

Aus dem Institut für Pathologie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Hans Konrad Müller-Hermelink

**Kombinierte zytogenetische und morphologische Analyse
follikulärer Non-Hodgkin Lymphome. Eine neue rekurrente
chromosomale Aberration bei prädominant diffusen folliculären
Lymphomen.**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Antje Laufer

aus Pforzheim

Würzburg, März 2008

Referent: Prof. Dr. med. German Ott

Koreferent: Prof. Dr. med. Holger Höhn

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2008

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Maligne Lymphome: Definition und historische Aspekte	1
1.2.	Lymphomklassifikationen	1
1.3.	Die WHO-Klassifikation maligner Lymphome	3
1.4.	Das folliculäre Non-Hodgkin Lymphom (FL)	4
1.5.	Grading folliculärer Lymphome	5
1.6.	Zytogenetik der folliculären Lymphome	6
1.7.	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	7
2.	Material und Methoden	8
2.1.	Untersuchungsmaterial	8
2.2.	Klassifikation der folliculären Lymphome	8
2.3.	Immunhistochemische Untersuchungen	9
2.4.	Die Ermittlung des Mitoseindex	10
2.5.	Die Bestimmung des Proliferationsindex	10

2.6.	Zytogenetische Untersuchungen	10
2.7.	Statistische Analysen	11
3.	Ergebnisse	12
3.1.	Follikuläre Lymphome mit überwiegend oder partiell follikulärem Wachstumsmuster	12
3.1.1.	Klassifikation und Histopathologie	12
3.1.2.	Mitoseindex	14
3.1.3.	Proliferationsindex	15
3.1.4.	CD10 Expression	15
3.1.5.	BCL-2 Expression	15
3.1.6.	Expression von p53	15
3.1.7.	Sekretorische Differenzierung (CIg)	16
3.1.8.	Zytogenetische Analysen	16
3.2.	Follikuläre Non-Hodgkin Lymphome mit überwiegend diffusem Wuchstyp	19

4.	Diskussion	23
4.1.	Follikuläre Lymphome Grad 1-3 mit follikulärem Wachstumsmuster	23
4.1.1.	Morphologie und Grading follikulärer Lymphome	23
4.1.2.	Immunphänotyp und Relation zu anderen Parametern	24
4.1.3.	Chromosomale Aberrationen und Bedeutung für Verlauf und Prognose	26
4.2.	Follikuläre Lymphome mit überwiegend diffusem Wachstumsmuster	27
5.	Zusammenfassung	31
	Literaturverzeichnis	33

1. Einleitung

1.1. Maligne Lymphome: Definition und historische Aspekte

Maligne Lymphome sind primäre Neoplasien der Zellen des lymphatischen Gewebes (der Lymphknoten, der Milz, der Tonsillen und des Knochenmarks) und können auch primär extranodal (extralymphatisch) entstehen. Der Begriff des malignen Lymphoms wurde erstmals von Rudolf Virchow (1821-1902) erwähnt. Die Einteilung der malignen Lymphome erfolgt in die malignen Lymphome vom Hodgkin-Typ und in die Non-Hodgkin Lymphome (NHL).

Als mögliche Risikofaktoren in der Entstehung eines Non-Hodgkin Lymphoms wurden der soziale und wirtschaftliche Status, familiäre Faktoren, Immundefizienzen, bakterielle und virale Infektionen, Impfungen und Medikamente, Bestrahlungen, berufliche Exposition, Tierkontakte, Ernährungsgewohnheiten und Lebensstil erwähnt (Jaffe et al., 2001). Die Ursache für die Entstehung der meisten Non-Hodgkin Lymphome ist unbekannt. Die bedeutendsten Risikofaktoren sind eine angeborene oder erworbene Immundefizienz, virale (humanes T-Zell-Leukämie-Virus Typ I, Epstein-Barr-Virus, HI-Virus) und bakterielle (*Helicobacter pylori*) Infektionen, die Therapie mit Diphenylhydantoin-haltigen antineoplastischen Medikamenten und der Kontakt mit Pestiziden und organischen Lösungsmitteln (Ferris Tortajada et al., 2001).

1.2. Lymphomklassifikationen

Im Jahre 1956 wurde von Rappaport (Rappaport et al., 1956) eine histologische Klassifikation der malignen Lymphome vorgeschlagen, die 1966 in den AFIP-Band: „Tumors of the Hematopoietic System“ integriert wurde. 1976 wurde diese einer Revision unterzogen (Nathwani et al., 1976). Man unterschied einen lymphozytischen, einen histiozytischen und einen gemischtzelligen Typ. Diese

Einteilung verbreitete sich unter dem Eindruck der klinischen Relevanz zunehmend in den englischsprachigen Ländern, während in Deutschland bis zur Einführung der Kiel-Klassifikation die sog. „einfache“ Lymphomeinteilung (Lennert, 1967 und Lennert, 1969) Anwendung fand. Ursprünglich wurde die Kiel-Klassifikation für die nodalen Lymphome definiert, die sich von verschiedenen Differenzierungsstadien der B-Lymphozyten ableiten (Gerard-Marchant et al., 1974). 1988 erschien die sog. Aktualisierte Kiel-Klassifikation, in der auch die T-Zell Lymphome mitberücksichtigt wurden (Stansfeld et al., 1988). Das Grundprinzip der Kiel-Klassifikation ist die zytomorphologische Charakterisierung der neoplastischen Zelle mit morphologischen, immunologischen und molekularbiologischen Verfahren und ihr Bezug zu der jeweiligen Ursprungszelle.

Lukes und Collins verwendeten zur zytologischen Charakterisierung zunächst die Kernform (Lukes und Collins, 1974 und 1975). Sie unterschieden Keimzentrumszellen mit gekerbten oder nicht gekerbten Kernen, sowie lymphoide Zellen mit gyriformen Kernen. Diagnostisch berücksichtigten sie bereits die Ableitung von der B- und T-Zell Reihe und von einer undefinierbaren Zellreihe.

Die Working Formulation erschien 1982 und klassifizierte die Non-Hodgkin Lymphome nach ihrer Prognose, dem Verlauf und der therapeutischen Beeinflussbarkeit und enthält so Begriffe und Prinzipien der Klassifikationen von Lukes und Collins und Rappaport. In der Working Formulation erfolgt die Unterteilung in drei „prognostisch unterschiedliche“ Gruppen. Sie basiert auf der relativen Anzahl von großen und kleinen Zellen. Sind die kleinen Zellen in der Überzahl, so handelt es sich um einen Tumor vom kleinzelligen Typ. Bei Vorherrschen von großen Zellen ist das Lymphom großzellig. Ein gemischtzelliger („mixed“) Tumor liegt dementsprechend vor, wenn weder kleine, noch große Zellen in der Überzahl sind.

In jüngerer Zeit versuchte man, die Klassifikationen der malignen Lymphome zu vereinheitlichen. Das Ziel war es, verlässliche epidemiologische und klinisch-therapeutische Daten zu erhalten und einheitliche neue Behandlungsstrategien auch und insbesondere für Lymphome, die auf die bisherige Therapie nicht ansprachen, zu entwickeln. Die REAL-(Revised-European-American-Lymphoma-) Klassifikation (Harris et al., 1994) basiert auf den Prinzipien der Kiel-Klassifikation. Sie schließt aber weitere definierte extranodale Lymphomentitäten ein. Das Grundprinzip ist die Definition von Krankheitsentitäten, die sich pathologisch-anatomisch, klinisch, immunologisch, genetisch und möglichst auch pathogenetisch erkennen bzw. definieren lassen.

1.3. Die WHO-Klassifikation maligner Lymphome

Im Jahre 1995 wurde ein Projekt der European Association for Hematopathology und der Society of Hematology gestartet - die Schaffung einer WHO-Klassifikation des hämatopoetischen und lymphoiden Gewebes. Nach ihrer Vervollständigung (WHO Classification of the Tumors of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues 2001) ist sie weltweit als erste allgemein akzeptierte Klassifikation der hämatologischen Erkrankungen anerkannt und basiert auf den Prinzipien, welche schon in der REAL-Klassifikation definiert wurden. In der WHO-Klassifikation werden die Neoplasien primär nach ihrer zellulären Herkunft definiert (myeloisch, lymphatisch und histiozytisch/dentritisch). Innerhalb solcher Gruppen werden die verschiedenen Krankheiten nach ihrer Morphologie, dem Immunphänotyp, den genetischen Eigenschaften und klinischen Syndromen definiert. Die WHO-Klassifikation unterscheidet drei große Gruppen von lymphoiden Tumoren: B-Zell Lymphome, T- und NK-Zell Neoplasien und Hodgkin Lymphome. Sowohl Lymphome als auch Leukämien sind in diese Klassifikation eingeschlossen.

1.4. Das folliculäre Non-Hodgkin Lymphom (FL)

Das folliculäre Lymphom ist eine überwiegend beim Erwachsenen auftretende Erkrankung. Nur das folliculäre Lymphom vom großzelligen Typ kommt bei einem geringen Prozentsatz der Bevölkerung unter 20 Jahren vor. Die Häufigkeit des Auftretens der Erkrankung ist bei Männern und Frauen fast gleich. In den USA und in Europa sind ungefähr 30-40% aller Non-Hodgkin Lymphome folliculäre Lymphome (Jones et al., 1973).

Das folliculäre Lymphom ist eine Neoplasie von Keimzentrums-B-Zellen (Zentrozyten/gekerbte Follikelzentrumszellen und Zentroblasten/nichtgekerbte Follikelzentrumszellen). Brill (Brill et al., 1925) und Symmers (Symmers, 1927) beschrieben folliculäre Lymphome erstmals als Krankheit und benannten die dargestellten abnormen Proliferate lymphoider Follikel als „giant follicular hyperplasia“ oder „giant follicular lymphoma“ (Gall et al., 1941).

In der WHO-Klassifikation ist der Begriff des folliculären Lymphoms ausschließlich für Lymphome der Keimzentrumszellen definiert, die prinzipiell folliculär oder diffus wachsen können. Zytogenetisch weisen die folliculären Lymphome oft eine charakteristische chromosomale Translokation t(14;18)(q32;q21) auf. Molekularbiologisch liegt dieser Translokation ein Rearrangement des BCL-2 Gens zugrunde, das unter den Einfluss des Schwereketten-Promotors in 14q32 gerät. Hierdurch wird in den neoplastischen Zellen/Follikeln das normalerweise im reaktiven Keimzentrum herunterregulierte BCL-2 Protein überexprimiert, das sich auch immunhistochemisch nachweisen lässt und diagnostische Verwendung findet. Das Resultat dieser Überexpression ist die Vermeidung des programmierten Zelltodes, der Apoptose (Hockenberry et al., 1990; Reed, 1995; Tsujimoto et al., 1984).

Die WHO-Klassifikation empfiehlt die Subklassifikation der folliculären Lymphome in 3 Kategorien entsprechend der Zentroblastenanzahl. Auch die

„diffusen“ folliculären Lymphome sind als Variante eines folliculären Lymphoms in die WHO-Klassifikation eingeschlossen.

1.5. Grading folliculärer Lymphome

Berard und Kollegen (Berard et al., 1982) beschrieben eine auch heute noch verwendete Methode, um folliculäre Lymphome in Subtypen einzuteilen (zu „gradieren“). Diese basiert auf dem Auszählen der großen (noncleaved) Zellen (Zentroblasten) pro zehn Gesichtsfelder in starker Vergrößerung (high power field, Vergrößerung x40). Bei 0 bis 5 Blasten/HPF handelt es sich um ein überwiegend kleinzelliges Lymphom (small cell follicular lymphoma), bei 6 bis 15/HPF um einen gemischtzelligen Tumor (mixed cell follicular lymphoma) und bei mehr als 15 Zentroblasten/HPF um ein überwiegend großzelliges folliculäres Lymphom (large cell follicular lymphoma).

Lennert (Lennert, 1978 und Lennert et al., 1983) berücksichtigte zwei Parameter beim Grading folliculärer Lymphome - die Größe der Zentrozyten und die Anzahl der Zentroblasten. Klinische Vergleichsuntersuchungen zeigten eine Relevanz eines solchen Gradingystems. Patienten mit einem Tumor, der überwiegend aus großen Zentrozyten bestand, hatten eine geringere 5-Jahres-Überlebensrate (17%) als Patienten mit einem FL mit überwiegend kleinen Zentrozyten (42%). Eine statistische Signifikanz bestand jedoch nicht.

Die WHO-Klassifikation empfiehlt die Unterscheidung von drei Graden zur Subklassifikation folliculärer Lymphome. Es werden dafür die Zentroblasten in zehn „high power fields“ von 0,159 mm² (1 Okular mit einem 18 mm-Blickfeld in 1-facher Vergrößerung und einem 40-er Objektiv) ausgezählt. Beim Grad 1 überwiegen Zentrozyten deutlich, und es sind nur bis zu 50 Zentroblasten pro 10 HPF vorhanden. Beim Grad 2 liegen 51 bis 150 Zentroblasten pro 10 HPF vor. Bei mehr als 150 Zentroblasten pro 10 HPF handelt es sich um den Grad 3. Sind in einem FL Grad 3 neben mehr als 15 Zentroblasten per HPF auch

Zentrozyten vorhanden, so handelt es sich um den Grad 3A. Beim Grad 3B liegen ausschließlich Zentroblasten vor (Nathwani et al., 2001). Die folliculären Lymphome der Grade 1 und 2 entsprechen weitgehend den niedrigmalignen zentroblastisch-zentrozytischen Lymphomen der Kiel-Klassifikation. Folliculäre Lymphome Grad 3 stimmen weitgehend mit den „hochmalignen“ folliculären zentroblastischen Lymphomen überein (Lennert und Feller, 1992; Stansfeld et al., 1988).

Zusätzlich zum Grad des folliculären Lymphoms unterscheidet man anhand des Wachstumsmusters folliculäre und diffuse Typen. Bei einem folliculären Anteil von über 75% handelt es sich um ein rein folliculäres Lymphom, bei einem folliculären Anteil zwischen 25% und 75% um ein folliculäres und diffuses FL und bei einem folliculären Anteil unter 25% um ein überwiegend diffus wachsendes folliculäres Lymphom (Nathwani et al., 2001).

1.6. Zytogenetik der folliculären Lymphome

Die Analyse chromosomaler Aberrationen in folliculären Lymphomen legt nahe, dass praktisch alle Fälle zytogenetische Auffälligkeiten aufweisen (Mitelman, 1994). Hervorzuheben ist die Häufung von Translokationen (75-90%) zwischen den langen Armen der Chromosomen 14 und 18, die $t(14;18)(q32;q21)$. Auf eine bessere oder schlechtere Prognose hat die Translokation $t(14;18)$ jedoch keinen Einfluss. In einigen Fällen findet man die variante Translokation $t(2;18)(p12;q21)$. Nur etwa 10% der Fälle weisen die $t(14;18)$ als alleinige chromosomale Aberration auf. Bei den übrigen Fällen treten neben der $t(14;18)$ zusätzliche strukturelle Aberrationen (vor allem in den Chromosomen 1, 2, 4, 5, 13 und 17) oder zusätzliche Chromosomen (X, 7, 12 oder 18) auf. In 20-40% der B-Zell Lymphome treten Deletionen in 6q23-36 auf, die häufigste Sekundäraberration bei $t(14;18)$ positiven Fällen (Tilly et al., 1994). Diese Deletionen werden in 6q21, 6q23 und 6q25-27 beschrieben und weisen auf das

mögliche Vorhandensein von drei verschiedenen Tumor-Suppressorgenen hin (Offit et al., 1993).

1.7. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das zytomorphologische Spektrum und das Antigenexpressionsprofil follikulärer Lymphome der Grade 1, 2 und 3A zu charakterisieren und diese Merkmale in Korrelation zur mitotischen und proliferativen Aktivität sowie zum Spektrum der zytogenetischen Aberrationen zu setzen; der jeweilige Wert dieser individuellen Merkmale sollte für die Bestimmung biologischer Entitäten definiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungsmaterial

Von April 1990 bis Dezember 2001 wurden ca. 700 Fälle maligner Lymphome im zytogenetischen Labor des Pathologischen Institutes in Würzburg untersucht. In die vorliegende Arbeit gingen Daten von 95 Lymphomen ein, bei denen die histopathologische Diagnose eines follikulären Lymphoms bzw. eines Lymphoms mit follikulärem Wachstumsanteil gestellt wurde und eine zytogenetische Analyse durchgeführt worden war. In allen Fällen lag ein klonal aberranter Karyotyp vor.

Diese 95 Fälle waren das Ausgangsmaterial für alle durchgeführten Untersuchungen. Zur Zellgewinnung für die angestrebte Zytogenetik wurde ein Teil des nativen Tumormaterials durch ein feines Kunststoffnetz gepresst und unstimulierte Kulturen für die zytogenetischen Untersuchungen sofort angesetzt. Weiteres Material wurde für die histopathologischen Analysen formalinfixiert bzw. in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Von allen untersuchten Tumoren lag mindestens ein Paraffinblock vor. Zur Erstuntersuchung wurden die etwa 2-3 µm dicken Schnittpräparate mit Hämatoxylin-Eosin (HE), Giemsa und PAS angefärbt.

2.2. Klassifikation der follikulären Lymphome

Nach der Diagnosestellung bzw. -verifizierung wurden die untersuchten Lymphome nach der WHO-Klassifikation (Nathwani et al., 2001) klassifiziert. Follikuläre Lymphome wurden als Grad 1 bezeichnet, wenn die Anzahl der Zentroblasten in 10 zufällig ausgewählten „high power fields“ (HPF, x40) 50 oder weniger betrug. Bei einer Anzahl von 51 bis 150 Zentroblasten wurde der

Grad 2, bei Zentroblastenzahlen über 150 der Grad 3 diagnostiziert (Mann und Berard, 1982).

Bei einem follikulären Wachstumsanteil von mehr als 75% des gesamten Infiltratquerschnittes handelte es sich um einen rein follikulären Wachstumstyp. Ein follikulärer und diffuser Wachstumstyp wurde diagnostiziert, wenn der Anteil der Follikelstrukturen zwischen 25-75% lag. Ein (überwiegend) diffuser Wachstumstyp wurde angenommen, wenn ein follikuläres Wachstumsmuster in weniger als 25% des gesamten Lymphknotenquerschnittes vorlag.

Zur Gruppe der follikulären Lymphome Grad 3 wurden auch maligne Lymphome hinzugerechnet, die ausschließlich aus blastären Zellen bestanden, wenn ein follikulärer Wuchstyp in mindestens 25% des gesamten Infiltrates nachzuweisen war (follikuläre und diffuse zentroblastische Lymphome der Kiel-Klassifikation). Nach den Kriterien der WHO-Klassifikation wurden follikuläre Lymphome Grad 3 mit noch nachweisbaren Zentrozyten (FL3A) von solchen ohne Zentrozyten unterschieden (FL3B) (Ott et al., 2002; Katzenberger et al., 2004).

2.3. Immunhistochemische Untersuchungen

Am Paraffinschnitt wurden in der primären Diagnostik Antikörper gegen die B-Zell-assoziierten Antigene CD20, CD10 und CD23, die T-Zell-Marker CD3 und/oder CD5, sowie gegen das BCL-2 Antigen verwendet. In vielen Fällen wurden Antikörper für den Nachweis follikulärer dendritischer Retikulum-Zellen (Ki-M4p oder CD23), sowie nicht-paraffingängige Antikörper gegen CD3, CD5, CD10, CD22, CD23 am Gefriermaterial eingesetzt.

Die Expression von p53 wurde im Paraffinschnitt mit dem DO-7 Antikörper (DAKO, Dänemark) untersucht. Wie für das Ki67 Antigen (MIB-1, DAKO) wurde die Zahl positiver Kerne in 10%-Schritten ermittelt.

Alle immunhistochemischen Untersuchungen am Paraffingewebe wurden unter Verwendung der Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)-Methode nach Antigen-Retrieval durchgeführt (Rüdiger et al., 1998).

2.4. Die Ermittlung des Mitoseindex

Die Ermittlung des Mitoseindex (MI) erfolgte durch Auszählen der Mitosen (Kernteilungsfiguren) in 10 HPF (x40) im mit Giemsa angefärbten Schnittpräparat von Tumoranteilen mit der höchsten mitotischen Aktivität.

2.5. Die Bestimmung des Proliferationsindex

Der Proliferationsindex (PI) wurde durch die Ermittlung des Prozentsatzes von Zellen mit nukleärer Reaktivität für MIB-1 (DAKO, Dänemark) gegen das Ki67 Antigen am Paraffinschnitt bestimmt. Dazu wurden die Objektträger im Sinne einer „Antigen-Retrieval“ Reaktion in einem Dampf-Druckkochtopf vorbehandelt. Zur semiquantitativen Erfassung des Proliferationsindex wurde die Zahl der angefärbten Kerne im Schnittpräparat von Tumoranteilen mit der höchsten Reaktivität abgeschätzt, da sich diese Bestimmung im wesentlichen nicht von der quantitativen Erfassung des Proliferationsindex durch Auszählen der Zellen und Bestimmung der positiven Kerne in einem Gitter-Raster unterschied. Es wurde hier jeweils die obere Grenze angegeben. Somit entsprach ein PI von 80% einer Reaktivität von bis zu 80% der Kerne.

2.6. Zytogenetische Untersuchungen

Die klassischen zytogenetischen Analysen erfolgten nach Direktpräparation oder in unstimulierten Kurzzeitkulturen (über Nacht) nach Separation nativer Zellen mit Hilfe eines sterilen Nylonsiebes (Ott et al., 1997). Dabei wurde RPMI

1640 (GIBCO) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum und Antibiotika als Kulturmedium verwendet. Zur Hemmung des Spindelapparates wurden die Zellkulturen nach etwa 17-20 Stunden Kulturdauer mit 30µl einer Kolchizinlösung (0,1µg/ml) (ein Mitosegift) behandelt und danach für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Präparation der Metaphasen durch Inkubation der Zellen in einer hypotonen 0,075 molaren Kaliumchlorid-Lösung in einem 37°C Wasserbad und Fixation mit einer eisgekühlten Methanol/Eisessig-Mischung im Verhältnis 3:1. Zur Darstellung der Metaphasenchromosomen wurden die Objektträger in der Methanol/Eisessiglösung gewaschen und (ggf.) bei -20°C aufbewahrt. Das Pellet wurde resuspendiert und auf die gefrorenen Objektträger aus etwa 50cm Höhe vorsichtig aufgetropft. Die Schnittpräparate wurden dann anschließend bei Raumtemperatur für eine Woche aufbewahrt („Alterung“). Durch Inkubation mit einer Trypsinlösung (400mg/100ml 0,9%-iger NaCl-Lösung) und Gegenfärbung in Giemsa wurde nach 7-10 Tagen die Bänderung durchgeführt. Die Karyotypanalyse konnte mit Hilfe eines computergestützten Analysesystems (IKAROS, Metasystems) am Bildschirm oder durch Photodokumentation am Mikroskop (AXIPHOT, Zeiss) und Anfertigung von Abzügen durchgeführt werden. Nach den Regeln des ISCN (Mitelman, 1995) wurden die Karyotypen charakterisiert. Wenn bei mindestens 2 Metaphasen identische strukturelle Aberrationen oder ein identisches zusätzliches Chromosom vorlag oder bei mindestens 3 Metaphasen ein identischer Chromosomenverlust festgestellt wurde, handelte es sich um eine klonale chromosomale Aberration.

2.7. Statistische Analysen

Der Chi Square-Test, der T-Test für unabhängige Variablen und andere geeignete Tests wurden verwendet, um die Häufigkeiten der verschiedenen Parameter vergleichen und analysieren zu können.

3. Ergebnisse

3.1. Follikuläre Lymphome mit überwiegend oder partiell follikulärem Wachstumsmuster

3.1.1. Klassifikation und Histopathologie

Von über 700 malignen Lymphomen mit klonalen Karyotypalterationen wurden in Übereinstimmung mit den Kriterien der WHO-Klassifikation insgesamt 95 Lymphome als follikuläre Lymphome (FL) oder Lymphome mit einem follikulär wachsenden Tumoranteil klassifiziert. In der überwiegenden Zahl der Tumoren lag ein follikuläres Wachstumsmuster in mindestens 25% des infiltrierten Gewebes vor.

27 follikuläre Lymphome wurden dem Grad 1 (FL1) und 37 follikuläre Lymphome dem Grad 2 (FL2) zugeordnet. 16 überwiegend follikulär wachsende Non-Hodgkin Lymphome wiesen einen hohen Blastengehalt (>150/10HPF) auf und wurden als Grad 3 (FL3) klassifiziert. In 15 Lymphomen mit hohem Blastengehalt lag eine Komponente rasenartig sich ausbreitender basophiler Blasten vor; diese wurden als follikuläre Lymphome Grad 3 mit simultanem Anteil eines großzelligen diffusen B-Zell Lymphoms (DLBL) diagnostiziert.

In der Kiel-Klassifikation entsprachen die follikulären Lymphome Grad 1 und 2 den Kriterien der zentroblastisch-zentrozytischen Lymphome (CB-CC) mit geringem (FL1) oder mäßigem (FL2) Blastengehalt, die follikulären Lymphome Grad 3 dem zentroblastischen Lymphom mit follikulärem Wachstumstyp und die follikulären Lymphome mit follikulärem und diffusem Wachstumsmuster einem zentroblastischen Lymphom mit follikulärem und diffusem Wachstumstyp.

Die überwiegende Anzahl der follikulären Lymphome Grad 1 und Grad 2 zeigten ein überwiegend follikuläres Wachstumsmuster (follikulärer Anteil von

mehr als 75%). In 15 Tumoren war ein follikulärer und diffuser Wachstumstyp (follikulärer Anteil von 25-75%) nachweisbar. Nur in 5 Fällen lag ein überwiegend diffuses Wachstum (<25% follikulär) vor. 10 follikuläre Lymphome Grad 3 bestanden sowohl aus Zentroblasten als auch aus Zentrozyten. Sie wurden nach den Kriterien der WHO als follikuläre Lymphome Grad 3A klassifiziert (Abbildung 1a).

In 6 follikulären Lymphomen Grad 3 wurden ausschließlich kleine und große Zentroblasten gefunden, keine Zentrozyten. Diese Tumoren wurden dem Grad 3B zugeordnet (Abbildung 1b). Die 15 FL Grad 3 mit simultanem Anteil eines großzelligen diffusen B-Zell Lymphoms (DLBL) enthielten ausschließlich große und/oder kleine Blasten. Sie wurden als follikuläre Lymphome Grad 3B+DLBL klassifiziert.

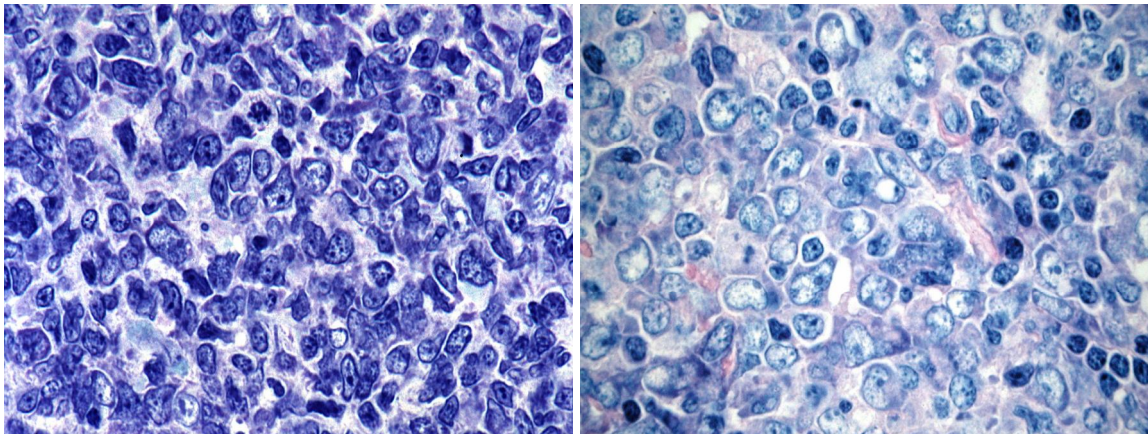


Abb. 1 (a und b):

Follikuläres Non-Hodgkin Lymphom Grad 3.

Follikuläres Lymphom Grad 3A (Abb.1a): Blasten und Zentrozyten.

Follikuläres Lymphom Grad 3B (Abb.1b): nur Blasten. (Giemsa x1000).

Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über die beschriebenen histopathologischen Diagnosen nach der WHO-Klassifikation und den Blastengehalt der Tumoren

Tabelle 2: Zusammensetzung der folliculären Lymphome

Diagnose	Zytologie	
	Blasten und Zentrozyten	Ausschließlich Blasten
FL1	27/27	0/27
FL2	37/37	0/37
FL3A und 3B	10/16	6/16
FL3B+DLBL	0/15	15/15

Aufgrund der zytologischen, immunhistochemischen und genetischen Unterschiede folliculärer Lymphome Grad 1, 2 und 3A gegenüber FL Grad 3B (Ott et al., 2002; Katzenberger et al., 2004) wurden im Folgenden nur folliculäre Lymphome mit einer zytologischen Zusammensetzung aus Zentroblasten und Zentrozyten (FL1, FL2 und FL3A) berücksichtigt (74 Tumoren).

3.1.2. Mitoseindex

Der Mitoseindex lag bei folliculären Lymphomen Grad 1 (Range 3-48/10 HPF) im Mittel bei 18/10 HPF. Bei folliculären Lymphomen Grad 2 (Range 10-80/10 HPF) lag der Mittelwert bei 33/10 HPF und bei folliculären Lymphomen Grad 3A (Range 22-80/10 HPF) bei 58/10 HPF. Bezogen auf die mitotische Aktivität waren die Unterschiede bei folliculären Lymphomen Grad 1-3A statistisch signifikant ($p < 0,0001$) und die mitotische Aktivität stieg parallel zum Grad an.

3.1.3. Proliferationsindex

Hinsichtlich des Proliferationsindex wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Wiederum war der Unterschied im Ki67-Index zwischen follikulären Lymphomen Grad 1, 2 und 3A statistisch signifikant ($p < 0,0001$). Der Proliferationsindex erreichte bei follikulären Lymphomen Grad 1 einen Mittelwert von 20% (Range 10-50%) und bei follikulären Lymphomen Grad 2 von 40% (Range 20-70%). Bei FL Grad 3A lag der mittlere Ki67-Index bei 70% (Range 40-80%). Er nahm also in den Gradierungsgruppen 1-3A kontinuierlich zu und war bei FL Grad 3A mit 70% am höchsten.

3.1.4. CD10 Expression

Follikuläre Lymphome Grad 1, 2 und 3A wiesen in der Regel eine Reaktivität für CD10 auf. In 24/24 follikulären Lymphomen Grad 1 und in 10/10 FL3A war CD10 exprimiert. Lediglich in der Gruppe der follikulären Lymphome Grad 2 (31/33 positiv) lagen einzelne CD10 negative Tumoren vor.

3.1.5. BCL-2 Expression

Eine deutliche BCL-2 Protein-Überexpression in den neoplastischen Keimzentren zeigte sich in allen follikulären Lymphomen Grad 1 (27/27), sowie in nahezu allen follikulären Lymphomen Grad 2 (36/37) und Grad 3A (9/10). Eine BCL-2 Negativität lag also insgesamt nur in 2/74 FL vor.

3.1.6. Expression von p53

Bei follikulären Lymphomen Grad 1 und Grad 3A lag eine signifikante p53 Überexpression (in mehr als 20% der Kerne) in keinem Fall vor. Lediglich in 2

von 37 Fällen follikulärer Lymphome Grad 2 war eine Überexpression von p53 nachweisbar. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen follikulären Lymphomen Grad 1/2 und 3A bestand also nicht.

3.1.7. Sekretorische Differenzierung (Clg)

Eine monotypische zytoplasmatische Immunglobulin-Expression wurde in den Gradierungsgruppen 1-3A mit zunehmender Fallzahl nachgewiesen: in 1 von 11 Fällen mit FL Grad 1, in 2 von 13 Fällen mit FL Grad 2 und in 3 von 10 Fällen mit FL Grad 3A. Der Unterschied im Ausmaß einer sekretorischen Differenzierung war statistisch nicht signifikant.

Tabelle 3: Überblick über biologische Parameter in der Subklassifikation follikulärer Non-Hodgkin Lymphome Grad 1, 2 und 3A

Morpho- logie	CD10 n (%)	BCL-2 n (%)	p53 n (%)	Clg n (%)	Ki67 (%)	Mitosen (10 HPF)
FL1	24/24 (100%)	27/27 (100%)	0/27 (0%)	1/11 (9%)	20% (10-50%)	18 (3-48)
FL2	31/33 (97%)	36/37 (94%)	2/37 (5%)	2/13 (15%)	40% (20-70%)	33 (10-80)
FL3A	10/10 (100%)	9/10 (90%)	0/10 (0%)	3/10 (30%)	70% (40-80%)	58 (22-80)

3.1.8. Zytogenetische Analysen

Daten aus der klassischen Zytogenetik lagen in allen untersuchten Fällen vor. Der Unterschied in der Gesamtzahl der Aberrationen zwischen follikulären Lymphomen Grad 1 und 2 und follikulären Lymphomen Grad 3A war statistisch nicht signifikant (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4: Mittelwerte numerischer und struktureller Aberrationen sowie der Gesamtaberrationen in folliculären Lymphomen unterschiedlicher Grade

Diagnosen	Numerisch (Mittelwerte)	Strukturell (Mittelwerte)	Gesamt (Mittelwerte)
FL1	2,5	1,8	4,6
FL2	2,4	2,5	5,1
FL3A	1,7	2,9	4,6

Unter den rekurrenten chromosomalen Aberrationen trat die Translokation t(14;18)(q32;q21) am häufigsten auf. Dieses Rearrangement wurde in 24 von 27 folliculären Lymphomen Grad 1, in 30 von 37 folliculären Lymphomen Grad 2 und in allen 10 folliculären Lymphomen Grad 3A gefunden. In 2 Fällen eines FL Grad 2 und in einem Fall eines FL Grad 3A konnten Aberrationen unter Mitbeteiligung der Bande 3q27 nachgewiesen werden.

Zugewinne in den chromosomalen Regionen 1q, 6q und 11/11q waren nur in den Gradierungsgruppen 1 und 2 nachweisbar. Zugewinne in 3/3q traten nur bei folliculären Lymphomen Grad 2 auf. Zugewinne in 5/5q, 18/der(18)t(14;18) und in X/Xp zeigten sich häufiger bei FL Grad 3A als bei FL Grad 1 und 2. Verluste genetischen Materials waren bei FL Grad 3A verglichen mit FL Grad 1 und 2 signifikant häufiger in 1/1p nachweisbar ($p < 0,05$). Verluste genetischen Materials in 6q, 10q und 17q waren in den Gradierungsgruppen 1-3A quantitativ etwa gleich nachweisbar.

Die Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Frequenz derjenigen chromosomalen Alterationen in FL Grad 1, Grad 2 und Grad 3A, die insgesamt in mehr als 10% der Fälle gefunden wurden.

Tabelle 5: Die häufigsten rekurrenten Aberrationen und ihre Verteilung in FL unterschiedlicher Grade

Morphologie Alteration	FL1	FL2	FL3A
t(14;18)	24/27 (89%)	30/37 (81%)	10/10 (100%)
BP 3q27	0/27 (0%)	2/37 (5%)	1/10 (10%)
+1q	1/27 (4%)	6/37 (15%)	0/10 (0%)
-1/1p	2/27 (7%)	5/37 (14%)	4/10 (40%)
+3/3q	0/27 (0%)	5/37 (14%)	0/10 (0%)
+5/5q	3/27 (11%)	3/37 (8%)	2/10 (20%)
-6q	3/27 (11%)	9/37 (24%)	2/10 (20%)
+6p	3/27 (11%)	5/37 (14%)	0/10 (0%)
+7/7q	5/27 (19%)	13/37 (35%)	2/10 (20%)
-10q	2/27 (7%)	4/37 (11%)	1/10 (10%)
+11/11q	1/27 (4%)	4/37 (11%)	0/10 (0%)
+12/12q	3/27 (11%)	9/37 (24%)	2/10 (20%)

-17p	2/27 (7%)	3/37 (8%)	1/10 (10%)
+18/+der(18) t(14 ;18)	7/27 (26%)	5/37 (14%)	4/10 (40%)
+X/Xp	6/27 (22%)	5/37 (14%)	3/10 (30%)

Insgesamt war festzustellen, dass die hier in Tabelle 5 aufgeführten Aberrationen in ähnlicher Häufigkeit in den FL der drei Grade 1, 2 und 3A auftraten. Die Translokation t(14;18) war in den untersuchten Tumorgruppen in 81-100% der Fälle nachweisbar.

3.2. Follikuläre Non-Hodgkin Lymphome mit überwiegend diffusem Wuchstyp

In 5 der in der vorliegenden Serie untersuchten Lymphome lag ein überwiegend diffuses Wachstumsmuster der Infiltrate vor. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Lymphomen zeigte sich hier also keine überwiegende oder zumindest typische follikuläre Infiltratstruktur. In den Tumoren war eine überwiegend diffuse, herdförmig gering knotig akzentuierte Infiltration des Gewebes nachweisbar, mit nur kleinherdig, in etwa 5-20% der Fläche der Lymphknoten vorliegenden, atypischen Follikeln (Abb.2). Zytologisch dominierten kleine und mittelgroße Zentrozyten mit schmalen Zytoplasma und häufig eher runden, teilweise unregelmäßig gebuchteten Kernen. Eingestreut fanden sich vorwiegend mittelgroße Blasten. Auffällig war ebenso ein hoher Gehalt an schmalzytoplasmatischen T-Zellen (Abb. 3).

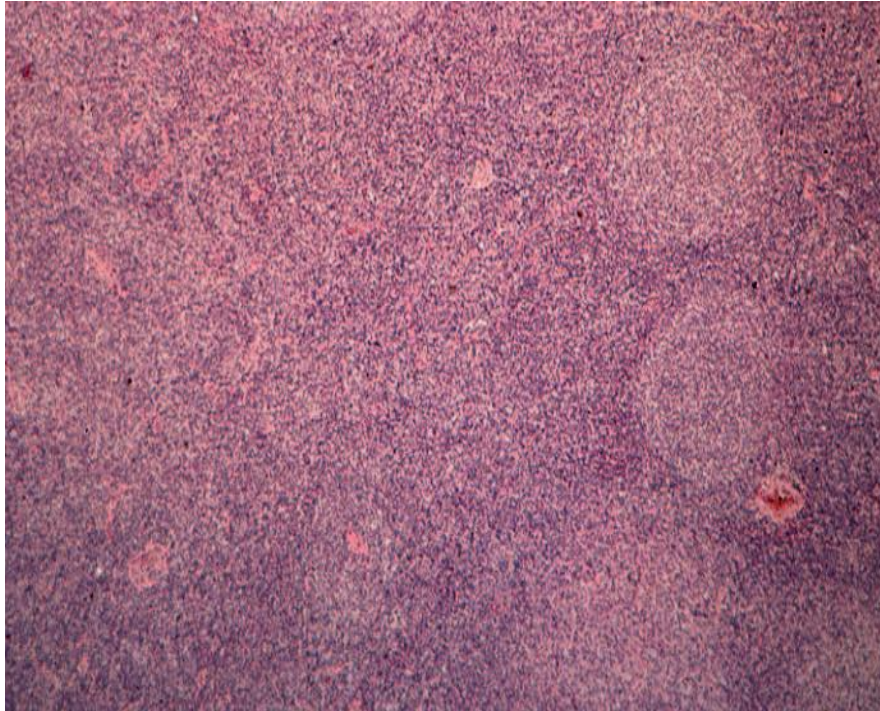


Abb. 2: Follikuläres Non-Hodgkin Lymphom mit überwiegend diffusem Infiltrationsmuster (HE x100)

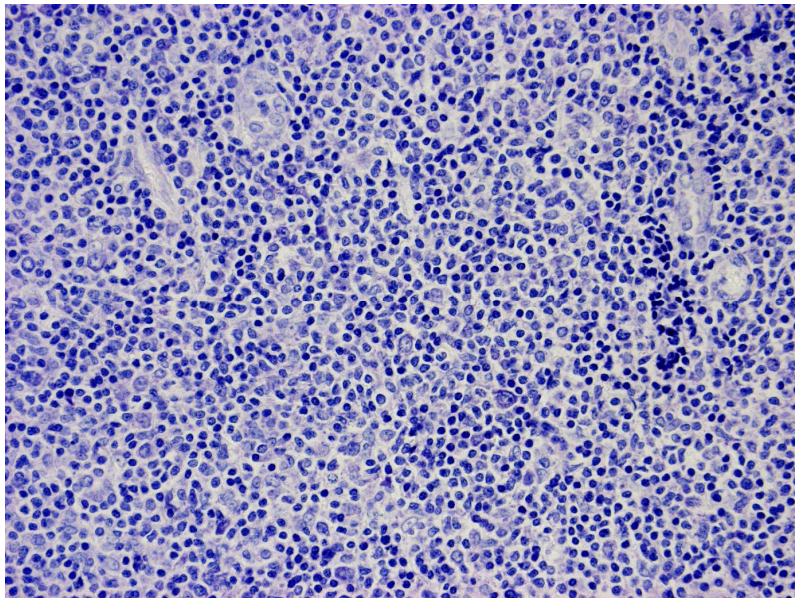


Abb. 3: Zytologie eines überwiegend diffusen, follikulären Non-Hodgkin Lymphoms (Giemsa x400).

Die vorliegenden follikulären Infiltratanteile (vgl. Abb. 2 und 3) bestanden aus atypischen follikulären Strukturen mit einem deutlich niedrigeren Proliferationsindex als reaktive Keimzentren. Diese Infiltratabschnitte entsprachen sicher neoplastischen Follikelstrukturen. Immunhistochemisch waren diese Tumoren, verglichen mit den follikulär bzw. follikulär und diffus wachsenden Lymphomen, auffällig. Eine CD10 Expression lag regelmäßig in den follikulären Infiltratanteilen vor, in den diffusen Infiltratabschnitten hingegen nur sehr selten. Die diffus wachsenden Tumoranteile waren hingegen kräftig CD23 positiv. Eine Reaktivität für BCL-2 lag insbesondere in den diffusen Abschnitten des Infiltrates vor, während die Follikel nur eine schwache Reaktivität oder keine Expression von BCL-2 aufwiesen. Eine p53 Überexpression oder eine sekretorische Differenzierung ließen sich nicht nachweisen. Der Mitoseindex und der mittlere Proliferationsindex lagen zwischen denen der follikulären Lymphome Grad 1 und 2.

Bemerkenswert war insbesondere das Ergebnis der zytogenetischen Untersuchungen. Die für Keimzentrumlymphome der Grade 1-3A hochcharakteristische Translokation t(14;18)(q32;q21) war in diesen follikulären Lymphomen mit überwiegend diffusem Wachstumsmuster in keinem einzigen Fall anzutreffen. Im Gegensatz hierzu lag als rekurrente Aberration in 4 von 5 Fällen eine Deletion/Rearrangement im kurzen Arm des Chromosoms 1 vor (Tabelle 6). In einer *in-situ* Hybridisierung mit einer für 1ptel spezifischen DNA-Sonde konnte dieser Befund bestätigt werden und insbesondere auch in dem Fall Nr. 4 (zytogenetisch negativ) eine Deletion in dieser Region bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 6: Klassische zytogenetische Analysen in 5 FL mit überwiegend diffusem Wachstumsmuster

Fall-Nr.	Karyotyp
1.	45-49, XY,add(1)(p36),t(7;11)(q11;q21)[3],+8[2],+11[2], der(18)t(9;18)(q13;q23)[cp8]
2.	50/51,XX,+X,der(1)t(1;?4)(p36;?q21),+5,+7,+8,+11,-18[5]
3.	50-56,XY,+X,del(1)(p35),-2,+add(3)(p22),+7,+22,+mar1-3[4]
4.	46/47,XY,?t(1;3)(q44;q21)[2],del(7)(q22),+8[7],+mar[2] [cp9]
5.	47/48,XY,t(1;2)(?p32;?p14)+del(7)(q22q32),+12,-14, add(21)(p22)[2]

4. Diskussion

4.1. Follikuläre Lymphome Grad 1-3 mit follikulärem Wachstumsmuster

4.1.1. Morphologie und Grading follikulärer Lymphome

Das typische, überwiegend follikuläre Wachstumsmuster follikulärer Non-Hodgkin Lymphome (FL) der Grade 1, 2, und 3A, ihre konsistente Zusammensetzung aus Zentroblasten und Zentrozyten (Keimzentrumszellen), ihr einheitlicher Immunphänotyp (CD10 Positivität und BCL-2 Reaktivität) und der Nachweis der Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ in der Mehrheit der untersuchten Fälle belegt, dass diese Tumoren Entitäten im Sinne der WHO-Klassifikation darstellen (Harris et al., 1994, Nathwani et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden morphologische, immunhistochemische und zytogenetische Daten von 95 follikulären Lymphomen bzw. Lymphomen mit einem eindeutig follikulären Tumoranteil verglichen. Nach den Kriterien der WHO-Klassifikation handelte es sich um 27 follikuläre Lymphome Grad 1, 37 FL Grad 2, 10 FL Grad 3A, 6 FL Grad 3B und 15 Tumoren Grad 3B mit simultanen Anteilen eines großzelligen diffusen B-Zell Lymphoms (DLBL). Konventionell-morphologisch entsprachen die FL der Grade 1 und 2 nach den Kriterien der Kiel-Klassifikation niedrigmalignen Non-Hodgkin Lymphomen vom Typ des zentroblastisch-zentrozytischen Lymphoms. Bei 10 der 16 („rein“) follikulären Lymphome Grad 3 bildeten die Zentrozyten einen Teil des neoplastischen Infiltrates (FL3A). Im Unterschied zu diesen bestanden 6 follikuläre Lymphome Grad 3B und alle 15 FL Grad 3B+DLBL ausschließlich aus basophilen Blasten. Somit waren die Kriterien für follikuläre zentroblastische Lymphome nach der Kiel-Klassifikation erfüllt (Lennert et al., 1992). Diese Diagnose entspricht nach der Kiel-Klassifikation einer hochmalignen Neoplasie. Verglichen mit den klassischen follikulären Lymphomen (1, 2 und 3A) wird die Prognose dieser

Lymphome mit aggressiverem Verlauf als signifikant schlechter angesehen (Brittinger et al., 1984).

4.1.2. Immunphänotyp und Relation zu anderen Parametern

Es konnte mittlerweile gezeigt werden, dass sich folliculäre Lymphome Grad 3 von folliculären Lymphomen der Grade 1 und 2 unterscheiden. Während in der Serie von Eshoa und Kollegen (Eshoa et al., 2001) nur 20% der folliculären Lymphome Grad 3 CD10 positiv waren, wurde das CD10 Membranglykoprotein bei 70-100% der folliculären Lymphome Grad 1 und 2 exprimiert gefunden. Die Translokation t(14;18) konnte bei 73-93% der FL Grad 1 und 2 nachgewiesen werden und trat bei FL Grad 3 seltener auf (59-67%) (Offit et al., 1991 und Yunis et al., 1987). Nur bei 50% der folliculären Lymphome Grad 3 lag eine positive BCL-2 Expression vor (Eshoa et al., 2001 und Nguyen et al., 1996).

Diesen heterogenen Befunden in der Kategorie der FL Grad 3 liegt eine unterschiedliche biologische Derivation bzw. liegen unterschiedliche Transformationswege in diesen Tumoren zugrunde. Ott und Kollegen (Ott et al., 2002) und Katzenberger und Mitarbeiter (Katzenberger et al., 2004) konnten zeigen, dass FL Grad 3A (mit Zentrozyten) in der Regel (60-70% der Fälle) mit der t(14;18) assoziiert sind, während diese Translokation in FL Grad 3B nicht und in FL Grad 3B+DLBL nur in 10-20% nachweisbar ist. FL Grad 3B in Kombination mit einem DLBL hingegen zeigen in knapp 60% der Fälle ein Rearrangement von BCL-6 (Katzenberger et al., 2004).

Im Vergleich vollständig bzw. teilweise folliculär wachsender FL gegenüber überwiegend diffusen FL wurden daher in der vorliegenden Arbeit nur FL der Grade 1, 2 und 3A berücksichtigt.

Die FL Grad 1-3A mit folliculärem bzw. folliculärem und diffusem Wachstumsmuster zeigten in der vorliegenden Serie eine bemerkenswerte

Homogenität bezüglich der immunhistochemischen Daten. Unabhängig vom Grad waren nahezu alle Fälle CD10 und BCL-2 positiv. Im Gegensatz zu publizierten Daten in der Literatur (Eshoa et al., 2001 und Nguyen et al., 1996) zeigten also auch die FL Grad 3A ein den FL1 und 2 vergleichbares Expressionsspektrum dieser Proteine. Auch für die t(14;18) ließ sich kein signifikanter Unterschied in den Gradierungsgruppen nachweisen; im Gegenteil waren sogar alle FL Grad 3A positiv für ein BCL-2 Rearrangement. Pezzella und Mitarbeiter (Pezzella et al., 1990) berichteten, dass in ihrer Serie interessanterweise die t(14;18) negativen FL Grad 1 und 2 ebenfalls häufig BCL-2 positiv waren. Bei diesen Lymphomen wurden bemerkenswerterweise in einem hohen Prozentsatz andere Aberrationen des Chromosoms 18 (insbesondere eine Trisomie 18) gefunden. Demgegenüber lag bei den t(14;18) negativen FL3 in der vorliegenden Serie kaum eine BCL-2 Expression vor. Es konnten aber 3 t(14;18) negative FL Grad 1 ermittelt werden, die ebenso wie die t(14;18) positiven FL eine BCL-2 Expression nachweisen ließen. Unter den FL Grad 3A hingegen lag in allen Fällen eine Translokation t(14;18) vor. Einer dieser Fälle zeigte eine BCL-2 Negativität, ein Befund der von Schraders und Kollegen (Schraders et al., 2005) mit einer Mutation des translozierten BCL-2 Gens im Bereich der Antikörper-Bindungsstelle erklärt werden konnte.

Follikuläre Lymphome Grad 3A lassen sich also aufgrund ihrer charakteristischen Zytomorphologie, ihres Immunphänotyps und des Nachweises der t(14;18) typischen Keimzentrumslymphomen der Grade 1 und 2 zuordnen.

4.1.3. Chromosomale Aberrationen und ihre Bedeutung für Klassifikation, Verlauf und Prognose

Yunis und Kollegen (Yunis et al., 1987) korrelierten erstmals rekurrente chromosomale Aberrationen in folliculären Lymphomen mit histopathologischen Befunden. Seitdem sind zahlreiche Arbeiten zu diesem Thema veröffentlicht worden. In diesen Arbeiten wurden ähnliche sekundäre Karyotypalterationen beschrieben, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit charakterisiert wurden. „Sekundäre“ chromosomale Aberrationen geben einen Hinweis auf das Fortschreiten der Erkrankung (Johansson et al., 1995). Die An- oder Abwesenheit der primären Chromosomenänderungen, wie der Translokation t(14;18), weisen hingegen auf die verschiedenen Tumorentitäten hin. Die t(14;18) Negativität der meisten folliculären Lymphome Grad 3B (mit oder ohne Anteil eines DLBL) zeigt eindrucksvoll, dass diese Keimzentrumslymphome einen unterschiedlichen Transformationsweg aufweisen (Ott et al., 2002 und Katzenberger et al., 2004, Müller-Hermelink et al., 2001 und Matolcsy et al., 1999). Der im Vergleich zu der vorgelegten Serie auffallend niedrige Nachweis einer t(14;18) (Offit et al., 1991 und Yunis et al., 1987), bzw. einer Expression von BCL-2 und CD10 (Eshoa et al., 2001, Nguyen et al., 1996, Pezzella et al., 1992 und Gaulard et al., 1992) unter folliculären Lymphomen Grad 3 stellt also kein eigenes Merkmal dieser Subgruppe der folliculären Lymphome dar. Es resultiert vielmehr aus der Heterogenität der Fälle, mit einem offensichtlich hohen Anteil folliculärer Lymphome Grad 3B in den älteren Serien.

Beim Vergleich sekundärer chromosomaler Aberrationen folliculärer Lymphome Grad 1 und 2 versus 3A konnte als einziger signifikanter Unterschied ein häufigeres Auftreten einer Deletion in Chromosom 1p bei FL Grad 3A beobachtet werden ($p < 0,05$). Weitere statistisch signifikante Unterschiede lagen nicht vor, bei allerdings insgesamt nicht allzu großer Fallzahl. Das Spektrum der beobachteten sekundären Karyotypalterationen war mit Daten aus der Literatur vergleichbar. Yunis und Kollegen (Yunis et al., 1987) untersuchten 71 folliculäre Lymphome, die nach der Working Formulation subklassifiziert worden waren

und konnten zeigen, dass folliculäre Lymphome mit der alleinigen Karyotypalteration der Translokation t(14;18) einen eher indolenten klinischen Verlauf nahmen und blastenarme Tumoren waren. Bei zusätzlichem Auftreten einer Deletion in 13q32 oder bei Zugewinn von 8p zeigte sich ein progredienter aggressiver klinischer Verlauf. Bei „mixed type“ Tumoren wurden häufig Deletionen in 6q assoziiert mit einer Trisomie 7 (komplett/partiell) und/oder Trisomie 12 beschrieben. In blastenreichen („large cell type“) folliculären Lymphomen waren oft die Trisomien 3, 18 oder 21 (komplett/partiell) nachweisbar. Bei Vorliegen einer Trisomie 2 oder 2p zeigte sich unabhängig von der zellulären Morphologie eine eher aggressive klinische Progression. Offit und Kollegen (Offit et al., 1991) untersuchten 29 „low grade“ und 19 „intermediate/high grade“ t(14;18) positive Lymphome. Dabei waren Trisomien von 7 und 12 deutlich häufiger bei höhergradigen Lymphomen nachweisbar. In einer Studie von Patienten mit Zeichen der Transformation in einer Rebiopsie zeigte sich ein erhöhtes Auftreten einer Deletion in 6 oder 6q und von Zugewinnen für 7 oder 7q (Richardson et al., 1987). Tilly und Mitarbeiter (Tilly et al., 1994) erbrachten in ihren Studien den Nachweis, dass das Vorhandensein von Bruchereignissen in 6q, 17p und die absolute Anzahl von Chromosomenbrüchen signifikant negative prognostische Indikatoren waren.

4.2. Folliculäre Lymphome mit überwiegend diffusem Wachstumsmuster

Folliculäre Lymphome mit überwiegend diffusem Wachstumsmuster sind sehr selten, rein diffus wachsende (nodale) FL sind offenbar Raritäten (Nathwani et al., 2001). Lediglich 5 der in der vorliegenden Serie untersuchten folliculären Lymphome (5%) zeigten ein überwiegend diffuses (mehr als 75% diffus) Wachstumsmuster. Diese Frequenz entspricht etwa der von Lennert (Lennert et al., 1978) angegebenen Häufigkeit. Die Prognose des diffus wachsenden folliculären Lymphoms wird im Vergleich zu folliculären oder folliculär und diffus wachsenden Keimzentrumslymphomen als signifikant schlechter angegeben (Brittinger et al., 1984); die Diagnose ist allerdings schwierig. In einer Serie

betrug die Richtigkeit der Diagnose lediglich 20% der Fälle (Lennert und Feller, 1990). Die Schwierigkeiten in der Diagnostik dieser Lymphome werden auch in den in der Literatur angegebenen Daten zur zytogenetischen Analyse deutlich: von den spärlichen im "Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer" (Mitelman, 1994) angeführten „diffusen zentroblastisch-zentrozytischen“ Lymphomen wiesen über die Hälfte eine t(11;14)(q13;q32) auf, entsprachen also Mantelzell-Lymphomen. Es ist also davon auszugehen, dass ein Teil der diffusen FL in älteren Publikationen wahrscheinlich Mantelzell-Lymphome darstellen, mit einem dieser Diagnose entsprechend ungünstigen klinischen Verlauf.

Die in der vorliegenden Serie untersuchten 5 Tumoren wiesen ein überwiegend (>75%) diffuses Infiltrat auf, das zytologisch überwiegend aus kleinen bis mittelgroßen Zentrozyten-ähnlichen Zellen sowie eingestreuten Zentroblasten bestand. In allen Fällen lagen zusätzlich atypische follikulär strukturierte Infiltratanteile in 5-20% der Fläche vor. Im Vergleich zu follikulären bzw. follikulären und diffusen FL1 und FL2 war der Immunphänotyp dieser Tumoren auffällig. In den follikulären Infiltratabschnitten lag eine Expression von CD10 (und teilweise auch schwach von CD23) vor, während die diffusen Infiltratabschnitte in 4/5 Fällen eine kräftige Reaktivität für CD23 aufwiesen und nur in einem Fall eine CD10 Positivität nachzuweisen war.

In der REAL-Klassifikation wird für die Diagnose (der provisorischen Entität) eines follikulären B-Zell Lymphoms, diffus, eine Reaktivität der Tumorzellen gefordert, die dem eines klassischen follikulären Lymphoms entspricht. Obwohl die Mehrzahl der untersuchten follikulären Lymphome Grad 1-3A eine überwiegende CD10 Expression aufwiesen, ist eine zusätzliche Expression von CD23 bei Keimzentrumslymphomen durchaus keine Seltenheit. In 2 von 8 untersuchten Fällen diffuser zentroblastisch-zentrozytischer Lymphome (von denen lediglich 4 eine CD10 Expression aufwiesen) fanden Zukerberg und Mitarbeiter (Zukerberg et al., 1993) eine Expression von CD23. Altfeld (1990) konnte zeigen, dass zentroblastisch-zentrozytische Lymphome mit einem

typischen folliculären Wachstumsmuster überwiegend CD23 negativ waren, dass CD23 aber bei einem folliculären *und* diffusen Wachstumsmuster in 38% (in z.T. mehr als 90% der Tumorzellen) nachweisbar war. Bemerkenswert war, dass von 2 diffusen zentroblastisch-zentrozytischen Lymphomen in seiner Serie ein Fall eine gleichzeitige Expression von CD10 und CD23 zeigte, ein weiterer Fall war ausschließlich CD23 positiv. Er schlussfolgerte aus diesem Befund, dass es im Übergang von einem folliculären in einen diffusen Wuchstyp bei identischem Immunglobulin-Isotyp zu einem Wandel des Immunphänotyps mit einem Verlust von CD10 und erhöhter CD23 Expression kommen könnte. Dieses Konzept wäre mit dem hier vorliegenden Befund einer CD10 Reaktivität aller Lymphome in den folliculären Abschnitten und einer CD23 Expression in den (überwiegend) diffusen Arealen gut vereinbar.

In den klassischen zytogenetischen Untersuchungen der 5 FL diffus konnte in keinem einzigen Fall eine $t(14;18)(q32;q21)$ nachgewiesen werden. Hingegen lagen in 4 von 5 Fällen strukturelle Aberrationen im kurzen Arm des Chromosoms 1 in den Banden 1p32-36 vor. 3 dieser Rearrangements führten zu Deletionen genetischen Materials in dieser Region. In einer ergänzenden Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung mit einer für terminale repetitive Sequenzen von 1p36 spezifischen Sonde konnte in *allen* Fällen eine Deletion nachgewiesen werden. Zusätzlich vorliegende rekurrente Aberrationen waren Deletionen im langen Arm des Chromosoms 7 in zwei Fällen und eine Trisomie 7 in zwei weiteren Fällen.

Der Nachweis einer identischen Morphologie, eines vergleichbaren Immunphänotyps und identischer Veränderungen auch auf der genetischen Ebene legt nahe, dass es sich bei folliculären Lymphomen mit überwiegend diffusem Wachstumsmuster um eine den typischen Keimzentrumlymphomen wahrscheinlich verwandte, jedoch eigenständige Identität handelt. Lymphatische Neoplasien dieses Typs entsprechen dann differenzierten Keimzentrumlymphomen, die wahrscheinlich aufgrund des Fehlens einer $t(14;18)(q32;q21)$ ein primär und ausgeprägt diffuses Wachstumsmuster

aufweisen. Die $\text{add}(1)(\text{p}36)$ ist eine rekurrente Aberration in follikulären und diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen, die häufig mit einer $\text{t}(14;18)(\text{q}32;\text{q}21)$ assoziiert ist. Bajalica und Mitarbeiter (Bajalica et al., 1995) fanden in 3 als niedrigmaligne follikuläre Lymphome klassifizierten $\text{t}(14;18)$ negativen Fällen bei Untersuchungen mittels FISH heraus, dass das auf $1\text{p}36$ translozierte Material vom langen Arm des Chromosoms 2 ($2\text{q}31$ -ter) stammte. In einem von diesen 3 hinsichtlich einer Deletion in $1\text{p}36$ untersuchten Fällen lag diese tatsächlich vor. Zu dem gegenüber klassischen follikulären Lymphomen in der Literatur beschriebenen, etwas aggressiveren Verlauf würde auch der Befund der deutlich gesteigerten Gesamtaberrationsrate bei follikulären Lymphomen prädominant diffus passen.

5. Zusammenfassung

Das folliculäre Lymphom ist eines der häufigsten Non-Hodgkin Lymphome und überwiegend eine Erkrankung des erwachsenen Menschen. In der WHO-Klassifikation ist es als ein Lymphom von Keimzentrumzellen definiert, das folliculär und/oder diffus wachsen kann. Zur Subklassifikation folliculärer Lymphome empfiehlt die WHO-Klassifikation eine Unterscheidung der Grade 1, 2 und 3 durch Auszählen der Zentroblasten pro zehn Gesichtsfelder in starker Vergrößerung. Beim Grad 3A liegen neben Zentroblasten auch Zentrozyten vor. FL Grad 3B bestehen ausschließlich aus Zentroblasten. Hinsichtlich der Zytomorphologie, Immunhistologie und Genetik bestehen deutliche Unterschiede zwischen FL Grad 1, 2 und 3A gegenüber FL Grad 3B.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die weit überwiegende Zahl der folliculären Lymphome Grad 1, 2 und 3A ein prädominant folliculäres Wachstumsmuster aufwies. Ein folliculärer und diffuser Wuchstyp lag seltener vor. Noch seltener war ein überwiegend bzw. „rein“ diffuses Wachstumsmuster. Die mitotische und proliferative Aktivität stieg mit dem Tumorgrad linear an. Hinsichtlich der CD10 Reaktivität, der BCL-2 und p53 Expression sowie des Nachweises einer sekretorischen Differenzierung ergaben sich beim Vergleich der FL Grad 1 bis 3A keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die BCL-2 Expression nahm allerdings bei den FL1-3A mit zunehmendem Grad ab.

In zytogenetischen Untersuchungen wurden in allen folliculären Lymphomen Grad 1 bis 3A primäre bzw. sekundäre Chromosomenaberrationen gefunden. Unter den rekurrenten chromosomalen Alterationen trat die Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ am häufigsten auf und war insbesondere bei folliculären Lymphomen Grad 1 und 2, in etwas geringerem Maße auch bei FL Grad 3A anzutreffen. Diese Translokation scheint also in einem frühen Stadium der B-Zell-Entwicklung aufzutreten und führt primär zu einem höher differenzierten (zentrozytenreichen) Lymphom. Die $t(14;18)$ bedingt zumeist eine

Überexpression des BCL-2 Gens, die sich auch immunhistochemisch nachweisen lässt und diagnostische Verwendung findet. Das BCL-2 Protein ist daher von Nutzen für die Unterscheidung neoplastischer von reaktiven Follikeln, nicht aber, um folliculäre von anderen „low grade“ B-Zell Lymphomen zu unterscheiden. Die sekundären Alterationen charakterisieren bestimmte undifferenzierte Stadien mit hohem Blastenanteil und einer hohen mitotischen und proliferativen Aktivität.

In zytogenetischen Untersuchungen von überwiegend diffus wachsenden FL konnte keine Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ nachgewiesen werden. Die identische Morphologie dieser Lymphome und die identischen Veränderungen auch auf genetischer Ebene deuten auf die nahe Verwandtschaft der überwiegend diffus wachsenden FL mit den typischen Keimzentrumslymphomen hin. Es handelt sich jedoch um eine eigenständige Identität, die differenzierten Keimzentrumslymphome, die wahrscheinlich aufgrund des Fehlens einer $t(14;18)(q32;q21)$ ein primär und ausgeprägt diffuses Wachstumsmuster aufweisen.

Literaturverzeichnis

Altfeld Peter. Zentroblastisch-zentrozytische Lymphome, 1990.

Bajalica S., Brondum-Nielsen K., Sorensen A.G., Pedersen N.T., Kristoffersson U., Akerman M., Anderson M., Pisa P., Nordenskjold M.. Characterization of add(1)(p36) in non-Hodgkin lymphomas by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 1995 May; 13(1): 34-9.

Berard C.W., Mann R.B.. Criteria for the cytologic subclassification of follicular lymphomas: a proposed alternative method. *Hematol Oncol*. 1982; 1: 187-192.

Brill N.E., Baehr G., Rosenthal N.. Generalized giant lymph follicle hyperplasia of lymph nodes and spleen. a hitherto undescribed type. *JAMA*. 1925; 84: 668-671.

Brittinger G., Bartels H., Common H., et al. Clinical and prognostic relevance of the Kiel classification of non-Hodgkin lymphomas: results of a progressive multicenter study by the Kiel lymphoma study group. *Hematol Oncol*. 1984; 2: 269-306.

Eshoa C., Perkins S., Kampalath B., Shidham V., Juckett M., Chang C.C.. Decreased CD10 expression in grade III and in interfollicular infiltrates of follicular lymphomas. *Am J Clin Pathol*. 2001; 115: 862-867.

Ferris Tortajada J., Garcia Castell J., Berbel Tornero O., Clar Gimeno S.. Risk factor for non-Hodgkin's lymphomas. Unidad de Oncología Pediátrica. Hospital Infantil Universitario La Fe. Valencia. 2001; Sep; 55(3): 230-8.

Gall E.A., Morrison H.R., Scott A.T.. The follicular type of malignant lymphoma: a survey of 63 cases. *Ann Intern Med*. 1941; 14: 2073-2090.

Gaulard P., d'Agay M.F., Peuchmaur M., et al. Expression of the bcl-2 gene product in follicular lymphoma. *Am J Pathol.* 1992; 140: 1089-1095.

Gerard-Marchant R., Hamlin J., Lennert K., Rilke F., Stansfeld A.G., van Unnik J.A.M.. Classification of non-Hodgkin's lymphomas [letter], *Lancet* 1974; 2: 406-408.

Harris N.L., Jaffe E.S., Stein H., et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood.* 1994; 84: 1361-1392.

Hockenberry, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D. & Korsmeyer, S.J.. bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348, 1990; 334-6.

Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W., (eds). Pathology & Genetics of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid tissues. *Lyon: IARC Press; 2001: 162-167.*

Johansson B., Mertens F., Mitelman F.. Cytogenetic evolution patterns in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 1995; 86: 3905-3914.

Jones S.E., Fuks Z., Bull M., et al. Non-Hodgkin's lymphomas. IV. Clinicopathologic correlation in 405 cases. *Cancer.* 1973; 31: 806-823.

Katzenberger T., Ott G., Klein Th., Kalla J., Müller-Hermelink H.K., Ott M.M.. Cytogenetic alterations affecting bcl 6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a diffuse large B cell component. *Am J Pathol* 165. 2004: 481-490.

Lennert K.. Classification of malignant lymphomas (European concept) In: Rüttimann A. (Ed.). Progress in Lymphology. Proceedings of the International Symposium on Lymphology, Zürich, Switzerland, July 19-23, 1966. G. Thieme, Stuttgart 1967.

Lennert K.. Germinal centers and germinal center neoplasia. *Acta Hematol Jpn.* 1969; 32: 495-500.

Lennert K.. Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease. New York: Springer-Verlag, 1978.

Lennert K., Collins R.D., Lukes R.J.. Concordance of the Kiel and Lukes-Collins classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Histopathology.* 1983; 7: 549-559.

Lennert K., Feller A.C.. Histopathologie der Non-Hodgkin-Lymphome (nach der aktualisierten Kiel-Klassifikation), 2.Aufl.. Springer, Berlin 1990.

Lennert K., Feller A.C.. Histopathology of non-Hodgkin's lymphomas. New York, Berlin, Heidelberg: Springer; 1992.

Lukes R.J., Collins R.D.. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer.* 1974; 34: 1488-1503.

Lukes R.J., Collins R.D.. New approaches of the classification of the lymphomata. *Brit. J. Cancer.* 1975; 31, Suppl.2: 1-28.

Mann R.B., Berard C.W.. Criteria for the cytologic subclassification of follicular lymphomas: a proposed alternative method. *Hematol Oncol.* 1982; 1: 187-192.

Matolcsy A.. High-grade transformation of low-grade non-Hodgkin's lymphomas: mechanisms of tumor progression. *Leuk Lymphoma.* 1999; 34: 251-259.

Mitelman F.. "Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer" Chromosomes, genes, and cancer. *CA Cancer J Clin.* 1994 May-Jun; 44(3): 133-5.

Mitelman F.. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Memphis, Tennessee: S. Karger AG. 1995.

Müller-Hermelink H.K., Zettl A., Pfeifer W., Ott G.. Pathology of lymphoma progression. *Histopathology.* 2001; 38: 285-306.

Nathwani B.N., Harris N.L., Weisenburger D., et al. Follicular Lymphoma. In: Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W., (eds). Pathology & Genetics of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid tissues. *Lyon: IARC Press;* 2001: 162-167.

Nathwani B.N., Kim H., Rappaport H.. Malignant lymphoma, lymphoblastic. *Cancer.* 1976, 38: 964-983.

Nguyen P.L., Zukerberg L.R., Benedict W.F., Harris N.L.. Immunohistochemical detection of p53, bcl-2 and retinoblastoma proteins in follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 1996; 105: 538-543.

Offit K., Jhanwar S.C., Ladanyi M., Filippa D.A., Chaganti R.S.. Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: correlations between recurrent aberrations, histology and exposure to cytotoxic treatment. *Gene Chromosomes Cancer.* 1991; 3: 189-201.

Offit K., Parsa N.Z., Gaidano G., et al. 6q Deletions define distinct clinico-pathologic subsets of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 82 1993: 2157-2162.

Ott et al., 1997.

Ott G., Katzenberger T., Lohr A., Kindelberger S., Rüdiger T., Wilhelm M., Kalla J., Rosenwald A., Müller J.G., Ott M.M., Müller-Hermelink H.K.. Cytomorphologic, immunohistochemical and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood* 99. 2002: 3806-3812.

Pezzella F., Gatter K.C., Mason D.Y., et al. bcl-2 protein expression in follicular lymphomas in absence of 14;18 translocation. *Lancet*. 1990; 336: 1510-1511.

Pezzella F., Jones M., Ralfkiaer E., Ersboll J., Gatter K.C., Mason D.Y.. Evaluation of bcl-2 protein expression and 14;18 translocation as prognostic markers in follicular lymphoma. *Br J Cancer*. 1992; 65: 87-89.

Rappaport H.. Tumors of the hematopoietic system. Atlas of Tumor Pathology, Vol 1, Section III, Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology. 1966.

Rappaport H., Winter W.J., Hicks E.B.. Follicular lymphoma: A reevaluation of its position in the scheme of malignant lymphoma, based on a survey of 253 cases. *Cancer*. 1956; 9: 792-821.

Reed, J.C.. bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematol Oncol Clin North Am* 9. 1995; 451-73.

Richardson M.E., Chen Q.G., Filippa D.A., et al. Intermediate - to high-grade histology of lymphomas carrying t(14;18) is associated with additional nonrandom chromosome changes. *Blood*. 1987; 70: 444-447.

Rüdiger T., Ott G., Ott M.M., Müller-Deubert S.M., Müller-Hermelink H.K.. Differential diagnosis between classic Hodgkin's lymphoma, T-cell-rich B-cell lymphoma and paragranuloma by paraffin immunohistochemistry. *Ann J Surg Pathol*. 1998; 22: 1184-1191.

Schraders M., de Jong D., Kluin P., Groenen P., van Krieken H.. Lack of Bcl-2 expression in follicular lymphoma may be caused by mutations in the BCL2 gene or by absence of the t(14;18) translocation. *J Pathol.* 2005 Feb; 205(3): 329-35.

Stansfeld A.G., Diebold J., Noel H., et al. Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet.* 1988; 1: 292-293.

Symmers D.. Follicular lymphadenopathy with splenomegaly. A new recognized disease of the lymphatic system. *Arch Path.* 1927; 3: 816-820.

Tilly H., Rossi A., Stamatoullas A., et al. Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma. *Blood.* 1994; 84: 1043-1049.

Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C. & Croce, C.M.. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226. 1984: 1097-9.

Yunis J.J., Frizzera G., Oken M.M., McKenna J., Theologides A., Arnesen M.. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N Engl J Med.* 1987; 316: 1510-1511.

Zukerberg L., Medeiros L., Ferry J., et al. Diffuse low-grad B-cell lymphomas: four clinically distinct subtypes defined by a combination of morphologic and immunophenotypic features. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 373-385.

Ich danke

Herrn Prof. Dr. med. German Ott für die freundliche Überlassung des Themas und seine Unterstützung bei der Erstellung der Dissertation.