mit blastischer Morphologie berücksichtigt.

Obwohl dieser Tumor früher nach der Kiel-Klassifikation als niedrig maligne klassifiziert wurde (Gerard-Marchant et al., 1974), hat er einen aggressiven klinischen Verlauf mit einer medianen Überlebenszeit von 3-4 Jahren (Zucca et al., 1995).

Der Großteil der Patienten ist männlich und über 60 Jahre alt. Bei Diagnosestellung liegt meist ein Stadium IV nach Ann Arbor mit generalisiertem Lymphknotenbefall, Knochenmarksinfiltration und Splenomegalie vor (Weisenburger et al., 1996).

Zytomorphologisch unterscheidet man 3 Subtypen: Den klassischen Typ, den blastoiden und den pleomorphen Typ (Ott et al., 1997).

Die klassische Variante besteht aus kleinen bis mittelgroßen Zellen mit teilweise runden, auch unregelmäßigen und gebuchteten Nuklei, spärlichem Zytoplasma und fein verteiltem Chromatin mit unauffälligen Nukleoli.

Die blastoide Variante zeichnet sich durch mittelgroße blastäre Zellen mit runderen Kernen und einer vesikulären Chromatinstruktur aus.

Die pleomorphe Variante besteht entweder aus größeren oder einer Mischung aus mittelgroßen und großen Zellen mit leicht basophilem Zytoplasma und pleomorphen, z. T. tief eingekerbten oder gefalteten Kernen mit größerer Chromatinverteilung und mehreren Nukleoli.

Die Translokation t(11;14) ist ein charakteristischer Marker des Mantelzell-Lymphoms und lässt sich durch die FISH in praktisch allen Fällen nachweisen (Cuneo et al., 1997).

Durch diese Translokation kommt es zu einem Rearrangement des *BCL1* Gens in der Bande 11q13 und seiner Translokation in den Bereich des Immunglobulinschwerkettengens in 14q32. Dies führt zu einer Überexpression von Cyclin D1 (CCND1/PRAD1) (Rosenberg et al., 1991). Cyclin D1 scheint mit Cyclin abhängigen Kinasen (v.a. CDK4 und CDK8) Komplexe zu bilden, die zu einer Inaktivierung des Retinoblastomproteins durch Hyperphosphorylierung führen (Daudy et al., 1993). Durch die Inaktivierung des Retinoblastomproteins können wichtige Transkriptionsfaktoren wie E2F nicht mehr gebunden werden und die Zellen werden über den G1-Restriktionspunkt in die S-Phase getrieben (Sherr et al., 1996). Auf diese Art wird die Zellzyklusdauer verkürzt.

Weitere häufige Aberrationen umfassen Deletionen in den langen Armen der Chromosomen 11 und 13, den kurzen Armen der Chromosomen 9 und 17 und

Überrepräsentationen der langen Arme der Chromosomen 3, 8, und 18 (Bentz et al., 2000).

Im Unterschied zu anderen B-Zell-Lymphomen weist das Mantelzell-Lymphom häufig tetraploide Chromosomensätze auf (Ott et al., 1998).

Obwohl die meisten Patienten nur eine medianen Überlebenszeit von 3-4 Jahren haben, weist ein geringer Teil der Patienten eine wesentlich längere Überlebenszeit auf.

Patienten mit einer Überlebenszeit von über 7 Jahren fassten wir als Langzeitüberlebende zusammen. Langzeitüberlebende wiesen auch signifikant weniger Knochenmarksinfiltrate auf und hatten einen niedrigen (low/low intermediate) IPI (Majlis et al., 1997).

In der Studie von Molina et al. (2000) werden 8 Patienten ohne Lymphknotenbefall beschrieben, die bei leukämischem Blutbild und Splenomegalie nur eine mediane Überlebensdauer von 8 Monate aufwiesen.

Bekannte klinische Risikofaktoren, die mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert sind, lassen sich als International Prognostic Index (IPI) (The international Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993) zusammenfassen.

Dieser setzt sich aus einem Alter über 60 Jahren, einem reduzierten Allgemeinbefinden (Karnofski-Index <80%), einem fortgeschrittenen Tumorstadium (Ann Arbor III-IV), einem extranodalen Befall in mehr als zwei Lokalisationen und eine Laktatdehydrogenase (LDH) von mehr als 240 U/l zusammen.

B-Symptomatik, Splenomegalie und eine Leukozytenzahl von mehr als  $10 \times 10^9/l$  wurden bereits als Risikofaktoren identifiziert (Bosch et al., 1998). Ein erhöhter Proliferationsindex gehört ebenfalls zu den ungünstigen Faktoren (Rosenwald et al., 2003).

Auch eine leukämische Ausschwemmung wurde mit einer verkürzten Überlebenszeit assoziiert (Bertoni et al., 1999; Argatoff et al., 1997).

Ebenfalls prognostisch ungünstig sind ein erhöhter Mitoseindex und blastoide Varianten (Bosch et al., 1998). Auch Inaktivierungen von p16 (Pinyol et al., 1997) und p53 (Louie et al., 1995) werden mit einer verkürzten Lebenserwartung assoziiert.

## **1.2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit:**

Ziel dieser Arbeit war es, prognostisch wichtige biologische Risikofaktoren zu identifizieren, um so ein Grading der individuellen Tumoren innerhalb des Mantelzell-Lymphoms zu ermöglichen.

Dies erschien uns gerade wegen des unterschiedlichen klinischen Verlaufs sehr wichtig. In dieser Studie wurden hierzu sowohl zytogenetische, zytomorphologische sowie biologische und klinische Faktoren untersucht.

Durch die hohe Fallzahl in unserer Studie hoffen wir, möglichst repräsentative Ergebnisse für diesen Tumor zu erhalten.

## **2 Material und Methoden:**

### **2.1 Patientenkollektiv:**

Für die Studie wurden Daten von 225 Patienten verwendet, bei denen zwischen 1986 und 2001 ein Mantelzell-Lymphom diagnostiziert worden war: Davon zeigten 186 Fälle eine klassische Zytomorphologie, bei 9 Fällen fand sich ein klassischer Typ mit blastoider Komponente.

Bei 30 Fällen wurde ein blastoider Zelltyp mit entweder lymphoblastoider oder pleomorpher Kernstruktur festgestellt. Da beiden Gruppen nur jeweils wenige Fälle zugeordnet werden konnten, werteten wir blastoide und pleomorphe Fälle in einer gemeinsamen Gruppe aus.

### **2.2 Zytomorphologie:**

Es wurden Färbungen mit Hämatoxylin-Eosin, Giemsa, Perjod-Säure/Schiff'schem Reagenz (PAS) und Gomöri-Versilberung angefertigt.



Nach der Färbung wurden alle Fälle nach der Zytomorphologie in klassische, blastoide oder pleomorphe Fälle aufgeteilt (Ott et al. 1997).

### **2.3 Wachstumsmuster:**

Die Zuordnung zu einem Wachstumsmuster wurde nach dem überwiegenden Verteilungsmuster (>50%) getroffen. Traten zwei Komponenten zu jeweils gleichen Anteilen bei einem Patienten auf, so wurden beide Komponenten für die Gruppenfindung herangezogen.

Unterschieden wurde perifollikuläres Wachstum von nodulärem und diffusem Wachstum.

In die erste Gruppe wurden die Patienten mit perifollikulärem Wachstumsmuster eingeordnet. Hinzu kamen noch die Fälle, die zu gleichen Anteilen ein perifollikuläres Wachstum und ein noduläres oder diffuses Wachstum aufwiesen (mindestens 50% perifollikulär).

Die zweite Gruppe umfasste die Patienten mit nodulärem Wachstum und die Fälle mit gleichem Anteil an nodulärem und diffusem Wachstum (mindestens 50% nodulär).

Die dritte Gruppe wurde aus den Patienten gebildet, die ein überwiegend diffuses Wachstumsmuster aufwiesen (>50% diffus).

### **2.4 Immunhistochemische Untersuchungen:**

Die Paraffinschnitte wurden zur diagnostischen Einschätzung der Tumordinfiltrate auf die Expression von CD3, CD5, CD10, CD20 und CD23 nach der Methode von Ott et al. (1997) untersucht.

### **2.5 Mitotischer Index:**

Bei den mit Giemsa gefärbten Schnitten wurden in 10 zufällig gewählten mikroskopischen Feldern in 40facher Vergrößerung die Mitosen ausgezählt.

## **2.6 Proliferationsindex und p53:**

Der Proliferationsindex wurde von zwei Beobachtern in den Arealen mit der höchsten nukleären Reaktivität des MIB1-Antikörpers (DAKO, Glostrup, Dänemark) gegen das Ki 67-Antigen auf Paraffinschnitten in 10% Stufen bestimmt.

Die p53-Expression wurde in Paraffinschnitten mit Hilfe des DO-7 Antikörpers (DAKO) bestimmt. Als positiv wurden nur Fälle befunden, die bei mehr als 30% der Zellen eine starke Kernanfärbung zeigten.

Alle immunhistochemischen Reaktionen auf Paraffin wurden mit der Peroxidase-Anti-Peroxidase-Methode nach Vorbehandlung der Schnittpräparate (Antigen retrieval) durchgeführt (Bosch et al., 1998).

## **2.7 Cyclin D1:**

Das molekulargenetische Äquivalent der t(11;14)(q13;q32), die Neuordnung des Cyclin D1 Gens, wurde durch Fluoreszenz in-situ Hybridisierung, Zytogenetik, Southern blotting an hochmolekularer DNA von frisch eingefrorenem Gewebe oder an Paraffinschnitten mit Immunhistochemie nachgewiesen. Um die Überexpression von Cyclin D1 nachzuweisen, wurde der monoklonale Antikörper DCS-6 (Lukas et al., 1994; Bartkova et al. 1994) verwendet.

## **2.8 Zytogenetische Untersuchungen:**

Die zytogenetischen Untersuchungen wurden nach etablierten Protokollen durchgeführt.

Es wurden unstimulierte 10ml Zellkulturen im RPMI 1640 Medium, die jeweils 1 bis  $2 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter Kulturmedium enthielten, über Nacht inkubiert.

Die Metaphasepräparation umfasste eine 30 minütige Einwirkzeit mit Colchicin, einen hypotonen Schock mit 0,075 M KCl und Fixation mit Methanol/Eisessig  $-20^\circ$  C im Verhältnis 3:1.

Die Metaphasen wurden mit einer Trypsin-Giemsa-Standardtechnik gefärbt und die Ergebnisse wurden nach dem Internationalen System der Zytogenetischen Nomenklatur (ISCN 1985) ausgewertet.

Die Anzahl an strukturellen Aberrationen in einem Fall wurde als Summe der strukturellen Aberrationen gewertet, wobei Translokationen zwischen zwei Chromosomen, Deletionen oder Additionen innerhalb eines Chromosoms als jeweils eine Aberration gewertet wurden.

Numerische Aberrationen wurden als eine Aberration gewertet und überzählige Chromosomen mit strukturellen Aberrationen wurden als 2 Aberrationen gewertet.

Bruchereignisse wurden einfach gezählt, so dass eine reziproke Translokation zwei Bruchereignisse beinhaltetete.

## **2.9 Klinische Daten:**

Klinische Daten konnten von 139 Patienten erhoben werden.

Das Datenmaterial stammte von den betreuenden Hausärzten und Kliniken der Patienten, wobei die Befunde standardisiert mit Hilfe eines Fragebogens erfasst wurden.

## **2.10 Statistische Analysen:**

Häufigkeiten einzelner Parameter wurden mit dem  $X^2$ -Test verglichen.

Das Gesamtüberleben wurde vom Diagnosedatum bis zum Tod unabhängig von der Todesursache oder bis zur letzten Untersuchung bestimmt.

Die Verteilungen des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Überlebens wurden mit dem log-Rank-Test (Peto, 1973) bestimmt und nach der Methode von Kaplan und Meier (1958) dargestellt.

### **3. Ergebnisse:**

#### **3.1 Zytomorphologie:**

Von den insgesamt analysierten 225 Fällen zeigten 186 (83%) einen klassischen Typ. 144 (64%) Fälle entsprachen dem klassischen Typ 1 (C1) mit kleinen bis mittelgroßen Zellen oder einem Überwiegen von runden Zellen mit runden, häufig irregulär geformten Zellkernen (siehe Anhang Abb. 1). Die Zellen hatten wenig Zytoplasma, das Chromatin war fein verteilt und die Nukleoli wirkten unauffällig.

42 Fälle wurden als klassischer Typ 2 (C2) als größerzellig, aber ohne blastoide Komponente diagnostiziert (siehe Anhang Abb. 2)

Diesen wurden 30 (13%) blastische Fälle gegenübergestellt:

Wir unterschieden hierbei 9 (0,4%) blastoide Fälle mit mittelgroßen Zellen und runderen Kernkonturen mit mehr bläschenartigem Chromatin, so dass die Zellen Lymphoblasten ähnelten (L), von 21 (0,9%) pleomorphen Varianten (P). Die pleomorphen Formen bestanden aus großen und mittelgroßen Zellen mit leicht basophilem Zytoplasma und pleomorphen, z.T. stark gefalteten Kernen mit primitiverer Chromatinverteilung und mehreren Nukleoli. In die Gruppe der pleomorphen Fälle wurden auch die Fälle eingeordnet, die neben der pleomorphen Komponente eine blastoide Struktur aufwiesen. Abbildung 3 des Anhangs zeigt einen lymphoblastoiden, Abbildung 4 einen pleomorphen Typ.

9 Fälle (0,4%) wiesen sowohl klassische als auch blastische Merkmale auf (C2L, C2P).

### **3.2 Wachstumsmuster:**

Bei insgesamt 194 Tumoren konnte das Wachstumsmuster anhand von Lymphknotenbiopsiematerial bestimmt werden.

Die erste Gruppe mit perifollikulärem Wachstumsmuster umfasste 17 (9%) Patienten.

Die zweite Gruppe mit nodulärem Wachstum enthielt 52 (27%) Patienten (siehe Abbildung 8 des Anhangs).

Die dritte Gruppe mit überwiegend diffusem Wachstumsmuster umfasste 125 (64%) Patienten (siehe Abbildung 9 des Anhangs).

3.2.1 Vergleich des Wachstumsmusters bei verschiedenem zytomorphologischem Befund:

In der Gruppe des klassischen Typs 1 mit 121 Fällen zeigten 13 (11%) ein perifollikuläres Wachstum. 42 Fälle (35%) zeigten ein noduläres und 66 Fälle (54%) ein diffuses Wachstumsmuster.

In der klassischen Gruppe Typ 2 fanden sich 33 Fälle. 2 Fälle (6%) wurden der Gruppe mit perifollikulärem Wachstum zugeordnet. 5 Fälle (15%) zeigten ein noduläres Wachstum und 26 Fälle (79%) entfielen auf die Gruppe mit diffusem Wachstumsmuster.

Fasst man alle Fälle mit blastischen Strukturmerkmalen und die Fälle mit sowohl klassischen als auch blastischen Merkmalen zusammen, so erhält man 39 Tumoren, von welchen 2 (5%) in der Gruppe mit perifollikuläres Wachstum zu finden sind. 5 (13%) der Patienten wurden der Gruppe mit nodulärem Wachstum zugeordnet. 32 (82%) Patienten zeigten ein diffuses Wachstumsmuster.

Schließt man alle Patienten, die nicht den klassischen Typ 1 aufweisen zusammen, so verteilen sich die 72 Patienten wie folgt:

(6%) wurden der Gruppe mit perifollikuläres Wachstum zugeordnet, 10 (14%) zeigte ein nodulärem Wachstum und 58 (80%) gehörten zur Gruppe mit diffusem Wachstum (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 : Vergleich des Wachstumsmuster in verschiedenen zytomorphologischen Gruppen :

<b>Variable</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C1, C2</b>	<b>C2L, C2P</b>	<b>L,P</b>	<b>C2L, C2P, L, P</b>	<b>C2,C2L, C2P,L,P</b>
<b>Anzahl</b>	<b>121</b>	<b>33</b>	<b>154</b>	<b>9</b>	<b>30</b>	<b>39</b>	<b>72</b>
<b>Wachstum</b>							
<b>Diffus (%)</b>	66 (55)	26 (79)	92 (60)	8 (89)	24 (80)	32 (82)	58 (80)
<b>Nodulär (%)</b>	42 (34)	5 (15)	47 (30)	0 (0)	5 (17)	5 (13)	10 (14)
<b>Perifollikulär (%)</b>	13 (11)	2 (6)	15(10)	1 (11)	1 (3)	2 (5)	4 (6)

Einteilung nach der Zytomorphologie:

C1: Kleinzellige

C2: Größere zellige ohne blastische Komponente

C2L: Größere zellige mit blastoider Komponente

C2P: Größere zellige mit pleomorpher Komponente

L: blastoide

P. Pleomorphe

Vergleicht man die Anteile der Patienten mit diffusem Wachstumsmuster innerhalb der einzelnen zytomorphologischen Gruppen, so ist der Unterschied zwischen den Patienten mit klassischem Typ 1 mit 66/121 (55%) diffusem Wachstum signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Gruppe mit klassischem Typ 2 mit einem Anteil von 26/33 (79%).

Vergleicht man den Anteil mit diffusem Wachstumsmuster aller Patienten mit klassischem Typ mit 92/154 (60%) mit allen anderen Tumoren (größere zellige, nicht blastische und blastische Formen) mit 32/39 (82%), so erhält man auch hier einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ), (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Vergleich des Anteils mit diffusem Wachstumsmuster in verschiedenen zytomorphologischen Gruppen :

	C1 vs. C2	C1,C2 vs. C2L,C2P,P,L	C1 vs. C2,C2L,C2P,L,P
Anteil mit diffusem Wachstum	66/121 (55) vs. 26/33 (79)	92/154 (60) vs. 32/39 (82)	66/121 (55) vs. 58/72 (81)
P-Wert	<0,05	<0,05	<0,001

### 3.3 Mitoseindex:

Der Mitoseindex (MI) wurde bei 223 Patienten bestimmt.

Bei 106/223 Lymphomen (48%) war der Mitoseindex über 20/10 HPF. In 87/223 (39%) der Tumoren betrug der MI über 30/10 HPF. Einen MI von über 40/10 HPF wiesen 66/223 (30%) der Tumoren auf.

Die Gruppe mit klassischem Typ 1 wies eine Verteilung von 2-130 Mitosen/10HPF mit einem Median von 10 Mitosen/10 HPF auf. Im Vergleich zu dieser Gruppe wiesen die übrigen Fälle einen Median von 47 Mitosen/10 HPF und eine Verteilung von 2-130 Mitosen/10 HPF auf.

Ordnet man alle klassischen Formen (C1, C2) einer Gruppe zu und vergleicht diese mit allen anderen Formen, so erhält man für die erste Gruppe einen Bereich von 2-130 Mitosen/10 HPF und einen Median von 12 Mitosen/10 HPF, in der zweiten Gruppe einen Bereich von 20-126 Mitosen/10 HPF mit einem Median von 62 Mitosen/10 HPF.

Verglichen wurde der Anteil der Patienten mit einem MI von mehr als 40/10HPF in den einzelnen morphologischen Gruppen bei 221 Patienten.

In der Gruppe mit klassischem Typ 1 war der Anteil des MI über 40/10HPF 17/141 (12%).

Der Unterschied zu allem anderen Formen mit 48/80 (60%) war hoch signifikant ( $p < 0,001$ ).

Verglichen wurde wieder der Anteil der Mitosen über 40/10HPF: In der Gruppe mit allen klassischen Formen fanden sich 35/182 (19%), in der zweiten Gruppe mit allen anderen Formen waren dies 30/39 (77%). Auch hier war der Unterschied hoch signifikant ( $p < 0,001$ ).

Auch wenn die morphologischen Gruppen anders zugeordnet wurden, ergaben sich signifikante Unterschiede bei der Verteilung des Mitoseindex (siehe Tabelle 3).

Die Gruppentrennung beim MI bei 40/10HPF war willkürlich gewählt, auch bei einer Gruppentrennung bei 30/10HPF oder 50/10HPF Mitosen waren die errechneten Unterschiede hoch signifikant (Tabelle 3).

Tabelle 3: Vergleich des Mitoseindex in verschiedenen zytomorphologischen Gruppen

p-Wert	C1 vs. C2 Anzahl pos. Fälle (%)		C1,C2 ,C2L,C2P vs. L,P Anzahl pos. Fälle (%)		C1 vs.c2,C2L,C2P,L,P Anzahl pos. Fälle (%)	
	C1	C2	C1,C2,C2L, C2P	L,P	Siehe 1.Spalte	Alle Diagnosen
<b>Mitosen</b>						
<b>Bereich</b>	2-130	2-90	2-130	20-126		2-130
<b>Mittelwert</b>	17,3	41,4	23,6	70,1		29,5
<b>Median</b>	10	41	12	66,5		16
<b>(St.-Abw.)</b>	(19,1)	(25,9)	(23,3)	(29,9)		(28,7)
<b>Mitosen/ 10HPF 0-30 vs. 31-160</b>	<b>&lt;0,00001</b>	>30 27/141 (19) vs. 25/42 (60)	<b>&lt;,00001</b>	>30 60/191 (31) vs. 26/30 (87)	<b>&lt;0,00001</b>	>30 27/141 (19) vs. 59/80 (74)
<b>Mitosen / 10HPF 0-40 vs. 41-160</b>	<b>0,00001</b>	>40 17/141 (12) vs. 18/42 (43)	<b>&lt;,00001</b>	>40 41/191 (21) vs. 24/30 (80)	<b>&lt;0,00001</b>	>40 17/141 (12) vs. 48/80 (60)
<b>Mitosen / 10HPF 0-50 vs. 51-160</b>	<b>0,00053</b>	>50 8/141 (6) vs. 10/42 (24)	<b>&lt;,00001</b>	>50 21/191 (11) vs. 12/21 (70)	<b>&lt;0,00001</b>	>50 8/141 (6) vs. 34/80 (42)



### 3.3.1 Vergleich des Wachstumsmusters mit dem Mitoseindex:

Untersucht wurde der Anteil der Fälle mit Mitosen über 40/10HPF in folgenden Gruppen:

Die erste Gruppe mit perifollikulärem und nodulärem Wachstum hatte eine MI von mehr als 40/HPF bei 11/69 (16%) Fällen. In der zweiten Gruppe mit überwiegend diffusem Wachstum war dieser Anteil bei 49/125 (39%).

Dieser Unterschied war hoch signifikant ( $p < 0,001$ ).

### 3.4 Proliferationsindex:

Der Proliferationsindex (PI) wurde bei insgesamt 221 Patienten bestimmt, der Median lag bei 30%. Die Abbildungen 5 und 6 des Anhangs zeigen den Marker Ki67 als Indikator des Proliferationsindexes.

Davon war bei 127 (57%) der PI höher als 20%. 86 (39%) hatten einen Wert über 30%. Bei 70 (32%) der Patienten lag der PI über 40%.

Betrachtete man den Anteil der Fälle mit einem PI über 40% in den einzelnen zytomorphologischen Gruppen, so verteilten sich die 219 Patienten wie folgt: Für die Gruppe mit klassischem Typ 1 erhielt man einen Anteil von 18/139 (13%). Der Median dieser Gruppe lag bei 20%.

Verglichen wurden die Fälle mit klassischem Typ 1 mit der Gruppe mit klassischem Typ 2 mit einem Anteil von 19/41 (46%) und einem Median von 40%. Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen war hoch signifikant ( $p < 0,001$ ).

Rechnete man zu den Mantelzell-Lymphomen vom klassischen Typ mit blastischer Komponente noch die Fälle mit überwiegend blastischer Morphe hinzu, so ergab sich ein Anteil von 32/39 (82%) und ein Median von 60%. Verglichen mit allen klassischen Fällen mit einem Anteil von mehr als 40% bei 37/180 (21%) war auch hier der Unterschied hoch signifikant ( $p < 0,001$ ).

Verglich man die Fälle mit klassischem Typ 1 mit einem Anteil von 18/139 (13%) mit allen anderen Fällen mit einem Anteil von 51/80 (64%) mit einem Median von 55%, so war der Unterschied wieder hoch signifikant.

Auch wenn man die Höhe des Proliferationsindex in eine Gruppe bis 30 und in eine darüber aufteilte, erhielt man für die genannten zytomorphologischen Gruppen hoch signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Vergleich des Proliferationsindex in den verschiedenen zytomorphologischen Gruppen:

p-Wert	C1 vs. C2 Anzahl pos. Fälle (%)		C1,C2 vs. C2L,C2P,P,L Anzahl pos. Fälle (%)		C1 vs. C2,C2L,C2P,L,P Anzahl pos. Fälle (%)	
	C1	C2	C2L,C2P	C2L,C2P,L,P	L,P	Alle Diagnosen
<b>Proliferation</b>						
<b>Bereich</b>	0,05-0,9	0,2-0,9	0,15-0,8	0,15-0,9	0,2-0,9	0,05-0,9
<b>Mittelwert</b>	0,25	0,44	0,46	0,60	0,65	0,34
<b>Median</b>	0,20	0,4	0,50	0,60	0,7	0,30
<b>(Std.Abw.)</b>	(0,18)	(0,21)	(0,21)	(0,20)	(0,18)	(0,23)
<b>Proliferationsindex &gt;30%</b>	<b>&lt;0,001</b>	>30% 25/139 (18) vs. 25/41 (61)	<b>&lt;0,001</b>	>30% 50/180 (28) vs. 35/39 (90)	<b>&lt;0,001</b>	>30% 25/139 (18) vs. 60/80 (75)
<b>Proliferationsindex &gt;40%</b>	<b>&lt;0,001</b>	>40% 18/139 (13) vs. 19/41 (46)	<b>&lt;0,001</b>	>40% 37/180 (21) vs. 32/39 (82)	<b>&lt;0,001</b>	>40% 18/139 (13) vs. 51/80 (64)

Einteilung nach der Zytomorphologie:

C1: Kleinzellig

C2: Größere zellige ohne blastoide Komponente

C2L: Größere zellige mit lymphoblastoide Komponente

C2P: Größere zellige mit pleomorpher Komponente

L: blastoid

P. Pleomorphe

#### 3.4.1 Vergleich des Wachstumsmusters mit dem Proliferationsindex:

Untersucht wurde der Anteil der Fälle mit einem PI von mehr als 40% in der Gruppe mit perifollikulärem oder nodulärem Wachstum mit einem Anteil von 15/68 (22%) im Vergleich zur Gruppe mit diffusem Wachstum mit einem Anteil von 49/124 (40%). Der Unterschied ist nicht signifikant, obwohl sich tendenziell ein höherer PI bei diffusem Wachstum abzeichnet.

### 3.5. p53-Expression

Die Expression von p53 wurde bei insgesamt 203 Tumoren ermittelt. Davon wiesen 38 (19%) einen Wert über 20% auf, 26 (13%) hatten einen Wert über 30%.

In 201 Fällen wurden die morphologischen Gruppen hinsichtlich einer Überexpression von p53 in mehr als 30% untersucht: Für die Gruppe mit klassischem Typ 1 ergab sich ein Anteil von 7/123 (6%). Bei den klassischen Fälle Typ 2 wiesen 8/39 Fälle (21%) eine Überexpression auf. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war hoch signifikant ( $p < 0,001$ ).

Verglich man die klassischen Fälle mit einer Frequenz von 15/162 (9%) p53 positive Fälle mit der Gruppe der blastoiden Mantelzell-Lymphome mit einem Anteil von 9/39 (23%), so war der Unterschied in beiden Gruppen signifikant ( $p < 0,05$ ).

Auch beim Vergleich zwischen der Gruppe mit klassischem Typ 1 und allen anderen Fällen mit einem Anteil von 17/78 (22%), war dieser Unterschied hoch signifikant ( $p < 0,001$ ).

#### 3.5.1 Proliferationsindex und p53:

Die Fälle wurden nach der Höhe des PI in zwei Gruppen eingeteilt: Die erste Gruppe umfasste alle Fälle mit einem PI zwischen 0-40% und die zweite Gruppe von 41-90%.

In der ersten Gruppe betrug der Anteil der Fälle mit einem p53 Wert von mehr als 30% 10/134 (7%). Der Unterschied zur zweiten Gruppe mit einem Anteil von 16/69 (23%) war hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) (siehe Tabelle 5).

### 3.5.2 Mitoseindex und p53:

Gebildet wurde eine Gruppe mit einem Mitoseindex zwischen 0-40/10HPF und eine zweite mit einem MI zwischen 41-160/10HPF.

Der Anteil von p53>30% in der ersten Gruppe betrug 11/137 (8%). Der Unterschied zur zweiten Gruppe mit 15/65 (23%) war hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Vergleich des Proliferations- und des Mitoseindex mit p53.

	Proliferationsindex		Mitoseindex	
	0-40%	41-90%	0-40/10HPF	41-160/10HPF
<b>P53&gt;30%</b>	10/134 (7%)	16/69 (23%)	11/137 (8%)	15/65 (23%)
<b>p-Wert</b>	<0,001		<0,001	

### 3.6 Nachweis der t(11;14)

187/225 Fälle der Mantelzell-Lymphome wurden auf die Anwesenheit der t(11;14)(q13;q32) untersucht. Dazu wurden die Ergebnisse der klassischen Zytogenetik herangezogen oder FISH, Southern blot oder PCR durchgeführt. Außerdem wurde die Expression von Cyclin D1 am Paraffinschnitt untersucht (siehe Abbildung 9 des Anhangs). Bei 3 Fällen war die Translokation sowohl beim immunhistochemischen Nachweis als auch bei Anwendung der FISH negativ. Diese 3 Fälle zeigten jedoch die typische Morphologie und den Immunphänotyp eines Mantelzell-Lymphoms: 2/3 wurden als klassischer Typ 1 klassifiziert, 1/3 wurde als Typ C2 eingeordnet.

### 3.7 Ploidie:

Insgesamt wurde der Ploidiegrad in 149 Fällen durch klassische oder Interphasenzytogenetik bestimmt. Davon waren 109 (73%) diploid und 40 (27%) tetraploid.

#### 3.7.1 Zytomorphologie und Ploidie:

Tetraploid waren in der Gruppe mit klassischem Typ 1 11/80 (14%), beim klassischen Typ 2 waren es 11/31 (35%), dieser Unterschied war hoch signifikant ( $p < 0,001$ ).

Bei den größerzelligen Fällen mit blastischer Komponente waren 2/7 (29%) tetraploid und bei den überwiegend blastischen Fällen lag dieser Anteil bei 16/24 (67%). Dabei hatten die pleomorphen Fälle einen tetraploiden Anteil von 14/16 (87,5%), die lymphoblastoiden wiesen einen Anteil von 2/8 (25%) auf.

Hoch signifikante Unterschiede gab es in der Gruppe der klassischen Fälle und klassischen Fälle mit blastischer Komponente mit 24/118 (20%) im Vergleich zu den blastischen Fällen mit 16/24 (67%)

Ebenfalls hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) unterschiedlich war die Verteilung in der Gruppe der klassischen Fälle mit 22/111 (20%) im Vergleich zu allen anderen mit 18/31 (58%).

Auch der Vergleich zwischen den klassischen Fälle Typ 1 mit 11/80 (14%) und allen anderen Formen mit 29/62 (47%) ergab einen hoch signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ).

#### 3.7.2 Proliferationsindex und Ploidie:

Der Proliferationsindex (PI) wurde in eine Gruppe von 0-40% und eine Gruppe von 41-90% unterteilt und der Anteil beider Gruppen für Tetraploidie wurde bestimmt: In der ersten Gruppe erhielten wir einen Anteil 17/83 (20%). In der zweiten Gruppe entsprach der Anteil 21/55 (38%). Dieser Unterschied war signifikant ( $p < 0,05$ ).

### 3.7.3 Mitoseindex und Ploidie:

Der Mitoseindex wurde in eine Gruppe von 0-40/10 HPF und in eine Zweite von 41-160/10 HPF unterteilt und der Anteil jeder Gruppe mit Tetraploidie wurde verglichen. In der ersten Gruppe betrug dieser Anteil von 21/91 (23%). Der Unterschied zur zweiten Gruppe mit einem Anteil von 18/50 (36%) war nicht signifikant.

### 3.7.4 p53 und Ploidie:

p53 wurde in eine Gruppe mit allen Werten von 0-30% und einer zweiten Gruppe mit allen Werten von 35-100% unterteilt. Der tetraploide Anteil der ersten Gruppe lag bei 27/109 (25%). Der Unterschied zur zweiten Gruppe mit einem Anteil von 8/19 (42%) war nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Die gleiche prozentuale Verteilung ergibt sich, wenn man der ersten Gruppe alle p53 Werte von 0-20% und der zweiten Gruppe alle Werte von 25-100% zuordnet.

## 3.8 Klassische Zytogenetik:

In 83 Fällen konnten aberrante Karyotypen durch Kurzzeitkultur nachgewiesen werden.

Bei 7 Fällen konnte in der klassischen Zytogenetik keine t(11;14) nachgewiesen werden, jedoch gelang der Nachweis in fünf von diesen 7 Fällen in der FISH, so dass hier von einer kryptischen Translokation ausgegangen werden kann. Bei den übrigen beiden Fällen handelt es sich um für die t(11;14) negative Fälle. Diese 7 Fälle hatten zwischen 0-5 Bruchpunkte (Mittelwert 2,4), 1-4 numerische Aberrationen (Mittelwert 2,4), zwischen 0-3 strukturelle Aberrationen (Mittelwert 1,6) und zwischen 1-7 Gesamtaberrationen (Mittelwert 4,0).

Die häufigsten Bruchpunkte waren (absolute Häufigkeit in Klammern): 11q13 (74), 14q32 (74), 1p22 (7), 1p32 (5), 6q21 (5), 1p11 (4), 1q21 (4), 10q24 (4).

Die häufigsten (partiellen) Trisomien waren: +3 (10), +3q (10), +5/5q (8), +7 (7), +12q (7), + X/Xp/Xq (6), +3p (5), +11q (5), +17q (5), +6p (4), +8q (4).

Die häufigsten Deletionen waren: -1p (19), -6/6q (15), -17/17p (14), -14/14q (13), -8p (11), -9/9p (10), -11/11p (10), -13/13p (10), -X/Xp/Xq (7), -Y (7), -1q (6), -3q (6), -15/15q (6), -2/2q (5).

Bezogen auf die morphologischen Gruppen ergaben sich signifikant unterschiedliche Verteilungen der einzelnen Aberrationen in folgenden Fällen:

Für 1p32 in der Gruppe mit klassischer Morphologie (C1, C2) in 2/66 (3%) der Fälle, im Vergleich zur Gruppe mit klassischer Morphe und blastoider Komponente mit ¼ (25%) ergab sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).

Der Unterschied war hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) für den Vergleich zwischen den Fällen mit klassischer Morphe (C1, C2) mit 2/66 (3%) und den blastoiden Mantelzell-Lymphomen mit 3/12 (25%).

Fasste man alle klassischen Formen mit den Fällen mit klassischer und blastischer Komponente zusammen, so erhielt man 3/70 (4%) Fälle mit dieser Aberration. Der Unterschied zu den überwiegend blastischen Fällen mit 2/8 (25%) war auch hier signifikant ( $p < 0,05$ ).

Signifikant ( $p < 0,05$ ) war ebenfalls der Unterschied zwischen den klassischen Fällen der Gruppe 1 mit 1/48 (2%) im Vergleich mit allen anderen Formen mit 4/30 (13%).

Auch bezüglich der Verteilung von Markerchromosomen ohne Zentromer ergab sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) für die Gruppe der klassischen Fälle mit 2/66 (3%) im Vergleich zur Gruppe der klassischen Fälle mit blastischer Komponente mit ¼ (25%). Vergleich man diesen Parameter in der Gruppe klassischen Formen Typ 1 mit 0/48 (0%) mit allen anderen Formen mit 3/30 (10%), so war auch hier der Unterschied signifikant ( $p < 0,05$ ) (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Zytogenetische Aberrationen in verschiedenen zytomorphologischen Gruppen

p-Wert	C1,C2 vs.C2L,C2P,L,P p-Wert Pos Fälle (%)	C1,C2,C2L,C2P vs .L,P p-Wert Pos Fälle (%)	C1 vs. C2L,C2P,L,P p-Wert Pos Fälle (%)
1p32	<b>&lt;0,001</b> 2/66 (3) vs. 3/12 (25)	<b>0,023</b> 3/70 (4) vs. 2/8 (25)	<b>0,048</b> 1/48 (2) vs. 4/30 (13)
+min	0,38	0,42	<b>0,025</b> 0/48 (0) vs. 3/30 (10)

Einteilung nach der Zytomorphologie:

C1: Kleinzellig

C2: Größere zellige ohne blastoide Komponente

C2L: Größere zellige mit lymphoblastoide Komponente

C2P: Größere zellige mit pleomorpher Komponente

L: blastoid

P. Pleomorphe

Eine Übersicht über die prozentuale Verteilung der einzelnen Aberrationen zeigt

Tabelle 7.

### 3.8.1. Proliferationsindex und Aberrationen:

Verglichen wurden die Fälle mit einer spezifischen Aberration mit den Fällen ohne diese Aberration in Bezug auf die Höhe des Proliferationsindex: Bei 3 Aberrationen fanden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr Fälle mit einem Proliferationsindex (PI) von mehr als 40% als bei den Fällen ohne diese Aberration:

Bei den Fällen mit der Deletion 1p hatten 10/19 (53%) einen PI von mehr als 40%, in der Kontrollgruppe waren dies nur 15/54 (28%).

Bei der Deletion 9/9p waren es 6/9 (67%) im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 19/64 (30%).

Signifikant war auch der Unterschied bei der Deletion 1q: 5/6 (83%) der aberranten Fälle hatten einen PI von mehr als 40% im Vergleich zu 22/67 (33%) in der Gruppe ohne diese Aberration.

Eine Übersicht über die prozentuale Verteilung der einzelnen Aberrationen zeigt

Tabelle 7.



Tabelle 7: Einzelne Aberrationen bei verschiedener Zytogenetik und Ki-67.

Variable	Klassische MCL (66 Fälle)	Blastische MCL (12 Fälle)	Ki-67<40% (48 Fälle)	Ki-67>40% (25 Fälle)
1p32	2 (3%)	3 (25%)	2 (4%)	3 (12%)
1p22	4 (6%)	2 (17%)	4 (8%)	3 (12%)
1p11	3 (5%)	1 (8%)	2 (4%)	2 (8%)
-1p	14 (21%)	4 (33%)	9 (19%)	10 (40%)
-1q	4 (6%)	2 (17%)	1 (2%)	5 (20%)
-2/2q	4 (6%)	1 (8%)	1 (2%)	3 (12%)
+3	6 (9%)	3 (25%)	8 (17%)	2 (8%)
+3p	4 (6%)	1 (8%)	5 (10%)	0 (0%)
+3q	8 (12%)	2 (17%)	9 (19%)	1 (4%)
-3q	5 (8%)	1 (8%)	4 (8%)	2 (8%)
+5/5q	6 (9%)	1 (8%)	4 (8%)	3 (12%)
6q21	4 (6%)	1 (8%)	3 (6%)	1 (4%)
-6/6q	11 (17%)	3 (25%)	9 (19%)	4 (16%)
+7	5 (8%)	2 (17%)	2 (4%)	4 (16%)
-8p	9 (14%)	2 (17%)	8 (17%)	3 (12%)
+8q	4 (6%)	0 (0%)	3 (6%)	1 (4%)
-9/9p	6 (9%)	2 (17%)	3 (6%)	6 (24%)
11q13	58 (88%)	11 (92%)	40 (83%)	24 (96%)
-11/11p	9 (14%)	1 (8%)	8 (17%)	2 (8%)
+11q	5 (8%)	0 (0%)	3 (6%)	2 (8%)
+12q	7 (11%)	0 (0%)	4 (8%)	1 (4%)
-13/13p	6 (9%)	3 (25%)	4 (8%)	6 (24%)
14q32	58 (88%)	11 (92%)	40 (83%)	24 (96%)
-14/14q	12 (18%)	1 (8%)	9 (19%)	2 (8%)
-15/15q	6 (9%)	0 (0%)	2 (4%)	4 (16%)
-17/17p	11 (17%)	2 (17%)	8 (17%)	6 (24%)
+17q	4 (6%)	0 (0%)	5 (10%)	0 (0%)
-x/xp/xq	6 (9%)	1 (8%)	5 (10%)	2 (8%)
+x/xp/xq	5 (8%)	0 (0%)	3 (6%)	3 (12%)
-y	6 (9%)	1 (8%)	6 (13%)	1 (4%)

### 3.8.2 Mitoseindex und Aberrationen:

Berechnet wurde die Häufigkeit, bei der ein Mitoseindex von mehr als 40/10HPF bei einzelnen Aberrationen auftrat. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne die jeweilige Aberration ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

### 3.9 Genomische Instabilität:

In 83 Fällen, von denen ein aberranter Karyotyp vorlag, wurde die Zahl der Gesamtaberrationen bestimmt: Der Median lag bei 4, der Mittelwert betrug 5,2, das Minimum lag bei 1 und das Maximum bei 39 Aberrationen.

Bei den Bruchereignissen lag der Median ebenfalls bei 4, der Mittelwert betrug 4,7, das Minimum betrug 0 und das Maximum 31 Aberrationen.

Bei den numerischen Aberrationen lag der Median bei 1, der Mittelwert betrug 2,3, das Minimum lag bei 0 und das Maximum bei 20 Aberrationen.

Der Median der strukturellen Aberrationen lag bei 2, der Mittelwert betrug 2,9, das Minimum lag bei 0 und das Maximum bei 19 Aberrationen.

#### 3.9.1 Zytologische Gruppen und genomische Instabilität:

Signifikante Assoziationen ergaben sich lediglich für den Wert der numerischen Aberrationen, wenn man der ersten Gruppe alle Fälle zuordnet die zwischen 0 bis 2 numerische Aberrationen aufwiesen und der zweite Gruppe mit 3 bis 20 numerischen Aberrationen gegenüberstellt. Es ergaben sich signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) für die einzelnen morphologischen Gruppen:

Dies war der Fall, wenn man die klassischen Fälle mit einem Anteil von 15/66 (23%) mit mehr als 2 numerischen Aberrationen mit den klassischen Fällen mit blastischer Komponente verglich. Diese zweite Gruppe hatte einen Anteil von 3/4 (75%).

Ebenfalls signifikant war dieser Unterschied für alle klassischen Fälle mit einem Anteil von 15/66 (23%) im Vergleich zu allen blastischen Formen und klassischen Formen mit blastischer Komponente mit einem Anteil von 6/12 (50%).

Hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) war der Unterschied für die klassischen Fälle Typ 1 mit einem Anteil von 8/48 (17%) im Vergleich zu allen anderen Formen mit einem Anteil von 13/30 (43%). Bezüglich der Anzahl der strukturellen Aberrationen, Gesamtaberrationen und Anzahl der Bruchereignisse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen zytomorphologischen Gruppen.

Eine Übersicht mit Median und Mittelwert zeigte Tabelle 8.

### 3.9.2 Proliferationsindex und genomische Instabilität:

Teilte man die numerischen Aberrationen in zwei Gruppen auf und teilte der Ersten alle Werte bis 2 und der zweiten Gruppe alle Werte darüber zu, so war in der ersten Gruppe der Anteil mit einem PI über 40 bei 14/52 (27%). Der Unterschied zur zweiten Gruppe mit einem Anteil von 11/21 (52%) war signifikant ( $p < 0,05$ ).

Bezüglich der Anzahl der strukturellen Aberrationen, Gesamtaberrationen und Anzahl der Bruchereignisse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zur Höhe des Proliferationsindex.

Eine Übersicht mit Median und Mittelwert zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8: Vergleich der genomischen Instabilität bei unterschiedlicher Zytomorphologie, p53 und Ki-67.

Variable	Zytogenetik von klassischen MCL (66 Fälle)	Zytogenetik von blastischen MCL (12 Fälle)	P53≤30% (49 Fälle)	P53>30% (9 Fälle)	Ki-67 <40% (48 Fälle)	Ki-67 >40% (25 Fälle)
Gesamt- aberrationen MW, Median	5,05 3,0	5,83 5,0	5,82 3,0	5,67 6,0	4,35 3,0	7,64 5,0
Numerische Aberrationen MW, Median	2,21 1,0	2,92 2,0	2,94 1,0	2,22 2,0	1,96 1,0	3,72 1,0
Strukturelle Aberrationen MW, Median	2,83 2,0	2,92 2,0	2,88 2,0	3,44 3,0	2,396 2,0	3,92 3,0
Bruchpunkte MW, Median	4,70 3,5	4,75 4,0	4,76 4,0	5,44 5,0	4,02 3,0	6,12 4,0
Ploidie, Anteil der tetraploiden Fälle	22/111 (19,8%)	18/31 (58,1%)	33/82 (40,2%)	7/16 (43,8%)	17/83 (20,5%)	21/55 (38,2%)

### 3.9.3 Mitoseindex und genomische Instabilität:

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für die Höhe des Mitoseindex in den unterschiedlichen Gruppen bezogen auf die Höhe der numerischen, strukturellen oder Gesamtaberrationen. Auch bei den Bruchereignissen waren die Unterschiede nicht signifikant.

### 3.9.4 p53 und genomische Instabilität:

Für die p53-positive Gruppe (nukleäre Expression  $\geq 30\%$ ) und die p53-negative Gruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der numerischen, strukturellen oder Gesamtaberrationen. Auch bei den Bruchereignissen waren die Unterschiede nicht signifikant.

## **3.10 Klinische Daten:**

### 3.10.1 Patientenkollektiv:

Klinische Daten konnten von 139 Fällen erhoben werden. Davon waren 15 Patienten schon vor Biopsieentnahme mit einer Chemotherapie behandelt worden.

29 Patienten (21%) waren weiblich und 110 (79%) waren männlich.

96/139 (69%) der Patienten waren mindestens 60 Jahre alt. Der Altersmedian lag bei 65, mit einem Minimum von 27 und einem Maximum von 87 Jahren.

18/133 (14%) wiesen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einen Karnofsky-Index von unter 80 auf.

118/138 (86%) Patienten wurden den Stadien III und IV nach Ann Arbor zugeteilt.

76/135 (56%) hatten mindestens 2 extranodale Befallslokalisationen.

56/109 (51%) der Patienten hatten bei Diagnosestellung einen LDH-Wert von 240 oder mehr.

Der Beobachtungszeitraum hatten einen Median von 613 Tagen, bei einem Minimum von 3 und einem Maximum von 7499 Tagen.

Die Gesamtüberlebenszeit betrug für alle Patienten durchschnittlich 956,5 Tage (~2Jahre und 8 Monate) mit einem Median von 747 Tagen und einer Verteilung von 3 bis 7499 Tagen.

### 3.10.2 Fälle ohne nodale Beteiligung:

116/136 (85%) wiesen ein nodales Befallsmuster auf.

20 Fälle zeigten keine nodale Beteiligung. Diese Fälle wiesen folgende, miteinander kombinierte Befallsmuster auf: Jeweils 12 (60%) wiesen einen Knochenmarksbefall bzw. einen Milzbefall auf, 5 (25%) hatten einen Befall des Gastrointestinaltrakts, 3 (15%) hatten einen Leberbefall und 2 (10%) einen Befall der Tonsillen. In jeweils einem Fall (5%) lag ein Befall von Lunge/Pleura, dem Auge oder der Haut vor. Bei 1 Fall war die extranodale Befallslokalisierung unklar.

Zwischen den Patienten ohne nodales Befallsmuster und den Patienten mit nodaler Beteiligung ergab sich kein Unterschied in der zu erwartenden Überlebensdauer ( $p=0,499$ ). Bei 20 Fällen ohne nodale Beteiligung verteilt sich das Befallsmuster wie folgt (Tabelle 9):

Tabelle 9: Fälle ohne nodale Beteiligung:

Fall-nummer	Langzeitüberlebender	Befallsmuster	Leukämisch	Karnofsky-Index <80	Stadium nach Ann Arbor	Leukozytenzahl	Lymphozytenzahl
E1840/01	Nein	KM	Ja	Ja	IV	12100	48
H1616/94	Nein	Milz, KM, Tonsille	Nein	Ja	IV	4900	15
E15990/89	Nein	Tonsille	Nein	Ja	II	88700	19
H3192/93	Nein	Milz, KM, Leber, GIT	Nein	Ja	III	12000	Unbekannt
E23481/98	Nein	GIT	Nein	Ja	I	8800	13
H6280/99	Nein	Milz, KM	Ja	Ja	IV	27600	83
E6849/00	Nein	Milz, Leber	Ja	Ja	IV	32800	72
E415/96	Ja	Milz, KM, Lunge/ Pleura	Ja	Ja	IV	16500	35
E25777/00	Nein	Auge	Nein	Ja	I	8700	21
E15552/90	Ja	GIT	Nein	Ja	I	8700	21
H5764/97	Ja	GIT	Nein	Ja	I	Unbekannt	Unbekannt
E12610/01	Nein	Milz, KM	Ja	Ja	IV	81700	Unbekannt
E7057/99	Nein	Milz, KM	Ja	Ja	IV	19600	74
E21355/98	Nein	Milz, KM, Leber	Ja	Unbekannt	IV	764000	99
E19365/99	Nein	Milz, KM, GIT	Ja	Ja	IV	57000	80
H5655/97	Nein	Unbekannt	Unbekannt	Ja	IV	59000	45
H5173/97	Nein	Milz, KM	Ja	Ja	IV	13500	70
E1415/99	Nein	KM	Nein	Nein	IV	5800	Unbekannt
E16958/01	Nein	Milz, Haut,	Ja	Nein	IV	37300	96
H1262/99	Nein	Milz, KM	Nein	Ja	IV	5700	34

Langzeitüberlebender: Gesamtüberlebenszeit nach Diagnose >7 Jahre

KM: Knochenmark

GIT: Gastrointestinaltrakt

69/135 (51%) der Patienten hatten einen Milzbefall. Dieser Parameter ergab in unseren Daten aber keinen signifikanten Unterschied in der Überlebensdauer, was vielleicht darauf zurückzuführen ist, dass die Zuordnung zu einer Gruppe durch die behandelnden Ärzte nach unterschiedlichen Kriterien erfolgte: Einige Ärzte gingen von einem Milzbefall aus, wenn sich sonographisch eine Splenomegalie zeigte, andere hingegen nur dann, wenn eine positive Histologie der Milz vorlag.

### 3.10.3 Klinische Parameter und Überlebensdauer:

Interessant waren einige Korrelationen in verschiedenen Untergruppen:

Leukämische Fälle hatten zu einem signifikant höheren Anteil einen Milz- oder Leberbefall. Patienten mit Milzbefall zeigten signifikant häufiger einen Knochenmark- oder Leberbefall oder waren leukämisch.

Ebenfalls zeigte sich, dass Patienten ohne Lymphknotenbefall signifikant häufiger Leukozytenwerte unter 6000/ $\mu$ l aufwiesen.

(Tabelle 10):

Tabelle 10: Korrelationen in verschiedenen Untergruppen:

Variable 1	Variable 2	Von den Fällen mit Variable 1 positiv, ist dieser Anteil positiv für Variable 2	Von den Fällen mit Variable 1 negativ, ist dieser Anteil positiv für Variable 2	P-Wert
Leberbefall	-17,17p	4/9 (44%)	8/52 (15%)	<b>0,039</b>
Leukämische Fälle	Milzbefall	68/127 (54%)	1/9 (11%)	<b>0,00003</b>
Leukämische Fälle	Leberbefall	17/127 (13%)	0/9 (0%)	<b>0,0016</b>
Milzbefall	KM-Befall	61/69 (88%)	29/67 (43%)	<b>&lt;,00001</b>
Milzbefall	Leberbefall	17/69 (25%)	0/67 (0%)	<b>0,00002</b>
Milzbefall	Leukämisch	51/66 (77%)	27/67 (40%)	<b>0,00003</b>
Ohne LK- Befall	Leukos <6000	6/12 (50%)	3/18 (16%)	<b>0,042</b>

Es ergaben sich signifikante Unterschiede in der Überlebensdauer bei folgenden klinischen Parametern zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (Tabelle 11):



Tabelle 11: Signifikante Unterschiede in der Überlebensdauer bei unterschiedlichen Kollektiven:

Vergleich von Gruppe 1 mit Gruppe 2	Anteil aller Verstorbenen	Anteil der Verstorbenen von Gruppe 1	Anteil der Verstorbenen von Gruppe 2	Überlebensdauer kürzer für	p-Wert
Karnofskyindex Gruppe 1: >80 Vs. Gruppe 2: <80	76/133 (57,1%)	64/115 (55,7%)	12/18 (66,7%)	Karnofskyindex <80	0,033
Ann Arbor Stadien 1-2 Vs. 3-4	79/138 (57,3%)	13/20 (65%)	66/118 (55,9%)	Ann Arbor Stadien 3-4	0,027
B-Symptome Ja vs. Nein	79/138 (57,3%)	38/63 (60,3%)	41/75 (54,7%)	Mit B-Symptomatik	0,0018
Hb –Wert <12,5 vs. ≥12,5	73/129 (56,6%)	30/50 (60,0%)	43/79 (54,4%)	Hb <12,5	0,018
IPI-Wert 0-1 vs. 2-5	63/104 (60,6%)	8/15 (53,3%)	55/89 (61,8%)	IPI-Werte von 2-5	0,0003
Knochenmarkbefall Ja vs. Nein	79/135 (58,5%)	30/46 (65,2%)	49/89 (55,0%)	Mit Knochenmarkbefall	0,015
Leberbefall Ja vs. Nein	79/139 (56,8%)	68/122 (55,7%)	11/17 (64,7%)	Mit Leberbefall	0,04
Leukozyten < 10.000 vs. ≥10.000	72/128 (56,3%)	46/78 (59,0%)	26/50 (52,0%)	Leukozyten ≥10.000	0,018
Therapieergebnis Komplette oder partielle Remission vs. Keine Remission oder Progression	76/132 (57,6%)	50/99 (50,5%)	26/33 (78,8%)	Keine Remission oder Progression	0,00003

Somit bestätigt sich, dass ein Karnofski-Index unter 80 und ausgedehnter Lymphombefall (Ann Arbor III-IV) mit einem signifikant kürzeren Überleben assoziiert

sind. Diese beiden Parameter werden im International Prognostic Index (IPI) zusammengefasst und gelten als gesicherte Risikofaktoren.

Die Parameter extranodaler Befall in mehr als 2 Lokalisationen, ein Alter > 60 Jahren und eine LDH von mehr als 240 U/l, die ebenfalls im IPI zusammengefasst werden, ergaben in unserer Studie keinen signifikanten Unterschied in der Überlebensdauer.

Berechnet man den IPI aus diesen 5 Parametern, so ist auch hier ein signifikanter Unterschied in der Überlebensdauer feststellbar.

Die Parameter B-Symptomatik und eine Leukozytenzahl von mehr als 10.000/ $\mu$ l ergaben bei uns signifikante Unterschiede für die Überlebensdauer. Dies bestätigt die Ergebnisse von Stein et al. (1984).

#### 3.10.4 Langzeitüberlebende:

Bei 9 Patienten, die noch mindestens 7 Jahre nach Diagnosestellung lebten, konnte ein signifikanter Verteilungsunterschied der IPI-Kriterien Stadium nach Ann Arbor und LDH > 240 U/l im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden: Von den Langzeitüberlebenden wiesen 44% ein Stadium III oder IV nach Ann Arbor auf. In der Kontrollgruppe waren dies 88%. Ein LDH > 240 U/l hatten 14% der Langzeitüberlebenden im Vergleich zu 54% in der Kontrollgruppe.

Auch beim extranodalen Befall zeigten sich hier signifikante Unterschiede. Allerdings nur, wenn man jeden extranodalen Befall wertete und nicht, wie im IPI vorgesehen, die Grenze bei über 2 Befallslokalisationen setzte. Die Langzeitüberlebenden hatten in 56%, die Kontrollgruppe dagegen in 91% einen extranodalen Befall.

Signifikante Unterschiede zwischen Langzeitüberlebenden und der Kontrollgruppe gab es auch für folgende Parameter: Milzbefall (11% versus 54%), Knochenmarkbefall (22% versus 69%), B-Symptomatik (11% versus 47%), sowie lokalisiertem Befall (56% versus 12%).

In der Gruppe der Langzeitüberlebenden lag kein Fall mit einem PI>30% vor. Das Minimum lag bei 10%, das Maximum bei 25% und der Mittelwert bei 17% in der Gruppe der Langzeitüberlebenden. Der Unterschied zur Gruppe der Nicht-Langzeitüberlebenden ist im Bezug auf die Höhe des Proliferationsindex signifikant ( $p<0,05$ ) (Tabelle 12).

Keine signifikanten Unterschiede zwischen Langzeitüberlebenden und der Kontrollgruppe ergaben sich für den Anteil an blastoider Zytomorphologie, die Höhe von p53 und MI. Die Verteilung der Höhe der numerischen, strukturellen und Gesamtaberrationen und die Anzahl der Bruchereignisse konnte nicht bestimmt werden, da das untersuchte Kollektiv bei den Langzeitüberlebenden zu klein war.

Tabelle 12: Langzeitüberlebende und Parameter, die mit der Überlebensdauer assoziiert waren:

Variable	Anteil der Langzeitüberlebenden (>7 Jahre) mit positiver Variable	Anteil der Gruppe der Nichtlangzeit-Überlebenden mit positiver Variable 2	P-Wert
Extranodaler Befall	5/9 (56%)	115/127 (91%)	<b>0,0025</b>
Milzbefall	1/9 (11%)	68/127 (54%)	<b>0,012</b>
KM-Befall	2/9 (22%)	88/127 (69%)	<b>0,0042</b>
lokalisierter Befall	5/9 (56%)	15/129 (12%)	<b>0,0015</b>
B-Symptome	1/9 (11%)	61/129 (47%)	<b>0,033</b>
Ann Arbor III-IV	4/9 (44%)	114/129 (88%)	<b>0,0003</b>
LDH>240	1/7 (14%)	55/102 (54%)	<b>0,042</b>
Blastoide Zytomorphologie	1/9 (11%)	20/127 (16%)	<b>n.s.</b>
Mitosen>40	1/9 (11%)	39/124 (31%)	<b>n.s.</b>
PI>40	0/9 (0%)	39/123 (32%)	<b>0,0442</b>
P53>30	1/9 (11%)	15/117 (13%)	<b>n.s.</b>

Interessant ist, dass 3 von insgesamt 9 Fällen der Langzeitüberlebenden keinen nodalen Befall aufwiesen, auch wenn sich bei uns kein Unterschied bei der Überlebensdauer zwischen Patienten mit und ohne nodalen Befall zeigte.

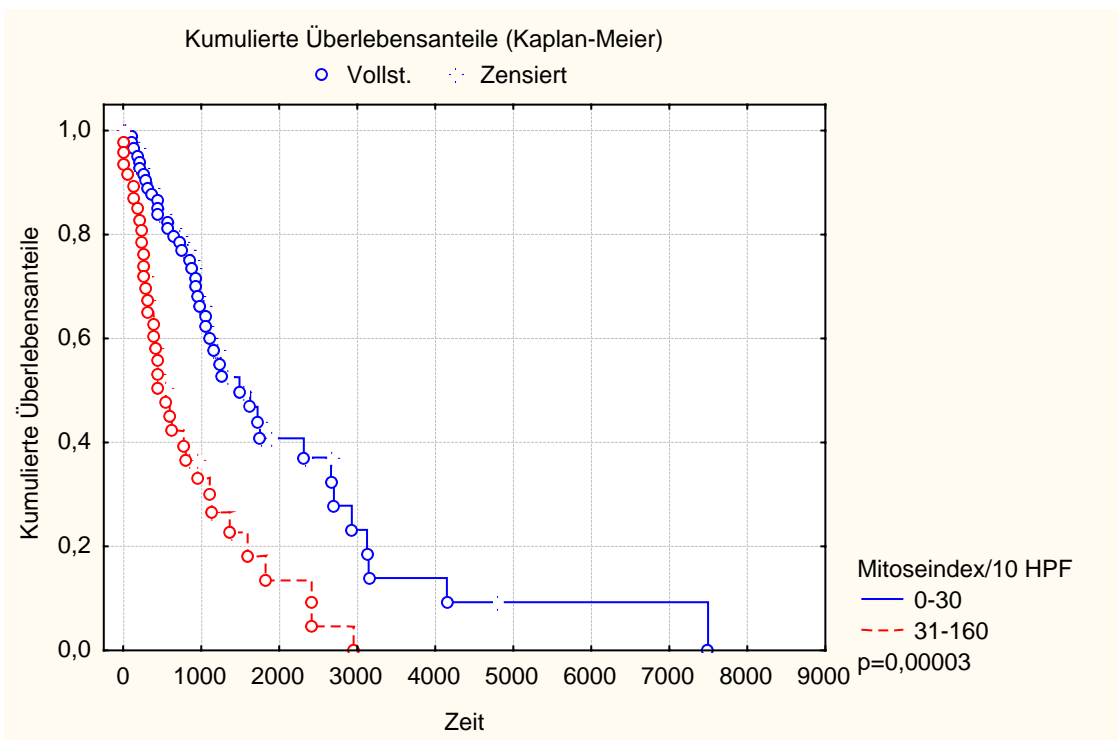
### 3.10.4 Biologische Parameter:

Von den klinisch erfassten Patienten ( $\cong 100\%$ ) wurde bei 136 (98%) die Zytomorphologie und bei 133 (96%) der mitotische Index (MI) erhoben.

Der Proliferationsindex wurde in 132 (95%) Fällen bestimmt. Die p53 Expression wurde bei 126 (91%) und das Wachstumsmuster bei 113 (82%) erhoben.

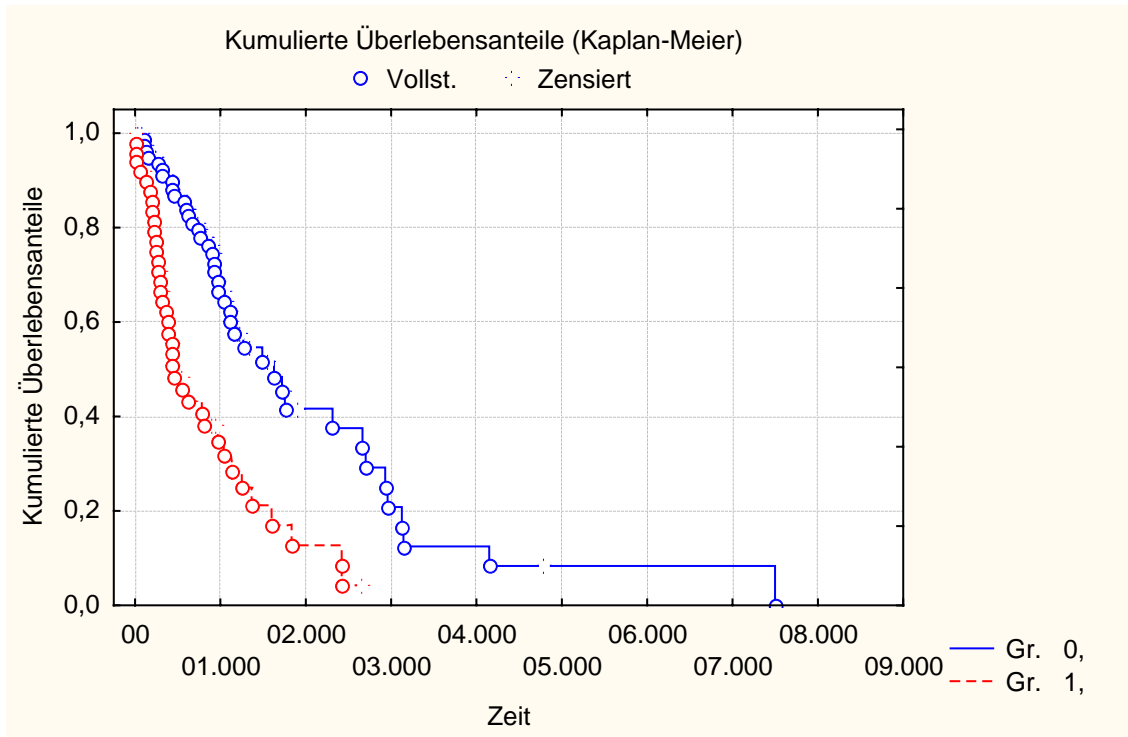
Signifikante Unterschiede bei der Überlebensdauer ergaben sich für folgende Parameter: Fälle mit einem Mitoseindex von 0-30/10HPF hatten eine signifikant längere Überlebensdauer ( $p=0,00003$ ) als Fälle mit einem MI von mehr als 30/10HPF. Siehe Graphik 1:

GRAPHIK 1: ÜBERLEBENSDAUER BEI UNTERSCHIEDLICH HOHEM MI



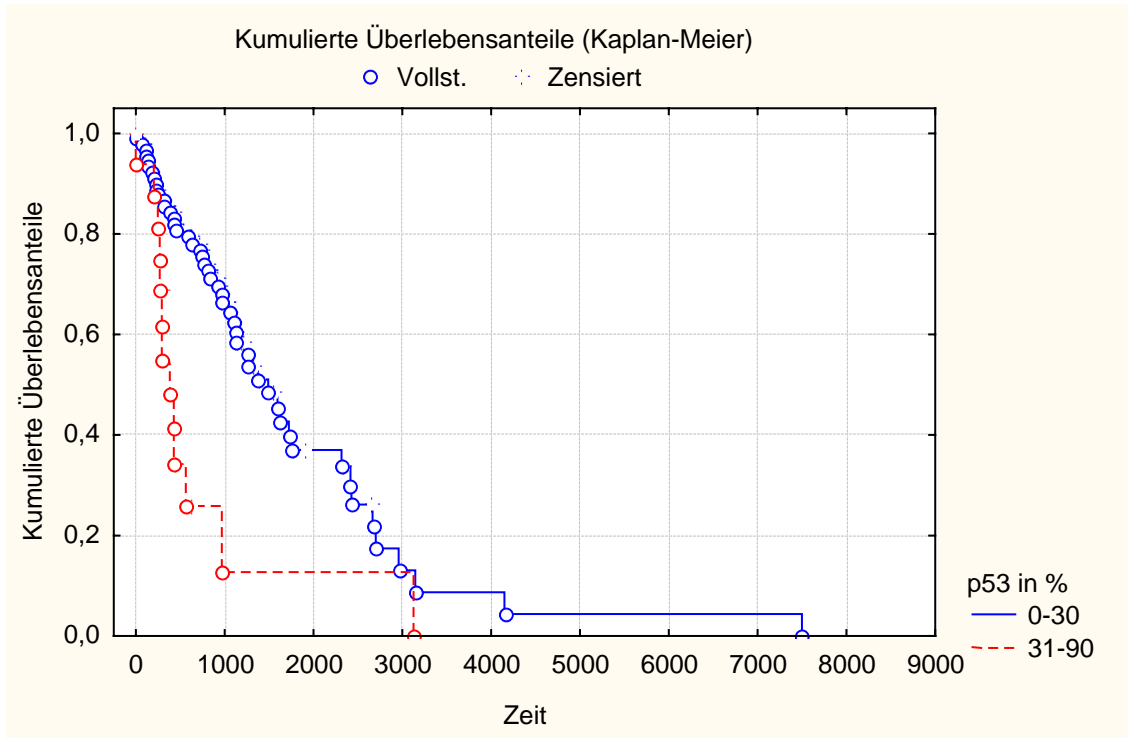
Auch in der Gruppe mit einem Proliferationsindex von 2-30% war die Überlebensdauer signifikant länger ( $p=0,00003$ ) als in der Gruppe mit einem PI von mehr als 30%. Siehe Graphik 2:

GRAPHIK 2: ÜBERLEBENSDAUER BEI UNTERSCHIEDLICH HOHEM PI:



Fälle mit einer Expression von p53 in 0-30% hatten eine signifikant ( $p=0,0055$ ) längere Überlebensdauer als Fälle mit einer p53 Expression von über 30%. Siehe Graphik 3:

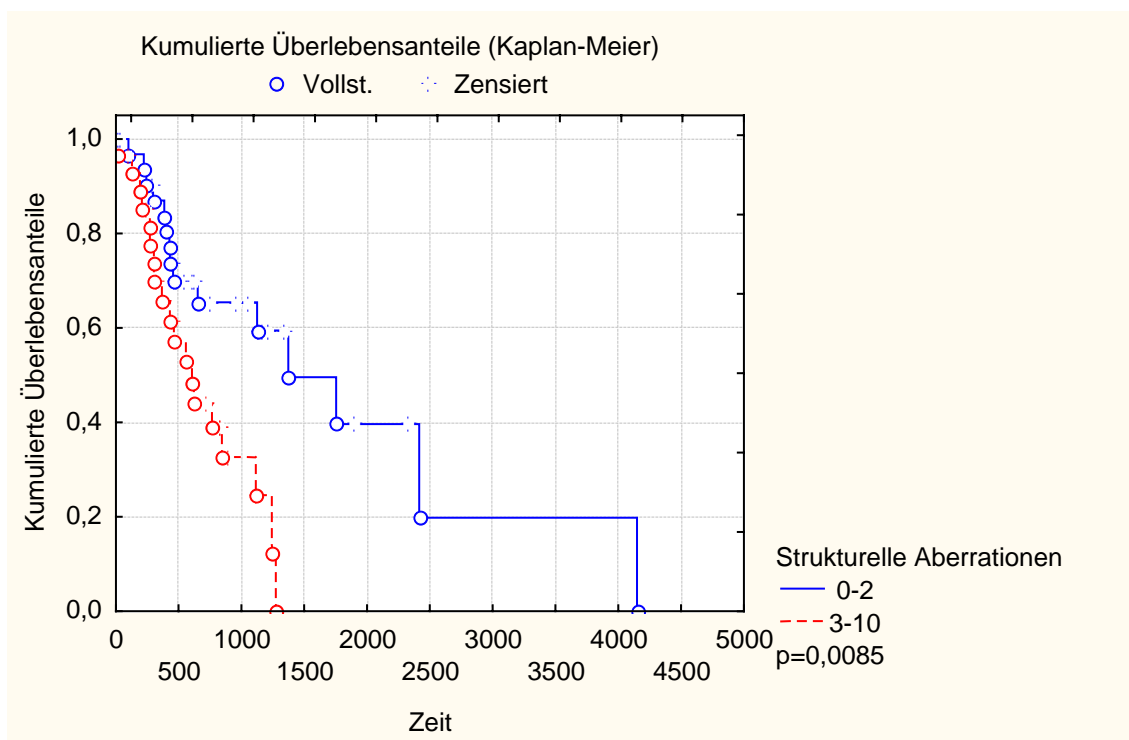
GRAPHIK 3: ÜBERLEBENSDAUER BEI UNTERSCHIEDLICH HOHEM P53:



Männliche Patienten mit einem Verlust des Y-Chromosoms hatten eine nahezu signifikant ( $p=0,051$ ) längere Überlebensdauer als Männer ohne diese Aberration.

Auch die Anzahl der strukturellen Aberrationen war signifikant ( $p=0,0085$ ) für die Überlebensdauer: Patienten, deren Tumoren 0-2 strukturellen Aberrationen aufwiesen lebten signifikant länger als Patienten mit mehr strukturellen Aberrationen. Siehe Graphik 4:

GRAPHIK 4: ÜBERLEBENSDAUER BEI UNTERSCHIEDLICHER ANZAHL STRUKTURELLER ABERRATIONEN:



Tumoren mit 1-3 Bruchereignissen waren mit einer signifikant ( $p=0,014$ ) längeren Überlebenszeit assoziiert als Tumoren mit 4-31 Bruchereignissen.

Siehe Graphik 5:

GRAPHIK 5: ÜBERLEBENSDAUER BEI UNTERSCHIEDLICHER ANZAHL DER BRUCHEREIGNISSE:

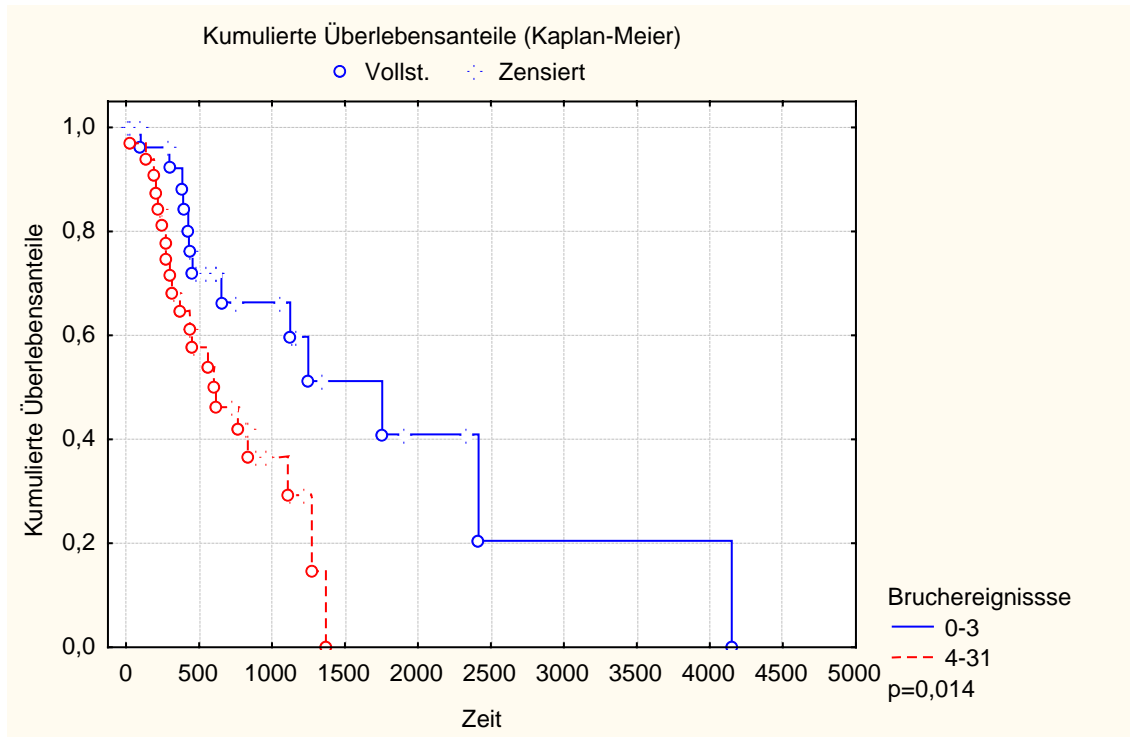




Tabelle 13: Unterschiede in der Überlebensdauer bei verschiedenen Parametern:

Vergleich von Gruppe 1 mit Gruppe 2	Anteil aller Verstorbenen	Anteil der Verstorbenen von Gruppe 1	Anteil der Verstorbenen von Gruppe 2	Überlebensdauer kürzer für	p-Wert
Mitosen /10HPF 0-30 vs. 31-160	77/133 (58%)	41/85 (48,2%)	36/48 (75%)	Mitosen 31-160	<b>0,00003</b>
Proliferationsindex In % 2-30 vs. 35-90	77/132 (58,3%)	40/82 (48,8%)	37/50 (74%)	Proliferationsindex 35-90	<b>0,00003</b>
P53 in % 0-30 vs. 31-90	61/110 (55,5%)	48/93 (51,6%)	13/17 (76,5%)	P53 31-90	<b>0,0055</b>
-y (nur Männer)	28/52 (54%)	0/4 (0%)	28/48 (58%)	Nicht Aberrante	<b>0,0506</b>
Zahl der Struk. Abberationen 0-2 vs. 3-10	34/61 (56%)	15/33 (45,5%)	19/28 (67,9%)	3-10 Aberrationen	<b>0,0085</b>
Zahl der Bruchereignisse 1-3 vs. 4-31	34/61 (56%)	13/29 (44,8%)	21/32 (65,6%)	4-31 Breakpoints	<b>0,014</b>

Bei den Aberrationen steht die erste Gruppe für die aberranten Fälle, die zweite Gruppe beinhaltet alle Fälle ohne diese Aberration.

Die Unterschied in der Überlebensdauer zwischen Patienten, deren Tumoren diploide oder tetraploide Chromosomensätze aufwiesen, war mit  $p=0,09$  nicht signifikant.

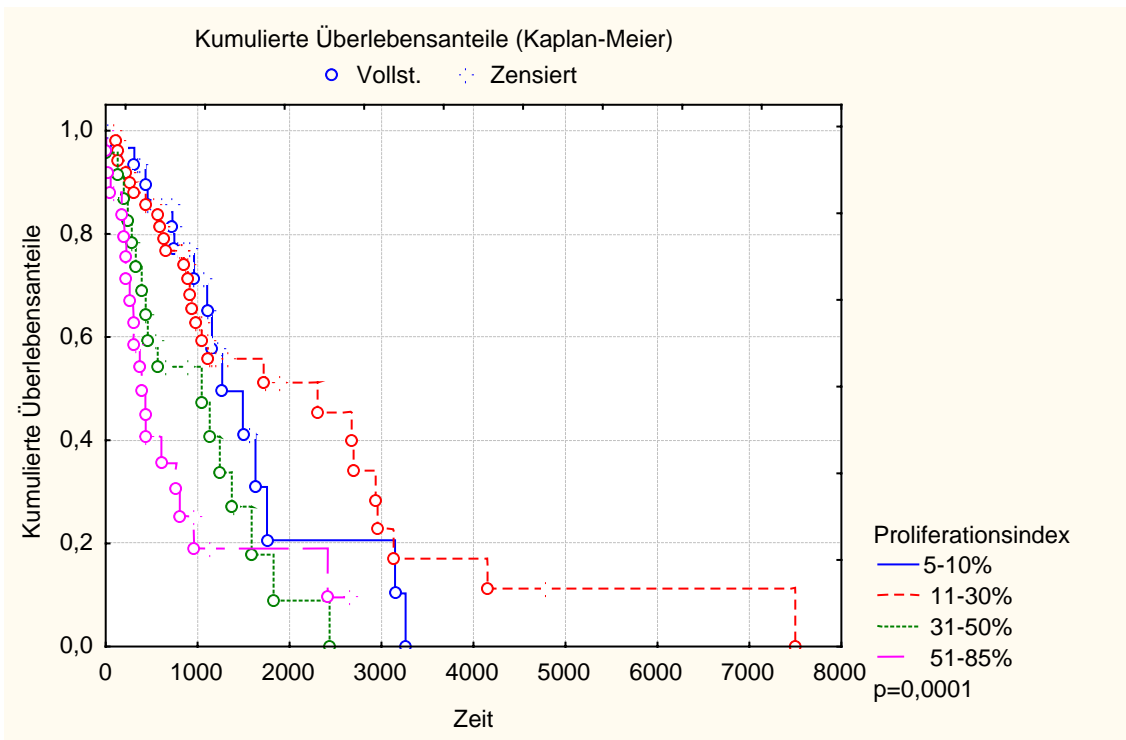
Auch das Vorhandensein einzelner Aberrationen (außer dem Verlust des Y-Chromosoms) konnte nicht mit einem signifikanten Unterschied in der Überlebensdauer assoziiert werden.

Das Vorhandensein der  $t(11;14)$  war ebenfalls nicht ausschlaggebend für die Überlebensdauer.

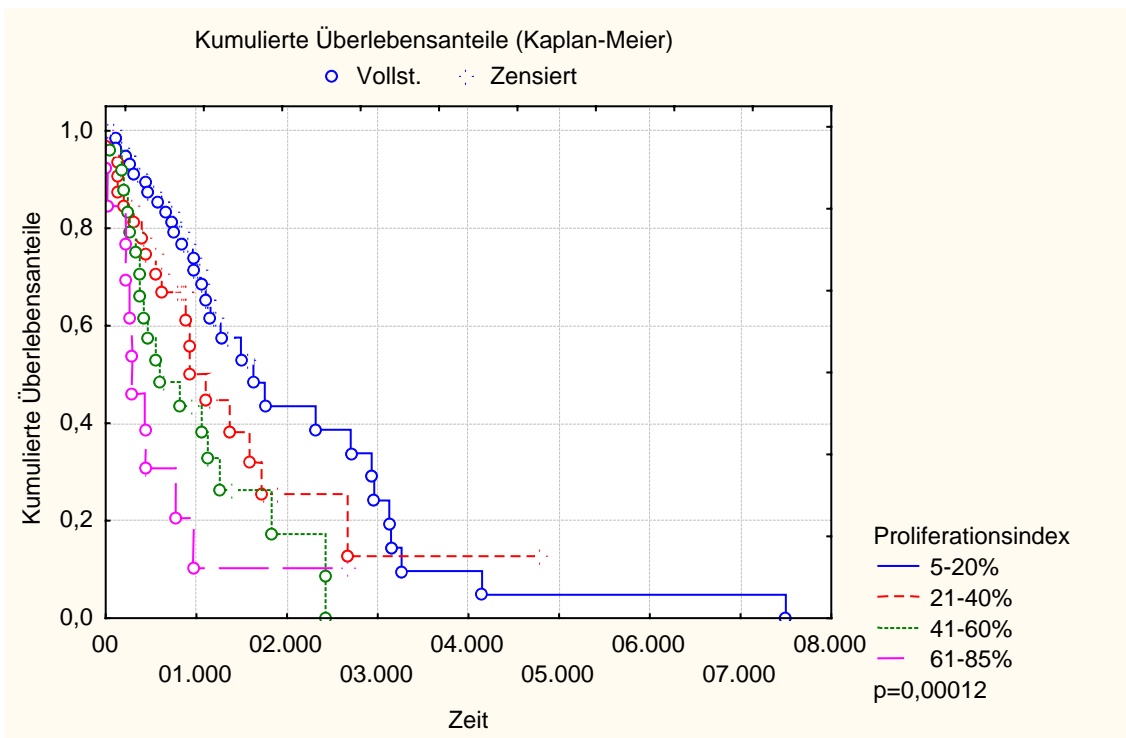
Einen signifikanten Unterschied in der Überlebensdauer erhält man nicht nur dann, wenn man nach der Höhe des Proliferationsindex zwei Gruppen bildet, sondern auch, wenn man 4 Gruppen mit ansteigendem PI miteinander vergleicht.

Wie auch in der Arbeit von Rosenwald (2003) konnten wir somit zeigen, dass der Anstieg des Proliferationsindex kontinuierlich zu kürzeren Überlebenszeiten führt. Die Unterschiede in den einzelnen Gruppen sind hoch signifikant. Siehe Graphen 6 und 7.

GRAPHIK 6: LEBENSDAUER BEI UNTERSCHIEDLICH HOHEM PI:



GRAPHIK 7: ÜBERLEBENSDAUER BEI UNTERSCHIEDLICH HOHEM PI:



Bei der Zuordnung zu einzelnen zytomorphologischen Gruppen zeigten sich signifikante Unterschiede bei der Überlebensdauer (siehe Tabelle 14):

Tabelle 14: Gesamtüberlebensdauer bei verschiedener Zytomorphologie:

<b>p-Wert</b>	<b>C1 vs. C2</b>	<b>C1,C2 vs. C2L,C2P</b>	<b>C1,C2,C2L,C2P vs. L,P</b>	<b>C1,C2 vs. C2L,C2P,P,L</b>	<b>C1vs. C2,C2L,C2P,L,P</b>
<b>Gesamt-überleben</b>	0,053	0,81	<b>0,035</b>	0,087	<b>0,012</b>

## **4. Diskussion:**

In der vorliegenden Studie wurden Daten von 225 Patienten mit Mantelzell-Lymphomen im Bezug auf Zytomorphologie, Wachstumsmuster, Mitoseindex, Ki-67 Index, p53, die Zytogenetik und klinische Parameter verglichen. Hiermit handelt es sich um die bisher größte Studie sowohl zur Zytogenetik als auch zu klinischen Daten beim Mantelzell-Lymphom überhaupt.

### **4.1 Wachstumsmuster:**

Beim Wachstumsmuster unterschieden wir überwiegend perifollikuläres Wachstum (8%) von nodulärem (27%) und diffusem (65%) Wachstumsmuster.

Wie auch bei Ott et al. (1997) und Rätty et al. (2002) konnten wir zeigen, dass der Anteil von Mantelzell-Lymphomen mit diffusem Wachstumsmuster in der Gruppe mit blastischer Zytomorphologie signifikant höher war als in der Gruppe mit klassischer Zytomorphologie. Siehe Tabelle 15:

Tabelle 15: Vergleich der Zytomorphologie mit dem Wachstumsmuster

	Mantelzone/Perifollikuläres Wachstumsmuster			Noduläres Wachstumsmuster			Diffuses Wachstumsmuster		
	Eigene Daten	Räty, 2002	Ott, 1997	Eigene Daten	Räty, 2002	Ott, 1997	Eigene Daten	Räty, 2002	Ott, 1997
Klassische Zytomorphologie	15 (10%)	2 (2%)	9 (26%)	47 (30%)	21 (21%)	16 (46%)	92 (60%)	77 (77%)	10 (28%)
Blastische Zytomorphologie	2 (5%)	0 (0%)	5 (17%)	5 (13%)	0 (0%)	2 (7%)	32 (82%)	20 (100%)	22 (76%)

#### 4.2 Zytomorphologie:

In der Zytomorphologie unterschieden wir verschiedene Unterformen des klassischen Typs von den blastischen und pleomorphen Fällen, die wir aufgrund der geringen Fallzahl als blastoide Mantellzell-Lymphome zusammenfassten.

Als klassischen Typ 1 (C1) fassten wir Tumoren mit kleinen bis mittelgroßen Zellen oder einem Überwiegen von runden Zellen mit runden, häufig irregulär geformten Zellkernen zusammen. Die Zellen hatten wenig Zytoplasma, das Chromatin war fein verteilt und die Nukleoli wirkten unauffällig.

Dem klassischen Typ 2 (C2) wurden Tumoren mit größeren Zellen, aber ohne blastoide Komponente zugeordnet.

Wir unterschieden bei den blastischen Fällen die blastoiden Fälle mit mittelgroßen Zellen und runderen Kernkonturen mit mehr bläschenartigem Chromatin, so dass die Zellen Lymphoblasten ähnelten (L), von den pleomorphen Varianten (P). Die pleomorphen Formen bestanden aus großen und mittelgroßen Zellen mit leicht basophilem Zytoplasma und pleomorphen, z.T. stark gefalteten Kernen mit primitiverer Chromatinverteilung und mehreren Nukleoli. In die Gruppe der pleomorphen Fälle wurden auch die Fälle eingeordnet, die neben der pleomorphen Komponente eine blastoide Struktur aufwiesen. 9 Fälle (0,4%) wiesen sowohl klassische als auch blastische Merkmale auf (C2L, C2P). Diese Klassifikation zeigt, dass es bei der Zytomorphologie ein Kontinuum und keine strenge Unterteilung in klassische und

blastische Formen gibt. Daß diese Unterteilung nicht rein theoretischer Natur ist, zeigen auch unsere Ergebnisse, die belegen, dass es signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen zytomorphologischen Gruppen bezüglich der Verteilung von Proliferationsindex, Mitoseindex, p53 und der Ploidie gibt. Auch die Ergebnisse von Rosenwald et al. (2003) deuten darauf hin, dass diese Übergänge fließend zu verstehen sind. Insbesondere wird in diesem Zusammenhang auf die Bedeutung der Proliferation und damit auch auf die Verkürzung der Zellzyklusdauer hingewiesen (Tabelle 16).

Tabelle 16: Proliferationsindex, Mitoseindex, p53 und Ploidie bei unterschiedlicher Zytomorphologie:

<b>p-Wert</b>	<b>C1 vs. C2</b>	<b>C1,C2vs. C2L,C2P</b>	<b>C1,C2,C2L,C2 P vs. L,P</b>	<b>C1,C2vs. C2L,C2P, L,P</b>	<b>C1 vs. C2,C2L,C2P, L,P</b>
	<b>Anzahl pos. Fälle (%)</b>	<b>Anzahl pos. Fälle (%)</b>	<b>Anzahl pos. Fälle (%)</b>	<b>Anzahl pos. Fälle (%)</b>	<b>Anzahl pos. Fälle (%)</b>
<b>Proliferation</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>In %</b>	>30	>30	>30	>30	>30
<b>0-30 vs.</b>	25/139 (18)	50/180 (28)	57/189 (30)	50/180 (28)	25/139 (18)
<b>31-90</b>	25/41 (61)	7/9 (78)	28/30 (93)	35/39 (90)	60/80 (75)
<b>P53 in %</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,89	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>0-30 vs.</b>	>30		>30	>30	>30
<b>35-100</b>	7/123 (6)		16/171 (9)	15/162 (9)	7/123 (6)
	8/39 (21)		8/30 (27)	9/39 (23)	17/78 (22)
<b>Ploidie ISH</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,58	<b>&lt;,00001</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,00001</b>
<b>D vs. DT, T</b>	DT,T		DT,T	DT,T	DT,T
	11/80 (14)		24/118 (20)	22/111 (20)	11/80 (14)
	11/31(35)		16/24 (67)	18/31 (58)	29/62 (47)
<b>Mitosen/ 10Hpf</b>	<b>&lt;0,00001</b>	<b>0,00014</b>	<b>&lt;,00001</b>	<b>&lt;0,00001</b>	<b>&lt;0,00001</b>
<b>&gt;30</b>	>30	>30	>30	>30	>30
<b>0-30 vs.</b>	<b>27/141 (19)</b>	152/182 (29)	60/191 (31)	52/182 (29)	27/141 (19)
<b>31-160</b>	<b>25/42 (60)</b>	8/9 (89)	26/30 (87)	34/39 (87)	59/80 (74)

Zytogenetik mit

D: diploidem Klon ; T: tetraploidem Klon

DT: diploidem und tetraploidem Klon

Der Anteil der blastischen Fälle lag in unserer Studie bei 17%, ähnlich den Ergebnissen von Rätzy et al. (2002) mit einem Anteil von 17% und bei Weisenburger et al. (1996), mit einem Anteil von 20% blastoiden Fällen.

#### **4.3 Mitoseindex, Proliferationsindex:**

Wie schon in früheren Studien (Rosenberg et al., 1991; Daudy et al., 1993; Sherr et al., 1996; Swerdlow et al., 2002) gezeigt werden konnte, ist die Zellzyklusregulation beim Mantelzell-Lymphom gestört: Durch die mit der  $t(11;14)(q13;q32)$  verbundene Überexpression von Cyclin D1 werden mit Cyclin abhängigen Kinasen Komplexe gebildet, die wichtige Inhibitoren wie das Retinoblastomprotein inaktivieren und so die Zellen vom G1 Restriktionspunkt in die S-Phase treiben. Auf diese Weise wird die Zellzyklusdauer verkürzt.

Auch in der vorliegenden Studie waren hohe Mitose- (Argatoff et al., 1997) und Proliferationsindices (Rosenwald, 2003), die eine kurze Zellzyklusdauer und hohe Zellteilungsrate widerspiegeln, auch in unserer Studie mit kürzerer Überlebenszeit und blastischer Zytomorphologie (Ott et al., 1998) assoziiert. Obschon hohe Proliferations- und Mitoseindices eindeutig mit blastischer Zytomorphologie assoziiert war, war die Spannweite der Werte in den einzelnen zytomorphologischen Gruppen wie auch bei Ott et al. (1998) sehr hoch.

Interessant ist es sicherlich auch an dieser Stelle auf die Publikation von Rosenwald et al. (2003) hinzuweisen: In dieser Studie war der aussagekräftigste Parameter für die zu erwartende Lebensdauer die sog. „Proliferation signature“. Dieses Expressionsmuster reflektiert die Aktivierung von Genen in proliferierenden Zellen und ist mit einer Inaktivierung bestimmter Zellzyklus inhibierender Gene, wie z.B. p16, assoziiert. Die „Proliferation signature“ war proportional assoziiert mit Ki-67 und dem Mitoseindex und umgekehrt proportional zur Gesamtüberlebensdauer.

In der Publikation von Rosenwald (2003) konnte gezeigt werden, dass der Proliferationsindex nicht nur dann mit der Überlebenszeit assoziiert war, wenn der PI in

eine Gruppe mit hohem und eine Gruppe mit niedrigem PI eingeteilt wurde, sondern auch, wenn 4 Gruppen mit ansteigendem PI miteinander verglichen wurden. Wir konnten diese Ergebnisse bestätigen und somit zeigen, dass der Anstieg des PI kontinuierlich zu kürzeren Überlebenszeiten führt.

In der Arbeit von Rosenwald war die sog. „proliferation signature“ der Parameter, der den höchsten prädiktiven Wert für die Überlebensdauer lieferte. Auch in unseren Ergebnissen war die Höhe des PI stark mit der zu erwartenden Überlebensdauer assoziiert.

#### **4.4 p53:**

Auch hohe Werte für p53 waren mit kürzerer Überlebenszeit und blastischer Zytomorphologie assoziiert (vgl. Greiner et al., 1996, Hernandez et al, 1996).

Der Anteil der p53-positiven Fälle lag in unserem Kollektiv mit 26/203 (13%) etwa so hoch wie bei Greiner et al. (1996) mit 15% für p53 positiven Tumoren bei einer Nachweisgrenze von 5%, obwohl wir für die Expression des p53-Proteins eine wesentlich höhere Nachweisgrenze von 30% mit positiver Kernfärbung forderten. Bei Hernandez et al. (1996) wurden 9% der Tumoren für p53 positiv gewertet bei einer Nachweisgrenze von 20% positiven Zellen.

Wie erwartet, ergab sich ein signifikanten Zusammenhang zwischen hohen Werten für p53 und hohen Werten für Ki-67 und den MI.

#### **4.5 Zytogenetik:**

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass das Mantelzell-Lymphom typische sekundäre zytogenetische Aberrationen aufweist: Eine Übersicht zeigt Tabelle 17.

Tabelle 17 Zytogenetische Aberrationen in verschiedenen Publikationen:

Variable	<b>Eigene Daten (83 Fälle)</b>	<b>Bea 1999 (45 Fälle)</b>	<b>Bentz 2000 (39 Fälle)</b>	<b>Monni 1998 (27 Fälle)</b>	<b>Wing, 2001 (214 Fälle)</b>
<b>1p22</b>	7 (8%)	k. A.	k. A.	k. A.	k.A.
<b>-1p</b>	19 (23%)	24%	unklar	33%	24 (11%)
<b>-1q</b>	6 (7%)	k. A.	k. A.	k. A.	k.A.
<b>+3</b>	10 (12%)	k. A.	k. A.	k. A.	13 (6%)
<b>+3q</b>	10 (12%)	49%	49%	52%	12 (6%)
<b>-3q</b>	6 (7%)	k. A.	k. A.	k. A.	k.A.
<b>+5/5q</b>	8 (10%)	k. A.	k. A.	k. A.	k.A.
<b>-6/6q</b>	15 (18%)	27%	13%	30%	(-6q) 40 (19%)
<b>+7</b>	7 (8%)	k. A.	k. A.	k. A.	k.A.
<b>-8p</b>	11 (13%)	k. A.	21%	k. A.	k.A.
<b>+8q</b>	4 (5%)	22%	28%	30%	k.A.
<b>-9/9p</b>	10 (12%)	16%	41%	30%	28 (13%)
<b>11q13</b>	74 (89%)	k. A.	k. A.	k. A.	k.A.
<b>T(11 ;14)</b>	74 (89%)	100%	k. A.	38%	100%
<b>-11/11q</b>	10 (12%)	k. A.	31	30	(-11q) :23 (11%)
<b>+12q</b>	7 (8%)	20%	13%	k. A.	9 (4%)
<b>-13/13p</b>	10 (12%)	44%	69%	k. A.	(-13): 27 (13%)
<b>14q32</b>	74 (89%)	k. A.	k. A.	k. A.	k.A.
<b>-14/14q</b>	13 (16%)	k. A.	k. A.	k. A.	24 (11%)
<b>-15/15q</b>	6 (7%)	k. A.	k. A.	k. A.	(-15) : 12 (6%)
<b>-17/17p</b>	14 (17%)	16%	26%	k. A.	(-17p) 17 (8%)
<b>-X/Xp/Xq</b>	6 (7%)	k. A.	k. A.	k. A.	k.A.
<b>+X/Xp/Xq</b>	7 (8%)	k. A.	k. A.	k. A.	k.A.
<b>-Y</b>	7 (8%)	k. A.	k. A.	k. A.	21 (10%)



Die Daten von Bea, Bentz und Monni wurden mit Hilfe der CGH erhoben. Unsere Ergebnisse stammen aus der klassischen Zytogenetik, wie auch die von von Wing berichteten eigenen 47 Fälle. Bei den eigenen Daten wurden nur chromosomale Aberrationen, die in mind. 7% auftraten angegeben, oder wenn in anderen Studien höhere Werte angegeben wurden. k. A.: Keine Angaben

Die vorliegenden Daten umfassen die bisher größte Studie zur klassischen Zytogenetik beim MCL aus einer Institution. Auffällig ist, dass der Anteil der einzelnen Aberrationen in unserm Patientenkollektiv im unteren Bereich der Literaturangaben liegen. Dies kann zum einen an unterschiedlichen Untersuchungsmethoden liegen (in den vorliegenden Fällen wurde klassische Zytogenetik angewendet, bei Bea et al. und Monni et al. die CGH und bei Bentz et al. die CGH und/oder FISH), zum anderen aber auch am Kollektiv selbst, so wurden bei Bea et al. und Wing et al. nur t(11;14) positive Fälle in die Studie aufgenommen. Zusätzlich sollte man beachten, dass die zu vergleichenden Studien mit 27 bis 45 Fällen kleine, vielleicht nicht repräsentative Kollektive darstellen.

Die häufigsten Bruchpunkte waren (absolute Häufigkeit in Klammern): 11q13 (74), 14q32 (74), 1p22 (7). Die häufigsten (partiellen) Trisomien waren: +3 (10), +3q (10), +5/5q (8), +7 (7), +12q (7). Die häufigsten Deletionen waren: -1p (19), -6/6q (15), -17/17p (14), -14/14q (13), -8p (11), -9/9p (10), -11/11p (10), -13/13p (10), -X/Xp/Xq (7), -Y (7).

Im Falle der Verluste von 1p und -6/6p und der Zugewinne bei 12q ergaben sich zwar relativ niedrige, aber mit anderen Studien vergleichbare Ergebnisse. Bei den Verlusten von 8p und 13/13p sowie Zugewinnen von 8q erhielten wir niedrigere Ergebnisse als in anderen Kollektiven. Die Häufigkeit von +3q und -9/9p ist in unserer Studie und bei Wing et al. niedriger als in den anderen Studien, offenbar wegen der höheren Sensitivität der CGH.

Bemerkenswert ist außerdem, dass wir in unserem Kollektiv weitere häufige Aberrationen nachweisen konnten, die in anderen Studien bisher nicht erwähnt wurden. Hierbei handelt es sich um den Bruchpunkt 1p22, Zugewinne bei 5/5q, 7 und X/Xp,Xq, sowie Verluste von 3q, 11/11p, X/Xp und Xq. Verluste des Y-Chromosoms werden

auch bei Wing et al. (2001) beschrieben. In den Arbeiten von Monni et al. , Bentz et al. und Bea et al. werden Verluste des Y-Chromosoms nicht erwähnt.

Der Verlust des Y-Chromosoms in den Tumorzellen ging mit einer verlängerten Überlebenszeit einher. Dies ist auch deshalb interessant, da ca. 80% der Mantelzell-Lymphompatienten männlich sind.

Bemerkenswert ist, dass nicht nur einzelne definierte Aberrationen, sondern die Anzahl an strukturellen Aberrationen und Bruchereignisse, die die genomische Instabilität widerspiegeln, mit der Überlebenszeit korreliert waren. In den Ergebnissen von Bea et al. (1999) wird dagegen auf den Zusammenhang zwischen einer hohen Zahl an chromosomalen Zugewinnen und einer verkürzten Überlebenszeit hingewiesen.

Obwohl hohe p53-Werte mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert waren, konnte die Deletion des Chromosoms 17/-17p, auf der der Genlokus für p53 identifiziert wurde (Imamura, 1994), nicht mit einer kürzeren Überlebenszeit in Verbindung gebracht werden. Dies lässt sich mit der Knudson-Hypothese erklären, die besagt, dass ein Ausfall der Genfunktion nur dann auftritt, wenn zusätzlich zur Inaktivierung des einen Allels noch eine Deletion des unveränderten Allels auftritt. Es ist also zu vermuten, dass das retinierte Allel bei diesen Fällen nicht mutiert war.

Mit einer blastischen Zytomorphologie war der Bruchpunkte 1p32 assoziiert. Interessant ist, dass Chromosomenverluste bei 1p, 9/9p und 1q mit höheren Ki-67 Werten assoziiert waren als die Kontrollgruppe.

Erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von Bea et al. (1999), bei welchen sich im Zusammenhang mit Zugewinnen von 3q und Verlusten von 9p verkürzte Überlebenszeiten ergaben.

Auch in der Arbeit von Dreyling et al. (1997) ergab sich wie bei uns ein Zusammenhang zwischen dem auf Chromosom 9 kodierten Inhibitor des Cyclin C1/cdk4-Komplexes, p16, und der Höhe von Ki-67. Somit können wir neuere Hypothesen stützen (Dreyling et al. (1997), Rosenwald et al. (2003)) die von einer entscheidenden Bedeutung von p16 bei der Steuerung des G1/S-Restriktionspunkts ausgehen. Obwohl weder unsere Studie noch die Daten von Dreyling et al. die Ergebnisse von Campo et al. (1999) unterstützen konnten, die einen Zusammenhang

zwischen einem Verlust von p16 und aggressiven Varianten ergaben, deuten auch diese Ergebnisse in die selbe Richtung.

#### **4.6 t(11;14):**

Wie auch in den Studien von Luthra et al. (1995) und Swerdlow et al. (2002) konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der untersuchten Mantelzell-Lymphome die t(11;14)(q13;q32) in klassischen zytogenetischen, FISH- und Blot/PCR Untersuchungen aufwiesen. In 3 (1,5%) Fällen konnte auch in der FISH kein Nachweis dieser Translokation geführt werden.

Zunehmend setzt sich die Hypothese durch, dass es sich bei den t(11;14) negativen MCL weder um einen Nachweisfehler noch um eine falsche Klassifikation des Mantelzell-Lymphoms handelt, sondern dass diese Fälle aufgrund ihrer gleichen „signature genes“ und der nicht zu unterscheidenden Morphologie sowie der gleichen durchschnittlichen Überlebensdauer zur Entität des Mantelzell-Lymphoms gehören, obwohl sie keine t(11;14) aufweisen (Rosenwald et al., 2003). Der Anteil der Cyclin D1 negativen Fälle lag in der Arbeit von Rosenwald et al. bei 9%.

Die t(11;14) und Überexpression von Cyclin D1 ist aber nach wie vor eng mit dem Mantelzell-Lymphom assoziiert, auch wenn beide nicht spezifisch für dieses Lymphom sind. Auch in anderen B-Zell-Neoplasien wie dem Multiplen Myelom finden sich in etwa 25% eine Überexpression von Cyclin D1 und die t(11;14) (Fonseca, 1998). Obwohl die Überexpression von Cyclin D1 ein wichtiges Merkmal für die Transformation und Tumorinduktion beim Mantelzell-Lymphom darstellt, ist die alleinige Überexpression von Cyclin D1 zur Tumorinduktion wohl nicht ausreichend.

Es konnte in Versuchen mit für Cyclin D1 transgenen Tieren gezeigt werden, dass sich nur bei zusätzlicher Aktivierung von Onkogenen (z. B. c-myc) Lymphome entwickeln (Lovec, 1994). Damit sind zusätzliche genetische Alterationen offenbar unablässig für die Entwicklung des Mantelzell-Lymphoms. Insofern sind die 13 Fälle interessant, die von den 74 in der Zytogenetik für t(11;14) positiven Fällen ansonsten keine weiteren

Aberrationen aufwiesen. Es wäre denkbar, dass sich in diesen Fällen noch bisher unbekannte, zytogenetisch nicht nachweisbare Aberrationen finden.

#### **4.7 Ploidie:**

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass der Anteil der Tumoren mit tetraploidem Chromosomensatz beim Mantelzell-Lymphom wesentlich höher war, als dies sonst bei B-Zell-Lymphomen beobachtet wurde. Insbesondere die blastischen Fälle wiesen mit 67% einem signifikant höheren Anteil tetraploide Chromosomensätze auf als die klassischen Fälle mit 20%. Dies bestätigt die Ergebnisse von Ott et al. (1997, 1998).

In unseren Daten zeigte sich auch ein Zusammenhang zwischen tetraploiden Chromosomensätzen und einem hohen Ki-67. Dagegen ergab sich keine Korrelation zwischen Ploidie auf der einen Seite und Mitoseindex und p53 auf der anderen Seite.

#### **4.8 Genomische Instabilität:**

Wir konnten die Ergebnisse von Monni et al. (1998) und Bea et al. (1999) bestätigen, die zeigten, dass Tumoren mit blastischer Zytomorphologie zu einem höheren Anteil chromosomale Imbalancen aufwiesen, als die Tumoren mit klassischer Zytomorphologie. Auch zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der numerischen Aberrationen und der Höhe von Ki-67.

Die Bedeutung von Ki-67 in unserer Studie wird von der Studie von Rosenwald et al. (2003) untermauert, in der ein eher quantitatives Modell entwickelt wurde, welches als „Proliferation signature“ zusammengefasst wurde und aus Komponenten zusammengesetzt ist, die die Zellzyklusdauer verkürzen. Mit diesem Modell ließ sich die zu erwartende Lebenspanne gut vorhersagen.

Für die Anzahl an strukturellen Aberrationen, Bruchpunkten oder Gesamtaberrationen konnten allerdings kein Zusammenhänge zu Ki-67 oder blastischer Zytomorphologie gezeigt werden.

#### 4.9 Klinische Daten:

Das Befallslokalisierung unseres Patientenkollektivs zeigt eine ähnliche Verteilung wie bei Weisenburger et al. (1996) und Rätty et al. (2002). Zu beachten ist, dass einige Gruppen anders definiert wurden und sich so auch andere Befallshäufigkeiten ergaben (z.B. beim Leberbefall). Auch bei uns konnte also gezeigt werden, dass bei Diagnosestellung meist ein ausgedehnte Befall mit fortgeschrittenem Tumorstadium (Ann Arbor III-IV) vorlag. Einen Überblick zeigt Tabelle 18:

Tabell 18: Klinische Parameter in verschiedenen Studien:

	<b>Unser Kollektiv</b>	<b>Weisenburger et al.</b>	<b>Rätty et al.</b>
Medianes Alter in Jahren	65	60	65
Geschlechtsverhältnis m:f	4:1	4:1	4:1
Lymphknotenbefall	87% Lymphknotenbefall	90% generalisierter Lymphknoten-Befall	Nicht erhoben
Milzbefall/ Splénomegalie	50% Milzbefall	60% Splénomegalie	41% Milzbefall
Leberbefall / Hepatomégalie	12% Leberbefall	30% Hepatomégalie	Nicht erhoben
Knochenmarkinfiltration	66%	80%	63%
Befall des Gastrointestinaltrakts	21%	20%	21%
Ann Arbor III-IV	85%	90%	83%
B-Symptomatik	46%	40%	35%
Schlechtes Allgemeinbefinden (Karnofski-Index <80%)	19%	20%	WHO <=1 85%

Bei 9 Fällen ohne nodalen Befall ergab sich kein Unterschied in der zur erwartenden Überlebensdauer im Vergleich zu den Fällen mit nodaler Beteiligung.

In der Arbeit von Molina et al. (2000), in welcher 8 Fälle ohne nodale Beteiligung vorgestellt wurden, ergab sich dagegen eine signifikant niedrigere Überlebensdauer für dieses Patientenkollektiv als es sonst in der Literatur beschrieben wird. Allerdings wiesen deren Fälle alle eine Splenomegalie und ein leukämisches Blutbild auf.

Die Gesamtüberlebenszeit unseres Patientenkollektivs mit durchschnittlich 956 Tagen (ungefähr 32 Monate) lag leicht unter den sonst in der Literatur beschriebenen Überlebenszeiten mit 34 (Räty et al., 2002), 43 (Argatoff et al., 1997) und 45 Monaten (Swerdlow, 2002).

Die zu den IPI-Kriterien gehörenden Risikofaktoren fortgeschrittenes Tumorstadium (Ann Arbor III-IV) und ein Karnofsky-Index von  $<80$  waren wie auch in anderen Studien mit einer verkürzten Überlebenszeit assoziiert. Außerdem war wie auch bei Majlis et al. (1997) und Bosch et al. (1998) ein hoher IPI-Index mit einer kürzeren Überlebenszeit verbunden.

Die in diesen beiden Studien identifizierten Risikofaktoren blastische Histologie und hoher Mitoseindex konnten durch unsere Daten bestätigt werden. Dort wird auch von einer verkürzten Überlebenszeit im Zusammenhang mit leukämischem Blutbild gesprochen. Dies konnte durch unsere Daten nicht bestätigt werden, allerdings zeigte sich bei uns, dass ein Leukozytenwert von  $>10.000$  mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert war. Dies lässt sich vielleicht darauf zurückführen, dass bei einigen Patienten mit leukämischem Blutbild kein Differenzialblutbild vorlag und dass einige Patienten mit hohen Leukozytenwerten an Infektionen litten, die durch die tumor- oder therapiebedingte Immunsuppression gefördert werden und eine häufige Todesursache darstellen.

Mit einer verkürzten Überlebenszeit waren folgende Risikofaktoren assoziiert: Ein hoher Proliferationsindex (hohes Ki-67) und ein fortgeschrittenes Tumorstadium (Ann Arbor III-IV) (Räty et al., 2002) und eine erhöhte Expression von p53 (Norton et al. (1995), Greiner et al. (1996) und Chiarle et al. (2000)). Wie in unserer Studie war ein Alter über 60 Jahren (Argatoff et al., 1997 und Bosch et al, 1998), die Höhe des Serum-LDH und der histologische Subtyp (nodulär, perifollikulär oder diffus) nicht

ausschlaggebend für die Gesamtüberlebenszeit. Letzteres wird auch in den Studie von Norton et al. (1995), Argatoff et al. (1997) und Samaha et al. (1998) bestätigt.

Da durch die „Proliferation signature“ bei Rosenberg et al. (2003) die Entwicklung eines guten prognostischen Index gelungen ist und sich die große Bedeutung des Proliferationsindex auch in unseren Daten und in denen von Rätty et al. (2002) widerspiegelt empfehlen wir in Zusammenschau dieser Ergebnissen , den IPI als prognostischen Index durch den Proliferationsindex bzw. die „Proliferation signature“ zu ergänzen, da der IPI in seiner jetzigen Form anders als in anderen Non-Hodgkin-Lymphomen keinen optimalen Indikator für die zu erwartende Lebensdauer darzustellen scheint.

Signifikante Unterschiede in der Verteilung der klinischen Parameter zwischen klassischer und blastischer Zytomorphologie konnte nur für einen Tumordurchmesser von über 6 cm und die Wahrscheinlichkeit, eine komplette Remission zu erzielen, gezeigt werden.

## **5. Zusammenfassung:**

In unserer Studie wurden Daten von 225 Mantelzell-Lymphomen verglichen. Klinische Daten standen von 139 Patienten zur Verfügung. Zytogenetische Daten konnten in 83 Fällen erhoben werden.

Eine blastoide Zytomorphologie und eine verkürzte Lebenserwartung war mit hohen Werten beim Mitoseindex, bei Ki-67 und p53 korreliert. Außerdem zeigte sich ein Zusammenhang zwischen einer Überexpression von p53 und dem MI bzw. Ki-67-Index.

In der Zytogenetik erhielten wir im Vergleich zu anderen Studien relativ niedrige prozentuale Werte für die einzelnen Aberrationen. Es ergaben sich folgende häufige Veränderungen:

Die häufigsten Bruchpunkte waren (absolute Häufigkeit in Klammern): 11q13 (74), 14q32 (74), 1p22 (7), 1p32 (5), 6q21 (5), 1p11 (4), 1q21 (4), 10q24 (4).

Die häufigsten partiellen Trisomien waren: +3 (10), +3q (10), +5/5q (8), +7 (7), +12q (7), +x/xp/xq (6), +3p (5), +11q (5), +17q (5), +6p (4), +8q (4).

Die häufigsten Deletionen waren: -1p (19), -6/6q (15), -17/17p (14), -14/14q (13), -8p (11), -9/9p (10), -11/11p (10), -13/13p (10), -X/Xp/Xq (7), -Y (7), -1q (6), -3q (6), -15/15q (6), -2/2q (5).

Besonders wichtige genetische Parameter waren in unseren Untersuchungen der Bruchpunkt 1q32, der mit blastoider Zytomorphologie assoziiert war und die Deletionen in 1p, 9/9p und 1q, bei welchen der Proliferationsindex signifikant höher als in den Kontrollgruppen war. Gerade genetischen Verlusten von Chromosom 9/9p, auf welchem das Tumorsuppressorgen p16 gelegen ist, wird in neueren Studien große Bedeutung beigemessen.

Wir konnten zeigen, dass tetraploide Chromosomensätze und die Anzahl an numerischen Aberrationen auf der einen Seite mit blastoider Zytomorphologie und hohem Ki-67 auf der anderen Seite assoziiert waren. Hingegen zeigte sich kein Zusammenhang zur Ploidie, dem Mitoseindex oder einer Überexpression von p53.

In 18% (13/74) der in der Zytogenetik für t(11;14) positiven Fälle fanden sich keine weiteren genomischen Veränderungen auf der Ebene des Karyotyps. Dies erscheint auch deshalb interessant, da man davon ausgeht, dass weitere genomische Veränderungen zusätzlich zur t(11;14) zur Entstehung eines Mantelzell-Lymphoms nötig sind. Daher ist davon auszugehen, dass in diesen Fällen zusätzliche, submikroskopische Aberrationen vorhanden sein könnten.

Prognostisch ungünstig waren folgende klinische Faktoren: Ein Karnofskyindex <80, ausgedehnter Lymphombefall (Ann Arbor III-IV), ein IPI>1, Hb<12,5mg/dl, Knochenmarks- und Leberbefall, Leukozyten>10.000, keine Remission oder Progression nach Therapie. Bei den biologischen Parametern waren folgende Faktoren mit einer verkürzten Überlebensdauer verbunden: >3 Bruchereignisse, >2 strukturelle Aberrationen, hohe Werte für MI, Ki-67 und p53. Ein Verlust des Y-Chromosoms war mit einer längeren Überlebenszeit assoziiert.

In der Gruppe der Langzeitüberlebenden (>7 Jahre) fanden sich signifikant weniger extranodale Befallslokalisationen, weniger Milz- und Knochenmarkbefall, weniger B-Symptomatik, niedrigere Werte für LDH, weniger ausgedehnter Tumorbefall (Ann



Arbor III-IV) und häufiger ein lokalisiertes Befallsmuster. Außerdem war der Proliferationsindex in dieser Gruppe signifikant niedriger als in der Gruppe der Nicht-Langzeitüberlebenden. Kein einziger Fall der Langzeitüberlebenden wies einen PI von >30% auf.

Wie auch in der Arbeit von Rosenwald et al. (2003) konnten wir zeigen, dass die Höhe des Proliferationsindex auch dann signifikant mit der Überlebensdauer korreliert ist, wenn man vier Gruppen mit ansteigendem Proliferationsindex bildet und diese auf die Überlebensdauer untersucht. Der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen war hoch signifikant und belegt die prognostische Bedeutung des PI beim Mantelzell-Lymphom.

## 6. Literatur:

- Argatoff, LH., Connors, JM., Klasa, RJ., Horsman, DE., Gascoyne, RD. Mantle cell lymphoma (1997) A clinicopathologic study of 80 cases *Blood* 89, 6: 2067-2078.
- Au, W.A., Gascoyne, R.D., Viswanatha, D.S., Connors, J.M., Klasa, R.J., Horsman, D.E. (2002) Cytogenetic Analysis in Mantle Cell Lymphoma: A review of 214 cases. *Leukemia and Lymphoma*, Vol.43 (4), 783-791.
- Bartkova, J., Lukas, J., Strauss, M., Bartek, J.(1994) Cell cycle related variation and tissue related expression of cyclin D1 protein. *Journal of Pathology*. 172, 237-245.
- Bea, S., Ribas, M., Hernandez, JM., Garcia, JL. Flores, Gonzalez, M., Lopez-Guillermo, A., Piris, MA., Miro, R., Campo, E., Cardesa, A. (1999) Increased number of imbalances and high level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastic variants. *Blood* 93, 4365-4374.
- Bentz, M., Plesch, A., Bullinger, L., Stilgenbauer, S., Ott, G., Müller-Hermelink, HK., Baudis, M., Barth, TFE., Möller, P., Lichter, P., Döhner, H. (2000) t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer* 27: 285-294.
- Bertoni, F., Roggero, E., Luscieti, P., Pedrinis, E., Cavalli, F., Zucca, E. (1999) Clonality assessment in blood of patients with mantle cell lymphoma. *Leukemia and Lymphoma*, 32, 375-379.
- Bosch, F., Lopez-Guillermo, A., Campo, E., Ribera, JM., Conde, E., Piris, MA., Vallespi, T., Woessner, S., Montserrat, E. (1998) Mantle cell Lymphoma presenting features, response to therapy, an prognostic factors. *Cancer* 82(3):567-575.
- Chiarle, R., Budel, LM., Skolnik, J. et al (2000). Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood* 95: 619-626.

- Coignet, L.J., Schuurin, E., Kibbelaar, R.E., Raap, A.K., Kleiverda, J.K., Bertheas, M.F., Wiegant, J., Beverstock, G.C., Kluin, P.M (1996). Detection of 11q13 rearrangements in hematologic neoplasias by double-color fluorescence in situ hybridization. *Blood* 87: 1512-1519.
- Cuneo, A., Bigoni, R., Negrini, M., Bullrich, F., Veronese, M.L., Roberti, M.G. et al. (1997) "Cytogenetic and interphase cytogenetic characterization of atypical chronic lymphocytic leukemia carrying BCL1 translocation", *Cancer Res.* 57(6), 1144-1150.
- Daudy, S.F., Hinds, P.W., Louie, K., Reed, S.I., Arnold, A., Weinberg, R.A. (1993) Physical interaction of the Retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 73: 499-511.
- Dreyling, M.H., Bullinger, L., Ott, G., Stilgenbauer, S., Müller-Hermelink, H.K., Bentz, M., Hiddemann, W., Döhner, H. (1997). Alterations of the Cyclin D1/p16-pRB Pathway in Mantle cell Lymphoma. *Cancer Research* 57, 4608-4614.
- Fonseca, R., Witzig, T.E., Gertz, M.A., et al (1998). Multiple myeloma and the translocation t(11;14)(q13;q32): A report on 13 cases. *British Journal of Haematology* 101: 296-301.
- Gaidano, G., Ballerini, P., Gong, J.Z., Inghirami, G., Neri, A., Newcomb, E.W., Magrath, I.T., Knowles, D.M., Dalla-Favera, R. (1991). p53 mutations in human lymphoid malignancies: Association with Burkitt Lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5413.
- Gerard-Marchant, R., Hamlin, I., Lennert, K., Rilke, F., Stansfeld, A.G., Van Unnik, J.A.M. (1974) Classification of Non-Hodgkin's Lymphomas. *Lancet*, 2, 406-408.
- Greiner, T., Moynihan, M.J., Chan, W.C., Lytle, D.M., Pedersen, A., Anderson, J.R., Weisenburger, D.D (1996) p53 Mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood*, Vol 87, No 10, pp 4302-4310
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K.C., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peters, C., Falini, B., Gatter, K.C., Grogan, T.M., Isaacson, P.G., Knowles, D.M., Mason, D.Y., Müller-Hermelink, H.K., Pileri, S.A., Piris, M.A., Ralfkiaer, E., Warnke, R.A. (1994) A revised European-American classification of lymphoid

- neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 84, 1361-1392.
- Hernandez, L., Fest, T., Cazorla, M., Teruya-Feldstein, J., Bosch, F., Peinado, MA., Piris, M., Montserrat, E., Cardesa, A., Jaffe, ES., Campo, E., Raffeld, M. (1996). p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphoma. *Blood*, Vol 87, No 8, pp 3351-3359.
- Imamura, J., Miyoshi, I., Koeffler, HP. (1994). p53 in hematologic malignancies. *Blood* 84: 2412-2421.
- Jaffe, ES., Bookman, MA., Longo, DL. (1987) Lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation – mantle zone lymphoma: A distinct subtype of B-cell lymphoma. *Hum Pathol.*, 18, 877-880.
- Kaplan GL, Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 1958;53:457-481.
- Lardelli, P., Bookman, MA., Longo, DL, Jaffe, ES. (1990) Lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation. Morphologic and immunologic spectrum and clinical correlations. *Am J surg Pathol*, 14, 752-763.
- Lennert, K., Mohri, N. (1978). Histopathology and diagnosis of Non-Hodgkin's lymphoma. Lymphomas of germinal center cells. In: Lennert, K., (ed.) *Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease*. Springer Berlin Heidelberg New York, 281-345.
- Leroux, D., Le Marc'hadour, F., Gressin, R., Jacob, MC., Keddari, E., Monteil, M., Caillot, P., Jalbert, P., Sotto, JJ. (1991) Non Hodgkin's lymphoma with t(11;14)(q13;q32): a subset of mantle zone/ intermediate lymphocytic lymphoma? *British Journal of Haematology* 77: 346-353.
- Louie, DC, Offit, K., Jaslow, R., Parsa, NZ.; Murty, VV., Schluger, A., Chaganti, RS. (1995): p53 overexpression as a marker of poor prognosis in mantle cell lymphomas with t(11;14)(q13, q32). *Blood* 86, 2892-2899.
- Lovec, H., Grzeschiczek, A., Möröy, T. (1994). Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphomas in transgenic mice. *EMBO J* 13: 3487-3495.
- Lukas, J., Pagano, M., Staskova, Z., Draetta, G., Bartek, J. (1994). Cyclin D1 protein

oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumor cell lines. *Oncogene* 9, 707-718.

- Luthra, R., Hai, S., Pugh, WC. (1995). Polymerase chain reaction detection of the t(11;14) translocation involving the bcl-1 major translocation cluster in mantle cell lymphoma. *Diagn Mol Pathol* 4: 4-7.
- Majlis, A., Pugh, WC., Rodriguez, MA., Benedict, WF., Cabanillas, F. (1997) : Mantle cell lymphoma: Correlation of clinical outcome and biologic features with three histologic variants. *Journal of Clinical Oncology* 15: 1664-1667.
- Molina, TJ., Delmer, A., Cymbalista, F., Le Tourneau, A., Perrot, JY., Ramond, S., Marie, JP., Audouin, J., Zittoun, R., Diebold, J.. Mantle cell lymphoma, in leukaemic phase with prominent splenomegaly. A report of eight cases with similar clinical presentation and aggressive outcome. (2000) *Virchows Arch* 437:591-598.
- Monni, O., Oinonen, R., Elonen, E., Franssila, K., Teerenhovi, L., Joensuu, H. (1998) Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 21: 298-307.
- Norton, AJ., Matthews, J., Pappa, V., Rohatiner AZS., Lister, TA. (1995) Mantle cell Lymphoma: Natural history defined in a serially biopsied population over a 20-year period. *Ann Oncol* 6:249-.256
- Ott, G., Kalla, J., Hanke, A., Müller, JG., Rosenwald, A., Katzenberger, T., Kretschmar, R., Kreipe, H., Ott, MM., Müller-Hermelink, HK.(1998) The cytomorphological spectrum of mantle cell lymphoma is reflected by distinct biological features, *Leukemia and Lymphoma*, Vol. 32 (1-2), pp55-63.
- Ott, G., Kalla, J., Ott, M., Schryen, B., Katzenberger, T., Müller, JG., Müller-Hermelink, HK (1997) Blastoid variants of mantle cell lymphoma: Frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. *Blood*, Vol 89 pp1421-1429.
- Peto R, Pike MC. Conservatism of the approximation  $(O-E)^2/E$  in the log-rank test for survival data or tumour incidence data. *Biometrics*. 1973;29:759-784.
- Pinyol, M., Hernandez, L., Cazorla, M., Balbin, M., Jares, P., Fernandez, PL., Montserrat, E., Cardesa, A., Lopez-Otin, C., Campo, E. (1997) Deletions and

loss of expression of p16 and p21 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 89: 272.

- Quintanilla-Martinez, L., Thieblemont, C., Fend, F., Kumar, S., Pinyol, M., Campo, E., Jaffe, E., Raffeld, M. (1998) mantle cell lymphoma lack expression of p27, a cyclin-dependent kinase inhibitor. *American Journal of Pathology*. Vol. 153, No1, pp 175-182.
- Räty, R., Franssila, K., Joensuu, H., Teerenhovi, L., Elonen, E. (2002) Ki-67 expression level, histological subtype, and the International Prognostic Index as outcome predictors in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 69: 11-20.
- Rimokh, R., Berger, F., Delsol, G., Charrin, C., Bertheas, MF., French, M., Garoscio, M., Felman, P., Coiffier, B., Bryon, PA., Rocher, M., Gentilhomme, O., Germain, D., Magaud, JP. (1993) Rearrangements and overexpression of the BCL1/PRAD-1 gene in intermediate lymphocytic lymphomas and in t(11q13)-bearing leukemias. *Blood* 81: 3063-3067.
- Rosenberg, CL., Wong, E., Petty, EM., Bale, AE., Tsujimoto, Y., Harris, NL., Arnold, A (1991) PRAD 1, a candidate BCL 1 oncogene: mapping and expressing in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad. Sci USA* 88: 9636-9642.
- Rosenwald, A., Wright, G., Wiestner, A., Wing, CC. et al. (2003) The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer cell* Vol. 3, 185-197.
- Samaha, H., Dumontet, C., Ketterer, N. et al (1998) Mantle cell lymphoma, a retrospective study of 121 cases. *Leukemia* 12: 1281-1287.
- Sherr, CJ. (1996), *Cancer cell cycles*. *Science* 274. 1672-1677.
- Stein, H., Lennert, K., Feller, A.C., Mason, DY. (1984) Immunohistochemical analysis of human lymphoma: Correlation of histological and immunohistochemical categories. *Adv Cancer Res*, 42, 67-147.
- Swerdlow, SH., Williams, ME. (2002). From Centrocytic to Mantle Cell Lymphoma: A Clinicopathologic and Molecular Review or 3 Decades *Hum Pathol* 33: 7-20.
- The international Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project: A predictive model for aggressive non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* 329: 987, 1993

- Weisenburger, DD., Vose, JM., Lynch, JC., Chan, WC., Bierman, PJ., Dave, BJ., Sanger, WG., Armitage, JO. (2000). Mantle cell lymphoma. A clinicopathologic study of 68 cases from the Nebraska Lymphoma Study Group. *American Journal of Hematology*. 64(3): 190-6.
- Weisenburger DD, Armitage JO. (1996) Mantle cell lymphoma: An entity comes of Age. *Blood* 87: 4483-4494.
- Zucca, E., Roggero, E., Pinotti, G., Pedrinis, E., Capella, C., Venco, A. & Cavalli, F. (1995) Patterns of survival in Mantle cell lymphoma. *Annals of Oncology*, 6, 257-262.

## 7. Anhang

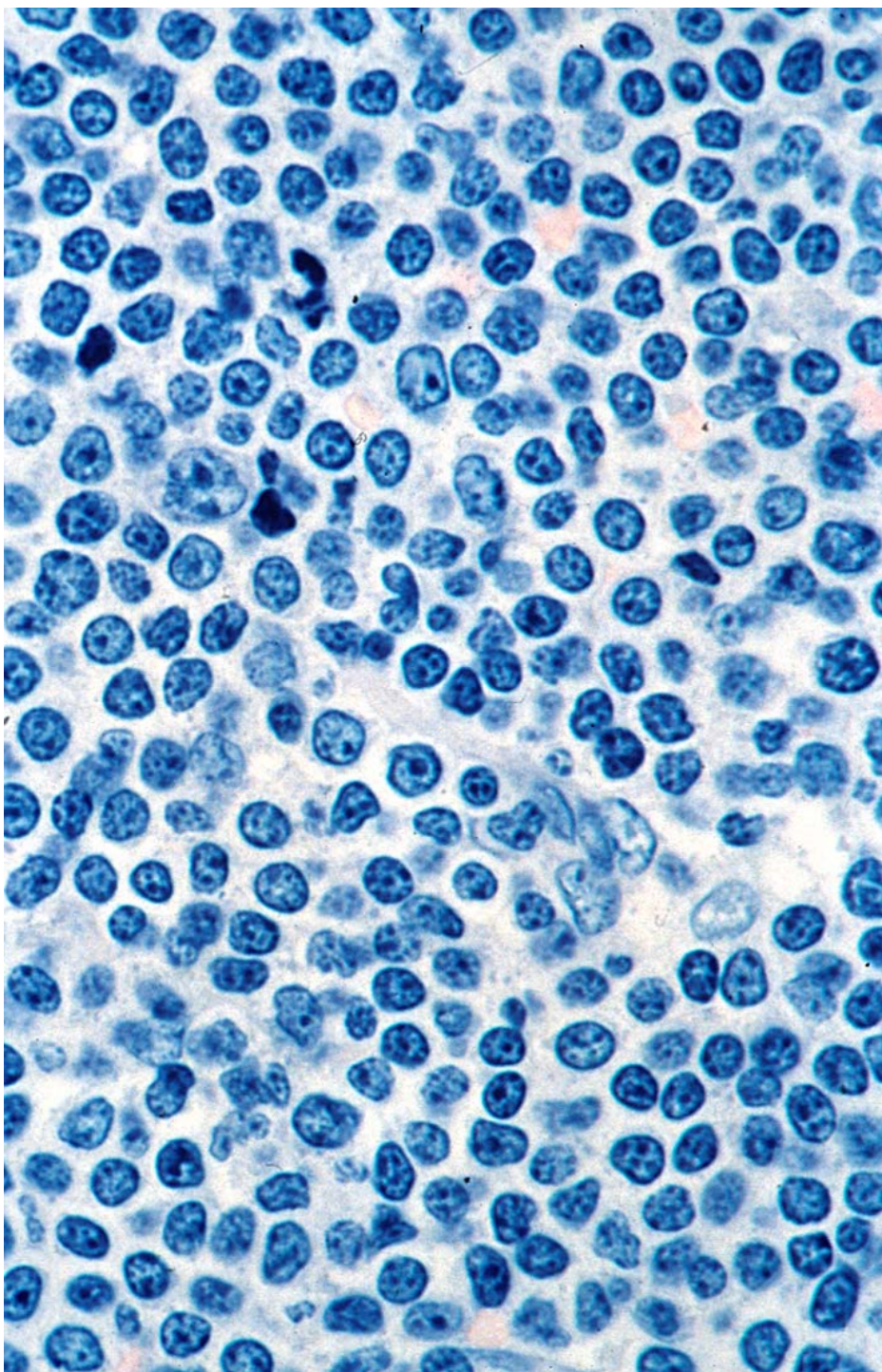
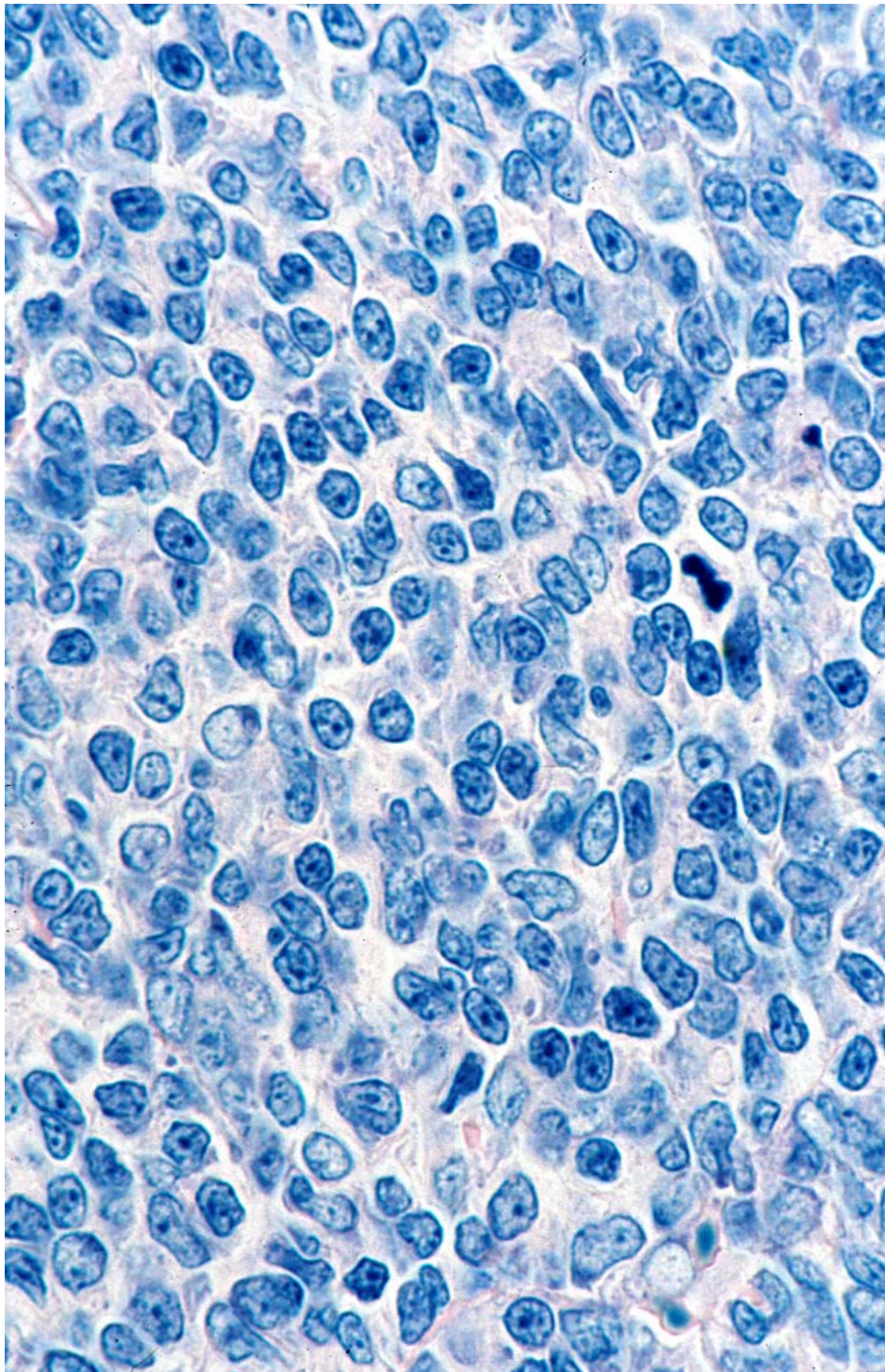


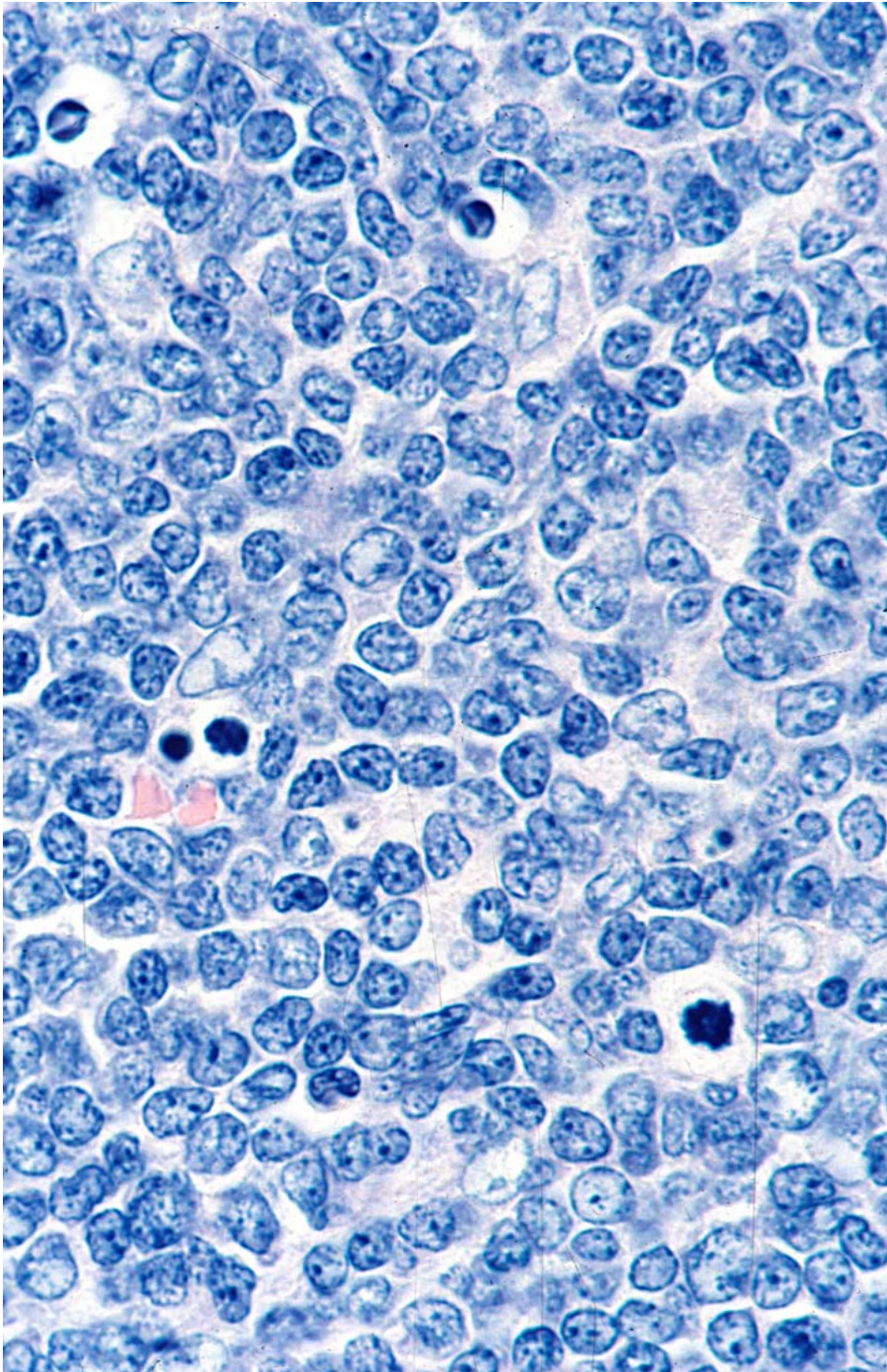
Abbildung 1: MCL klassischer Typ 1





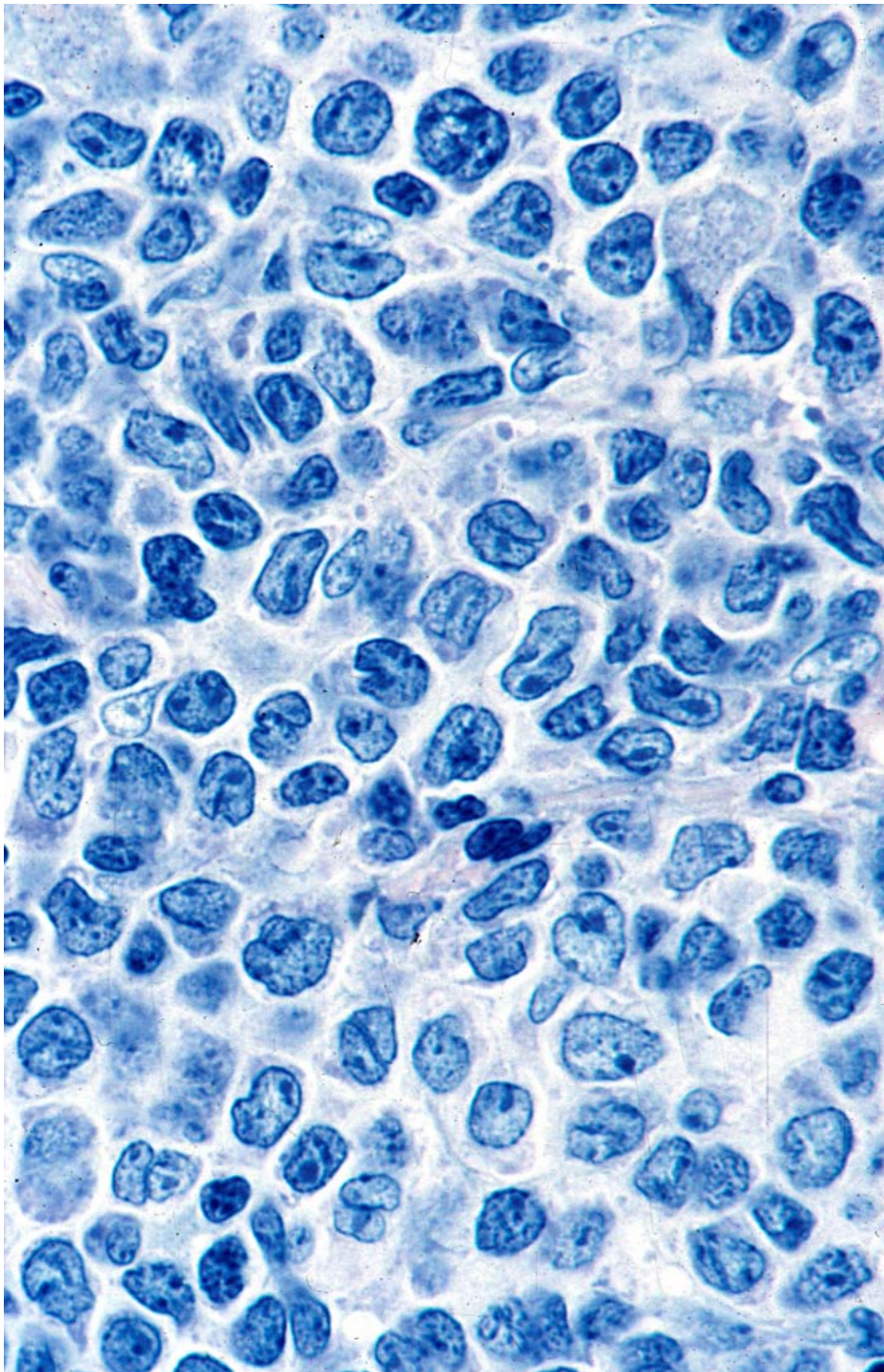
**Abbildung 2: MCL klassischer Typ 2**





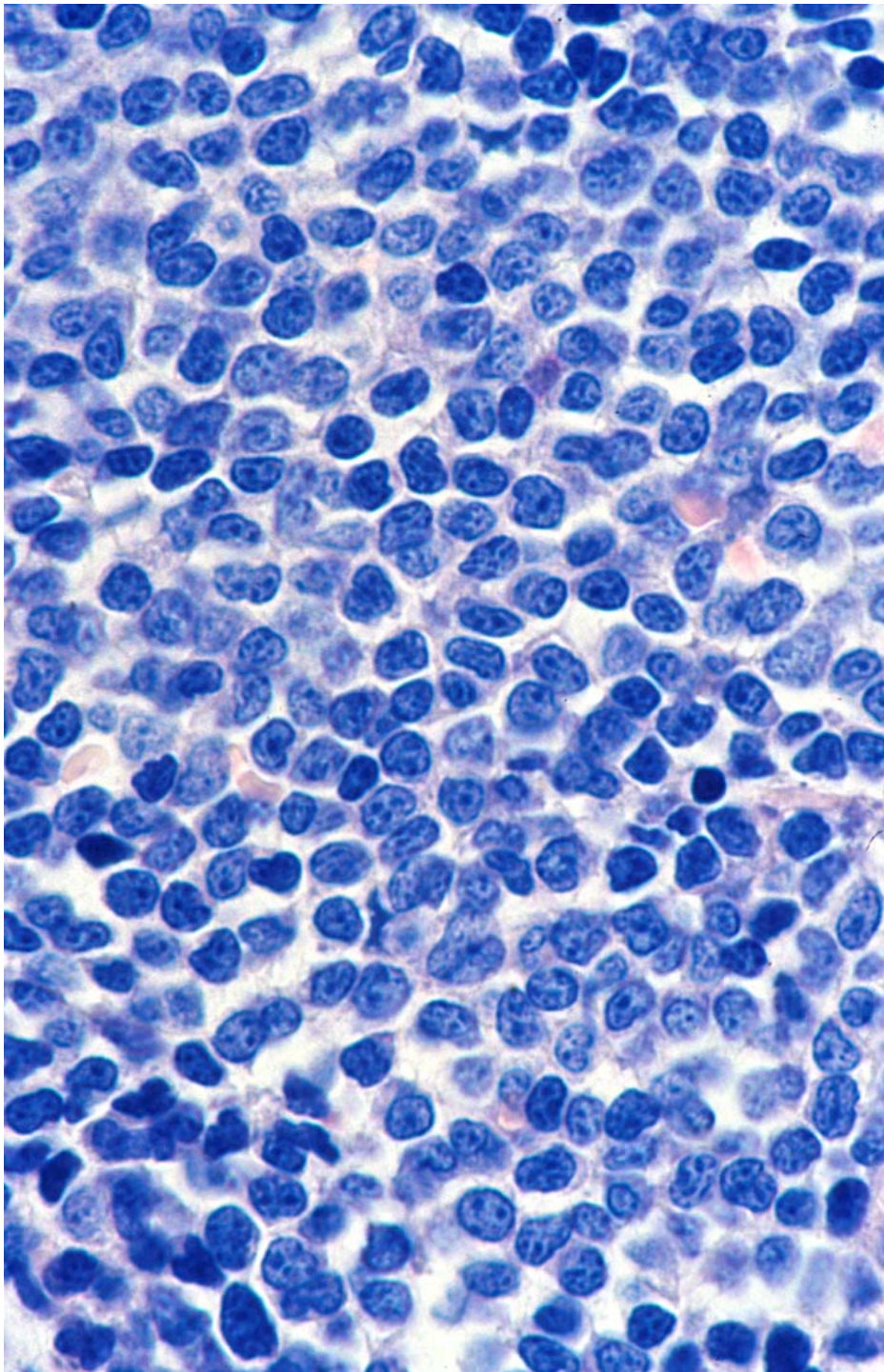
**Abbildung 3: MCL Lymphoblastoid**





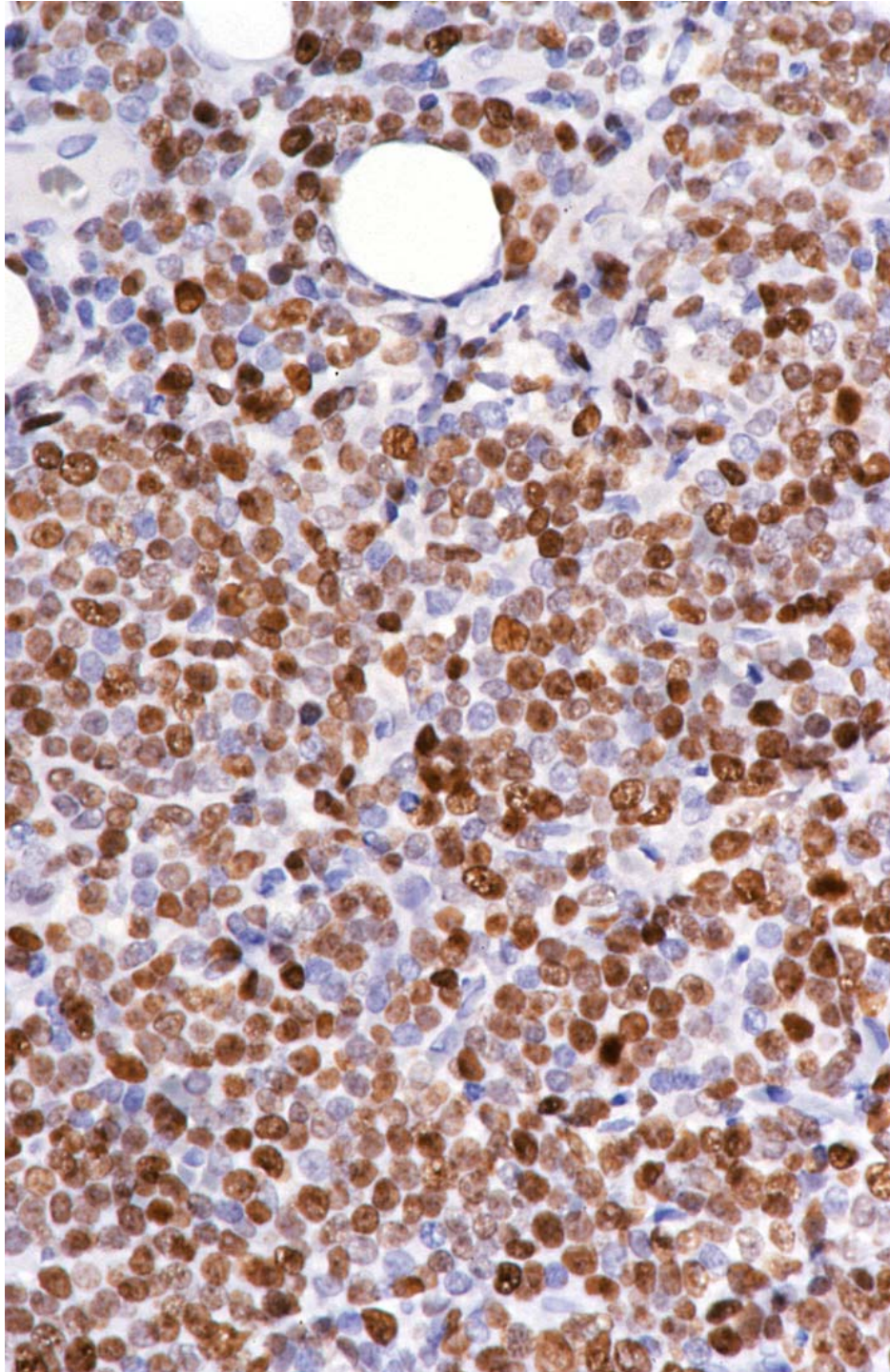
**Abbildung 4: MCL Pleomorph**





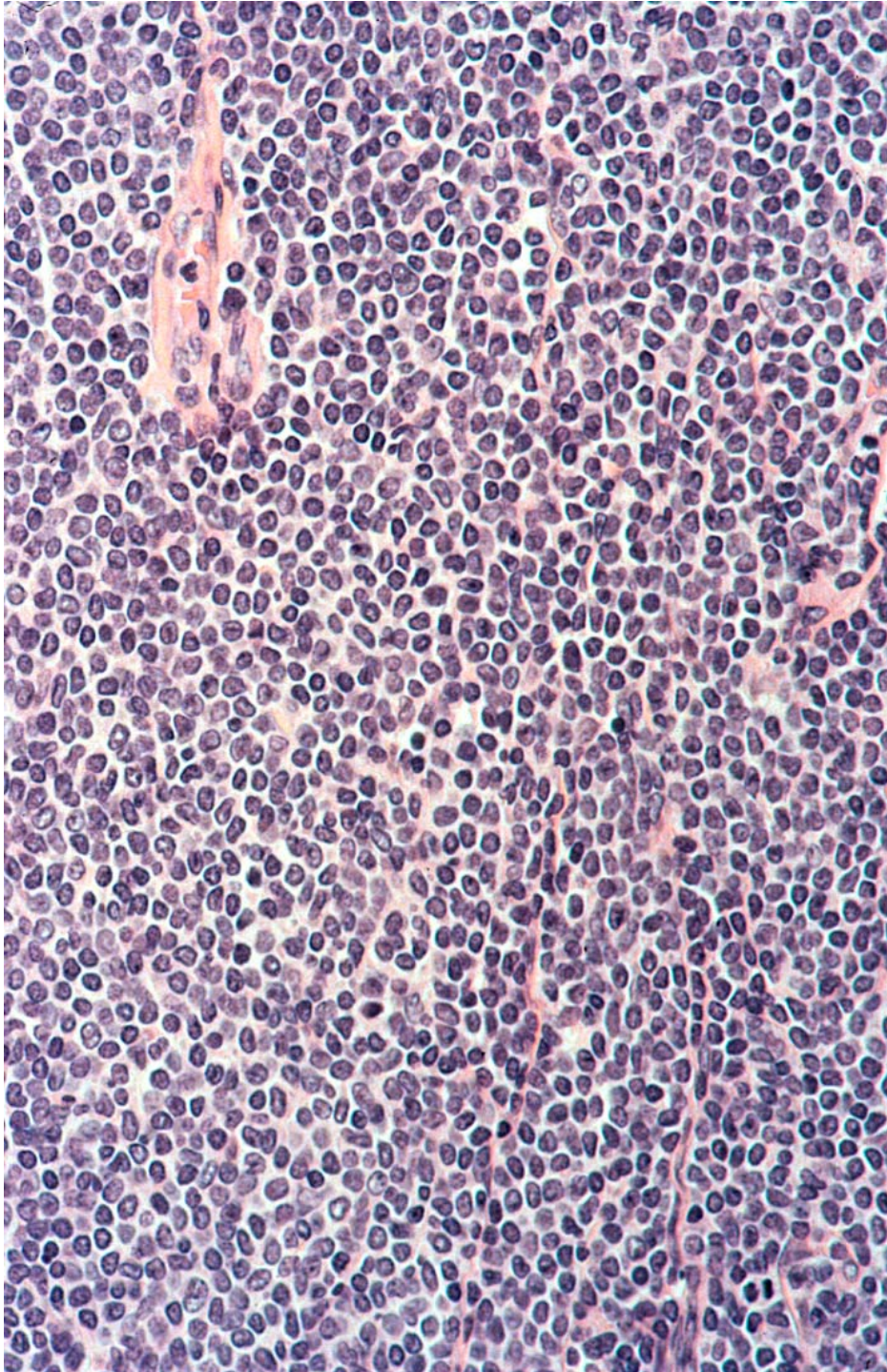
**Abbildung 5: MCL, klassisch mit hohem Ki67 Index**





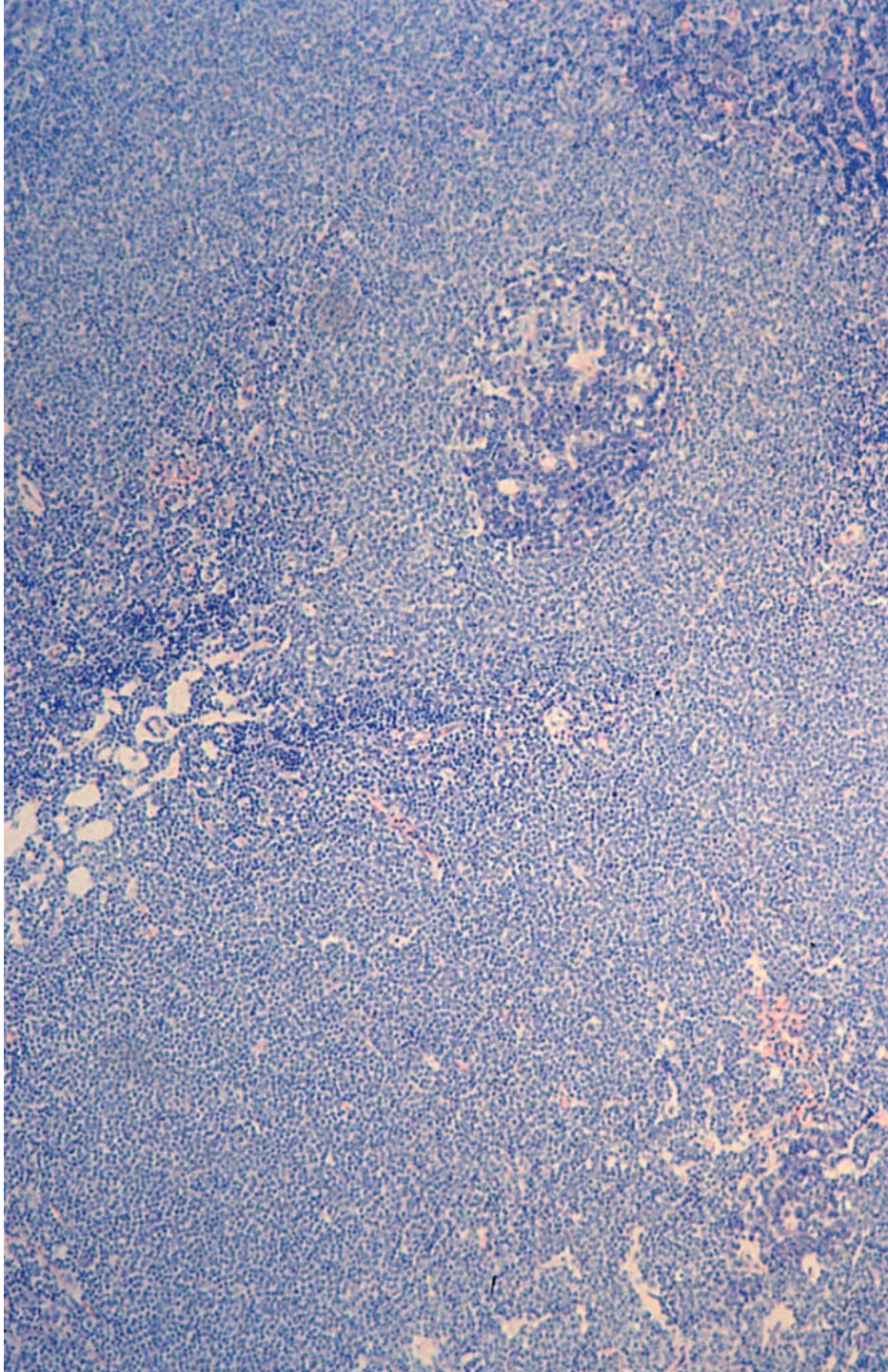
**Abbildung 6: Ki67**



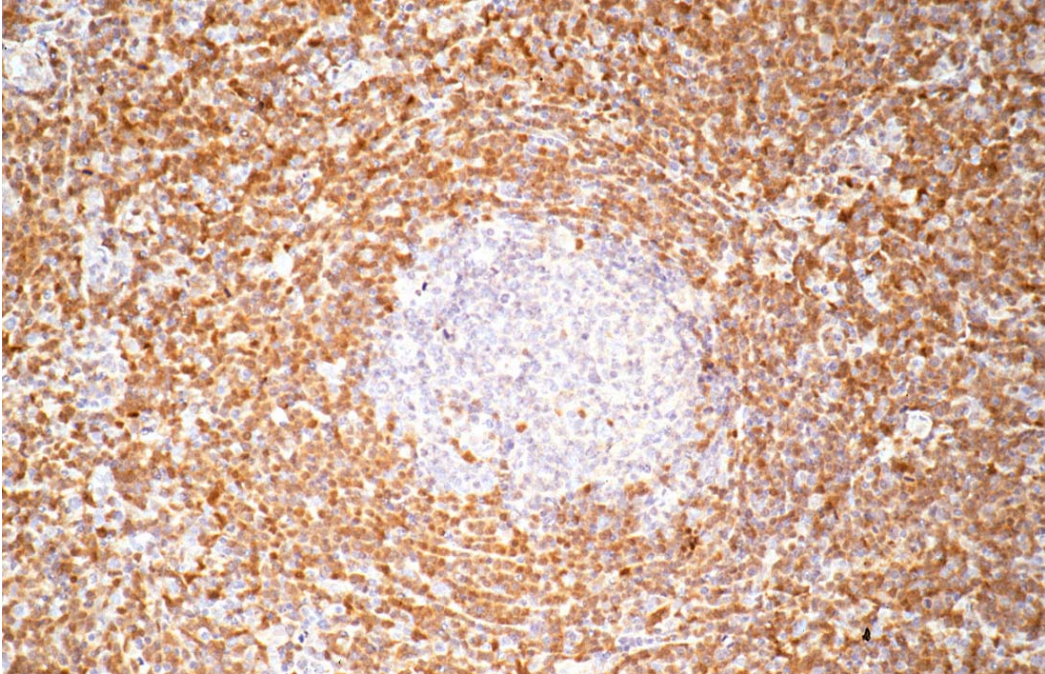


**Abbildung 7: Wachstumsmuster Diffus (70-80%)**





**Abbildung 8: Wachstumsmuster Nodulär/Perifollikulär (20-30%)**



**Abbildung 9: t(11;14)/ Cyclin D1 Färbung**