

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Andreas Rosenwald

**Genomische Untersuchung von peripheren T-Zell-Lymphomen und
anaplastisch-großzelligen T-Zell-Lymphomen**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Maria-Anette Konrad
aus Würzburg

Würzburg, Januar 2010

Referent: Priv.- Doz. Dr. med. Andreas Zettl
Koreferent: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2010

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinem Vater gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Definition	1
1.2	Ätiologie	2
1.3	Stadieneinteilung und Prognose	3
1.4	Klassifikation	4
1.4.1	Periphere T-Zell-Lymphome (PTCL-NOS)	6
1.4.2	Anaplastisch-großzellige T-Zell-Lymphome (ALCL)	7
1.5	Genetik	9
1.6	Grundprinzipien der CGH	10
1.7	Fragestellung	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Auswahl des untersuchten Materials	12
2.2	Klinische Daten der ausgewählten Fälle	13
2.3	DNA-Extraktion	16
2.3.1	Frischmaterial	16
2.3.2	Paraffinmaterial	16
2.4	Immunhistochemie	18
2.5	Nick-Translation	18
2.6	Komparative genomische Hybridisierung (CGH)	20
2.7	Digitale Metaphasendarstellung und –auswertung	22
2.8	Statistische Analyse	23

3	Ergebnisse	24
3.1	Immunhistochemische Merkmale	24
3.2	CGH der PTCL NOS	24
3.3	CGH der ALK-negativen ALCL	29
3.4	CGH der ALK-positiven ALCL	31
3.5	CGH der kutanen ALCL	33
3.6	Vergleich der Genetik von unterschiedlichen T-NHL	34
4	Diskussion	37
4.1	Analyse der peripheren T-Zell-Lymphome (PTCL-NOS)	37
4.1.1	Abgrenzung von Subgruppen von PTCL-NOS	39
4.2	Genetische Abgrenzung der PTCL-NOS von ALCL	42
4.3	Genetische Abgrenzung der PTCL-NOS und ALCL von T-Prolymphozyten Leukämien/-Lymphomen (T-PLL), Enteropathie-assoziierten T-Zell-Lymphomen (EATCL) und adulten T-Zell-Lymphomen/-Leukämien (ATCL)	43
5	Zusammenfassung	45
6	Abkürzungsverzeichnis	47
7	Literaturverzeichnis	49
8	Anhang	60
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Definition

Non-Hodgkin-Lymphome sind klonale Neoplasien, die aus unterschiedlich differenzierten Lymphozyten der B- oder T-Zellreihe entstehen.

Circa 80-85% der Non-Hodgkin-Lymphome sind B-Zell-Lymphome, nur etwa 10-15% gehen auf T- oder NK- (natürliche Killer-) Zellen zurück. Sie manifestieren sich als nodale und extranodale Lymphome, sowie zu 30 % als Leukämien (Swerdlow et al. 2008).

Die Lymphome werden nach Grad ihrer Differenzierung (Vorläufer- oder reife Lymphome) und Linienzugehörigkeit (B- oder T-Zell-Lymphome) unterteilt. Die charakteristische Differenzierung und Benennung erfolgt nach zytologischen, immunhistochemischen und klinischen Kriterien.

Die aktuelle WHO-Klassifikation der Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes unterscheidet bei den T-Zell-Lymphomen achtzehn Entitäten (siehe 1.4) (Swerdlow et al. 2008).

Hierunter finden sich in der Gruppe der nodalen T-Zell-Lymphomen die sogenannten peripheren T-Zell-Lymphome, nicht weiter spezifiziert (PTCL, not otherwise specified, PTCL-NOS) und die anaplastisch-großzelligen T-Zell-Lymphome (ALCL), welche in dieser Arbeit untersucht werden.

Periphere T-Zell Lymphome (PTCL) sind seltene Neoplasien, die in Deutschland und Europa einen Anteil von 8% bis 10% der malignen Non-Hodgkin Lymphome ausmachen (Rüdiger et al. 2002). Obwohl sich in Deutschland die Prognose für Patienten mit aggressiven B-Zell-Lymphomen und Hodgkin-Lymphomen in den letzten Jahren wesentlich verbessert hat (Diehl et al. 1998), ist die Prognose für Patienten mit PTCL (mit Ausnahme des ALK-positiven anaplastisch-großzelligen Lymphoms) mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 30% immer noch schlecht (Rüdiger et al. 2002, Siegert et al. 1994, Siegert et al. 1995).

Dies ist zum einen auf mangelnde positive Therapieerfahrungen (Reimer P. et al. 2004), zum anderen aber auch auf Defizite im biologischen Verständnis der PTCL zurückzuführen, die eine therapeutische Stratifizierung nach der histologischen Diagnose, wie sie bei B-Zell-Lymphomen in den klinischen Studien üblich ist, verhindern (Jaffe et al. 2001; Stansfeld AG et al. 1988; Hastrup N et al. 1991).

1.2 Ätiologie

Die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) sind seltene Erkrankungen, deren Auftreten in den letzten dreißig Jahren jedoch im Gegensatz zu den Hodgkin-Lymphomen stark zugenommen hat. Non-Hodgkin-Lymphome sind damit die hämatologische Neoplasie mit der höchsten Erkrankungszunahme überhaupt. Besonders stark gestiegen ist die Inzidenz der hochmalignen Lymphome. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland wird auf 10 bis 15 pro 100.000 Personen geschätzt. Männer erkranken geringfügig häufiger als Frauen (Schottenfeld et al. 1996; Devesa et al. 1992; Stat. Landesamt Saarland 1998, Deutsche Krebsgesellschaft 2008).

Die Erkrankung kann in jedem Alter auftreten, aber mit dem Alter steigt die Wahrscheinlichkeit, an einem Non-Hodgkin-Lymphom zu erkranken, an. Das Mittel (Median) liegt bei knapp über 60 Jahren. Mögliche Ursachen sind chromosomale Veränderungen (Mutationen), die häufig bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom beobachtet werden.

Durch die Mutationen kann es zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (= Gene, die Zellwachstum hemmen) und / oder zur Aktivierung von Onkogenen (= Gene, die Zellwachstum stimulieren) kommen, wodurch die veränderte Zelle einen Wachstumsvorteil erhält. Zudem kann die Funktion der Gene, die den Zelltod (Apoptose) oder die DNA-Reparatur regulieren, gestört werden, was zu einem autonomen neoplastischen Zellwachstum führen kann (Hanahan et al. 2000).

Insgesamt ist die Genese der T-NHL jedoch weitestgehend unbekannt.

1.3 Stadieneinteilung und Prognose

Die klinische Stadieneinteilung der Non-Hodgkin-Lymphome erfolgt nach der Ann-Arbor-Klassifikation, ähnlich wie bei M. Hodgkin. Es wird hierbei zwischen einer primär nodalen und einer primär extranodalen Manifestation unterschieden.

Die Prognose ist abhängig vom histologischen Typ, dem Krankheitsstadium, dem Vorhandensein von B-Symptomen sowie dem Allgemeinzustand und Lebensalter des Patienten. Ungünstig sind ein generalisiertes Stadium und eine extranodale Manifestation, ebenso wie B-Symptomatik, Alter über 60 Jahre und ein reduzierter Allgemeinzustand (Falini et al 1999, Rizvi et al. 2006, Swerdlow et al. 2008)

Stadieneinteilung der Non-Hodgkin-Lymphome (Ann-Arbor-Klassifikation)
(Deutsche Krebsgesellschaft, Leitlinien 2008):

Stadium	Primär nodale Manifestation (70%)	Primär extranodale Manifestation (30%)
1	Befall einer Lymphknotenregion	Befall eines extralymphatischen Organs oder Gewebes
2	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells	Befall eines extralymphatischen Organs mit den regionalen Lymphknoten auf einer Seite des Zwerchfells
3	Befall von Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells und Befall eines extralymphatischen Organs oder Gewebes und/oder der Milz	Befall eines extralymphatischen Organs und Lymphknotenbefall auf beiden Seiten des Zwerchfells und Befall eines weiteren extralymphatischen Organs oder Gewebes und/oder der Milz
4	Lymphknotenbefall mit diffusem oder disseminierten Befall extralymphatischer Organe oder Gewebe	Diffuser oder disseminierter Organbefall mit oder ohne Lymphknotenbefall
<p>A: Ohne Allgemeinbeschwerden</p> <p>B: Mit Fieber und/oder Nachtschweiß und/oder Gewichtsverlust (>10% in den letzten sechs Monaten)</p>		

1.4 Klassifikation

Nach der WHO-Klassifikation für hämatologische Neoplasien von 2008 werden T-Zell-Lymphome nach folgenden Kategorien unterschieden (Swerdlow et al. 2008).

Nodale T-Zell-Lymphome:

- Anaplastisch-großzelliges T-Zell-Lymphom, ALK-positiv
- Anaplastisch-großzelliges T-Zell-Lymphom, ALK-negativ
- Peripheres T-Zell-Lymphom, nicht weiter spezifiziert
- Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom

Extranodale T-Zell-Lymphome:

- Extranodales NK/T-Zell-Lymphom, nasaler Typ
- Enteropathie-assoziiertes T-Zell-Lymphom
- Hepatosplenisches T-Zell-Lymphom
- Subkutanes Pannikulitis-ähnliches Lymphom

Kutane T-Zell-Lymphome:

- Mycosis fungoides
- Sezary-Syndrom
- Primär kutanes gamma-delta T-Zell-Lymphom
- Primär kutane CD30-positive T-Zell-lymphoproliferative Erkrankung

Leukämien:

- Prolymphozyten-Leukämie vom T-Zell-Typ
- Leukämie der großen granulären Lymphozyten (LGL-Leukämie)
- Aggressive NK-Zell-Leukämie
- Adulte T-Zell-Leukämie/Lymphom
- Epstein-Barr-Virus (EBV)-positive T-Zell-lymphoproliferative Erkrankung im Kindesalter
- Chronische lymphoproliferative Erkrankung der NK-Zellen

Die in dieser Arbeit untersuchten peripheren T-Zell-Lymphome, nicht weiter spezifiziert (PTCL-NOS) sowie die ALK-positiven und ALK-negativen anaplastisch-großzelligen T-Zell-Lymphome (ALCL) gehören zu den nodalen T-Zell-Lymphomen.

1.4.1 Periphere T-Zell-Lymphome (PTCL-NOS)

Die peripheren T-Zell-Lymphome, nicht weiter spezifiziert (PTCL-NOS) umfassen ca. 50% aller peripheren T-NHL und ca. 3,7% aller Non-Hodgkin-Lymphome. Diese Gruppe von Lymphomen tritt hauptsächlich bei Erwachsenen im Verhältnis Männer zu Frauen von 2:1 auf. Kinder können jedoch auch betroffen sein (Rizvi et al. 2006, Pileri et al. 2008).

PTCL-NOS zeigen in der Regel einen aggressiven Verlauf mit schlechter Prognose, sind aber potenziell heilbar. Die Erkrankung verläuft meist generalisiert mit Lymphknotenschwellung, Hautbeteiligung, Leber- und Milzbefall. Häufig kommt es zu Rezidiven. Im Gegensatz zu peripheren B-Zell-Lymphomen liegt meist ein fortgeschrittenes Stadium mit B-Symptomatik vor (Ralfkiaer et al. 2001, Pileri et al. 2008, Rizvi et al. 2006).

Morphologisch findet sich meist eine deutliche Polymorphie des Infiltrats mit mittelgroßen bis großen, pleomorphen Zellen mit oft irregulären Zellkernen und häufig hellem Zytoplasma. Reed-Sternberg-ähnliche Zellen können vorkommen. Das Zellbild im Hintergrund ist oft bunt, bestehend aus Histiocytenclustern, eosinophilen Granulozyten und reichlich Plasmazellen (Harris et al. 1994, Jaffe et al. 2006).

PTCL-NOS sind gewöhnlich durch einen aberranten T-Zell-Phänotyp mit wiederholter verminderter Expression von CD5 und CD7 charakterisiert (Went et al. 2006). In Fällen mit nodaler Herkunft findet sich häufig ein CD4+/CD8-Phänotyp. Gelegentlich wird eine zweifache Positivität oder Negativität von CD4/CD8, sowie die Expression von CD8, CD56 und zytotoxischer Granula beobachtet (Went et al. 2006). Genetisch finden sich rearrangierte T-Zell-Rezeptorgene (Rizvi et al. 2006), üblicherweise ist die T-Zell-Rezeptor(TCR)-beta-Kette (β -F1) exprimiert und ermöglicht die Unterscheidung von gamma-delta T-Zell-Lymphomen und NK-Zell-Lymphomen (Chang et al. 2007, Piccaluga et al. 2007, Rodig et al. 2006). CD30 kann, im Ausnahmefall auch mit CD15, exprimiert werden, aber der Gesamtphänotyp und die Morphologie erlauben eine Unterscheidung der PTCL-NOS von den ALCL und den Hodgkin-Lymphomen (Barry et al. 2003, Went et al. 2006). Die Proliferationsrate der

PTCL-NOS ist gewöhnlich hoch und eine Expression von Ki67 von mehr als 70% ist zudem mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Went et al. 2006, Pileri et al. 2008).

Oft ist ein komplexer Karyotyp nachweisbar (Harris et al. 1994, Jaffe et al. 2006). Die häufigsten bisher in Untersuchungen der klassischen Zytogenetik nachgewiesenen genetischen Alterationen in PTCL-NOS stellten Verluste auf Chromosom 6q (Schlegelberger et al. 1994, Schlegelberger et al. 1996, Lepetre et al. 2000), Verluste auf Chromosom 13q (Schlegelberger et al. 1994, Schlegelberger et al. 1996, Lepetre et al. 2000, Rosenwald et al. 1999) und Zugewinne auf Chromosom 7q dar (Gebhart 2005).

1.4.2 Anaplastisch-großzellige T-Zell-Lymphome (ALCL)

Anaplastisch-großzellige T-Zell-Lymphome (ALCL) stellen eine distinkte Entität der PTCL dar, die erstmals 1985 beschrieben wurde (Stein et al., 1985).

Das Vorhandensein einer spezifischen Translokation t(2;5), durch die das Gen für die „anaplastic lymphoma kinase“ (ALK) überexprimiert wird, unterscheidet zwei Gruppen, die ALK-positiven und die ALK-negativen ALCL (Benharroch et al. 1998, Falini et al. 1998, Stein et al. 2000). Beide Gruppen haben unterschiedliche klinische Merkmale und Prognosen, ähneln sich jedoch hinsichtlich Morphologie und Immunphänotyp (Falini et al. 1999, Delsol et al. 2001, Delsol et al. 2008, Mason et al. 2008).

Insgesamt repräsentieren die ALCL ca. 3% der Non-Hodgkin-Lymphome beim Erwachsenen und ca. 10-30% der Lymphome beim Kind (Stein et al. 2000). Sie befallen sowohl Lymphknoten als auch extranodale Regionen, wie die Haut, Knochen, Weichgewebe, Lunge und Leber. Die meisten Patienten befinden sich bei Diagnosestellung bereits im Stadium 3 oder 4 nach Ann Arbor mit peripherer und/oder abdominaler Lymphadenopathie und zeigen eine B-Symptomatik (Falini et al. 1999, Stein et al. 1985).

Das ALK-positive ALCL tritt vor allem bei jungen männlichen Patienten auf (3. Lebensdekade und jünger), und besitzt nach Chemotherapie eine günstige Prognose (Benharroch et al. 1998, Falini et al. 1999).

ALK-negative ALCL finden sich bei älteren Patienten, zeigen ein Geschlechterverhältnis von 1,5:1 (m:w) und gehen mit einer ungünstigeren Prognose einher (Falini B. 2001, Stein et al. 2000).

Eine ALK-Expression ist somit prognostisch günstig. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei ALK-positiven ALCL bei 80%, im Gegensatz zu 48% bei ALK-negativen Fällen (Falini et al. 1999, Gascoyne et al. 1999, Delsol et al. 2001, Delsol et al. 2008, Mason et al. 2008).

Das primär kutane ALCL, welches morphologisch und immunphänotypisch Überschneidungen mit der lymphomatoiden Papulose zeigt, besitzt auch unter lokaler Therapie eine exzellente Prognose. Ein sekundärer systemischer Befall kommt dabei vergleichsweise selten vor (Foss et al. 2000).

Die Tumorzellen der ALCL wachsen oft kohäsiv in den Lymphknotensinus und ähneln zytologisch Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms. ALCL bestehen hauptsächlich aus Lymphomzellen mit reichlich Zytoplasma sowie typischen ausgeprägt pleomorphen, embryoartigen Kernen, den so genannten „Hallmark-Zellen“, und zeigen in der Mehrheit der Zellen eine starke Expression von CD30 mit einer Anfärbung der Zellmembran oder des Golgiapparates. Zudem haben sie häufig eine zytotoxische Differenzierung (Stein et al. 1985, Foss et al. 1996, Benharroch 1998, Falini et al. 1998, Delsol et al. 2001, Delsol et al. 2008, Mason et al. 2008). Die Mehrheit der ALCL zeigt eine klonale Neuordnung des T-Zell-Rezeptor-(TCR)-Gens, egal ob sie T-Zell-Antigene exprimieren oder nicht (Foss et al. 1996).

Eine Abgrenzung von ALK-negativen ALCL gegenüber PTCL-NOS ist histologisch gelegentlich schwierig, da PTCL-NOS auch CD30 exprimieren können (Falini B 2001, Jaffe ES 2001, Geissinger et al. 2004).

1.5 Genetik

Die häufigsten bisher beschriebenen genetischen Alterationen von T- und B-Non-Hodgkin-Lymphomen stellen Verluste von genetischem Material auf den Chromosomen 6q und 13q dar (Zhang et al. 2000). Zudem sind Zugewinne auf Chromosom 7q beschrieben. Zusammen mit den Verlusten auf den Chromosomen 6q und 13q werden sie als gemeinsame sekundäre chromosomale Alterationen betrachtet und sind häufig mit einer Lymphomprogression assoziiert (Gebhart 2005).

In den Untersuchungen der klassischen Zytogenetik zeigten 20 bis 35% der PTCL-NOS Deletionen auf Chromosom 6q (Schlegelberger et al. 1994, Schlegelberger et al. 1996, Lepetre et al. 2000). Ebenso wurden häufig Verluste auf Chromosom 6q in CGH-Untersuchungen von Adulten T-Zell-Leukämien/Lymphomen (ATCL), von Prolymphozyten-Leukämien vom T-Zell-Typ (T-PLL) und NK-Zell-Lymphomen/Leukämien beobachtet. Die Region 6q21 war am wenigsten betroffen. Häufig fanden sich Deletionen in den Regionen 6q14-q16 und 6q23-q24 (19 bis 22% der Fälle) (Tsukasaki et al. 2000, Soulier et al. 2000, Siu et al. 1999). In weiteren früheren genetischen Studien zeigten PTCL-NOS in 14 bis 26% der Fälle rekurrente Verluste auf Chromosom 13q, die bereits in CGH-Untersuchungen von ATCL, T-PLL, Sézary-Syndrom und NK-Zell-Neoplasien beobachtet worden waren (Schlegelberger et al. 1994, Schlegelberger et al. 1996, Lepetre et al. 2000, Tsukasaki et al. 2000, Soulier et al. 2000, Siu et al. 1999, Karenko et al. 1999). Die klassischen zytogenetischen Analysen von PTCL-NOS zeigten Verluste auf der chromosomalen Bande 13q14, welche sich auch bei B-Zell-Lymphomen fanden (Rosenwald et al. 1999).

Die bei den ALCL zuvor am häufigsten wiederholt gefundene Alteration ist die Translokation t(2;5) zwischen dem ALK-Gen auf Chromosom 2 (2p23) und dem Nucleophosmin-Gen auf Chromosom 5 (5q35), die zur Überexpression der Anaplastisch-großzelligen-Kinase (ALK) führt. Diese unterscheidet somit die ALK-positiven ALCL von den ALK-negativen ALCL, die bei nahezu identischer Morphologie und Immunphänotyp diese Translokation nicht aufweisen (Mason

et al. 1990, Morris et al. 1994, Lamant et al. 1996, Delsol et al 2000, Delsol et al. 2008).

1.6 Grundprinzipien der CGH

Die komparative genomische Hybridisierung (comparative genomic hybridization, CGH) wurde erstmals 1992 von Kallioniemi beschrieben (Kallioniemi et al. 1992).

Es handelt sich hierbei um eine molekulargenetische Methode, mit deren Hilfe Zugewinne und Verluste von genetischem Material, entsprechend numerischen chromosomalen Aberrationen eines Tumors, durch Vergleich von Tumor-DNA mit DNA aus nichtneoplastischem Gewebe ermittelt werden können. Nach unterschiedlicher Markierung der Normal- und Tumor-DNA und Kohybridisierung auf normale humane Metaphasen können anhand des jeweiligen Signalverhältnisses Gewinne und Verluste von genetischem Material nachgewiesen werden. Nach Untersuchung mehrerer Fälle ergibt sich ein Aberrationsmuster einer Tumorentität (Petersen et al. 1997). Chromosomenabschnitte, die Verluste von genetischem Material aufweisen, können hierbei Hinweise auf die Lokalisation eines in der Pathogenese des jeweiligen Tumors bedeutenden Tumorsuppressor-Gens geben. Amplifikationen sowie chromosomale Regionen, die einen Zugewinn an genetischem Material aufweisen, können Onkogene beinhalten, die in der Tumorgenese von Bedeutung sind.

Die CGH hat sich als rasche und umfassende genetische Screening-Methode erwiesen, die sowohl an Frisch- als auch an Paraffinmaterial angewendet werden kann. Balancierte chromosomale Veränderungen wie Inversionen oder auch Translokationen sind allerdings mit der Methode der CGH nicht darstellbar. Limitiert ist die Methode weiterhin durch die Auflösung, die je nach Autor mit 2 bis 10 Megabasen (Mb) bei Amplifikationen, sowie größer als 10 Mb bei Deletionen angegeben werden. Ausnahme hierbei sind sogenannte High-level-Amplifikationen, die je nach Amplifikationsgrad auch schon im Bereich von

weniger als 1 Mb darstellbar sind (Kallioniemi et al. 1994, Forozan et al. 1997, James L 1999).

1.7 Fragestellung

Die peripheren T-Zell-Lymphome (PTCL-NOS) und die ALK-negativen anaplastisch-großzelligen T-Zell-Lymphome (ALCL) stellen die Mehrheit der T-Zell-Lymphome dar.

Über ihre Genetik war bisher nur wenig bekannt. In klassischen zytogenetischen Untersuchungen dieser Gruppe fanden sich Hinweise auf komplexe chromosomale Veränderungen. Aufgrund der Seltenheit dieser Neoplasie basierten die Berichte bis zum Beginn dieser Arbeit nur auf einer geringen Anzahl von Fällen. Für die heterogene Gruppe von PTCL-NOS war bisher keine charakteristische Veränderung beschrieben.

Zudem waren die genetische Beziehung zwischen ALK-negativen ALCL und PTCL-NOS, die Genetik von kutanen ALCL und die sekundären genetischen Veränderungen in ALK-positiven ALCL unklar.

In dieser Arbeit wurden Fälle von PTCL-NOS und ALCL durch komparative genomische Hybridisierung (CGH) zum Nachweis rekurrenter genetischer Alterationen untersucht.

Die Ergebnisse der CGH-Untersuchung von PTCL-NOS und ALK-negativen ALCL wurden mit zuvor bereits veröffentlichten Ergebnissen über Enteropathie-assoziierte T-Zell-Lymphome (EATCL), Prolymphozyten-Leukämien vom T-Zell-Typ (T-PLL) und aggressive adulte T-Zell-Leukämien/Lymphome (ATCL) verglichen (Zettl et al. 2002; Tsukasaki et al. 2000; Soulier et al. 2000).

2. Material und Methoden

2.1 Auswahl des untersuchten Materials

Es wurden mehr als 600 Fälle von peripheren T-Zell-Lymphomen, nicht weiter spezifiziert (PTCL-NOS) und anaplastisch-großzelligen T-Zell-Lymphomen (ALCL) aus dem Archiv des Lymphknotenreferenzzentrums des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg und dem Institut für Klinische Pathologie der Universität Wien ausgewählt.

Alle Fälle wurden gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation der Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes als periphere T-Zell-Lymphome und anaplastisch-großzellige T-Zell-Lymphome klassifiziert (Jaffe et al. 2001, Swerdlow et al. 2008).

In der Differenzierung zwischen PTCL-NOS und ALK-negativen ALCL wurden die Lymphome als ALK-negative ALCL klassifiziert, die hauptsächlich aus lymphoiden Zellen mit reichlich Zytoplasma bestanden und die typischen ausgeprägten pleomorphen, embryoartigen Kerne zeigten. Weiterhin musste in der Mehrheit der Zellen eine starke Expression von CD30 mit einer Anfärbung der Zellmembran oder des Golgiapparates nachweisbar sein. In Übereinstimmung mit der WHO-Klassifikation des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes wurden Lymphome, die diese morphologischen Kriterien nicht zeigten und/oder nur schwach CD30 in einem kleinen Teil der Tumorzellen exprimierten, als PTCL-NOS klassifiziert (Jaffe et al. 2001, Swerdlow et al. 2008).

Um einen ausreichend hohen Tumorzellgehalt in den Proben für die CGH sicherzustellen, konnten lediglich 196 Fälle zur DNA-Extraktion verwendet werden, da nur sie einen Tumorzellgehalt von über 60% aufwiesen. Bei zu geringem Tumorzellgehalt bestünde die Möglichkeit, dass genetische Alterationen in der CGH unentdeckt bleiben (Weiss et al. 1999).

In 11 Fällen, davon acht PTCL und drei ALK-negative ALCL, war kryoasserviertes Frischmaterial zur DNA-Extraktion verfügbar. In den restlichen

185 Fällen wurde die DNA aus in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcken unter Verwendung von Phenol und Chloroform extrahiert (Zettl et al. 2000) (vgl. 2.3).

Die Länge der gewonnenen DNA wurde nach entsprechenden DNA-Längenstandards auf einem 0.7%igem Agarose-Gel durch Elektrophorese analysiert. Nur in 68 Fällen (38%) konnte hochmolekulare DNA von Paraffinblöcken extrahiert und durch CGH erfolgreich analysiert werden. In den restlichen 117 Fällen war die aus Paraffinblöcken extrahierte DNA aufgrund von DNA-Abbau (DNA-Fragmentgröße < 1000 bp) nicht zur weiteren Analyse durch CGH geeignet.

2.2 Klinische Daten der ausgewählten Fälle

Die klinischen Daten der ausgewählten Fälle umfassten die Patientengeschichte mit Art und Dauer der Symptome bei erstmaligem Auftreten der Erkrankung und Art der Behandlung. Die klinischen Daten wurden aus den Patientenakten, durch den behandelnden Arzt oder aus Obduktionsberichten ermittelt.

Bei 36 von 42 PTCL-NOS stammte das zur Verfügung stehende Material aus Gewebeproben bei Erstdiagnose der Erkrankung, die vor Beginn der Therapie entnommen worden waren. In sechs Fällen konnte nur Material von Tumorrezidiven analysiert werden (Fälle 36 bis 42, siehe Tabelle 2, Anhang). In zwei Fällen konnten zusätzlich Lymphomrezidive analysiert und mit dem Primärtumor verglichen werden (Fall 36 mit einem Zeitintervall von 1 Jahr und Fall 40 mit einem Zeitintervall von 7 Monaten).

Von den 36 Primärfällen von PTCL-NOS waren 22 Patienten männlich und 14 weiblich (Tabelle 2). Das Alter bei Diagnosestellung reichte von 27 bis 90 Jahren, im Durchschnitt lag es bei 66 Jahren. Von den 36 Patienten mit primärer Krankheitsmanifestation waren vier Patienten im Stadium 1, drei im Stadium 2, sechs im Stadium 3 und 11 befanden sich in Stadium 4 nach Ann Arbor. Bei den übrigen Patienten war das Krankheitsstadium unbekannt.

34 von 36 PTCL NOS waren primär nodale Lymphome. Bei nur zwei Fällen fand sich eine extranodale Manifestation, einmal im subkutanen Fettgewebe der Kniekehle und einmal in der Nebenniere. Der weitere klinische Verlauf war von 30 Patienten verfügbar. Von diesen waren bereits 23 verstorben. Die Überlebenszeit nach Diagnosestellung lag zwischen einem und 32 Monaten, im Durchschnitt bei 10 Monaten. Sieben Patienten waren noch am Leben, zwei davon mehr als 24 Monate nach Erstdiagnose.

Die sechs PTCL-Rezidivfälle waren alle männlich und im Alter von 35 bis 71 Jahren (im Durchschnitt 57 Jahre, Tabelle 2). Die Zeitintervalle zwischen Erstdiagnose und Rezidiv lagen bei drei Monaten (Fall 38), 20 Monaten (Fall 40), sechs Jahre (Fall 41) und 13 Jahre (Fall 39). Für die restlichen Fälle gab es keine Angaben. Bis auf einen Patienten waren alle verstorben. Die Überlebenszeit nach Rezidivauftritt lag bei vier bis 32 Monaten und im Durchschnitt bei 13 Monaten.

Informationen über die Patientenbehandlung lagen bei 28 von 42 Patienten vor. Mit der Polychemotherapie nach dem CHOP-Schema (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon) wurden 24 Patienten behandelt, nur ein Patient erhielt eine Chemotherapie nach dem IMVP-Protokoll (Ifosfamid, Methotrexat und Etoposid). Drei der Patienten erhielten aufgrund ihres Alters oder des fortgeschrittenen Tumorstadiums keine Therapie. Zwei der Patienten erhielten zusätzlich eine lokale Strahlentherapie und ein Patient eine allogene Knochenmarkstransplantation.

Von den neun Patienten mit ALK-positiven ALCL (Fälle 43 bis 51) waren sechs männlich (siehe Tabelle 3, Anhang) und bei Diagnosestellung zwischen 11 und 73 Jahren alt (im Durchschnitt 33 Jahre). Alle Fälle waren nodale ALCL. Das analysierte Material hiervon war bis auf eine Ausnahme (Fall 51, Rezidiv 18 Monate nach Primärdiagnose) aus dem Primärtumor vor der Behandlung des Patienten. Von den Primärfällen waren je vier im Tumorstadium 2 und 3 nach Ann Arbor. Der klinische Verlauf stand von sieben Patienten zur Verfügung. Ihre Überlebenszeit reichte von zwei bis 62 Monaten.

Bei 13 der 17 ALK-negativen systemischen ALCL stammte das analysierte Material von der Probe der Erstdiagnose vor Behandlung des Patienten (Tabelle 3). Hiervon waren neun Patienten männlich und im Alter zwischen sieben und 92 (durchschnittlich 59 Jahre). Extranodale Manifestation fand sich nur in zwei Fällen (Weichgewebe, Knochen). Von den Primärfällen war einer im Krankheitsstadium 1, vier im Stadium 2, zwei im Stadium 3 und zwei im Stadium 4 nach Ann Arbor. Die restlichen Patienten waren keinem Stadium zugeordnet. Der weitere klinische Verlauf war von zehn Patienten verfügbar. Sieben waren nach einem Überlebenszeitraum von einem bis 86 Monaten verstorben, wohingegen drei (bei einem Überlebenszeitraum von 72 bis 92 Monaten) noch lebten.

Bei vier Patienten konnten nur Rezidive von ALK-negativen ALCL analysiert werden (Fälle 65 bis 68) (Tabelle 3). Die Zeitintervalle zwischen Erstdiagnose und Rezidiv betragen zwei Jahre (Fall 61), sieben Jahre (Fall 63) und acht Jahre (Fall 53). Für den verbleibenden Fall konnten keine Daten erhoben werden. Informationen über die Therapie lagen für sieben Patienten vor. Sechs Patienten wurden mit dem Polychemotherapieschema CHOP behandelt. Ein Patient erhielt das IMVP-Chemotherapieschema und anschließend eine autologe Knochenmarkstransplantation.

Von den 11 Patienten mit primären kutanen ALCL (Fälle 69 bis 79) (Tabelle 3) waren acht männlich. Das Alter lag zwischen 29 und 87 Jahren, im Durchschnitt 57 Jahre. In allen Fällen war das Material vor Therapiebeginn gewonnen worden. Der weitere Verlauf konnte von acht Patienten verfolgt werden. Von den sieben Patienten, die mit lokaler Strahlentherapie behandelt wurden, war eine weitere Überlebenszeit von mindestens fünf bis 48 Monaten zu erheben.

2.3 DNA-Extraktion

2.3.1 Frischmaterial

Zur DNA-Gewinnung aus Frischmaterial wurden zunächst 5µm dünne Schnitte mit einem Mikrotom vom Gewebe entnommen. Zur Füllung eines 2ml-Eppendorftubes waren 20 bis 30 Schnitte erforderlich. Zum Gewebeverdau erfolgte die Zugabe von Verdauopuffer, bestehend aus 100mmol/l NaCl, 10 mmol/l Tris-HCl mit pH 8, 25 mmol/l EDTA mit pH 8 und 0,5% SDS (alle Substanzen Sigma, St. Louis, USA) und 40µl Proteinase K (0,1 mg/ml, Roche Diagnostics, Mannheim) mit anschließender Inkubation über Nacht bei 50°C.

Die DNA wurde am nächsten Tag nun wie bei Paraffinmaterial und im Folgenden beschrieben mit der Phenol/Chloroform-Methode extrahiert und anschließend mit Ethanol/Natriumacetat präzipitiert.

2.3.2 Paraffinmaterial

Vom Paraffinmaterial erfolgte zunächst das Abwiegen von 15-30 mg in Form von 30 bis 40 Mikrotomschnitten mit einer Dicke von 6 µm, die in Eppendorftubes gegeben wurden. Zum Entfernen des Paraffins aus dem Gewebe wurde das Material jeweils mindestens zweimal mit 1ml Xylol sowie anschließend zweimal mit 1ml 100%igem Ethanol durch Hinzugabe, Vortexen, Zentrifugieren und schließlich Abpipettieren der Flüssigkeit gewaschen. Danach erfolgte für zwei Stunden die Trocknung auf dem Heizblock bei 50°C, bis eine pulverige Konsistenz des Materials erreicht war. Nach Zugabe von je 1ml NaSCN (1mol/l, Sigma, St. Louis, USA) wurden die Tubes für 24 Stunden bei Raumtemperatur belassen.

Am nächsten Tag erfolgte nach der Zentrifugation und dem Abpipettieren des NaSCN das dreimalige Waschen des Materials mit 1ml DNA-Isolationspuffer, bestehend aus 75mmol/l NaCl, 0,5% Tween 20, 25 mmol/l EDTA mit pH 8 (alle Substanzen von Sigma, St. Louis, USA). Anschließend wurden erneut jeweils 1ml DNA-Isolationspuffer und zusätzlich 80µl Proteinase K (20mg/ml, Roche

Diagnostics, Mannheim) zum Gewebe gegeben und dies für 72 Stunden bei 56°C inkubiert.

Die Abtrennung der Proteinreste von der DNA des nun verdauten Materials wurde durch Verwendung von Phenol und Chloroform erreicht. Hierzu wurde das Material zweimal mit je 1ml Phenol (pH 7,5) für 20 Minuten im Invertiershaker gewaschen, 10 Minuten bei 10000 U/min zentrifugiert und die obere wässrige Phase in neue Eppendorftubes pipettiert. Das gleiche Vorgehen erfolgte anschließend noch einmal mit Phenol/Chloroform und zweimal mit Chloroform (Phenol und Chloroform, Roth, Fürth).

Nach Zugabe von 25µl Natriumacetat (3mol/l, pH 5,2) und 1ml 100%igem Ethanol wurden die Proben für 30 Minuten bei -80°C zur Fällung belassen und danach bei 4°C für 15 Minuten mit 13000U/min zentrifugiert. Im Tube zeigte sich am Boden nun ein DNA-Pellet. Der wässrige Inhalt wurde abpipettiert, zum Pellet anschließend erneut 1ml gekühltes 70%-iges Ethanol hinzugefügt und die Zentrifugation bei 4°C wiederholt. Nach vollständigem Abpipettieren des Ethanols wurden die Pellets bei Raumtemperatur im offenen Tube über Nacht getrocknet.

Danach erfolgte die Resuspendierung der DNA-Pellets unter Zugabe von jeweils 25µl TE-Puffer (bestehend aus 10mmol/l Tris-HCl, pH 7,6 und 1mmol/l EDTA; Sigma, St. Louis, USA) sowie 25µl Aqua dest. und eine anschließende Rüttelung des Gemisches für 6 Stunden.

Die abschließende Bestimmung der Konzentration der so gewonnenen DNA erfolgte durch Photometrie.

2.4 Immunhistochemie

Von allen Fällen des in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Materials wurden zudem immunhistochemische Färbungen angefertigt. Hierfür wurden mit einem konventionellen Mikrotom 1 µm dicke Schnittpräparate angefertigt und auf silanisierte Objektträger aufgezogen. Für die immunhistochemischen Färbungen wurde die indirekte Immunperoxidasetechnik mit einem kommerziell erhältlichen Biotin/Streptavidin/Meerrettichperoxidasesystem (HistostainTM-Plus Staining kit, Zymed, San Francisco, USA) mit Hilfe des Pipettierautomaten TECAN Genesis RSP 200 (Tecan, Crailsheim) angewandt (Rüdiger et al.1998).

Die Immunfärbung beinhaltete die Marker CD3 (1:400, DAKO, Kopenhagen, Dänemark), CD4 (1:10, Novocastra), CD5 (1:20, Novocastra), CD8 (1:30, DAKO), CD20 (1:200, DAKO), CD30 (1:80, DAKO), TIA1 (1:800, Coulter, Hialeah, FL), Granzym B (GrB-7, 1:20; Sanbio, Germany), Ki 67 (1:300, Novocastra) und ALK1 (mouse monoclonal antibody, 1:50; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Karen Pulford, Universität von Oxford, Großbritannien).

2.5 Nick-Translation

Zur Markierung und Herstellung von DNA-Fragmenten der benötigten Länge der Tumor- und Vergleichs-DNA erfolgte die Durchführung einer Nick-Translation.

Tumor-DNA wurde durch Nick-Translation mit Biotin-16-dUTP (Roche Diagnostics, Mannheim) markiert. Die Referenz-DNA, die aus Plazentagewebe eines gesunden Neugeborenen gewonnen wurde, wurde mit Digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics) gekennzeichnet.

Ein Nick-Ansatz der Tumor-DNA mit insgesamt 130µl war für zwei Hybridisierungen der jeweiligen Tumor-DNA ausreichend.

Er enthielt 2µg Tumor-DNA, 13µl NT-Puffer (0.5mol/l Tris pH 8,0; 50mmol/l MgCl₂; 500mg/ml BSA), 10µl 0.1mol/l Mercaptoethanol (beides Sigma, St. Louis, USA), 10µl BioMix (100µl-Ansatz: 50 µl Bio-16-dUTP; 1,2µl 10mM dTTP; 5µl 10mM dATP; 5µl 10mM dGTP; 5µl 10mM dCTP; 33,8µl Aqua dest.), (alle Nukleotide Roche Diagnostics, Mannheim) und Aqua dest. in entsprechender Menge, bis die Gesamtmenge von 130µl erreicht war.

Es erfolgte noch die Zugabe von 4µl DNA-Polymerase (Promega, Mannheim) und 3µl von im Verhältnis 1:1000 verdünnter DNase I (Roche Diagnostics, Mannheim). Anschließend wurden die Eppendorftubes für 2 Stunden im 15°C-Kühlbad belassen.

Ein Ansatz für die Nick-Translation von Normal-DNA mit 1000µl Gesamtmenge reichte für 20 Hybridisierungen.

Er enthielt 20µg Normal-DNA, 100µl NT-Puffer, 100µl Mercaptoethanol, 100µl DigMix (100µl-Ansatz: 17µl Dig-11-dUTP; 3,3µl 10mM dTTP; 5µl 10mM dATP; 5µl 10mM dGTP; 5µl 10mM dCTP; 64,7µl Aqua dest. (alle Nukleotide Roche Diagnostics, Mannheim) und 644µl Aqua dest.

Es erfolgte die Zugabe von 30µl DNA-Polymerase (Promega, Mannheim) und 12µl von im Verhältnis 1:1000 verdünnter DNase I (Roche Diagnostics, Mannheim) mit anschließendem Belassen der Eppendorftubes für 1,25 Stunden im 15°C-Kühlbad.

Im Anschluß an die jeweilige Nick-Translation wurde die Länge der DNA-Fragmente auf einem 0.7%igem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarose-Gel durch Elektrophorese untersucht. Zeigten die Fragmente in der Elektrophorese eine Länge von über 1000 bp erfolgte ein Nachverdau durch erneute Zugabe der entsprechenden Menge DNase I und Inkubation im 15°C Kühlbad und anschließender erneuter Elektrophorese.

War die Ziellänge von 500 bis 1000 bp erreicht, erfolgte die Inaktivierung der DNase I in der Nick-Translation von Tumor-DNA durch Zugabe von 2,6µl EDTA (0,5M, pH8) und 1,3µl SDS (10%; beide Sigma, St. Louis, USA) und in der Nick-Translation von Normal-DNA durch Zugabe von 5µl SDS und 10µl EDTA, sowie

bei beiden Ansätzen anschließend die Erhitzung der Tubes für 10 Minuten bei 68°C auf dem Hitzeblock.

Es wurden keine Fragmente über 1000 bp verwendet um eine möglichst optimale Homogenität der Hybridisierung zu erreichen.

Nach Inaktivierung der DNase I wurden nicht verwendete Nukleotide und Fragmente unter 500bp mit Gelfiltration durch Sephadex G50-gefüllte Säulen (Sigma, St. Louis, USA) entfernt. Hierzu wurden die Säulen zuvor viermal mit 100µl Sephadex-Säulenpuffer (bestehend aus 10mmol/l Tris HCl pH 8; 1 mmol/l EDTA pH 8; 0,1% SDS; alle Substanzen Sigma, St. Louis, USA) befüllt und anschließend bei 3000U/min für jeweils 10 Minuten zentrifugiert.

Die Aufbewahrung der gewonnenen Nick-Translationsprodukte erfolgte bei minus 20°C.

2.6 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Die CGH wurde an 79 Fällen, davon 42 PTCL-NOS und 37 ALCL, nach einem Standardprotokoll (Lichter et al.1995) durchgeführt.

Für einen Hybridisierungsansatz wurden jeweils 1 µg der Tumor-DNA und Referenz-DNA, sowie zusätzlich 70µg Cot-1 DNA (Roche Diagnostics, Mannheim) zur Blockierung eventuell vorhandener hochrepetitiver DNA-Sequenzen, benötigt. Zu diesem DNA-Gemisch erfolgte die Zugabe von 357µl eisgekühltem 100%igem Ethanol und zur Ausfällung zusätzlich von 8,5µl 3mol/l Natriumacetat mit pH 5,2. Anschließend wurden die Tubes für 40 Minuten bei minus 70°C belassen.

Nach Zentrifugation bei 4°C und 13000U/min für 15 Minuten und Abpipettieren des 100%igem Ethanol wurde das nun sichtbare DNA-Pellet mit 500µl 70%igem Ethanol von der Tubewand gelöst und für 10 Minuten bei 4°C und 13000U/min zentrifugiert.

Nach erneutem Abpipettieren des Ethanols erfolgte die Trocknung der DNA-Pellets in den geöffneten Tubes für 12 Minuten bei 37°C auf dem Hitzeblock.

Danach wurde zu jedem Ansatz 7µl deionisiertes Formamid zugegeben und das Tube 60 Minuten bei Raumtemperatur zum Auflösen der DNA-Pellets maschinell gerüttelt. Nach Zugabe von 7µl Hybridisierungspuffer (bestehend aus 4 x SSC, 20% Dextransulfat) wurden die Tubes für weitere 60 Minuten gerüttelt, anschließend für 6 Minuten bei 75°C denaturiert und schließlich für 30 Minuten bei 37°C auf dem Hitzeblock inkubiert.

Während der insgesamt zweistündigen Rüttelung wurden bereits die kommerziell erworbenen Metaphasen-Objektträger (Vysis, Downers Grove, IL, USA) vorbereitet. Nach schrittweiser Erwärmung von -20°C über 4°C auf Raumtemperatur erfolgte die Markierung der Hybridisierungsfelder unter dem Mikroskop durch Einzeichnen der Metaphasenchromosomenfelder auf den Glasträgern. Anschließend wurden die Metaphasen für 30 Minuten bei 37°C und 30 Minuten bei 56°C inkubiert.

Währenddessen erfolgte die Herstellung der Denaturierungslösung aus 49ml deionisiertem Formamid, 7ml 20 x SSC, 7ml Natriumphosphatpuffer (0,05 mol/l Natriumdihydrogenphosphat, 0,05 mol/l Dinatriumhydrogenphosphat) sowie 7ml Aqua dest. und Einstellung auf pH 7. Nach Denaturierung der Objektträger in dieser Lösung für 3 Minuten bei 73°C erfolgte die Entwässerung derselben in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%igem, 90%igem und 100%igem eisgekühltem Ethanol für jeweils 5 Minuten und die Trocknung bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden die Metaphasenträger beschriftet und auf dem Hitzeblock bei 37°C erwärmt. Es wurden nun auf jeden Objektträger zwei Proben auf die zuvor markierten Hybridisierungsfelder aufgetragen, mit Deckgläschen bedeckt und diese mit Fixogum-Klebmasse fixiert. In einer vorbereiteten feuchten Kammer wurden die Objektträger über Nacht bei 37°C inkubiert.

Nach dieser Hybridisierung über Nacht bei 37°C wurden die Glasträger viermal mit Waschlösung A (50%iges Formamid, 2 x SSC, pH 7,0) bei 42°C und dreimal mit Waschlösung B (0.1 x SSC, pH 7,0) bei 60°C gewaschen.

Zur Visualisierung der Biotin- und Digoxigeninkennzeichnung der DNA erfolgte das Aufbringen von mit Fluoreszenz-Isothiocyanat markiertem Avidin (Vector

Laboratories, Burlingame, USA) und von mit Cy3-konjugiertem Anti-Digoxigeninantikörpern (Dianova, Hamburg) auf die Probenfelder, anschließend die Inkubation für 30 Minuten in der feuchten Kammer bei 37°C und das dreimalige Waschen für je 5 Minuten mit Waschlösung C (4 x SSC, 0,1% Tween 20, pH 7,0).

Die Darstellung der Chromosomenbanden ergab sich durch eine Gegenfärbung mit 4,6-Diamindino-2-Phenylindole (DAPI) für 20 Minuten mit anschließender Waschung für 2 Minuten in Waschlösung D (2 x SSC, 0,05% Tween 20).

Zum Abschluss erfolgte mit Antifadelösung (Vectashields, Vector Laboratories) das Fixieren von Deckgläsern auf den Objektträgern.

2.7 Digitale Metaphasendarstellung und –auswertung

Die Hybridisierungssignale auf den Metaphasen wurden mit einem Axiophot-Fluoreszenzmikroskop von Zeiss (Aalen) dargestellt und mit dem digitalen Analysesystem ISIS (MetaSystems, Altlußheim, Germany) ausgewertet. Zur Identifikation von chromosomalen Zugewinnen und Verlusten wurden Schwellenwerte des Fluoreszenzverhältnisses von 1.25 als obere und 0.8 als untere Schwelle verwendet. Eine High-Level-Amplifikation war definiert als eine Überrepräsentation von genetischem Material durch erhöhte Fluoreszenzwerte über 2.0 oder durch sehr starke lokale Fluoreszenzsignale auf chromosomalen Banden.

Es erfolgte von jedem Fall die Bilddokumentation und Auswertung von 15 bis 30 Metaphasen. Als Qualitätskriterien für eine erfolgreiche Hybridisierung und gute Auswertbarkeit galten neben einer entsprechenden DAPI-Färbung zur Chromosomenidentifikation, starke und homogene Hybridisierungssignale des kompletten Chromosoms und eine möglichst geringe Chromosomengranularität sowie Hintergrundfärbung.

2.8 Statistische Analyse

Die statistische Korrelation zwischen klinischen Merkmalen, Immunphänotyp, genetischen Veränderungen und der Vergleich genetischer Veränderungen zwischen PTCL NOS und ALK-negativen ALCL, EATCL, T-PLL und ATCL wurde unter Verwendung des Exakten Tests auf Unabhängigkeit nach Fisher und Spearmans Korrelationskoeffizient berechnet. *P* Werte unter 0.05 wurden als signifikant gewertet. Die Überlebenszeitanalyse (der Einfluss der Anzahl genetischer Veränderungen auf das Überleben) wurde mit Hilfe des Kaplan-Meier-Tests durchgeführt. Für die Signifikanztestung wurde ein Log-Rang-Test verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Merkmale

Alle Fälle wurden jeweils gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation für Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes als periphere T-Zell-Lymphome (PTCL-NOS) oder anaplastisch-großzellige T-Zell-Lymphome (ALCL) klassifiziert (Swerdlow et al. 2008).

Zusammenfassend zeigten 37 von 42 (88%) PTCL eine Expression von CD3, 27 (64%) von CD4, 5 (12%) von CD8 und 27 (64%) von CD5. Elf Fälle zeigten einen zytotoxischen Phänotyp mit Expression von TIA1 und/oder Granzym B. Bemerkenswerterweise zeigten 15 von 42 (36%) PTCL-NOS eine Expression von CD30. Diese Fälle zeigten jedoch allgemein nur eine schwache Färbung, die zudem nicht die Mehrheit der Tumorzellen umfasste. Außerdem fanden sich keine Zellen mit der charakteristischen Kernmorphologie der ALCL. Somit wurden diese Fälle gemäß der WHO-Klassifikation als PTCL-NOS und nicht als ALK-negative ALCL klassifiziert (Jaffe et al. 2001, Swerdlow et al. 2008).

3.2 CGH der PTCL-NOS

Von den PTCL-NOS wurden 42 Fälle durch CGH analysiert, davon 36 primäre PTCL-NOS und sechs Lymphom-Rezidive. Bei den primären PTCL-NOS (Fälle 1 bis 36) fanden sich bei 35 insgesamt 281 chromosomale Alterationen mit mehr Verlusten (n=159) als Zugewinnen (n=122) (Tabelle 2, Anhang). Nur ein Fall zeigte in der CGH keine genetischen Aberrationen. Die Anzahl der chromosomalen Imbalanzen der PTCL-NOS reichte von null bis 20 (Median sieben, im Durchschnitt 7,8). Die Anzahl der Verluste lag zwischen null und 13 (Median 3, im Durchschnitt 4,4) und die der Zugewinne zwischen null und zehn (Median 3, im Durchschnitt 3,4).

Die häufigsten rekurrenten Verluste von chromosomalem Material wurden auf Chromosom 13q (minimale Überlappungsregion 13q21; 13 Fälle, 36%), auf 6q

und 9p (6q21 und 9p21-pter; jeweils 11 Fälle, 31%), 10q und 12q (10q23-24 und 12q21-q22; je 10 Fälle, 28%) und 5q (5q21; 9 Fälle, 25%) beobachtet. Weitere häufige und rekurrente Verluste wurden auf den Chromosomen 8p (8p21-pter; 7 Fälle, 19%) und auf den Chromosomen 10p und 17p (10cen-p12 und 17p13; jeweils 6 Fälle, 17%) gefunden.

Besonders komplex waren Verluste auf dem langen Arm von Chromosom 6. Neben einer minimalen Überlappungsregion in der Bande 6q21, die in elf Fällen fehlte (31%), fehlte zudem rekurrent chromosomales Material anderer chromosomaler Banden, hierunter 6q22 (neun Fälle, 25%), 6q24-qter/6q15-q16 (acht Fälle, 22%) und 6q14/6q23 (sieben Fälle, 19%).

Zugewinne von chromosomalem Material in primären PTCL-NOS wurden am häufigsten auf Chromosom 7q (7q22-qter, elf Fälle, 31%), 17q (17cen-q21; neun Fälle, 25%), 16p (acht Fälle, 22%), 8q und 9q (8q24 und 9q33-qter; jeweils sieben Fälle, 19%), 3p, 1q und 11q (3p21, 1q32-qter und 11cen-q13; jeweils sechs Fälle, 17%) beobachtet.

Bei elf PTCL wurden insgesamt 16 High-Level-Amplifikationen beobachtet. Wiederholt zeigten sich diese in den chromosomalen Banden 12p13 (drei Fälle), 1p36 und 6p25 (jeweils zwei Fälle). Einzelne Amplifikationen fanden sich in den chromosomalen Banden 2cen-p22, 5q13, 6p12, 6p21, 8q23-q24, 11p11-p12, 14q22-qter, 15q15 und 22q13.

Sechs Fälle der PTCL-NOS waren Lymphomrezidive (Fälle 37 bis 42). In diesen zeigten sich rekurrente chromosomale Alterationen an ähnlichen Lokalisationen wie in den primären PTCL-NOS. Es fanden sich Verluste auf den Chromosomen 5q (5q21; drei Fälle, 50%) und 10 (zwei Fälle, 33%) sowie Zugewinne auf Chromosom 7q (drei Fälle, 50%).

In zwei Fällen konnten Folgebiopsien aus den Rezidiven der Lymphome analysiert werden. Beide Proben (vom Primärtumor und vom Rezidiv) von Fall 36 zeigten einen Verlust von Chromosom 3p21-p24 und einen Zugewinn auf Chromosom 9q. Zusätzlich fanden sich im Rezidiv im Vergleich zum Primärtumor Zugewinne auf den Chromosomen 1q, 5q, 14q und Xq, sowie Verluste auf den Chromosomen 6q und 15q. Bei Fall 40 fanden sich als

Gemeinsamkeit beider Proben Zugewinne auf den Chromosomen 2p, 6p, 7, 16p und 17q, sowie Verluste auf den Chromosomen 5q, 6q, 9, 10, 12q und 16q. Das Rezidiv zeigte außerdem Zugewinne auf den Chromosomen 9q und 12q. Besonders interessant war, dass der Zugewinn auf Chromosom 6p24-p25 beim Rezidiv ein deutlich stärkeres Signal zeigte und somit im Vergleich auf eine höhere Amplifikation hinwies.

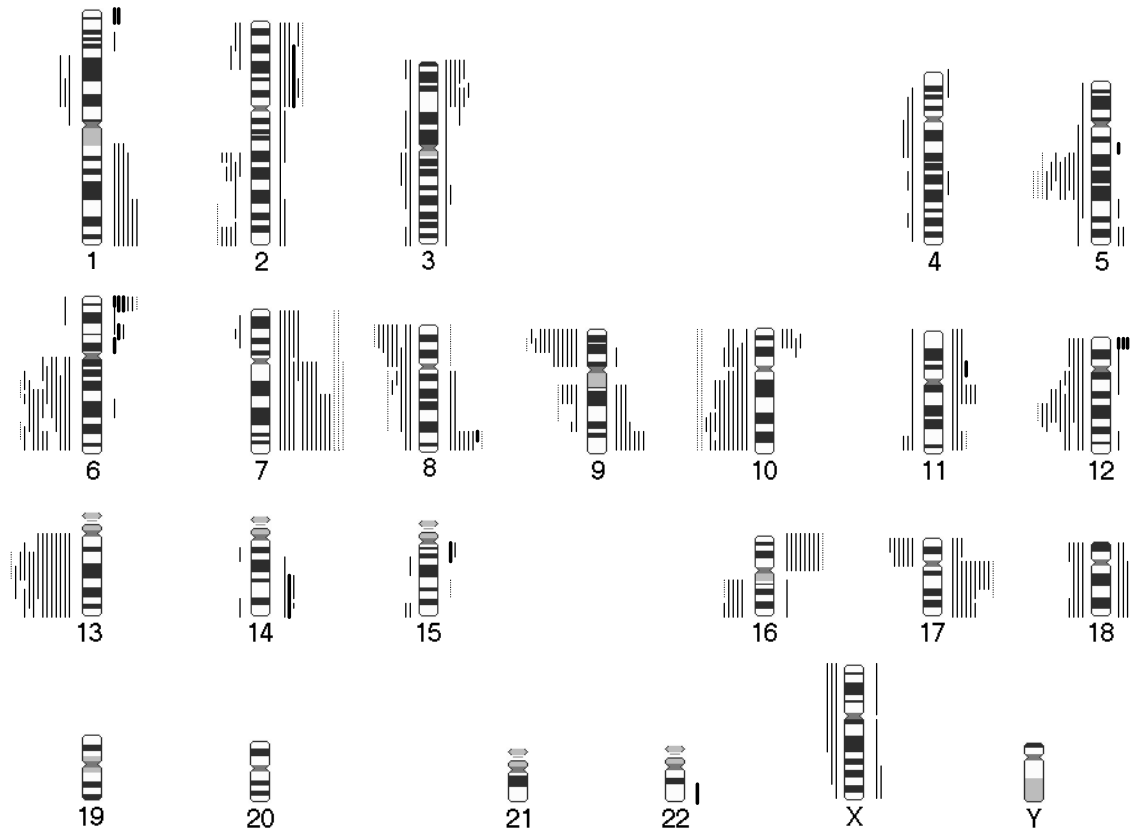
Die Ergebnisse der genetischen Veränderungen der PTCL-NOS wurden zu den klinischen Merkmalen und dem Immunphänotyp der entsprechenden Lymphome in Beziehung gesetzt.

Es konnte eine Gruppe von PTCL-NOS charakterisiert werden, die im Vergleich zu den anderen PTCL-NOS rekurrente Verluste auf den Chromosomen 5q, 10q und 12q zeigte. Zudem kennzeichnete diese Lymphomgruppe sowohl eine signifikant häufigere Expression von CD5 als auch ein Fehlen der Expression von zytotoxischen Markern wie Granzym B und TIA1 ($P < 0.05$). Es konnte in dieser Lymphomgruppe jedoch kein charakteristisches histomorphologisches Merkmal nachgewiesen werden. Beide Gruppen zeigten auch keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des klinischen Stadiums bei Diagnosestellung. Im Vergleich der Gesamtüberlebenszeiten von beiden Gruppen zeigten Fälle mit Verlusten auf Chromosom 5q/10q/12q allerdings eine signifikant höhere Überlebensrate als Fälle ohne diese chromosomalen Verluste.

Ferner zeigten Fälle mit Amplifikationen auf Chromosom 12p13 eine statistisch signifikante Korrelation mit einem zytotoxischen Immunphänotyp der Tumorzellen (Expression von TIA1 und/oder Granzym B).

Extranodale PTCL-NOS wiesen häufiger Zugewinne auf 9q33-qter auf. Es wurde keine statistisch signifikante Korrelation zwischen Gesamtanzahl der chromosomalen Alterationen, der Verluste und Zugewinne, sowie dem klinischen Verlauf beobachtet. Ebenso wurde keine statistisch signifikante Korrelation zwischen Verlusten auf den Chromosomen 13q, 6q und 9p sowie Zugewinnen auf 7q, den immunhistochemischen Expressionsprofilen und dem klinischen Verlauf festgestellt.

Abbildung 1: Chromosomale Zugewinne und Verluste bei peripheren T- Zell-Lymphomen (PTCL-NOS; n=42)



Legende zu Abbildung 1:

Linien rechts der Chromosomenideogramme: Zugewinne von chromosomalem Material

Linien links der Chromosomenideogramme: Verluste von chromosomalem Material

Dicke Linien: mehrfache Zugewinne/Genamplifikationen

Kontinuierliche Linien: chromosomale Imbalancen bei primären de novo PTCL-NOS

Diskontinuierliche Linien: chromosomale Imbalancen bei Rezidiven der PTCL-NOS

**Abbildung 2: Verluste von Chromosom 5q21 sind charakteristisch für
PTCL-NOS**

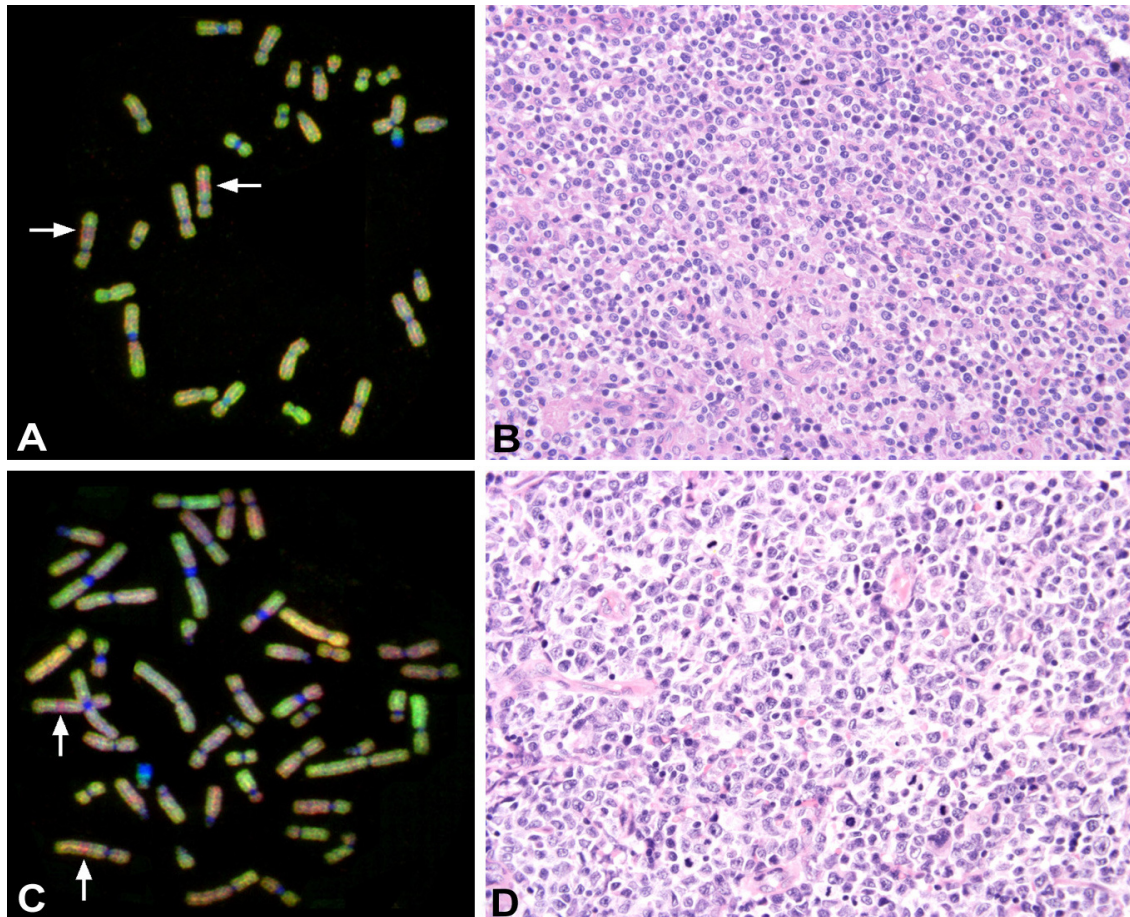


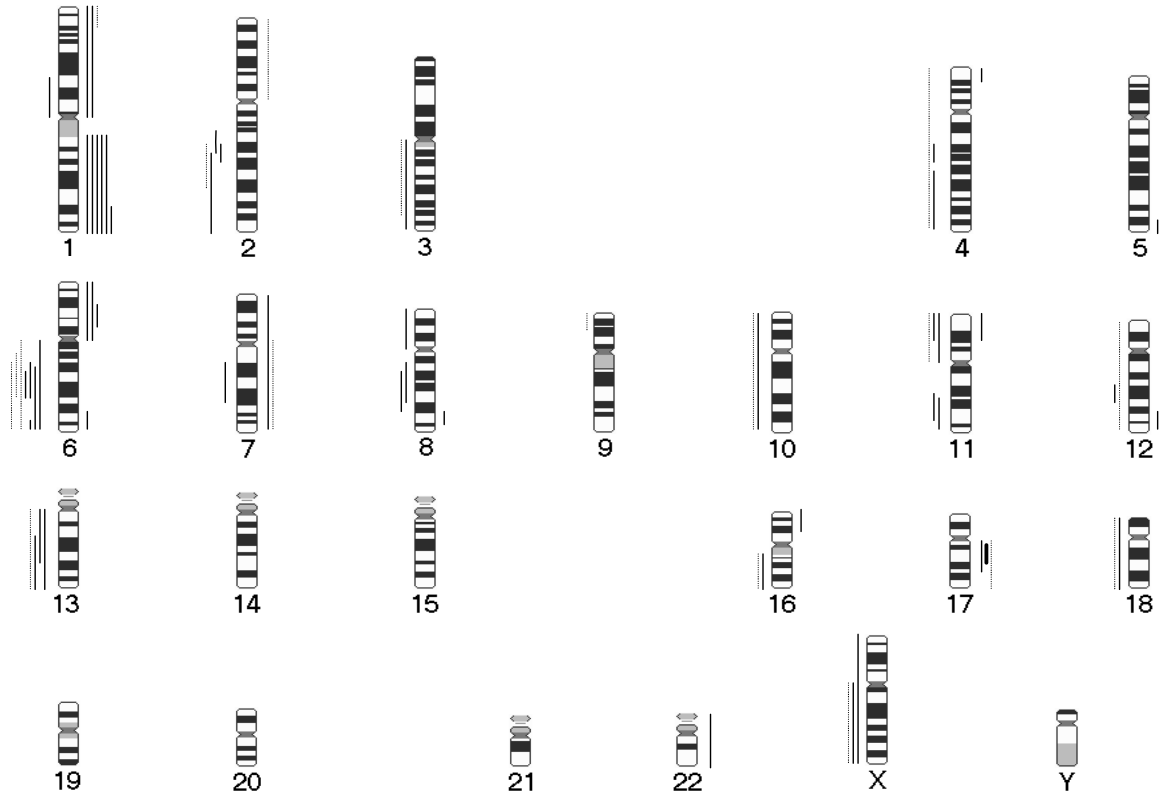
Abbildung 2: Charakteristische CGH Ergebnisse zweier PTCL-NOS Fälle, die Verluste von chromosomalem Material auf 5q aufweisen. Trotz heterogener Tumormorphologie zeigten Fälle mit 5q- (und 10q/12q) Verlusten signifikant häufigere Expression für CD5 sowie Negativität für zytotoxische Marker.

3.3 CGH der ALK-negativen ALCL

17 Fälle von ALK-negativen ALCL wurden mittels CGH analysiert. Davon stammten 13 von Primärtumoren und vier von Lymphomrezidiven. Von den 13 primären ALK-negativen ALCL (Fälle 52 bis 64) zeigten neun Fälle zusammen 49 chromosomale Alterationen, davon 20 Zugewinne und 29 Verluste (Tabelle 3, Anhang). Die Anzahl der chromosomalen Veränderungen pro Fall reichte von null bis 12 (Median 4, Durchschnitt 3.8). Dabei lag die Anzahl der Verluste zwischen null und sieben (Median 1, Durchschnitt 2.2) und die Anzahl der Zugewinne zwischen null und fünf (Median 1, Durchschnitt 1.5).

Die häufigste genetische Alteration von primären ALK-negativen ALCL war ein Zugewinn auf Chromosom 1q (1q41-qter; sechs Fälle, 46%). Rekurrente Verluste von chromosomalem Material wurden auf den Chromosomen 6q (6q21-q22; vier Fälle, 31%) und 13q (13q21-q22; drei Fälle, 23%) beobachtet. Eine High-Level-Amplifikation fand sich auf Chromosom 17q (17q12-q21). Von den vier Rezidivfällen der ALK-negativen ALCL (Fälle 65 bis 68) zeigten drei Fälle zudem Verluste von chromosomalem Material auf Chromosom 6q (6q21-q22, 75%) (Tabelle 3, Anhang).

**Abbildung 3: Chromosomale Zugewinne und Verluste bei ALK-negativen
anaplastisch-großzelligen T-Zell-Lymphomen (n=17)**



Legende zu Abbildung 3:

**Linien rechts der Chromosomenideogramme: Zugewinne von
chromosomalem Material**

**Linien links der Chromosomenideogramme: Verluste von
chromosomalem Material**

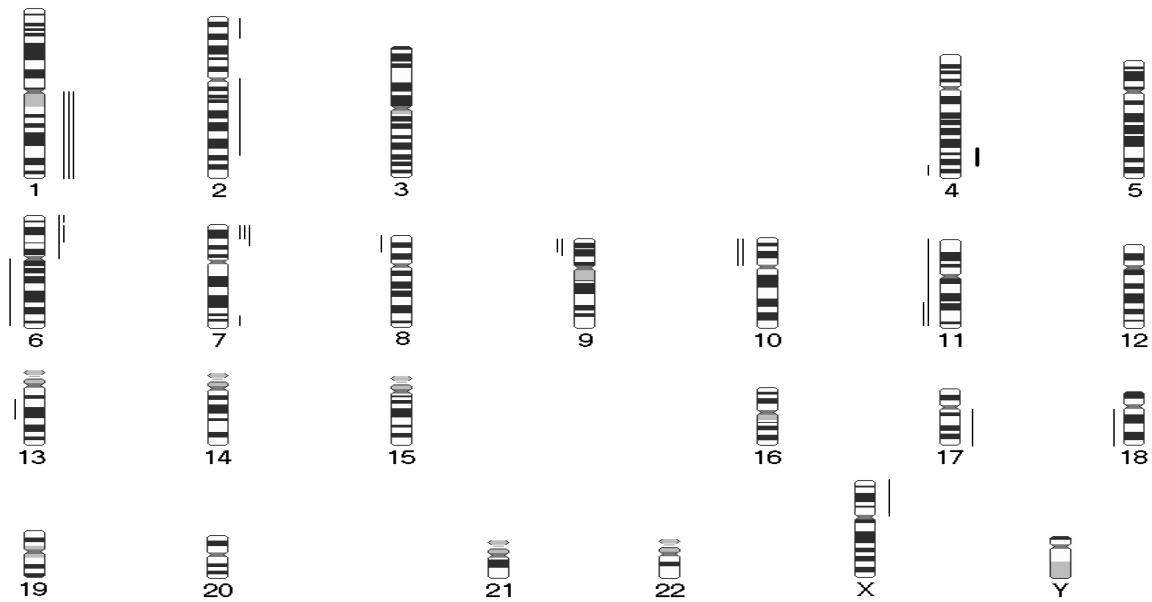
Dicke Linien: mehrfache Zugewinne/Genamplifikationen

3.4 CGH der ALK-positiven ALCL

Aus der Gruppe der ALK-positiven ALCL wurden neun Fälle durch CGH analysiert (Fälle 43 bis 51). Hiervon zeigten acht Fälle chromosomale Zugewinne und Verluste mit einer Anzahl von null bis sieben chromosomalen Alterationen (Tabelle 3, Anhang). Insgesamt wurden 16 Zugewinne und zehn Verluste beobachtet (Median 2, Durchschnitt 2.9 chromosomale Veränderungen pro Fall).

Rekurrente Zugewinne fanden sich auf den Chromosomen 1q, 7p und 6p (jeweils drei Fälle, 33%). Rekurrente Verluste zeigten sich auf den Chromosomen 9p, 10p und 11q (jeweils zwei Fälle, 22%). In einem Fall (Fall 47), einem Lymphomrezidiv, wurde eine High-Level-Amplifikation auf Chromosom 4q31-q34 beobachtet.

**Abbildung 4: Chromosomale Zugewinne und Verluste bei ALK-positiven
anaplastisch-großzelligen T-Zell-Lymphomen (n=8)**



Legende zu Abbildung 4:

Linien rechts der Chromosomenideogramme: Zugewinne von chromosomalem Material

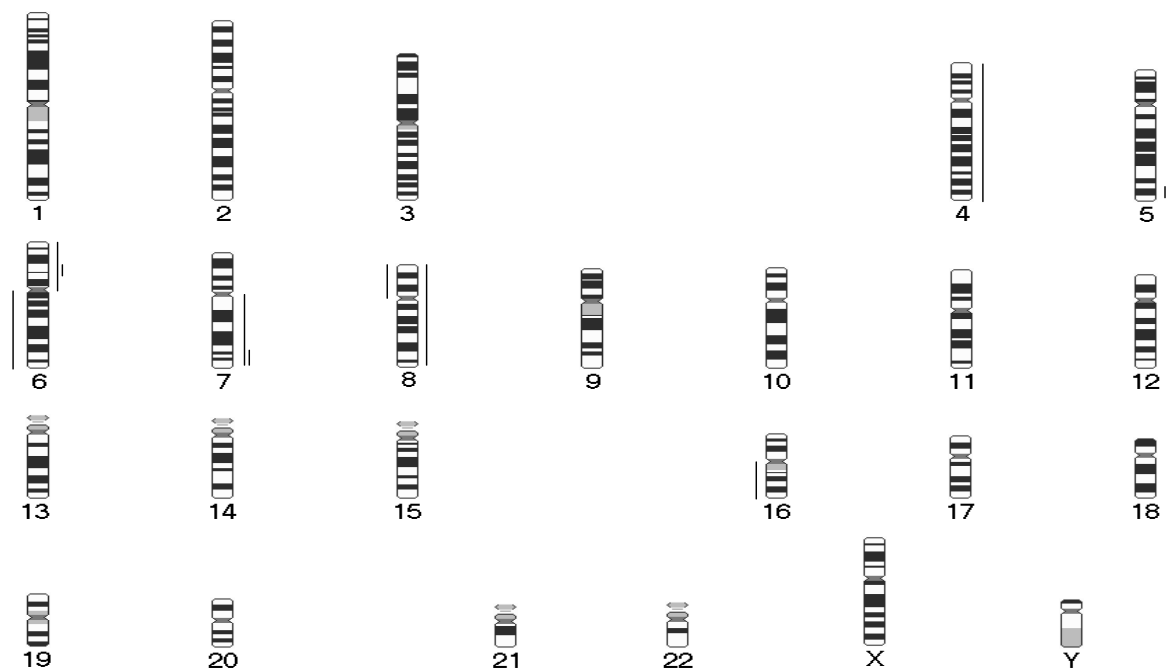
Linien links der Chromosomenideogramme: Verluste von chromosomalem Material

Dicke Linien: mehrfache Zugewinne/Genamplifikationen

3.5 CGH der kutanen ALCL

Von primären kutanen ALCL wurden elf Fälle durch CGH analysiert (Fälle 69 bis 79), wovon sieben chromosomale Veränderungen zeigten (Tabelle 3, Anhang). Insgesamt fanden sich nur sieben Zugewinne und drei Verluste (Median 1, Durchschnitt 0.9). In jeweils zwei Fällen (18%) konnten Zugewinne auf den Chromosomen 6p und 7q beobachtet werden. Es fanden sich keine High-Level-Amplifikationen.

Abbildung 5: Chromosomale Zugewinne und Verluste bei kutanen anaplastisch-großzelligen T-Zell-Lymphomen (n=11)



Legende zu Abbildung 5:

Linien rechts der Chromosomenideogramme: Zugewinne von chromosomalem Material

Linien links der Chromosomenideogramme: Verluste von chromosomalem Material

Dicke Linien: mehrfache Zugewinne/Genamplifikationen

3.6 Vergleich der Genetik von unterschiedlichen T-NHL

Die chromosomalen Alterationen, die mittels komparativer genomischer Hybridisierung bei primären peripheren T-Zell-Lymphomen (PTCL-NOS) und ALK-negativen anaplastisch-großzelligen T-Zell-Lymphomen (ALCL) gefunden worden waren, wurden mit den Alterationen bei Enteropathie-assoziierten T-Zell-Lymphomen (EATCL) verglichen. Zudem erfolgte ein Vergleich mit in der Literatur publizierten Ergebnissen über komparative genomische Hybridisierung von Prolymphozyten-Leukämien von T-Zell-Typ (T-PLL) und aggressiven adulten T-Zell-Lymphomen (ATCL) (Soulier et al. 2000, Tsukasaki et al. 2000, Zettl et al. 2002).

PTCL-NOS und ALK-negative ALCL zeigten viele gemeinsame rekurrente chromosomale Alterationen in identischer Lokalisation, wie zum Beispiel die Verluste auf den Chromosomen 6q und 13q.

Sie unterschieden sich jedoch in Hinsicht auf Verluste auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (9p21-pter). Diese waren in 31% der PTCL-NOS, aber nie bei den ALCL nachweisbar (Exakter Test auf Unabhängigkeit nach Fisher, $P=0.0244$).

Außerdem zeigten ALK-negative ALCL im Vergleich zu PTCL-NOS häufiger Zugewinne auf Chromosom 1q (46% versus 17%, Exakter Test nach Fisher, $P=0.0577$). Unter Einbeziehung der Rezidivfälle beobachtete man bei PTCL-NOS häufiger Verluste auf Chromosom 5q als bei ALK-negativen ALCL (33% versus 0%; Exakter Test nach Fisher, $P=0.0126$).

Zudem fanden sich bei PTCL-NOS charakteristische genetische Veränderungen im Vergleich mit jenen von EATCL, T-PLL und ATCL (für alle im Folgenden angegebene chromosomale Loci $P < 0.05$ im Exakten Test auf Unabhängigkeit nach Fisher).

Verluste von Chromosom 12q21-q22 unterschieden PTCL-NOS von T-PLL, EATCL und ATCL. Verluste von 5q21-q22, 6q21-q22, 10q23-q24 und 13q21 unterschieden PTCL-NOS von EATCL und ATCL. Verluste von Chromosom 9p und Zugewinne auf Chromosom 17cen-q21 grenzten PTCL-NOS von ATCL ab.

Außerdem zeigte sich ein signifikanter Unterschied von PTCL-NOS gegenüber EATCL hinsichtlich des seltenen Vorkommens von Zugewinnen auf den Chromosomen 8q und 14q, sowie den Verlusten auf 8p und 11q. PTCL-NOS unterschieden sich zudem von aggressiven ATCL aufgrund der seltenen Zugewinne auf Chromosom 3 und 14.

ALK-negative ALCL unterschieden sich von EATCL, T-PLL und ATCL durch verschiedene chromosomale Alterationen. Zugewinne auf Chromosom 1q grenzten ALCL von T-PLL und EATCL ab. Außerdem beobachtete man bei ALK-negativen ALCL weder die typischen rekurrenten Zugewinne (auf Chromosom 8q, 14q) und Verluste (auf Chromosom 8p, 11q) der T-PLL, sowie die rekurrenten charakteristischen Zugewinne bei EATCL (auf Chromosom 9q), noch zeigten sich gemeinsame chromosomale Charakteristika mit aggressiven ATCL (Zugewinne auf den Chromosomen 3 und 14q).

Tabelle 1: Vergleich der Häufigkeit numerischer chromosomaler

Alterationen bei unterschiedlichen, mittels CGH

charakterisierten T-Zell-Lymphomen

		PTCL	ALK-neg. ALCL	EATCL	T-PLL	ATCL
		n=36	n=13	n=38 (Zettl)	n=22 (Soulier)	n=46 (Tsukasaki)
Chr.	MOR	n	n	n	n	n
+1q	1q32-qter	6 17%	6 46%	5 13%	0 0%	11 24%
+3p	3p21	6 17%	0 0%	0 0%	1 4%	17 37%
+3p	3p24-pter	3 14%	0 0%	1 3%	1 4%	17 37%
+3q		2 6%	0 0%	0 0%	0 0%	16 35%
-5q	5q21-q22	9 25%	0 0%	1 3%	1 4%	4 9%
-6q	6q21-q22	11 31%	4 31%	3 8%	8 36%	4 9%
+7q	7q22-qter	11 31%	1 8%	8 21%	2 9%	15 33%
-8p	8p21-pter	7 19%	1 8%	8 21%	19 86%	3 7%
+8q	8q24	8 19%	1 8%	4 11%	18 82%	5 11%
-9p	9p21-pter	11 31%	0 0%	7 18%	6 27%	0 0%
+9q	9q33-qter	7 19%	0 0%	20 53%	0 0%	6 13%
-10q	10q23-24	10 28%	1 8%	2 5%	2 5%	3 7%
-11q	11q23-qter	3 8%	2 15%	4 11%	15 68%	0 0%
-12q	12q21-q22	10 28%	1 8%	1 3%	0 0%	1 2%
-13q	13q21	13 36%	3 23%	5 14%	9 41%	2 4%
+14q	14q32	3 8%	0 0%	1 3%	11 50%	15 33%
+17q	17cen-q21	9 25%	2 15%	3 8%	3 14%	2 4%

Legende zu Tabelle 1:

Chr.: Chromosom, MOR: Minimale Überlappungsregion

Die hervorgehobenen chromosomalen Veränderungen sind für die entsprechende T- Zell Lymphomentität charakteristisch.

4 Diskussion

Periphere T-Zell-Lymphome, nicht weiter spezifiziert (PTCL-NOS) und anaplastisch-großzellige T-Zell-Lymphome (ALCL) sind die häufigsten reifen T- und NK-Zell-Lymphome (Jaffe et al. 2001, Swerdlow et al. 2008). Trotz ihres großen Anteils an allen T-Zell-Lymphomen waren die genetischen Charakteristika dieser Lymphome bis zu diesen Untersuchungen weitestgehend unbekannt. Hiervon ausgenommen waren die bei ALK-positiven ALCL zuvor gefundene Translokation t(2;5) und ihre Varianten.

In den Untersuchungen von 79 Fällen von PTCL-NOS und ALCL mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) wurden bislang unbekannte und rekurrente charakteristische chromosomale Alterationen gefunden, die bei der exakten Definition dieser Lymphomentitäten von Bedeutung sein könnten.

4.1 Analyse der peripheren T-Zell-Lymphome (PTCL-NOS)

Die hier untersuchten peripheren T-Zell-Lymphome (PTCL-NOS) waren 42 tumorzellreiche Lymphome, die hauptsächlich nodaler Herkunft waren (93% der Fälle), häufig CD3 (88% der Fälle), CD4 (64%) und CD5 (64%) exprimierten und in 26% der Fälle einen zytotoxischen Phänotyp aufwiesen.

In früheren Untersuchungen war mittels klassischer zytogenetischer Methoden bei einer allerdings nur kleinen Anzahl von vergleichbaren Fällen, damals als sogenannte „high-grade“ periphere T-Zell-Lymphome, NOS klassifiziert, ein hoher Grad an chromosomaler Komplexität, Polyploidie und Aberrationen nachgewiesen worden (Schlegelberger et al. 1994; Schlegelberger et al. 1996; Lepetre et al. 2000). Hiermit übereinstimmend zeigten die PTCL-NOS im Rahmen dieser Untersuchungen in 43 von 44 Fällen (98%) im Durchschnitt mehr als sieben genetische Alterationen. Hierunter fanden sich besonders häufig rekurrente Verluste auf den Chromosomen 6q, 13q, 9p, 5q, 10q und 12q sowie häufige rekurrente Zugewinne auf Chromosom 7q.

Die häufigsten genetischen Alterationen in T- und B-Zell-Lymphomen stellen Verluste von genetischem Material auf den Chromosomen 6q und 13q dar (Zhang et al. 2000). Ähnlich wie die CGH-Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten 20 bis 35% der PTCL-NOS in den Untersuchungen der klassischen Zytogenetik Verluste auf Chromosom 6q (Schlegelberger et al. 1994; Schlegelberger et al. 1996; Lepetre et al. 2000). Ebenso wurden in anderen T-Zell-Lymphomentitäten wie Adulten T-Zell-Lymphomen (ATCL), Prolymphozyten-Leukämien vom T-Zell-Typ (T-PLL) und NK-Zell-Lymphomen/Leukämien durch CGH-Untersuchungen Verluste auf Chromosom 6q beobachtet (Tsukasaki et al. 2000; Soulier et al. 2000; Siu et al. 1999). In Analogie zur klassischen Zytogenetik von PTCL-NOS in früheren Untersuchungen war 6q21 auch in diesen Untersuchungen die minimale Überlappungsregion. Es wurden jedoch rekurrente chromosomale Verluste häufig auch in den chromosomalen Banden 6q14-q16 und 6q23-q24 beobachtet (19 bis 22% der Fälle).

In mehr als einem Drittel der Fälle der PTCL-NOS fanden sich Verluste auf Chromosom 13q. Die häufigsten chromosomalen Verluste der PTCL-NOS bei Erstdiagnose stellten sich in der minimalen Überlappungsregion 13q21 dar. In früheren genetischen Studien durch klassische Zytogenetik zeigten PTCL-NOS in 14 bis 26% der Fälle Verluste auf Chromosom 13q (Schlegelberger et al. 1994; Schlegelberger et al. 1996; Lepetre et al. 2000; Rosenwald et al. 1999). Diese rekurrenten Verluste auf Chromosom 13q wurden bereits in CGH-Untersuchungen von ATCL, T-PLL, Sézary-Syndrom und NK-Zell-Neoplasien berichtet (Tsukasaki et al. 2000; Soulier et al. 2000; Siu et al. 1999; Karenko et al. 1999).

In den hier untersuchten PTCL-NOS fand sich als die minimale Überlappungsregion die chromosomale Bande 13q21. Diese war telomerisch zur chromosomalen Bande 13q14, die sowohl in einer Vielzahl von B-Zell-Lymphomen, als auch in klassischen zytogenetischen Analysen von PTCL-NOS chromosomale Verluste zeigte. Eine zweite minimale Überlappungsregion auf Chromosom 13q war 13q31-qter, die bemerkenswerterweise der minimalen

Überlappungsregion von chromosomalen Verlusten in aggressiven ATCL entspricht (Tsukasaki et al. 2000).

Eine weitere rekurrente genetische Alteration bei den hier untersuchten PTCL-NOS war ein Zugewinn auf Chromosom 7q, der in 31% der PTCL-NOS bei Erstdiagnose und in 50% der Rezidive von PTCL-NOS beobachtet wurde. Zugewinne auf Chromosom 7q wurden in der bisher vorliegenden Literatur ebenso wie Verluste auf den Chromosomen 6q und 13q als gemeinsame sekundäre chromosomale Alterationen beschrieben, die mit einer Lymphomprogression assoziiert sein können und in einer Reihe von B- und T-Zell-Lymphomen nachgewiesen wurden (Gebhart 2005).

Bemerkenswerterweise wurde in diesen Untersuchungen keine statistische Korrelation zwischen klinischen Parametern, Immunphänotyp oder histomorphologischen Charakteristika der Lymphome und Zugewinnen auf Chromosom 7q oder Verluste auf den Chromosomen 6q und 13q beobachtet. Diese Ergebnisse können als indirekter Hinweis auf eine sekundäre Entstehung dieser genetischen Alterationen in der Pathogenese der PTCL-NOS interpretiert werden.

4.1.1 Abgrenzung von Subgruppen von peripheren T-Zell-Lymphomen (PTCL-NOS)

Bisher war bei PTCL-NOS nicht über rekurrente chromosomale Verluste auf den Chromosomen 5q, 10q und 12q berichtet worden.

In unseren Untersuchungen wurden Verluste auf dem Chromosom 5q, mit 5q21-q22 als minimaler Überlappungsregion, bei 25% der PTCL-NOS bei Erstdiagnose und bei 50% der Rezidive von PTCL-NOS beobachtet. Obwohl diese chromosomale Region das Tumorsuppressor-Gen APC beinhaltet, konnte dort bisher kein Gen identifiziert werden, das bei der Pathogenese von T-Zell-Lymphomen eine Rolle spielen könnte. Interessanterweise wurden kleine interstitielle Deletionen in exakt derselben chromosomalen Region bereits zuvor in anderen Typen von T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (T-NHL) beobachtet.

Tsukasaki et al. berichteten in ihrer Arbeit über aggressiven ATCL von kleinen interstitiellen Verlusten in der minimalen Überlappungsregion 5q21-q22 in vier von 46 untersuchten Fällen (9%) (Tsukasaki et al. 2000). Gleichermaßen zeigte sich in Untersuchungen von Fällen von Sézary-Lymphomen mittels CGH in zwei von sieben Fällen ein Verlust auf Chromosom 5. In einem dieser Fälle zeigte sich eine Deletion auf Chromosom 5q14-q23, welche die kleinste deletierte Region, die in diesen Untersuchungen erstmals bei PTCL-NOS beschrieben wird, einschließt (Karenko et al. 1999). Somit könnte es sein, dass Gene, die in der minimalen Überlappungsregion 5q21-q22 lokalisiert sind, eine wichtige Rolle in der Pathogenese von T-NHL spielen, insbesondere in der Lymphomgenese der PTCL-NOS.

28% der PTCL-NOS zeigten Verluste auf Chromosom 12q, wobei 12q21-q22 die minimale Überlappungsregion darstellte. Die chromosomale Region 12q21-q22 beinhaltet mehrere Gene, die potentiell in die Pathogenese der T-Zell-Lymphome involviert sein könnten. Hierunter finden sich Gene, die bei der Apoptoseregulation beteiligt sind, wie TDAG51 (T-cell-death-associated-gene 51) (Neef et al. 2002), RAIDD/CRAD (Casp2 und Ripk1 domain-containing adaptor with death domain) (Ahmad et al. 1997; Hofmann et al. 2001) und BTG1 (B-cell-translocation gene 1), ein Gen, das die Lymphozytenproliferation hemmt (Rouault et al. 1992; Sasajima et al. 2002).

Weitere rekurrente Verluste wurden zudem auf Chromosom 10q beobachtet (minimale Überlappungsregion 10q23-q24). Die Deletionen auf 10q wurden in der klassischen Zytogenetik und CGH der T-Zell-Lymphome bislang nur selten beobachtet (Schlegelberger et al. 1994; Schlegelberger et al. 1996; Lepetre et al. 2000; Tsukasaki et al. 2000; Soulier et al. 2000; Karenko et al. 1999). Mehrere Gene, die potentiell in die T-Zell-Lymphomentstehung involviert sein könnten, wurden in dieser minimalen Überlappungsregion 10q23-q24 gefunden, unter ihnen das Tumorsuppressor-Gen LGI1 (leucine-rich gene 1, lokalisiert auf 10q24) (Chernova et al. 1998), MXI1 (max interacting protein 1) (Wechsler et al. 1994) und das Apoptose-Gen FAS. Auf der chromosomalen Bande 10q23.3 ist zudem das Tumorsuppressor-Gen PTEN lokalisiert. PTEN hat sich als ein wichtiger Regulator der T-Zell-Homöostase erwiesen (Suzuki et al. 2001;

Suzuki et al 1998). Mäuse, in welchen PTEN spezifisch nur in T-Zellen ausgeschaltet wurde (T-Zell-spezifische PTEN Knockout-Mäuse) entwickeln sehr häufig CD4-positive T-Zell-Lymphome (Suzuki et al. 2001). Gleichmaßen zeigen Mäuse mit heterozygot mutiertem PTEN eine erhöhte Inzidenz von T-Zell-Lymphomen, die durch einen Verlust des Wild-Typ-Allels von PTEN gekennzeichnet sind (Suzuki et al. 1998). Die Signifikanz der rekurrenten chromosomalen Alterationen auf den Chromosomen 5q, 10q und 12q bei PTCL-NOS wurde zudem dadurch unterstrichen, dass Lymphome mit Verlusten eines dieser Genloci gemeinsame klinische und immunhistochemische Merkmale zeigten. Bemerkenswerterweise hob sich diese Lymphomgruppe in multivariater statistischer Analyse von den restlichen, histologisch nicht unterscheidbaren PTCL-NOS durch signifikant häufigere Expression von CD5 und Negativität für zytotoxische Marker ab. Außerdem zeigten diese Fälle, obwohl hier nur bei einer geringen Anzahl von Fällen klinische Informationen verfügbar waren, eine bessere Überlebenszeit im Vergleich zu Fällen ohne Verluste auf den Chromosomen 5q/10q/12q.

Es wurden in diesen Untersuchungen zudem zwei weitere bemerkenswerte Beziehungen zwischen den genetischen und klinischen/immunhistochemischen Charakteristika der Lymphome beobachtet. Zum einen fand sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen extranodaler Lymphommanifestation und chromosomalen Zugewinnen auf Chromosom 9q, welche die minimale Überlappungsregion einschlossen, die zuvor für EATCL beschrieben wurde (Zettl et al. 2002). Somit weisen diese Daten darauf hin, dass zumindest einige der T-Zell-Lymphome, die in die heterogene Kategorie der PTCL-NOS eingeordnet werden, und zwar vor allem jene mit extranodaler Krankheitsmanifestation, gemeinsame genetische Charakteristika mit EATCL aufweisen könnten. Zum anderen zeigten alle Fälle mit chromosomalen Amplifikationen auf 12p13 einen zytotoxischen Phänotyp und waren CD5-negativ, so dass auch diese Lymphomgruppe eine weitere genetische und immunphänotypische Subform innerhalb der PTCL-NOS bilden könnte.

4.2 Genetische Abgrenzung der PTCL-NOS von ALCL

Die Unterscheidung von verschiedenen T-Zell-Lymphomarten in der WHO-Klassifikation basiert in erster Linie auf der Morphologie, der Immunhistochemie und klinischen Merkmalen (Jaffe et al. 2001, Swerdlow et al. 2008).

Aufgrund dieser Charakteristika werden drei Typen von ALCL unterschieden, nämlich die ALK-positiven ALCL, die primär systemischen ALK-negativen ALCL und die primär kutanen ALCL (Stein et al. 2000). Die genetische Beziehung von ALK-negativen ALCL zu PTCL-NOS ist umstritten. Die Entdeckung der ALK-assoziierten Translokation t(2;5), die sich in 60 bis 80% der ALCL findet, und ihre prognostische Bedeutung haben die Diskussion aufgeworfen, ob diese primäre genetische Alteration alleine ALCL als Lymphomentität definieren sollte, während Fälle, denen diese Translokation und ALK-Expression fehlen, als eigene Entität, nämlich als eine Untergruppe der PTCL-NOS, klassifiziert werden sollte (Jaffe et al. 2001; Stein et al. 2000). Die morphologische Unterscheidung zwischen PTCL-NOS und ALK-negativen ALCL ist umstritten, jedoch werden in der aktuellen WHO-Klassifikation PTCL-NOS und ALK-negative ALCL als separate Lymphomentitäten differenziert. Gemäß den Kriterien der WHO-Klassifikation wurden in diesen Untersuchungen zur Differenzierung zwischen PTCL-NOS und ALK-negativen ALCL nur Fälle als ALK-negative ALCL definiert, wenn die Lymphome hauptsächlich aus Lymphomzellen mit reichlich Zytoplasma bestanden, die typischen ausgeprägten pleomorphen, embryoartigen Kerne zeigten, sowie in der Mehrheit der Zellen eine starke Expression von CD30 mit einer Anfärbung der Zellmembran oder des Golgiapparates nachweisbar war (Jaffe et al. 2001, Swerdlow et al. 2008). Lymphome, die diese morphologischen Kriterien nicht zeigten und/oder nur schwach oder teilweise CD30 exprimierten, wurden als PTCL-NOS klassifiziert.

Insgesamt zeigten ALK-negative ALCL im Durchschnitt zwar weniger genetische Imbalancen als PTCL-NOS, aber mehr genetische Imbalancen als ALK-positive ALCL (Median 4 genetische Veränderungen bei ALK-negativen ALCL im Gegensatz zu 7,3 Veränderungen bei PTCL-NOS und 2

Veränderungen bei ALK-positiven ALCL; $p < 0.05$). Zudem unterschieden sich ALK-negative ALCL genetisch von PTCL-NOS bezüglich der Verluste auf den Chromosomen 5q und 9p, während beide Entitäten auch viele rekurrente genetische Veränderungen, wie Verluste auf den Chromosomen 6q, 10q, 12q und 13q, sowie Zugewinne auf Chromosom 7q gemeinsam aufwiesen. In diesen Untersuchungen wurden keine Verluste auf den Chromosomen 5q (5q21) und 9p (9p21-pter) bei ALK-negativen ALCL beobachtet und bemerkenswerterweise auch keine Verluste auf Chromosom 5q21 bei ALK-positiven ALCL, kutanen ALCL oder EATCL mit anaplastischer Morphologie, wohingegen diese Verluste auf den Chromosomen 5q (5q21) und 9p (9p21-pter) in 25% bzw. 31% der PTCL-NOS beobachtet werden konnten.

4.3 Genetische Abgrenzung der PTCL-NOS und ALCL von T-PLL, EATCL und ATCL

PTCL-NOS und ALK-negative ALCL unterscheiden sich in ihren genetischen Charakteristika signifikant von jenen der EATCL, T-PLL und aggressiven ATCL gemäß ihrer Differenzierung als unterschiedliche T-Zell-Lymphomarten in der WHO-Klassifikation (Zettl et al. 2002; Tsukasaki et al. 2000; Soulier et al. 2000).

In diesen vergleichenden Untersuchungen zeigten sich PTCL-NOS erstmals durch Verluste auf Chromosom 5q charakterisiert, die sie von allen anderen Arten von T-Zell-Lymphomen, soweit sie bisher genetisch untersucht waren, differenzieren. Weiterhin fanden sich charakteristische Verluste auf Chromosom 12q, die sie somit von T-PLL, EATCL und aggressiven ATCL genetisch abgrenzen. Andererseits zeigen PTCL-NOS und ALK-negative ALCL sehr selten die charakteristischen genetischen Merkmale von T-PLL (wie Zugewinne auf den Chromosomen 8q und 14q, sowie Verluste auf den Chromosomen 8p und 11q), von EATCL (wie Zugewinne auf Chromosom 9q) und von aggressiven ATCL (wie Zugewinne auf Chromosom 3).

Zusammenfassend zeigten diese Untersuchungen, dass sich bei den morphologisch und immunhistochemisch heterogenen PTCL-NOS distinkte

chromosomale Alterationen fanden, die in anderen nach der WHO-Klassifikation definierten T-Zell-Lymphomentitäten nicht nachweisbar sind. Dem gegenüber konnten bei PTCL-NOS zahlreiche charakteristische numerische Alterationen, die homogenere T-Zell-Lymphomentitäten charakterisieren (wie EATCL, T-PLL, ATCL), nicht nachgewiesen werden.

Innerhalb der Gruppe von PTCL-NOS ließ sich eine Gruppe von nicht-zytotoxischen nodalen CD5-positiven T-Zell-Lymphomen abgrenzen, die durch rekurrente chromosomale Verluste auf den Chromosomen 5q, 12q und 10q charakterisiert sind. Daneben zeigten diese Untersuchungen, dass sich PTCL-NOS und ALK-negative ALCL durch Verluste auf den Chromosomen 5q und 9p (bei PTCL-NOS) sowie durch Zugewinne auf Chromosom 1q (bei ALCL), bei sonst erheblicher Überschneidung der genetischen Merkmale von ALK-negativen ALCL und PTCL-NOS, unterscheiden.

Beide, PTCL-NOS und ALK-negative ALCL, unterscheiden sich somit genetisch voneinander und von anderen genetisch untersuchten T-Zell-Lymphom-Arten, wie T-PLL, ATCL und EATCL.

5 Zusammenfassung

Obwohl sie die Mehrzahl der T-Zell-Lymphome darstellen, war über die Genetik der PTCL-NOS und ALK-negativen ALCL bisher nur wenig bekannt. Klassische zytogenetische Untersuchungen dieser Gruppe wiesen auf komplexe chromosomale Veränderungen hin. Aufgrund der Seltenheit dieser Neoplasien basierten die Berichte bis jetzt nur auf einer geringen Anzahl von Fällen (Schlegelberger et al. 1994; Schlegelberger et al. 1996; Lepetre et al. 2000; Renedo et al. 2001). Für die heterogene Gruppe von PTCL-NOS konnten bisher keine charakteristischen genetischen Veränderungen beschrieben werden. Zudem waren die genetische Beziehung zwischen ALK-negativen ALCL und PTCL-NOS, die Genetik von kutanen ALCL und die sekundären genetischen Veränderungen in ALK-positiven ALCL unklar.

In dieser Untersuchung wurden 42 PTCL-NOS und 37 ALCL, davon 17 anaplastisch-großzellige Kinase (ALK)-negative ALCL, 9 ALK-positive ALCL und 11 kutane ALCL, durch komparative genomische Hybridisierung analysiert und charakteristische rekurrente genetische Alterationen nachgewiesen.

Unter 36 primär diagnostizierten PTCL-NOS fanden sich rekurrente chromosomale Verluste auf den Chromosomen 13q (minimal überlappende Region 13q21, 36% der Fälle), 6q und 9p (6q21 und 9p21-pter, in 31% der Fälle), 10q und 12q (10q23-24 und 12q21-q22, in 28% der Fälle) und 5q (5q21, 25% der Fälle). Rekurrente Zugewinne wurden auf Chromosom 7q22-qter (31% der Fälle) gefunden. In 11 PTCL-NOS wurden High-level-Amplifikationen beobachtet.

Bei den PTCL-NOS konnte zudem eine Gruppe von nicht-zytotoxischen nodalen CD5-positiven T-Zell-Lymphomen abgegrenzt werden, die durch rekurrente chromosomale Verluste auf den Chromosomen 5q, 12q und 10q charakterisiert ist.

Während kutane und ALK-positive ALCL wenige rekurrente chromosomale Veränderungen zeigten, fielen bei ALK-negativen ALCL wiederholt Zugewinne

auf Chromosom 1q (1q41-qter, 46%) und Verluste auf Chromosom 6q (6q21, 31%) und 13q (13q21-q22, 23%) auf.

Insgesamt können somit PTCL-NOS von ALK-negativen ALCL durch Verluste auf den Chromosomen 5q und 9p (bei PTCL-NOS) sowie durch Zugewinne auf Chromosom 1q (bei ALCL) abgegrenzt werden. PTCL-NOS und ALK-negative ALCL unterscheiden sich genetisch außerdem von anderen T-NHL, wie Enteropathie-assoziierte T-Zell-Lymphome, Prolymphozyten-Leukämien vom T-Zell-Typ und adulte T-Zell-Leukämien/Lymphomen.

6 Abkürzungen

ALCL	Anaplastisch-großzelliges T-Zell-Lymphom
ALK	anaplastic large cell kinase (anaplastisch-großzellige Kinase)
ampl.	Amplifikation
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCL	Adultes T-Zell-Lymphom/-Leukämie
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	cluster of differentiation (Differenzierungsmarker)
CGH	comparative genomic hybridization (komparative genomische Hybridisierung)
DAPI	Diamidin Phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DNA	desoxyribonucleoid acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuclease
EATCL	Enteropathie-assoziiertes T-Zell-Lymphom
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
HCl	Salzsäure
Mb	Megabasen
MgCl	Magnesiumchlorid
mmol	Millimol

ml	Milliliter
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaSCN	Natriumthiocyanat
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK	Natürliche Killerzellen
p	kurzer Arm des Chromosoms
q	langer Arm des Chromosoms
PTCL NOS	peripheres T-Zell-Lymphom, nicht weiter spezifiziert
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SSC	sodiumchloride sodium citrate (Natriumzitat)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TIA	T-cell-restricted intracellular antigen
T-PLL	T-Prolymphozyten Leukämie/-Lymphom
U	Umdrehungen
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

7 Literaturverzeichnis

- **Ahmad** M, Srinivasula SM, Wang L, Talanian RV, Litwack G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES: CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2 and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res* 1997, 57: 615–619
- **Banks** PM, Warnke RA. Mature T-cell and NK-cell neoplasms. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds): *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press 2001, 189–230.
- **Barry** TS, Jaffe ES, Sorbara L, Raffeld M, Pittaluga S: Peripheral T-cell lymphomas expressing CD30 and CD15. *Am J Surg Pathol* 27, 2003, 1513-1522
- **Benharroch** D, Meguerian-Bedoyan Z, Lamant L, Amin C, Brugieres L, Terrier-Lacombe MJ, Haralambieva E, Pulford K, Pileri S, Morris SW, Mason DY, Delsol G: ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood* 1998, 91: 2076-2084
- **Chang** ST, Lu CL, Chuang SS: CD52 expression in non-mycotic T- and NK/T-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2007, 48: 117-121
- **Chernova** OB, Somerville RPT, Cowell JK: A novel gene, LGI1, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors. *Oncogene* 1998, 17: 2873–2881
- **Coupland** SE, Hummel M, Stein H: Lymphatisches System und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten. *Der Pathologe* 2000, 21: 106-112.
- **Delsol** G, Ralfkiaer E, Stein H, Wright D, Jaffe ES: Anaplastic large cell lymphoma. *World Health Organization Classification of Tumours. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Edited by Jaffe ES,

Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Lyon, France, IARC Press 2001, 230-235

- **Delsol** G, Jaffe ES, Falini B, Gascoyne RD, Müller-Hermelink HK, Stein H, Campo E, Kinney MC: Anaplastic large cell lymphoma (ALCL), ALK-positive. World Health Organization Classification of Tumours. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Edited by Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. Lyon, France, IARC Press 2008, 312-316
- **Devesa** SS, Fears T.: Non-Hodgkin's-lymphoma time trends: United States and international data. Cancer Res 1992, 52: 5432-5440
- **Diehl** V, Franklin J, Hasenclever D, Tesch H, Pfreundschuh M, Lathan B, Paulus U, Sieber M, Rueffer JU, Sextro M, Engert A, Wolf J, Hermann R, Holmer L, Stappert Jahn U, Winnerlein Trump E, Wulf G, Krause S, Glunz A, von Kalle K, Bischoff H, Haedicke C, Duehmke E, Georgii A, Loeffler M. BEACOPP, a new dose-escalated and accelerated regimen, is at least as effective as COPP/ABVD in patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: interim report from a trial of the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. J Clin Oncol 1998, 16: 3810-3821
- **Deutsche Krebsgesellschaft**, Leitlinien Lymphome 2008
- **Falini** B: Anaplastic large cell lymphoma: pathological, molecular and clinical features. Br J Haematol 2001, 114: 741-760
- **Falini** B, Bigerna B, Fizzotti M, Pulford K, Pileri SA, Delsol G, Carbone A, Paulli M, Magrini U, Menestrina F, Giardini R, Pilotti S, Mezzelani A, Ugolini B, Billi M, Pucciarini A, Pacini R, Pelicci PG, Flenghi L: ALK expression defines a distinct group of T/null lymphomas ("ALK lymphomas") with a wide morphological spectrum. Am J Pathol 1998, 153: 875-886
- **Falini** B, Pileri S, Zinzani PL, Carbone A, Zagonel V, Wolf-Peeters C, Verhoef G, Menestrina F, Todeschini G, Paulli M, Lazzarino M, Giardini R, Aiello A, Foss HD, Araujo I, Fizzotti M, Pelicci PG, Flenghi L, Martelli

- MF, Santucci A: ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood* 1999, 93: 2697-2706.
- **Forozan F**, Karhu R, Kononen J, Kallioniemi A, Kallioniemi OP: Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* 1997, 13: 405-409
 - **Foss HD**, Coupland SE, Stein H, Klinisch-pathologische Formen peripherer T- und NK-Zell-Lymphome. *Der Pathologe* 2000, 21: 137-146.
 - **Foss HD**, Mavafioti T, Stein H: "Die vielen Gesichter des anaplastischen großzelligen Lymphoms", *Der Pathologe* 2000, 21(2): 124-136
 - **Foss HD**, Anagnostopoulos I, Araujo I, Assaf C, Demel G, Kummer JA, Hummel M, Stein H: Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and null-cell phenotype express cytotoxic molecules. *Blood* 1996, 88: 4005-4011
 - **Gascoyne RD**, Aoun P, Wu D, Chhanabhai M, Skinnider BF, Greiner TC, Morris SW, Connors JM, Vose JM, Viswanatha DS, Coldman A, Weisenburger DD: Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 1999, 93: 3913-3921
 - **Gebhart E**: Genomic imbalances in human leukemia and lymphoma detected by comparative genomic hybridization (Review). *Int J Oncol.* 2005, 27(3): 593-606
 - **Geissinger E**, Odenwald T, Lee SS, Bonzheim I, Roth S, Reimer P, Wilhelm M, Müller-Hermelink HK, Rüdiger T: Nodal peripheral T-cell lymphomas and, in particular, their lymphoepithelioid (Lennert's) variant are often derived from CD8(+) cytotoxic T-cells. *Virchows Arch.* 2004, 445: 334-343.
 - **Gisselbrecht C**, Gaulard P, Lepage E, Coiffier B, Brière J, Haioun C, Cazals-Hatem D, Bosly A, Xerri L, Hervé T, Berger F, Bouhabdallah R, Diebold J: Prognostic significance of T-cell phenotype in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1998, 92: 76–82

- **Hanahan D, Weinberg RA:** The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000, 100: 57-70
- **Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC:** A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994, 84: 1361-1392
- **Hastrup N, Hamilton Dutoit S, Ralfkiaer E, Pallesen G.** Peripheral T-cell lymphomas: an evaluation of reproducibility of the updated Kiel classification. *Histopathology* 1991, 18: 99-105
- **Hofmann WK, de Vos S, Tsukasaki K, Wachsman W, Pinkus GS, Said JW, Koeffler HP:** Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood* 2001, 98: 787–794
- **Jaffe ES:** Anaplastic large cell lymphoma: the shifting sands of diagnostic hematopathology. *Mod Pathol* 2001, 14: 219-228
- **Jaffe ES:** Pathobiology of peripheral T-cell lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006, 126: 317-322
- **Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW:** Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *World Health Organization Classification of Tumours*. Lyon, IARC Press 2001
- **James L:** Comparative genomic hybridization as a tool in tumor cytogenetics. *J Pathol* 1999, 187: 385-395
- **Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D:** Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors, *Science* 1992, 258: 818-821
- **Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman F, Gray JW, Pinkel D:** Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1994, 10: 231-243

- **Karenko** L, Kähkönen M, Hyytinen ER, Lindlöf M, Ranki A: Notable losses at specific regions of chromosome 10q and 13q in the Sezary syndrome detected by comparative genomic hybridization. *J Invest Dermatol* 1999, 112: 392–395
- **Lamant** L, Meggetto F, al Saati T, Brugieres L, de Paillerets BB, Dastugue N, Bernheim A, Rubie H, Terrier-Lacombe MJ, Robert A, Rigal F, Schlaifer D, Shiuta M, Mori S, Delsol G : High incidence of the t(2;5)(p23 ;q35) translocation in anaplastic large cell lymphoma and its lack of deletion in Hodgkin's disease. Comparison of cytogenetic analysis, reverse transcriptase-polymerase chain reaction, and P-80 immunostaining. *Blood* 1996, 87: 284-291
- **Lennert** K, Feller AC: *Histopathologie der Non-Hodgkin Lymphome*. Springer Verlag, Berlin, 2. Auflage. 1990
- **Lepetre** S, Buchonnet G, Stamatoullas A, Lenain P, Duval C, d'Anjou J, Callat MP, Tilly H, Bastard C: Chromosome abnormalities in peripheral T-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2000, 117: 71–79
- **Lichter** P, Bentz M, Du Manoir S, Joos S: Comparative genomic hybridization. *Human Chromosomes: Principles and Techniques*, ed 2. Edited by RS Verma, A Babu. New York, McGraw-Hill, 1995, 191–210
- **Mason** DY, Bastard C, Rimokh R, Dastugue N, Hurel JL, Kristoffersson U, Magaud JP, Nezelof C, Tilly H, Vannier JP: CD30-positive large cell lymphomas ("Ki-1 lymphoma") are associated with a chromosomal translocation involving 5q35. *Br J Haematol* 1990, 74: 161-168
- **Mason** DY, Campo E, Harris NL, Kinney MC, Delsol G, Jaffe ES, Stein H, Falini B: Anaplastic large cell lymphoma (ALCL), ALK-negative. *World Health Organization Classification of Tumours. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Edited by Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. Lyon, France, IARC Press 2008, 317-319

- **Melendez** B, Diaz-Uriate R, Cuadros M, Martinez-Ramirez A, Fernandez-Piqueras J, Dopazo A, Cigudosa JC, Rivas C, Dopazo J, Martinez-Delgado B, Benitez J: Gene expression analysis of chromosomal regions with gain or loss of genetic material detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2004, 41: 353-365
- **Morris** SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT: Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994, 263: 1281-1284
- **Nacheva** EP, Grace CD, Bittner M, Ledbetter DH, Jenkins RB, Green AR, Comparative genomic hybridization: A comparison with molecular and cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 1998, 100: 93-105.
- **Neef** R, Kuske MA, Prols E, Johnson JP: Identification of the human PHLDA1/TDAG51 gene: down-regulation in metastatic melanoma contributes to apoptosis resistance and growth deregulation. *Cancer Res* 2002, 62: 5920–2929
- **Parkin** DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB: Cancer incidence in five continents, vol. VIII. IARC Scientific Publications 2002, Lyon, No.155.
- **Piccaluga** PP, Agostinelli C, Righi S, Zinzani PL, Pileri SA: Expression of CD52 in peripheral T-cell lymphoma. *Haematologica* 2007, 92: 566-567
- **Pileri** SA, Ralfkiaer E, Weisenburger DD, Nakamura S, Sng I, Müller-Hermelink HK, Jaffe ES: Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified. *World Health Organization Classification of Tumours. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Edited by Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. Lyon, France, IARC Press 2008, 306-308.

- **Ralfkiaer** E, Müller-Hermelink HK, Jaffe ES, Peripheral T-cell lymphoma, unspecified. World Health Organization Classification of Tumours. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Edited by Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Lyon, France, IARC Press 2001, 227-229.
- **Reimer** P, Schertlin T, Rüdiger T: Myeloablative radiochemotherapy followed by autologous peripheral blood stem cell transplantation as first-line therapy in peripheral T-cell lymphomas: first results of a prospective multicenter study. *Hematol J.* 2004, 5: 304-311.
- **Renado** M, Martinez-Delgado B, Arranz E, Garcia MJ, Urioste M, Martinez-Ramirez A, Rivas C, Cigudosa JC, Benitez J: Chromosomal changes pattern and gene amplification in T-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* 2001, 15: 1627–1632
- **Rizvi** MA, Evens AM, Tallman MS, Nelson BP, Rosen ST: T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006, 107: 1255-1264
- **Rodig** SJ, Abramson JS, Pinkus GS, Treon SP, Dorfman DM, Dong HY, Shipp MA, Kutok JL: Heterogeneous CD52 expression among hematologic neoplasms implications for the use of alemtuzumab (CAMPATH-1H). *Clin Cancer Res* 2006, 12: 7174-7179
- **Rosenwald** A, Ott G, Krumdiek AK, Dreyling MH, Katzenberger T, Kalla J, Roth S, Ott MM, Müller-Hermelink HK: A biological role for deletions in chromosomal band 13q14 in mantle cell and peripheral T-cell lymphoma? *Genes Chromosom Cancer* 1999, 26: 210–214
- **Rouault** JP, Rimokh R, Tessa C, Paranhos G, French M, Duret L, Garoccio M, Germain D, Samarut J, Magaud JP: BTG1, a member of a new family of antiproliferative genes. *EMBO J* 1992, 11: 1663–1670
- **Rüdiger** T, Ott G, Ott MM, Müller-Deubert SM, Müller-Hermelink HK: Differential diagnosis between classic Hodgkin's lymphoma, T-cell rich B-cell lymphoma and paragranuloma by paraffin immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 1998, 22: 1184–1191

- **Rüdiger** T, Weisenburger DD, Anderson JR, Armitage JO, Diebold J, MacLennan KA, Nathwani BN, Ullrich F, Müller-Hermelink HK: Peripheral T-cell Lymphoma. Results from the Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol.* 2002, 13: 140-149
- **Sasajima** H, Nakagawa K, Yokosawa H: Antiproliferative proteins of the BTG/Tob family are regulated by the ubiquitin-proteasome system. *Eur J Biochem* 2002, 269: 3596–3604
- **Schlegelberger** B, Himmler A, Gödde E, Grote W, Feller AC, Lennert K: Cytogenetic findings in peripheral T-cell lymphomas as a basis for distinguishing low-grade and high-grade lymphomas. *Blood* 1994, 83: 505–511
- **Schlegelberger** B, Himmler A, Bartles H, Kuse R, Sterry W, Grote W: Recurrent chromosome abnormalities in peripheral T-cell lymphomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1994, 78: 15–22
- **Schlegelberger** B, Feller AC: Classification of peripheral T-cell lymphomas: cytogenetic findings support the updated Kiel classification. *Leuk Lymphoma* 1996, 20: 411–416
- **Schottenfeld** D., Fraumeni, JF: *Cancer epidemiology and prevention.* Second Edition. Oxford University Press, New York Oxford, 1996
- **Siegert** W, Nerl C, Engelhard M, Brittinger G, Tiemann M, Parwaresch R, Heinz R, Huhn D: Peripheral T-cell non-Hodgkin's lymphomas of low malignancy: prospective study of 25 patients with pleomorphic small cell lymphoma, lymphoepitheloid cell (Lennert's) lymphoma and T-zone lymphoma. The Kiel Lymphoma Study Group. *Br J Haematol* 1994, 87: 529-534
- **Siegert** W, Nerl C, Agthe A, Engelhard M, Brittinger G, Tiemann M, Lennert K, Huhn D. Angioimmunoblastic lymphadenopathy (AILD)-type T-cell lymphoma: prognostic impact of clinical observations and laboratory findings at presentation. The Kiel Lymphoma Study Group. *Ann Oncol.* 1995, 6: 659-664

- **Siu LP, Wong KF, Chan JKC, Kwong YL:** Comparative genomic hybridization analysis of natural killer cell lymphoma/leukemia. *Am J Pathol* 1999, 155: 1419–1425
- **Soulier J, Pierron G, Vecchione D, Garand R, Brizard F, Sigaux F, Stern MH, Aurias A:** A complex pattern of recurrent chromosomal losses and gains in T-cell prolymphocytic leukemia. *Genes Chromosom Cancer* 2000, 31: 248–254
- **Stansfeld AG, Diebold J, Noel H, Kapanci Y, Rilke F, Kelenyi G, Sundstrom C, Lennert K, van Unnik JAM, Mioduszewska O, Wright DH.** Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet* 1988, 1: 292-293
- **Statistisches Landesamt Saarland:** Morbilität und Mortalität an bösartigen Neubildungen im Saarland. Jahresbericht 1994 und 1995. Sonderheft Nr. 191, 1998
- **Statistisches Bundesamt:** Todesursachen in Deutschland 2001. Gesundheitswesen, 2002, Fachserie 12, Reihe 4
- **Stein H, Mason DY, Gerdes J, O'Connor N, Wainscoat J, Pallesen G, Gatter K, Falini B, Delsol G, Lemke H:** The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 1985, 66: 848-858.
- **Stein H, Foss HD, Durkop H, Marafioti T, Delsol G, Pulford K, Pileri S, Falini B:** CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic and clinical features. *Blood* 2000, 96: 3681-3695
- **Suzuki A, Yamaguchi MT, Ohteki T, Sasaki T, Kaisho T, Kimura Y, Yoshida R, Wakeham A, Higuchi T, Fukumoto M, Tsubata T, Ohashi PS, Koyasu S, Penninger JM, Nakano T, Mak TW:** T cell-specific loss of PTEN leads to defects in central and peripheral tolerance. *Immunity* 2001, 14: 523–534
- **Suzuki A, de la Pompa JL, Stambolic V, Elia AJ, Sasaki T, del Barco Barrantes I, Ho A, Wakeham A, Itie A, Khoo W, Fukumoto M, Tak TW:**

High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol* 1998, 8: 1169–1178

- **Swerdlow** SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW: Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, IARC Press 2008
- **Thompson** MA, Stumph J, Henrickson SE, Rosenwald A, Wang Q, Olson S, Brandt SJ, Roberts J, Zhang X, Shyr Y, Kinney MC: Differential gene expression in anaplastic lymphoma kinase-positive and anaplastic kinase-negative anaplastic large cell lymphomas. *Hum Pathol* 2005, 36: 494-504
- **Tsukasaki** K, Krebs J, Nagai K, Tomonaga M, Koeffler P, Bartram CR, Jauch A: Comparative genomic hybridization analysis in adult T-cell leukemia/lymphoma: correlation with clinical course. *Blood* 2000, 97: 3875–3881
- **Uppenkam** M, Feller AC. Classification of Malignant Lymphoma. *Onkologie* 2002, 25: 563-570.
- **Wechsler** DS, Hawkins AL, Li X, Jabs EW, Griffin CA, Dang CV: Localization of the human Mxi1 transcription factor gene (MXI1) to chromosome 10q24–q25. *Genomics* 1994, 21: 669–672
- **Weiss** MM, Hermsen M, Meijer NCT, van Grieken, Baak JPA, Kuipers EJ, van Diest PJ, Comparative genomic hybridization. *Journal of Clinical Pathology* 1999, 52: 243-251.
- **Went** P, Agostinelli C, Gallamini A, Piccaluga PP, Ascani S, Sabbatini E, Bacci F, Falini B, Motta T, Paulli M, Artusi T, Piccioli M, Zinzani PL, Pileri SA: Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: a proposed clinical-pathologic prognostic score. *J Clin Oncol* 2006, 24: 2472-2479
- **Zettl** A, Ott G, Makulik A, Katzenberger T, Starostik P, Eichler T, Puppe B, Bentz M, Müller-Hermelink HK, Chott A: Chromosomal gains at 9q

characterize enteropathy-type T-cell lymphoma. *Am J Pathol* 2002, 161: 1635–1645

- **Zhang** Y, Matthiesen P, Harder S, Siebert R, Castoldi G, Calasanz MJ, Wong KF, Rosenwald A, Ott G, Atkin NB, Schlegelberger B: A 3-cM commonly deleted region in 6q21 in leukemias and lymphomas delineated by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 2000, 27: 52–58

8 Anhang

Tabelle 2: Klinische Merkmale, Immunphänotyp und Chromosomale Verluste und Zugewinne bei PTCL-NOS

Fall	Lokalisation	Alter	GS	Stadium (Ann Arbor)	ÜLZ	CD3	CD4	CD5	CD8	CD30	TIA1	GrB	Ki67
1	nodal	35	w	unbekannt	†	+	+	+	-	-	-	-	70%
2	nodal	67	w	unbekannt	†	-	-	-	-	-	-	-	60%
3	nodal	45	w	2a	20	+	-	-	+	-	+	+	70%
4	nodal	45	m	4b	7	+	-	+	-	-	-	-	80%
5	nodal	27	w	unbekannt	†	+	-	-	-	-	+	+	90%
6	nodal	59	w	unbekannt	1	+	+	+	-	-	-	-	80%
7	nodal	66	m	1a	32	+	-	+	-	-	-	-	70%
8	nodal	59	w	3b	25	+	+	+	-	(+)	-	-	70%
9	nodal	59	m	4	31	+	-	+	+	-	-	-	70%
10	nodal	51	m	3b	5	+	+	-	-	-	+	+	80%
11	nodal	63	m	unbekannt	48+	+	-	+	-	-	-	-	80%
12	nodal	72	m	unbekannt	3	+	+	+	-	(+)	-	-	80%
13	nodal	74	w	1a	†	+	+	+	-	-	-	-	90%
14	nodal	77	w	4b	1	+	+	-	-	+	-	-	80%
15	nodal	80	m	4b	3	+	-	-	-	-	+	+	80%
16	nodal	83	m	unbekannt	2	-	-	-	-	(+)	+	+	60%
17	nodal	66	w	3b	36+	+	-	-	-	-	+	+	90%
18	nodal	66	m	3	10	+	+	-	-	(+)	+	-	90%
19	nodal	74	w	unbekannt	1	+	+	+	-	-	-	-	60%
20	nodal	80	m	unbekannt	†	+	+	+	-	-	-	-	50%
21	nodal	84	m	4	13	+	+	+	-	+	-	-	40%
22	nodal	46	w	4b	15	+	+	+	-	(+)	-	-	70%

Legende zu Tabelle 2: GS: Geschlecht; w: weiblich; m: männlich; ÜLZ: Überlebenszeit in Monaten; †: verstorben

Tabelle 2: Klinische Merkmale, Immunphänotyp und Chromosomale Verluste und Zugewinne bei PTCL-NOS

Fall	Lokalisation	Alter	GS	Stadium (Ann Arbor)	ÜLZ	CD3	CD4	CD5	CD8	CD30	TIA1	GrB	Ki67
23	nodal	78	w	2	25	+	+	+	+	-	-	-	70%
24	Nebenniere	70	w	4	10	+	-	-	-	-	+	-	70%
25	nodal	77	m	1	17+	+	-	+	-	-	-	+	60%
26	nodal	72	m	1a	5+	+	+	+	-	-	-	-	60%
27	nodal	72	m	3	1	+	+	+	-	-	-	-	80%
28	nodal	58	m	2a	8+	+	-	+	-	-	-	-	40%
29	nodal	59	m	3a	12+	+	+	+	-	+	-	-	80%
30	nodal	64	m	4	8+	-	+	+	-	+	-	-	70%
31	nodal	66	w	unbekannt	†	+	+	-	-	-	-	-	90%
32	nodal	90	w	unbekannt	7	+	+	+	-	-	-	-	80%
33	nodal	63	m	4	4	-	+	+	-	(+)	-	-	90%
34	nodal	81	m	4b	2	+	-	-	-	(+)	-	-	60%
35	nodal	82	m	4	5	+	+	+	-	-	-	-	40%
36	Weichgewebe	80	m	unbekannt	13	+	+	-	+	-	+	+	90%
36	Weichgewebe												
36	Rezidiv												
37	nodal	61	m	2a	80+	+	+	+	-	+	+	-	60%
	Rezidiv												

Legende zu Tabelle 2: GS: Geschlecht; w: weiblich; m: männlich; ÜLZ: Überlebenszeit in Monaten; †: verstorben

Tabelle 2: Klinische Merkmale, Immunphänotyp und Chromosomale Verluste und Zugewinne bei PTCL-NOS

Fall	Lokalisation	Alter	GS	Stadium (Ann Arbor)	ÜLZ	CD3	CD4	CD5	CD8	CD30	TIA1	GrB	Ki67
38 Re- zidiv	nodal	54	m	1	4	+	+	+	+	-	-	-	50%
39 Re- zidiv	nodal	35	m	unbekannt	11	+	+	+	-	+	-	-	70%
40 Re- zidiv	nodal	71	m	1a	32	+	+	+	-	-	-	-	50%
41 Re- zidiv	nodal	56	m	4b	6	+	+	+	-	(+)	-	-	80%
42 Re- zidiv	kutan	67	m	unbekannt	10	-	-	-	-	-	+	-	60%

Legende zu Tabelle 2: GS: Geschlecht; w: weiblich; m: männlich; ÜLZ: Überlebenszeit in Monaten; †: verstorben

Tabelle 2: Klinische Merkmale, Immunphänotyp und Chromosomale Verluste und Zugewinne bei PTCL-NOS

Fall	Chromosomale Zugewinne	Chromosomale Verluste
1	+1q, +10p-13p-p14, +11, +14q22-q24	-6q25-q27, -10q26, -13q31-qter
2	+1q32-q42, +2	-Xp, -Xcen-q22
3	+2cen-q22, +6p21-pter, +6p25 (high-level), +9q33-q34	-4cen-p15, -4q, -6q21-qter, -9p21-pter, -13q21-q31, -Xp, -Xcen-q26, -18
4	+10p13-pter, +17	-2q22-24, -5q14-q23, -15q21
5	+7q	-
6	5q34-35, +7q22-qter	-2q24, -2q36-q37, -4q31-q32, -6q14-q16, -6q25-q27, -9q21, -9q31-32, -10q, -10cen-p13, -12, -13, -18p
7	+3p21, +7p, +7cen-q11, +11, +16p, +17q11-q21	-5q14-q23, -9p, -10, -12q14-q22
8	+2p23-pter, +2p12-13, +3q22-q24, +7q22-qter, +10p12-p13, +18	-2p16-p22, -3cen-p14, -3q27-qter, -4cen-q22, -8cen-p12, -8cen-q23, -10q21-q22, -10q24, 12q13-q23, -13, -16q, -17p
9	-	-2q23-q24, -5q15-q21, -7p13-p21
10	+12p13 (high-level), +12cen-p12, +12cen-q13	-
11	+2cen-p22 (high-level), +4q25-27, +7, +8q24, 9q34, +14q31-qter, +15q12-q14, +16p, +17q24-qter, +18	-3cen-q21, -5p, -5cen-q31, -6p22-pter, -8cen-q13, -9p21-pter, -10q24-qter, -12q, -13q14-qter, -15q26
12	-	-13q14-q21
13	+6p12 (high-level), +15q15 (high-level), +6q22	-
14	+1q, +11p15	-6q15-qter, -9p23-pter, -18, -X
15	+3p21-pter, +6p25 (high-level), +12p13 (high-level), +11q12q13, +12q24, +17q, +22q13 (high-level)	-6q, -9p21-pter

Tabelle 2: Klinische Merkmale, Immunphänotyp und Chromosomale Verluste und Zugewinne bei PTCL-NOS

Fall	Chromosomale Zugewinne	Chromosomale Verluste
16	-	-
17	+6p21 (high-level), +8q24, +12p13-pter (high-level), +14q22-qter (high-level), +Xq24-qter	-5q14-q22, -6cen-q22, 10p, -17p
18	-	-4q25-q27, -6en-q15, -6q24-qter, -8p, -10q, -11, -13q, -17p
19	+1p32-p35, +3p21, +7q, +16p, +17	-2p22-pter, -q35-qter, -9p, -9cen-q21
20	+8q24, +16p, +17cen-q23	-8p21-pter, -9p21
21	-7q, +11q13, +16p, +17q	-10p, 12q14-q22, -13q
22	+1p36 (high-level), +1q23-qter, +2p, +7q22-qter	-3p25-pter, -6q21-q22, -9p, -9cen-q21, -10q23-q24, -12p, -17p
23	+1p36 (high-level), +4p15-pter, +11cen-q13, +16p	-921-pter, -10cen-p12, -10q, -12q21-22, -13q
24	+1q, +3p24-pter, +5q34-qter, +625, +7, +8q, +9q, +17q	-8p, -11q24-q25, -17p
25	+3p14-p21	-1cen-p31, -8q13-q21, -12q21-q23, -13q14-q32
26	+3p25-pter, +7, +11q25-qter	-1p21-p22, 2p16-pter, -2q22, -3q13-q25, -5q, -6q21, -9p, -10q21-qter, -12, -13cen-q31, -16q
27	+7q, +8q23-q24 (high-level)	-2q22, -5q15-q23
28	+1q32-qter, +7q, +9q33-q34	-5q15-q23, -6q, -9p, -10q21-qter, -12p, -12cen-q22, -13q13-q21, -15q26-qter, -16q23-qter, -17p13, +18q
29	+Xp, +6p24-pter, +18q21	-2q36-q37, -2q22-q24, -5q21-q23, -6q21-qter, -9p, -9cen-q31, -10q, -11q24-qter, -12cen-q12, -12q15-qter, -13, -16q, -18q22-qter
30	+3q25-qter, +5q33, +17cen-q21	-4cen-p14, -4cen-q23, -6q13-q21, -7p15, -8, -13
31	+7, +10p13-pter, 11p, +11cen-q13, +14q21-qter	-

Tabelle 2: Klinische Merkmale, Immunphänotyp und Chromosomale Verluste und Zugewinne bei PTCL-NOS

Fall	Chromosomale Zugewinne	Chromosomale Verluste
32	+8q24-qter, +9q31-qter	-3, -8p
33	+2p, +p21, +7p, +11p11-p12 (high-level), +16p, +17p	-2q36-qter, -6q16-q24, -8, -10cen-p12, -14q31-qter, -16q, -18
34	+Xq, +5q13 (high-level)	-14q12-q13
35	+3, +8q, +9cen-p13, +9q, +16	-1p21-p31, 6cen-q24
36	+3p21-p24, +9q	-
36	+1q41-q42, +3p21-p24, +5q31-qter, +Xq21-qter, +9q, +14q32-qter	-6q26-q27, -15q26-qter
Re- zidiv		
37	+7q	-2q33-qter, -5q21-q23, -8p21-pter, -10
Re- zidiv		
38	+8p, +8q24, +15q22-q24	-
Re- zidiv		
39	+Y, +7	-5q21-q23, -13q14-q21
Re- zidiv		
40	+2p, +6p24-p25, +7, +16p, +17cen-q24, +2p, +6p24-p25 (high-level), +7, +9q34, +12q24-qter, +16p, +17cen-q24	-5q14-q23, -6q23-q25, -9p21, -9cen-q22, -10, -12q21-q22, -16q13-q22, -5q14-q23, -6q23-q25, -9q21, -9cen-q22, -10, -12q21-q22, -16q13-q22
41	+11q24-qter	-6q15-q21
Re- zidiv		
42	-	-8cen-q23
Re- zidiv		

Tabelle 3: Klinische Merkmale, Immunphänotyp und Chromosomale Verluste und Zugewinne bei ALCL

Fall		Lokali- sation	Alter	GS	Stadium (Ann Arbor)	ÜLZ	CD3	CD4	CD5	CD8	CD30	TIA1	GrB	EMA	Ki67
43	ALK+	nodal	13	m	3	62+	-	nu	+	nu	+	+	nu	+	nu
	ALCL														
44	ALK+	nodal	32	m	2b	†	-	-	-	-	+	-	+	+	60%
	ALCL														
45	ALK+	nodal	73	w	2b	48+	-	+	+	-	+	+	+	+	80%
	ALCL														
46	ALK+	nodal	23	m	2a	†	-	-	-	-	+	+	+	+	70%
	ALCL														
47	ALK+	nodal	28	m	3	9+	-	+	+	-	+	+	nu	+	90%
	ALCL														
48	ALK+	nodal	11	m	3b	13+	+	-	-	-	+	+	+	+	70%
	ALCL														
49	ALK+	nodal	50	w	3a	2+	+	+	-	-	+	-	-	+	80%
	ALCL														
50	ALK+	nodal	51	w	2b	6+	-	-	-	-	+	+	-	+	80%
	ALCL														
51	ALK+	nodal	15	m	4	32+	-	+	-	-	+	+	+	nu	90%
Re- zidiv	ALCL														

Legende zu Tabelle 3: GS: Geschlecht; w: weiblich; m: männlich; ÜLZ: Überlebenszeit in Monaten; †: verstorben; nu: nicht untersucht

Tabelle 3: Klinische Merkmale, Immunphänotyp und Chromosomale Verluste und Zugewinne bei ALCL

Fall		Lokali- sation	Alter	GS	Stadium (Ann Arbor)	ÜLZ	CD3	CD4	CD5	CD8	CD30	TIA1	GrB	EMA	Ki67
52	ALK- ALCL	nodal	29	m	2a	86	-	+	-	nu	+	nu	nu	nu	60%
53	ALK- ALCL	ossär	67	w	un- bekannt	92+	+	+	-	-	+	-	-	-	90%
54	ALK- ALCL	nodal	71	m	2	74+	+	-	-	-	+	-	-	-	70%
55	ALK- ALCL	nodal	7	m	3b	72+	-	-	-	-	+	-	-	+	70%
56	ALK- ALCL	nodal	88	w	un- bekannt	†	+	+	+	-	+	-	-	-	90%
57	ALK- ALCL	nodal	69	w	4	10	+	+	+	-	+	-	-	-	70%
58	ALK- ALCL	nodal	88	m	3	1	+	+	+	-	+	-	-	-	90%
59	ALK- ALCL	nodal	45	m	un- bekannt	1	+	+	-	-	+	+	+	+	70%
60	ALK- ALCL	nodal	92	w	un- bekannt	1	+	+	-	-	+	-	-	-	90%
61	ALK- ALCL	Weich- gewebe	21	m	1	†	-	+	-	-	+	-	+	+	90%

Legende zu Tabelle 3: GS: Geschlecht; w: weiblich; m: männlich; ÜLZ: Überlebenszeit in Monaten; †: verstorben; nu: nicht untersucht

Tabelle 3: Klinische Merkmale, Immunphänotyp und Chromosomale Verluste und Zugewinne bei ALCL

Fall		Lokali- Sation	Alter	GS	Stadium (Ann Arbor)	ÜLZ	CD3	CD4	CD5	CD8	CD30	TIA1	GrB	EMA	Ki67
62	ALK- ALCL	nodal	50	m	2	†	-	+	-	-	+	-	-	-	80%
63	ALK- ALCL	nodal	79	m	4a	10	+	+	-	-	+	-	-	-	90%
64	ALK- ALCL	nodal	63	m	2b	3	-	+	-	-	-	+	-	-	90%
65	ALK- ALCL	Pharynx	65	m	un- bekannt	†	-	-	-	-	+	-	-	+	70%
66	ALK- ALCL	nodal	34	m	3a	46+	+	+	-	-	+	+	-	-	80%
67	ALK- ALCL	nodal	28	w	4	†	-	-	-	-	+	-	+	-	80%
68	ALK- ALCL	nodal	73	w	2b	24	+	+	+	-	+	-	+	-	90%

Legende zu Tabelle 3: GS: Geschlecht; w: weiblich; m: männlich; ÜLZ: Überlebenszeit in Monaten; †: verstorben; nu: nicht untersucht

Tabelle 3: Klinische Merkmale, Immunphänotyp und Chromosomale Verluste und Zugewinne bei ALCL

Fall		Lokali- Sation	Alter	GS	Stadium (Ann Arbor)	ÜLZ	CD3	CD4	CD5	CD8	CD30	TIA1	GrB	EMA	Ki67
69	Kutane ALCL	kutan	32	w	1	48+	+	-	-	-	+	-	-	-	70%
70	Kutane ALCL	kutan	73	m	un- bekannt	†	-	+	-	-	+	-	-	-	90%
71	Kutane ALCL	kutan	29	m	1	24+	-	+	nu	-	+	-	+	-	90%
72	Kutane ALCL	kutan	87	w	1a	23+	+	+	-	-	+	-	-	-	90%
73	Kutane ALCL	kutan	54	m	un- bekannt	11	+	+	-	-	+	+	+	(+)	90%
74	Kutane ALCL	kutan	56	m	1	15+	+	+	-	-	+	-	-	-	70%
75	Kutane ALCL	kutan	82	m	un- bekannt	†	-	+	+	+	+	-	-	-	90%
76	Kutane ALCL	kutan	41	m	1	7+	+	+	+	-	+	-	+	(+)	80%
77	Kutane ALCL	kutan	67	w	1	†	-	-	-	-	+	-	-	-	90%
78	Kutane ALCL	kutan	57	m	1	8+	+	-	-	+	+	-	-	-	80%
79	Kutane ALCL	kutan	50	m	1	5+	-	+	-	-	+	-	-	-	80%

Legende zu Tabelle 3: GS: Geschlecht; w: weiblich; m: männlich; ÜLZ: Überlebenszeit in Monaten; †: verstorben; nu: nicht untersucht

Tabelle 3: Klinische Merkmale, Immunphänotyp und Chromosomale Verluste und Zugewinne bei ALCL

Fall	Chromosomale Zugewinne	Chromosomale Verluste
43	-	-9p21-pter
44	+1q, +Xp	-10p
45	+6p, +7p21-pter, +7q34-qter, +17q	-11, -13q21-22, -18q
46	-	-
47	+6p21-p22	-
48	+7p15-pter	-8p21-pter
49	+2p23-pter, +2cen-q33	-
50	+1q	-4q33-qter, -9p23-qter, -10p, -11q22-qter
51	+1q, 4q31-q34 (high-level), +6p24-p25, +7p21-pter	-6q
Rezidiv		
52	+1, +12q24-qter	-
53	-	-
54	-	-
55	-	-
56	+1q	-11p, -13q21-qter, -X
57	+4q16-pter, +6p, 16p12-pter, +17cen-q22, +22	-1cen-p22, -6q16-qter, -8q13-q22, -12q21-22, -18, -Xq
58	+1q, +6p, +6q25-qter	-8q21-q23
59	+1q, +5q35-qter, +6p21, +8q24-qter, 17q12-q21 (high-level)	-2q22-q32, -4q22-q25, -6q21-q22, -6q26-qter, -8p, -13cen-q22, -16q
60	+1q41-qter	-2q21-q22, -7q21-q31, -10
61	+1, +7	-
62	+11p14-pter	-3q, -4q27-qter, -6q16-q22, -11q22-qter, -13q

Tabelle 3: Klinische Merkmale, Immunphänotyp und Chromosomale Verluste und Zugewinne bei ALCL

Fall	Chromosomale Zugewinne	Chromosomale Verluste
63	-	-
64	-	-2q23-qter, -6q, -11p14-pter, -11q21-q23
65	-	-4, -6q14-q22, -9p21-pter, -10, -11p, -12, -16q, -18
Rezidiv		
66	-2q22-q33, -6q, -13q	-7q
Rezidiv		
67	-17q	-6q16-qter
Rezidiv		
68	+1p36 (high-level), +2p	-3cen-q26, -Xq
Rezidiv		
69	-	-
70	+5q34-pter	-6q
71	+7q	-
72	+6p	-8p
73	+6p21, +7q34-qter	-
74	-	-
75	-	-
76	-	-
77	+4	-
78	+8	-
79	-	-16q

Publikation der Ergebnisse

Andreas Zettl , Thomas Rüdiger , Maria-Anette Konrad , Andreas Chott , Ingrid Simonitsch-Klupp, Ruth Sonnen, Hans-Konrad Müller-Hermelink, German Ott

Genomic profiling of periphera T-cell-lymphoma, unspecified, and anaplastic large T-cell lymphoma delineates novel recurrent chromosomal alterations.

American Journal of Pathology, Vol. 164, No. 5; 1837-1848; May 2004

Genomic Profiling of Peripheral T-Cell Lymphoma, Unspecified, and Anaplastic Large T-Cell Lymphoma Delineates Novel Recurrent Chromosomal Alterations

Andreas Zettl,* Thomas Rüdiger,*
Maria-Anette Konrad,* Andreas Chott,†
Ingrid Simonitsch-Klupp,† Ruth Sonnen,‡
Hans Konrad Müller-Hermelink,* and German Ott*

From the Department of Pathology,* University of Würzburg, Würzburg, Germany; the Department of Hematology,‡ Allgemeines Krankenhaus St. Georg, Hamburg, Germany; and the Department of Pathology,† University of Vienna, Vienna, Austria

To characterize genetic alterations in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified (PTCL NOS), and anaplastic large T-cell lymphoma (ALCL), 42 PTCL NOS and 37 ALCL [17 anaplastic large cell kinase (ALK)-negative ALCL, 9 ALK-positive ALCL, 11 cutaneous ALCL] were analyzed by comparative genomic hybridization. Among 36 *de novo* PTCL NOS, recurrent chromosomal losses were found on chromosomes 13q (minimally overlapping region 13q21, 36% of cases), 6q and 9p (6q21 and 9p21-pter, in 31% of cases each), 10q and 12q (10q23-24 and 12q21-q22, in 28% of cases each), and 5q (5q21, 25% of cases). Recurrent gains were found on chromosome 7q22-qter (31% of cases). In 11 PTCL NOS, high-level amplifications were observed, among them 3 cases with amplification of 12p13 that was restricted to cytotoxic PTCL NOS. Whereas cutaneous ALCL and ALK-positive ALCL showed few recurrent chromosomal imbalances, ALK-negative ALCL displayed recurrent chromosomal gains of 1q (1q41-qter, 46%), and losses of 6q (6q21, 31%) and 13q (13q21-q22, 23%). Losses of chromosomes 5q, 10q, and 12q characterized a group of noncytotoxic nodal CD5+ peripheral T-cell lymphomas. The genetics of PTCL NOS and ALK-negative ALCL differ from other T-NHLs characterized genetically so far, among them enteropathy-type T-cell lymphoma, T-cell prolymphocytic leukemia, and adult T-cell lymphoma/leukemia. (*Am J Pathol* 2004, 164:1837-1848)

Among mature T- and NK-cell lymphomas, peripheral T-cell lymphoma, unspecified (PTCL NOS), and anaplastic large T-cell lymphoma (ALCL) are most frequent.¹ PTCL NOS represent a morphologically and immunohistochemically heterogeneous group of T-cell lymphoma that, by definition, do not correspond to any of the well-

defined entities of mature T-cell lymphoma in the World Health Organization classification.¹ In contrast, ALCL are characterized by anaplastic tumor cell morphology and the expression of CD30.^{1,2} Among ALCL, 60 to 80% of cases carry the translocation t(2;5) or its variants, leading to overexpression of the anaplastic large cell kinase (ALK).^{1,2} Following distinct clinical features, cutaneous and systemic ALCL are distinguished among ALK-negative ALCL.^{1,2}

Although representing the majority of T-cell lymphomas, the genetics of PTCL NOS and ALK-negative ALCL are only poorly characterized so far. Classical cytogenetic studies have demonstrated a high degree of chromosomal complexity. Yet, because of the rarity of these neoplasms, most reports were based on a small number of cases only.³⁻⁷ For the heterogeneous group of PTCL NOS, no characteristic genetic alterations have been defined so far. In addition, the genetic relationship between ALK-negative ALCL and PTCL NOS, the genetics of cutaneous ALCL, and the secondary genetic alterations in ALK-positive ALCL have remained enigmatic so far.

In this study, we investigated 79 cases of PTCL NOS and ALCL by comparative genomic hybridization (CGH), reporting recurrent genetic alterations in PTCL NOS and ALK-negative ALCL for the first time. We show that different T-cell lymphoma entities as defined by the World Health Organization classification show characteristic chromosomal alterations.

Materials and Methods

Specimen Selection and DNA Extraction

More than 600 cases of PTCL NOS and ALCL were selected from the files of the Lymph Node Reference Center at the Department of Pathology, University of Würzburg, Würzburg, Germany, and the Department of Pathology, University of Vienna, Vienna, Austria. All cases were classified as PTCL NOS and anaplastic large cell

Supported by the Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung, Würzburg, Germany, and in part by the European Commission (grant QL61-CT-2000-00687).

Accepted for publication January 28, 2004.

Address reprint requests to Andreas Zettl, M.D., Institute of Pathology, University of Würzburg, Josef-Schneider-Strasse 2, 97080 Würzburg, Germany. E-mail: andreas.zettl@mail.uni-wuerzburg.de.

T-cell lymphoma according to the current World Health Organization classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues.¹ In particular, to distinguish between PTCL NOS and ALK-negative ALCL, the latter diagnosis was only rendered if the lymphoma consisted mostly of large lymphoid cells with abundant cytoplasm, showed pleomorphic, in part embryo-like hallmark nuclei, and showed a very strong expression of CD30 in the majority of cells with a membrane and/or Golgi-pattern of staining. In keeping with the World Health Organization classification of hematopoietic and lymphoid tissues,¹ lymphoma cases that did not show these morphological features and/or only showed weak CD30 positivity in a minority of tumor cells were classified as PTCL NOS.

To assure a sufficient tumor cell content for CGH, 196 cases with <40% nonneoplastic bystander cells were included for DNA extraction. In 11 cases, fresh-frozen material was available for DNA extraction (eight PTCL NOS, three ALK-negative ALCL). In the remaining 185 cases, DNA was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks using the phenol-chloroform extraction method according to previously published protocols.⁹ The length of the extracted DNA was analyzed on an 0.7% agarose gel with suitable DNA length standards. In only 68 cases (38%) could high-molecular DNA be extracted from paraffin blocks and be successfully analyzed by CGH. In the remaining 117 cases, DNA extracted from paraffin-embedded material was not suitable for further genetic analysis by CGH because of DNA degradation (DNA fragment size <1000 bp).

Immunohistochemistry

Immunohistochemical analysis was performed in all cases on formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections according to previously published protocols.⁹ Immunostains included markers CD3 (1:400; DAKO, Copenhagen, Denmark), CD4 (1:10, Novocastra, Newcastle upon Tyne, United Kingdom), CD5 (1:20, Novocastra), CD8 (1:30, DAKO), CD20 (1:200, DAKO), CD30 (1:80, DAKO), TIA1 (1:800; Coulter, Hialeah, FL), Granzyme B (GrB-7, 1:20; Sanbio, Germany), Ki 67 (1:300, Novocastra), and ALK1 (mouse monoclonal antibody, 1:50; a kind gift from Karen Pulford, University of Oxford, Oxford, UK).

CGH

CGH was performed at the Department of Pathology, University of Würzburg, on 79 cases (42 PTCL NOS and 37 ALCL) according to a standard protocol.¹⁰ Tumor DNA was labeled by nick translation with biotin-16-dUTP (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Reference DNA, extracted from placental tissue of a healthy newborn, was labeled with digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics). The amount of DNase I (Roche Diagnostics) and DNA polymerase I (Promega, Mannheim, Germany) were adjusted to obtain DNA fragment sizes of ~500 to 1000 bp. After inactivation of DNase I, unincorporated nucleotides were removed by gel filtration on Sephadex

G50-packed columns (Sigma, St. Louis, MO). Equal amounts of tumor and reference DNA (1 µg each), together with 70 µg of Cot-1 DNA (Roche Diagnostics) for blocking repetitive sequences, were co-hybridized on commercially available metaphase slides (Vysis, Downers Grove, IL), which had been denatured in 70% deionized formamide/2× standard saline citrate/50 mmol/L sodium phosphate, pH 7.0, for 5 minutes at 70°C, followed by dehydration in cold ethanol. After overnight hybridization at 37°C, the slides were washed four times with 50% formamide/2× standard saline citrate, pH 7.0, at 42°C and three times at 60°C with 0.1× standard saline citrate. Biotin- and digoxigenin-labeled DNA were detected by addition of fluorescein-isothiocyanate avidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA) or Cy3-conjugated anti-digoxigenin antibodies (Dianova, Hamburg, Germany), respectively. A 4,6-diamidino-2-phenylindole counterstain was performed for chromosomal banding.

Signals were visualized with a Zeiss Axiophot fluorescence microscope and analyzed with ISIS digital image analysis system (MetaSystems, Altlußheim, Germany). Ratio values of 1.25 and 0.8 were used as upper and lower thresholds for identification of chromosomal gains or losses (Figures 1 and 2). A high-level amplification was defined as an overrepresentation of genetic material with the fluorescence ratio values exceeding 2.0 or based on the observation of strong focal signals in the fluorescein isothiocyanate fluorescence.

Comparison of Genetic Findings in Different Types of T-Cell Lymphoma

CGH findings in PTCL NOS and ALK-negative ALCL were compared to those previously published on enteropathy-type T-cell lymphoma (ETCL), T-cell prolymphocytic leukemia (T-PLL), and aggressive adult T-cell lymphoma/leukemia (ATCL).^{8,11,12} Only genetic imbalances occurring in at least 25% of cases analyzed in any lymphoma entity were included into the comparative study.

Clinical Characteristics and Statistical Analysis

Clinical information was obtained for the patient's history, type and duration of symptoms at initial presentation, and type of treatment. Follow-up information was obtained via clinical records, attending physicians, or autopsy files.

In 36 of the 42 PTCL NOS cases, the material analyzed stemmed from the initial diagnostic specimen obtained at diagnosis and previous to installment of patient treatment. In six cases, only material from recurrent disease could be analyzed (cases 37 to 42; see Table 1). In two cases, lymphoma recurrences could additionally be analyzed and compared to the primary tumor [case 36 (1 year time interval) and case 40 (7 month time interval)].

Regarding the 36 primary PTCL NOS cases, 22 patients were male and 14 were female (Table 1). Age at diagnosis ranged from 27 to 90 years (average, 66 years). Among the 36 patients with primary disease manifestation, 12 were not staged, 4 patients had stage 1, 3 had stage 2, 6 had stage 3, and 11 had stage 4 disease.

Thirty-four of 36 PTCL NOS were primarily nodal lymphomas, only in 2 cases, primary extranodal disease manifestation was observed (subcutaneous fatty tissue of the poplitea and adrenal gland, respectively). Clinical follow-up was available from 30 patients. Of the 30 patients, 23 had already died (survival after diagnosis between 1 to 32 months; average, 10 months). Seven patients were still alive, among them two patients with a follow-up period of longer than 24 months.

Among the six PTCL recurrences, all patients were male, with an average age of 57 years (age range, 35 to 71 years) (Table 1). The time intervals between initial diagnosis and recurrence were 3 months (case 38), 20 months (case 40), 6 years (case 41), and 13 years (case 39), for the remaining cases it was unknown. Except for one patient, all patients had died (survival time after relapse 4 to 32 months; average, 13 months).

Information about patient treatment could be obtained in 28 of 42 patients. Twenty-four patients were treated with CHOP polychemotherapy (combination of cyclophosphomid doxorubicin vincristine and prednisone) only one patient following the IMVP protocol (combination of ifosfamid, methotrexate, and etoposide). Three of the patients did not receive any therapy because of age or advanced disease stage. Two of the patients received additional involved field radiation therapy. One patient underwent allogeneic bone marrow transplantation.

Of nine patients with ALK-positive ALCL (cases 43 to 51), six were male (see Table 2). Age at diagnosis ranged between 11 and 73 years (average, 33 years). All cases were nodal ALCL, in all but one case (case 51, recurrence 18 months after initial diagnosis), the material analyzed stemmed from the initial diagnostic specimen obtained at diagnosis and previous to the treatment of the patient. Among the primary cases, four each were stage 2 and stage 3 disease. Clinical follow-up was available in seven patients, all of them being alive with a follow-up period ranging from 2 to 62 months.

In 13 of 17 ALK-negative systemic ALCL (cases 52 to 64), the material analyzed stemmed from the initial diagnostic specimen obtained at diagnosis and previous to the treatment of the patient (Table 2). Among these, nine patients were male. Age at diagnosis ranged between 7 and 92 (average, 59 years). In only two cases was there extranodal lymphoma manifestation (soft tissue, bone). Among the primary cases, one was stage 1, four were stage 2, two were stage 3, two were stage 4 disease, the remaining patients were not staged. Clinical follow-up was available in 10 patients. Seven patients had already died (survival between 1 and 86 months), whereas three were still alive with a follow-up ranging from 72 to 92 months.

In four patients, only recurrences of ALK-negative ALCL could be analyzed (cases 65 to 68) (Table 2). The time intervals between initial diagnosis and recurrences were 2 years (case 61), 7 years (case 63), and 8 years (case 53), for the remaining case, it was unknown. Information on the treatment regimen was available in seven patients. Six patients were treated with CHOP polychemotherapy, while one patient underwent IMVP chemotherapy followed by autologous bone marrow transplantation.

Of the 11 patients with primary cutaneous ALCL (cases 69 to 79), 8 were male. Age at diagnosis ranged between 29 and 87 years (average, 57 years). In all cases, the material analyzed stemmed from the initial diagnostic specimen previous to treatment. Clinical follow-up was available in eight patients, seven of whom were alive with follow-up periods ranging from 5 to 48 months. In these patients, treatment consisted of local, topic radiotherapy.

Statistical correlation between clinical features, immunophenotype, and genetic alterations, and the comparison of genetic alterations between PTCL NOS, ALK-negative ALCL, ETCL, T-PLL, and adult T-cell lymphoma/leukemia were calculated using Fisher's exact test and Spearman's rank correlation. *P* values below 0.05 were regarded as significant. Survival analysis (impact of the number of genetic imbalances on survival) was performed using Kaplan-Meier statistics; for significance testing, a log-rank test was used.

Results

Immunohistochemical and Clinical Characterization

All cases were classified as PTCL NOS and anaplastic large cell T-cell lymphoma, respectively, according to the current World Health Organization classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues.¹ The diagnosis of ALK-positive ALCL required unequivocal positivity in immunostains for ALK. To distinguish between PTCL NOS and ALK-negative ALCL, the latter diagnosis required the lymphoma to consist mostly of large lymphoid cells with abundant cytoplasm, to show pleomorphic embryo-like hallmark nuclei, and to display a very strong expression of CD30 in the majority of cells with a membrane and Golgi-pattern of staining. Following the World Health Organization classification of hematopoietic and lymphoid tissues,¹ lymphoma cases that did not show these morphological features and/or only showed weak CD30 positivity in a minority of tumor cells were classified as PTCL NOS.

The clinical and immunohistochemical features of the PTCL NOS and ALCL studied by CGH are summarized in Tables 1 and 2. In brief, 37 of 42 (88%) PTCL expressed CD3, 27 expressed CD4 (64%), 5 expressed CD8 (12%), and 27 expressed CD5 (64%). Eleven cases (26%) displayed a cytotoxic phenotype with expression of TIA1 and/or Granzyme B. Of note, 15 of 42 (36%) PTCL NOS expressed CD30; however, the staining intensity in these cases was generally weak and did not comprise the majority of tumor cells. Furthermore, characteristic hallmark cells were missing. Thus, these cases were diagnosed as PTCL NOS, not as ALK-negative ALCL based on the criteria forwarded by the World Health Organization classification as specified above.¹

CGH of PTCL NOS

Forty-two cases of PTCL NOS were analyzed by CGH, among them 36 primary PTCL NOS and 6 lymphoma

Table 1. Clinical Features, Immunophenotype, and Chromosomal Imbalances in PTCL, Unspecified

	Loc	Age	Sex	Stage	Sur	CD3	CD4	CD5	CD8	CD30	TIA1
1	Nodal	35	F	NS	Lost	+	+	+	-	-	-
2	Nodal	67	F	NS	Lost	-	-	-	-	-	-
3	Nodal	45	F	2a	20	+	-	-	+	-	+
4	Nodal	45	M	4b	7	+	-	+	-	-	-
5	Nodal	27	F	NS	Lost	+	-	-	-	-	+
6	Nodal	59	M	NS	1	+	+	+	-	-	-
7	Nodal	66	M	1a	32	+	-	+	-	-	-
8	Nodal	59	F	3b	25	+	+	+	-	(+)	-
9	Nodal	59	M	4	31	+	-	+	+	-	-
10	Nodal	51	M	3b	5	+	+	-	-	-	+
11	Nodal	63	M	NS	48+	+	-	+	-	-	-
12	Nodal	72	M	NS	3	+	+	+	-	(+)	-
13	Nodal	74	F	1a	Lost	+	+	+	-	(+)	-
14	Nodal	77	F	4b	1	+	+	-	-	+	+
15	Nodal	80	M	4b	3	+	-	-	-	-	+
16	Nodal	83	M	NS	2	-	-	-	-	(+)	+
17	Nodal	66	F	3b	36+	+	-	-	-	-	+
18	Nodal	66	M	3	10	+	+	-	-	(+)	-
19	Nodal	74	F	NS	1	+	+	+	-	-	-
20	Nodal	80	M	NS	Lost	+	+	+	-	-	-
21	Nodal	84	M	4	13	+	+	+	-	+	-
22	Nodal	46	F	4b	15	+	+	+	-	(+)	-
23	Nodal	78	F	2	25	+	+	+	+	-	-
24	Adrenal*	70	F	4	10	+	-	-	-	-	+
25	Nodal	77	M	1	17+	+	-	+	-	-	-
26	Nodal	72	M	1a	5+	+	+	+	-	-	-
27	Nodal	72	M	3	1	+	+	+	-	-	-
28	Nodal	58	M	2a	8+	+	-	+	-	-	-
29	Nodal	59	M	3a	12+	+	+	+	-	+	-
30	Nodal	64	M	4	8+	-	+	+	-	+	-
31	Nodal	66	F	NS	Lost	+	+	-	-	-	-
32	Nodal	90	F	NS	7	+	+	+	-	-	-
33	Nodal	63	M	4	4	-	+	-	-	(+)	-
34	Nodal	81	M	4b	2	+	-	-	-	(+)	-
35	Nodal	82	M	4	5	+	+	+	-	-	-
36	Soft tissue*	80	M	NS	13	+	+	-	+	-	+
36R	Soft tissue										
37R	Nodal	61	M	2a	80+	+	+	+	-	+	+
38R	Nodal	54	M	1	4	+	+	+	+	-	-
39R	Nodal	35	M	NS	11	+	+	+	-	+	-
40R	Nodal	71	M	1a	32	+	+	+	-	-	-
41R	Nodal	56	M	4b	6	+	+	+	-	(+)	-
42R	Cutaneous*	67	M	NS	10	-	-	-	-	-	+

R, disease recurrence; loc, localisation; F, female; M, male; NS, not staged; sur, survival in months.
 +, Patient still alive after a follow-up of the months given; immunophenotype: +, strong stain, (+), partial or weak stain; -, negative stain.
 *The extranodal PTCL, unspecified, were all negative in EBER hybridization, the nodal PTCL, unspecified, were not tested for EBV association. In case 40, two recurrences were analyzed.

Table 1. *Continued*

GrB	Ki67	Chromosomal gains	Chromosomal losses
-	70%	+1q, +10p13-p14, +11, +14q22-q24	-6q25-q27, -10q26, -13q31-qter
-	60%	+1q32-q42, +2	-Xp, -Xcen-q22
+	70%	+2cen-q22, +6p21-pter, +6p25 (high-level), +9q33-q34	-4cen-p15, -4q, -6q21-qter, -9p21-pter, -13q21-q31, -Xp, -Xcen-q26, -18
-	80%	+10p13-pter, +17	-2q22-24, -5q14-q23, -15q21
+	90%	+7q	-
-	80%	+5q34-35, +7q22-qter	-2q24, -2q36-q37, -4q31-q32, -6q14-q16, -6q25-q27, -9q21, -9q31-32, -10q, -10cen-p13, -12, -13, -18p
-	70%	+3p21, +7p, +7cen-q11, +11, +16p, +17q11-q21	-5q14-q23, -9p, -10, -12q14-q22
-	70%	+2p23-pter, +2p12-13, +3q22-q24, +7q22-qter, +10p12-p13, +18	-2p16-p22, -3cen-p14, -3q27-qter, -4cen-q22, -8cen-p12, -8cen-q23, -10q21-q22, -10q24, -12q13-q23, -13, -16q, -17p
-	70%	-	-2q23-q24, -5q15-q21, -7p13-p21
+	80%	+12p13 (high-level), +12cen-p12, +12cen-q13	-3cen-q21, -5p, -5cen-q31, -6p22-pter, -8cen-q13, -9p21-pter, -10q24-qter, -12q, -13q14-qter, -15q26
-	80%	+2cen-p22 (high-level), +4q25-27, +7, +8q24, +9q34, +14q31-qter, +15q12-q14, +16p, +17q24-qter, +18	-13q14-q21
-	80%	-	-
-	90%	+6p12 (high-level), +15q15 (high-level), +6q22	-6q15-qter, -9p23-pter, -18, -X
+	80%	+1q, +11p15	-6q, -9p21-pter
+	80%	+3p21-pter, +6p25 (high-level), +12p13 (high-level), +11q12-q13, +12q24, +17q, +22q13 (high-level)	-
+	60%	-	-
-	90%	+6p21 (high level), +8q24, +12p13-pter (high level), +14q22-qter (high level), +Xq24-qter	-5q14-q22, -6cen-q22, -10p, -17p
-	90%	-	-4q25-q27, -6cen-q15, -6q24-qter, -9p, -10q, -11, -13q, -17p
-	60%	+1p32-p35, +3p21, +7q, +16p, +17	-2p22-pter, -q35-qter, -9p, -9cen-q21
-	50%	+8q24, +16p, +17cen-q23	-8p21-pter, -9p21
-	40%	+7q, +11q13, +16p, +17q	-10p, -12q14-q22, -13q
-	70%	+1p36 (high-level), +1q23-qter, +2p, +7q22-qter	-3p25-pter, -6q21-q22, -9p, -9cen-q21, -10q23-q24, -12p, -17p
-	70%	+1p36 (high-level), +4p15-pter, +11cen-q13, +16p	-9p21-pter, -10cen-p12, -10q, -12q21-22, -13q
+	70%	+1q, +3p24-pter, +5q34-qter, +6p25, +7, +8q, +9q, +17q	-8p, -11q24-q25, -17p
-	60%	+3p14-p21	-1cen-p31, -8q13-q21, -12q21-q23, -13q14-q32
-	60%	+3p25-pter, +7, +11q25-qter	-1p21-p22, -2p16-pter, -2q22, -3q13-q25, -5q, -6q21, -9p, -10q21-qter, -12, -13cen-q31, -16q
-	80%	+7q, +8q23-q24 (high-level)	-2q22, -5q15-q23
-	40%	+1q32-qter, +7q, +9q33-q34	-5q15-q23, -6q, -9p, -10q21-qter, -12p, -12cen-q22, -13q13-q21, -15q26-qter, -16q23-qter, -17p13, +18q
-	80%	+Xp, +6p24-pter, +18q21	-2q36-q37, -2q22-q24, -5q21-q23, -6q21-qter, -9p, -9cen-q31, -10q, -11q24-qter, -12cen-q12, -12q15-qter, -13, -16q, -18q22-qter
-	70%	+3q25-qter, +5q33, +17cen-q21	-4cen-p14, -4cen-q23, -6q13-q21, -7p15, -8, -13
-	90%	+7, +10p13-pter, +11p, +11cen-q13, +14q21-qter	-
-	80%	+8q24-qter, +9q31-qter	-3, -8p
-	90%	+2p, +p21, +7p, +11p11-p12 (high-level), +16p, +17p	-2q36-qter, -6q16-q24, -8, -10cen-p12, -14q31-qter, -16q, -18
-	60%	+Xq, +5q13 (high-level)	-14q12-q13
-	40%	+3, +8q, +9cen-p13, +9q, +16	-1p21-p31, -6cen-q24
+	90%	+3p21-p24, +9q, +1q41-q42, +3p21-p24, +5q31-qter, +Xq21-qter, +9q, +14q32-qter	-6q26-q27, -15q26-qter
-	60%	+7q	-2q33-qter, -5q21-q23, -9p21-pter, -10
-	50%	+8p, +8q24, +15q22-q24	-5q21-q23, -13q14-q21
-	70%	+Y, +7	-5q14-q23, -6q23-q25, -9p21, -9cen-q22, -10, -12q21-q22, -16q13-q22
-	50%	+2p, +6p24-p25, +7, +16p, +17cen-q24	-5q14-q23, -6q23-q25, -9q21, -9cen-q22, -10, -12q21-q22, -16q13-q22
-	80%	+11q24-qter	-6q15-q21
-	60%	-	-8cen-q23

Table 2. Clinical Features, Immunophenotype, and Chromosomal Imbalances of ALCL

	Dx	Loc	Age	Sex	Stage	Sur	CD3	CD4	CD5	CD8	CD30	TIA1	GrB
43	ALK+ ALCL	Nodal	13	M	3	62+	-	ND	+	ND	+	+	ND
44	ALK+ ALCL	Nodal	32	M	2b	Lost	-	-	-	-	+	-	+
45	ALK+ ALCL	Nodal	73	F	2b	48+	-	+	+	-	+	+	+
46	ALK+ ALCL	Nodal	23	M	2a	Lost	-	-	-	-	+	+	+
47	ALK+ ALCL	Nodal	29	M	3	9+	-	+	+	-	+	+	ND
48	ALK+ ALCL	Nodal	11	M	3b	13+	+	-	-	-	+	+	+
49	ALK+ ALCL	Nodal	50	F	3a	2+	+	+	-	-	+	-	-
50	ALK+ ALCL	Nodal	51	F	2b	6+	-	-	-	-	+	+	-
51R	ALK+ ALCL	Nodal	15	M	4	32+	-	+	-	-	+	+	+
52	ALK- ALCL	Nodal	29	M	2a	86	-	+	-	ND	+	ND	ND
53	ALK- ALCL	Bone	67	F	NS	92+	+	+	-	-	+	-	-
54	ALK- ALCL	Nodal	71	M	2	74+	+	-	-	-	+	-	-
55	ALK- ALCL	Nodal	7	M	3b	72+	-	-	-	-	+	-	-
56	ALK- ALCL	Nodal	88	F	NS	Lost	+	+	+	-	+	-	-
57	ALK- ALCL	Nodal	69	F	4	10	+	+	+	-	+	-	-
58	ALK- ALCL	Nodal	88	M	3	1	+	+	+	-	+	-	-
59	ALK- ALCL	Nodal	45	M	NS	1	+	+	-	-	+	+	+
60	ALK- ALCL	Nodal	92	F	NS	1	+	+	-	-	+	-	-
61	ALK- ALCL	Soft tissue	21	M	1	Lost	-	+	-	-	+	-	+
62	ALK- ALCL	Nodal	50	M	2	Lost	-	+	-	-	+	-	-
63	ALK- ALCL	Nodal	79	M	4a	10	+	+	-	-	+	-	-
64	ALK- ALCL	Nodal	63	M	2b	3	-	+	-	-	-	+	-
65R	ALK- ALCL	Pharynx	66	M	NS	Lost	-	-	-	-	+	-	-
66R	ALK- ALCL	Nodal	34	M	3a	46+	+	+	-	-	+	-	-
67R	ALK- ALCL	Nodal	28	F	4	Lost	-	-	-	-	+	-	+
68R	ALK- ALCL	Nodal	73	F	2b	24	+	+	+	-	+	-	+
69	Cut ALCL	Cutaneous	32	F	1	48+	+	-	-	-	+	-	-
70	Cut ALCL	Cutaneous	73	M	NS	Lost	-	+	-	-	+	-	-
71	Cut ALCL	Cutaneous	29	M	1	24+	-	+	ND	-	+	-	+
72	Cut ALCL	Cutaneous	87	F	1a	23+	+	+	-	-	+	-	-
73	Cut ALCL	Cutaneous	54	M	NS	11	+	+	-	-	+	+	+
74	Cut ALCL	Cutaneous	56	M	1	15+	+	+	-	-	+	-	-
75	Cut ALCL	Cutaneous	82	M	NS	Lost	-	+	+	+	+	-	-
76	Cut ALCL	Cutaneous	41	M	1	7+	+	+	+	-	+	-	+
77	Cut ALCL	Cutaneous	67	F	1	Lost	-	-	-	-	+	-	-
78	Cut ALCL	Cutaneous	57	M	1	8+	+	-	-	-	+	-	-
79	Cut ALCL	Cutaneous	50	M	1	5+	-	+	-	-	+	-	-

R, disease recurrence; loc, localisation; F, female; m, male; NS, not staged; nd, not done; sur, survival in months.
 +, Patient still alive after a follow-up of the months given immunophenotype; +, strong stain, (+), partial or weak stain; -, negative stain.

recurrences. Among the primary PTCL NOS (cases 1 to 36), in total, 281 chromosomal imbalances were observed, with losses ($n = 159$) occurring more frequently than gains ($n = 122$) (Table 1; Figure 1). Only one case was negative for genetic imbalances in CGH. The number of chromosomal imbalances among PTCL NOS ranged between 0 and 20 (median, 7 imbalances; average, 7.8 imbalances). The number of losses ranged between 0 and 13 (median, 3 losses; average, 4.4 losses), and the number of gains between 0 and 10 (median, 3 gains; average, 3.4 gains).

The most frequent recurrent losses of chromosomal material were observed at 13q (minimally overlapping region 13q21; 13 cases, 36%), 6q and 9p (6q21 and 9p21-pter; 11 cases each, 31%), 10q and 12q (10q23-24 and 12q21-q22; 10 cases, 28%), and 5q (5q21; 9 cases, 25%) (Figure 1, continuous lines). Further recurrent losses were found on chromosomes 8p (8p21-pter; seven cases, 19%), and on chromosomes 10p and 17p

(10cen-p12 and 17p13; six cases each, 17%). The pattern of losses of chromosome 6q was rather complex; besides a minimally overlapping region of 6q21 lost in 11 cases (31%), material from other chromosomal bands was also frequently lost, among them 6q22 (lost in nine cases, 25%), 6q24-qter/6q15-q16 (lost in eight cases, 22%), and 6q14/6q23 (lost in seven cases, 19%).

Gains of chromosomal material in primary cases of PTCL NOS were most frequently observed on chromosomes 7q (7q22-qter; 11 cases, 31%), 17q (17cen-q21; 9 cases, 25%); 16p (8 cases, 22%); 8q and 9q (8q24 and 9q33-qter; 7 cases each, 19%); and 3p, 1q, and 11q (3p21, 1q32-qter, and 11cen-q13; 6 cases each, 17%) (Figure 1).

In 11 PTCLs, altogether 16 high-level gene amplifications were observed. Recurrent amplifications were detected at 12p13 (three cases), 1p36, and 6p25 (two cases each). Solitary amplifications were observed at 2cen-p22, 5q13, 6p12, 6p21, 8q23-q24, 11p11-p12,

Table 2. *Continued*

EMA	Ki67	Chromosomal gains	Chromosomal losses
+	ND	-	-9p21-pter
+	60%	+1q, +Xp	-10p
+	80%	+6p, +7p21-pter, +7q34-qter, +17q	-11, -13q21-q22; -18q
+	70%	-	-
+	90%	+6p21-p22	-
+	70%	+7p15-pter	-8p21-pter
+	80%	+2p23-pter, +2cen-q33	-
+	80%	+1q	-4q33-qter, -9p23-pter, -10p, -11q22-qter
ND	90%	+1q, 4q31-q34 (high-level), +6p24-p25, +7p21-pter	-6q
ND	60%	+1, +12q24-qter	-
-	90%	-	-
-	70%	-	-
+	70%	-	-
-	90%	+1q	-11p, -13q21-qter, -X
-	70%	+4p16-pter, +6p, +16p12-pter, +17cen-q22, +22	-1cen-p22, -6q16-qter, -8q13-q22, -12q21-22, -18, -Xq
-	90%	+1q, +6p, +6q25-qter	-8q21-q23
+	70%	+1q, +5q35-qter, +6p21, +8q24-qter, +17q12-q21 (high-level)	-2q22-q32, -4q22-q25, -6q21-q22, -6q26-qter, -8p, -13cen-q22, -16q
-	90%	+1q41-qter	-2q21-q22, -7q21-q31, -10
+	90%	+1, +7	-
-	80%	+11p14-pter	-3q, -4q27-qter, -6q16-q22, -11q22-qter, -13q
-	90%	-	-
-	90%	-	-2q23-qter, -6q, -11p14-pter, -11q21-q23
+	70%	-	-4, -6q14-q22, -9p21-pter, -10, -11p, -12, -16q, -18
-	80%	-2q22-q33, -6q, -13q	+7q
-	80%	+17q	-6q16-qter
-	90%	+1p36 (high-level), +2p	-3cen-q26, -Xq
-	70%	-	-
-	90%	+5q34-pter	-6q
-	90%	+7q	-
-	90%	+6p	-8p
(+)	90%	+6p21, +7q34-qter	-
-	70%	-	-
-	90%	-	-
(+)	80%	-	-
-	90%	+4	-
-	80%	+8	-
-	80%	-	-16q

14q22-qter, 15q15, and 22q13. Six cases of PTCL NOS were lymphoma recurrences (cases 37 to 42), among which recurrent chromosomal alterations were observed at similar loci as in the primary PTCL NOS, among them losses of chromosomes 5q (5q21; three cases, 50%) and 10 (two cases, 33%), and gains of 7q (three cases, 50%) (Figure 1, dotted lines). In two cases, follow-up biopsies of recurrent lymphoma could be analyzed. In case 36, both specimens shared a loss of chromosome 3p21-p24 and a gain of 9q, whereas the recurrence additionally showed gains on chromosomes 1q, 5q, 14q, and Xq, and losses on 6q and 15q not present in the initial specimen. In case 40, both specimens shared gains of chromosomes 2p, 6p, 7, 16p, and 17q, and losses of 5q, 6q, 9, 10, 12q, and 16q whereas in the second recurrent specimen, additional gains were observed on 9q and 12q. Of note, the gain on 6p24-p25 showed a much stronger signal in the second recurrence, indicating an increase in copy number between both specimens.

Losses of Chromosomes 5q, 10q, and 12q Characterize a Group of Nodal CD5+ Noncytotoxic PTCL NOS

The genetic findings in PTCL NOS were correlated with clinical features and the immunophenotype in multivariate analysis. The group of PTCL NOS showing any losses of 5q/10q/12q was compared to those devoid of these genetic imbalances. This group of lymphomas was distinct from PTCL NOS not showing losses of 5q/10q/12q by a higher frequency of CD5 as well as by negativity for cytotoxic markers Granzyme B and TIA1 ($P < 0.05$). No particular histomorphological characteristics of this group of lymphoma could be identified. Both groups failed to show significant differences with regard to clinical stage at diagnosis; however, when comparing the overall survival of both groups, cases with losses of 5q/10q/12q showed a better overall survival than the remaining T-NHLs (Figure 3). Furthermore, amplifications of



Figure 1. Genetic gains and losses in PTCL NOS ($n = 42$). Summation profile of genetic gains and losses occurring in PTCL NOS as detected by CGH. **Left bar,** loss of chromosomal material; **right bar,** gain of chromosomal material; **thick bars,** high-level amplifications; **continuous lines,** genetic imbalances in PTCL NOS at disease presentation ($n = 36$); **discontinuous dotted lines,** genetic imbalances observed in recurrent PTCL NOS ($n = 6$).

chromosome 12p13 showed a statistically significant correlation with a cytotoxic immunophenotype (expression of TIA1 and/or Granzyme B). Extranodal PTCL NOS more frequently showed gains of 9q33-qter. No statistically significant correlation was observed between the total number of alterations, losses and gains, and clinical features. Similarly, no correlation was observed between losses of 13q, 6q, and 9p and gains of 7q, and immunohistochemical expression profiles and clinical features.

CGH of ALK-Negative ALCL

Seventeen cases of ALK-negative ALCL were analyzed by CGH, among them 13 primary cases and 4 lymphoma recurrences. Among the 13 primary ALK-negative ALCL (cases 52 to 64), nine cases together showed 49 chromosomal imbalances (20 gains and 29 losses) (Table 2; Figure 2, continuous lines). The number of chromosomal imbalances ranged between 0 and 12 (median, 4 imbalances; average, 3.8 imbalances). The number of losses ranged between 0 and 7 (median, 1; average, 2.2) and the number of gains between 0 and 5 (median, 1; average, 1.5). The most frequent genetic alteration in ALK-negative ALCL at disease manifestation was gain of chromosome 1q (1q41-qter; six cases, 46%). Recurrent losses of chromosomal material were observed on chromosomes 6q (6q21-q22; four cases, 31%) and 13q (13q21-q22; three cases, 23%). A high-level amplification was observed on chromosome 17q (17q12-q21). Among four recurrent ALK-negative ALCL (cases 65 to 68), three cases also showed loss of chromosomal material on 6q (6q21-q22, 75%) (Table 2; Figure 2, dotted lines).

chromosome 1q (1q41-qter; six cases, 46%). Recurrent losses of chromosomal material were observed on chromosomes 6q (6q21-q22; four cases, 31%) and 13q (13q21-q22; three cases, 23%). A high-level amplification was observed on chromosome 17q (17q12-q21). Among four recurrent ALK-negative ALCL (cases 65 to 68), three cases also showed loss of chromosomal material on 6q (6q21-q22, 75%) (Table 2; Figure 2, dotted lines).

CGH of ALK-Positive ALCL

Nine cases of ALK-positive ALCL were analyzed by CGH (cases 43 to 51), eight of which showed chromosomal gains and losses (range, 0 to 7 chromosomal imbalances) (Table 2). In total, 16 gains and 10 losses were observed (median number of chromosomal imbalances, 2; average, 2.9 per case). Recurrent gains were observed at 1q, 7p, and 6p (three cases each, 33%). Recurrent losses were found on chromosomes 9p, 10p, and 11q (two cases each, 22%). In one case (case 47), a lymphoma recurrence, a high-level amplification was observed at chromosome 4q31-q34.

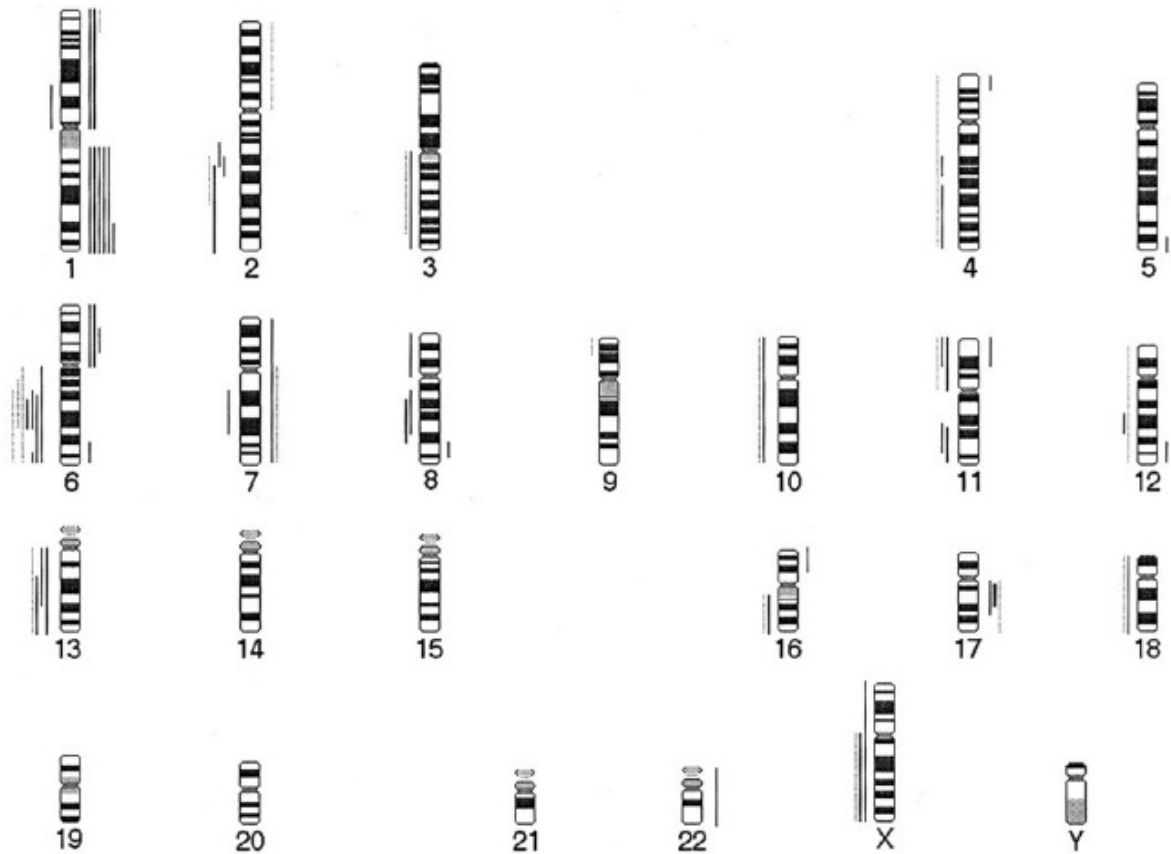


Figure 2. Genetic gains and losses in ALK-negative ALCL ($n = 17$). Summation profile of genetic gains and losses occurring in ALK-negative ALCL as detected by CGH. **Left bar,** loss of chromosomal material; **right bar,** gain of chromosomal material; **thick bars,** high-level amplifications; **continuous lines,** genetic imbalances in ALK-negative ALCL at disease presentation ($n = 13$); **discontinuous dotted lines,** genetic imbalances observed in recurrent ALK-negative ALCL ($n = 4$).

CGH of Cutaneous ALCL

Eleven cases of primary cutaneous ALCL were analyzed by CGH (cases 69 to 79), seven of which showed chromosomal imbalances (Table 2). In total, only seven gains and three losses were observed (median number of chromosomal imbalances, 1; average, 0.9). Gains involving 6p and 7q were observed in two cases each (18%). No high-level amplifications were observed.

Comparison of Genetics of Different Types of T-NHL

The chromosomal imbalances in PTCL NOS were compared to those of ALK-negative ALCL, and to those of ETCL we had previously published.⁸ In addition, they were compared to CGH results published in the literature on T-PLL and aggressive adult T-cell lymphoma (ATCL) (Table 3).^{11,12}

PTCL NOS and ALK-negative ALCL shared many recurrent genetic alterations (such as loss of 6q and 13q); in statistical analysis, however, they differed genetically with regard to the loss of 9p21-pter that occurred in 31% of PTCL NOS but never in this series in ALCL at disease

presentation (Fisher's, $P = 0.0244$). Furthermore, there was a trend for ALK-negative ALCL to more frequently show gains of chromosome 1q (46% versus 17%; Fisher's, $P = 0.0577$). Including the recurrent cases, PTCL NOS more frequently showed loss of chromosome 5q (33% versus 0%; Fisher's, $P = 0.0126$).

PTCL NOS also displayed characteristic genetic features in comparison to those of ETCL, T-PLL, and ATCL (for all genetic loci P value < 0.05 in Fisher's exact test): Losses of 12q 21-q22 segregated PTCL NOS from T-PLL, ETCL, and ATCL, losses of 5q21-q22, 6q21-q22, 10q23-q24, and 13q21 from ETCL and ATCL. Losses of 9p and gains of 17cen-q21 segregated PTCL NOS from ATCL. Furthermore, PTCL NOS significantly differed from ETCL because of the rare occurrence of gains of 9q; from T-PLL because of the rare occurrence of gains of 8q and 14q, and losses of 8p and 11q; and from aggressive ATCL because of the rarity of gains of chromosomes 3 and 14. Similarly, ALK-negative ALCL was genetically distinct from ETCL, T-PLL, and ATCL: gains of 1q segregated ALCL from T-PLL and ETCL, in addition, ALK-negative ALCL did not show the typical recurrent gains (of 8q, 14q) and losses (of 8p, 11q) of T-PLL, the characteristic recurrent gain of ETCL (gain of 9q), nor did it

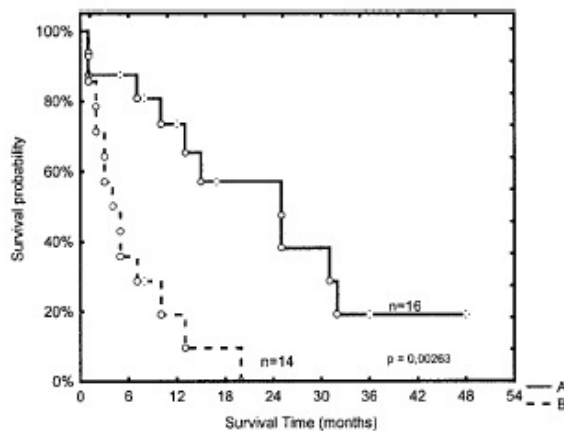


Figure 3. PTCL NOS with losses of 5q/10q/12q show a better survival rate. PTCL NOS displaying losses of 5q/10q/12q are characterized by frequent expression of CD5, a noncytotoxic phenotype and show a better survival rate as compared to cases devoid of these alterations (Kaplan-Meier). Line A, PTCL NOS with losses of 5q/10q/12q ($n = 16$; median follow-up, 14 months), line B, PTCL NOS devoid of losses of 5q/10q/12q ($n = 14$; median follow-up, 6 months).

display the common genetic features of aggressive ATCL (gains of chromosomes 3 and 14q).

Discussion

Among mature T- and NK-cell lymphomas, PTCL NOS and anaplastic large cell lymphoma (ALCL) are most frequent.¹ Yet, apart from ALK-positive ALCL carrying the translocation t(2;5) and its variants, the genetic features of these lymphomas are mostly unknown. We have investigated a series of 79 PTCL NOS and ALCL by CGH, revealing novel and recurrent characteristic chromosomal alterations.

The PTCL in our series consisted of 42 tumor cell-rich lymphomas that were mostly of nodal origin (93% of cases); frequently expressed CD3 (88%), CD4 (64%),

and CD5 (64%); and displayed a cytotoxic phenotype in 26% of cases. In similar lymphoma cases formerly classified as high-grade peripheral T-cell lymphomas, classical cytogenetics, in an albeit very limited number of cases studied, revealed a high degree of chromosomal complexity, polyploidy, and aberrations.³⁻⁶ In concordance, in our series, 43 of 44 cases (98%) of PTCL NOS showed on average more than seven genetic alterations, among them recurrent losses of chromosomes 6q, 13q, 9p, 5q, 12q, and 10q, and gains of chromosome 7q.

Losses of genetic material on chromosomes 6q and 13q are among the most frequent genetic alterations reported for T- and B-NHL.¹³ Similar to the CGH findings in our series, in classical cytogenetics, 20 to 35% of PTCL NOS showed deletions on 6q.³⁻⁶ Similarly, 6q deletions were frequently observed in CGH studies of ATCL, T-PLL, and NK-cell lymphoma/leukemia.^{11,12,14} In analogy to classical cytogenetics of PTCL NOS, 6q21 was the minimally deleted region; however, deletions affecting chromosomal bands 6q14-q16 and 6q23-q24 were also frequently observed (19 to 22% of cases).

Losses of chromosome 13q were observed in more than one third of our series of PTCL NOS, with losses of 13q21 representing the most frequent chromosomal loss among PTCL NOS at initial diagnosis. In previous cytogenetic studies, PTCL NOS showed 13q deletions in 14 to 26% of cases;^{3-6,15} recurrent 13q losses were also reported in CGH studies of ATCL, T-PLL, Sezary syndrome, and NK-cell neoplasms.^{11,12,14,16} The minimal overlapping region in our series of PTCL NOS was chromosomal band 13q21, telomeric to the chromosomal band 13q14 frequently deleted in a variety of B-cell lymphomas but also observed in classical cytogenetic analysis of PTCL NOS. A second minimal overlapping region on 13q was 13q31-qter, corresponding to the minimal overlapping deleted region reported for aggressive ATCL.¹¹

A further recurrent genetic alteration in our series of PTCL NOS was gain of chromosome 7q that we observed in 31% of PTCL NOS at diagnosis, and in 50% of PTCL

Table 3. Genetic Features of T-Cell Lymphomas—Comparison of CGH Findings in PTCL NOS and ALK-Negative ALCL with Previously Published CGH Data of ETCL, T-PLL, and ATCL

Chr.	MOR	PTCL $n = 36$	ALK-ALCL $n = 13$	ETCL $n = 38^9$	T-PLL $n = 22^{12}$	ATCL $n = 46^{11}$					
+1q	1q32-qter	6	17%	6	46%	5	13%	0	0%	11	24%
+3p	3p21	6	17%	0	0%	0	0%	1	4%	17	37%
+3p	3p24-pter	5	14%	0	0%	1	3%	1	4%	17	37%
+3q		2	6%	0	0%	0	0%	0	0%	16	35%
-5q	5q21-q22	9	25%	0	0%	1	3%	1	4%	4	9%
-6q	6q21-q22	11	31%	4	31%	3	8%	8	36%	4	9%
+7q	7q22-qter	11	31%	1	8%	8	21%	2	9%	15	33%
-8p	8p21-pter	7	19%	1	8%	8	21%	19	86%	3	7%
+8q	8q24	8	19%	1	8%	4	11%	18	82%	5	11%
-9p	9p21-pter	11	31%	0	0%	7	18%	6	27%	0	0%
+9q	9q33-qter	7	19%	0	0%	20	53%	0	0%	6	13%
-10q	10q23-24	10	28%	1	8%	2	5%	2	5%	3	7%
-11q	11q23-qter	3	8%	2	15%	4	11%	15	68%	0	0%
-12q	12q21-q22	10	28%	1	8%	1	3%	0	0%	1	2%
-13q	13q21	13	36%	3	23%	5	14%	9	41%	2	4%
+14q	14q32	3	8%	0	0%	1	3%	11	50%	15	33%
+17q	17cen-q21	9	25%	2	15%	3	8%	3	14%	2	4%

Chr, chromosome; MOR, minimally overlapping region; n, number of cases.

NOS at disease recurrence. Gains of chromosome 7q along with losses of 6q and 13q have been regarded as common secondary chromosomal alterations that may be associated with lymphoma progression. Of note, in our series, no statistical correlation between clinical features, immunophenotype, or histological type of lymphoma, and gains of 7q and losses of 6q and 13q were observed, giving indirect additional evidence for the possibly secondary nature of these genetic alterations in PTCL NOS.

Recurrent losses on chromosomes 5q, 10q, and 12q have not been reported so far in PTCL NOS. Losses of chromosome 5q, with 5q21 being the minimal overlapping region, were observed in 25% of PTCL NOS at initial diagnosis and in 50% of recurrent PTCL NOS. Although this chromosomal region harbors the adenomatous polyposis tumor suppressor gene locus *APC*, no candidate gene potentially involved in T-cell lymphomagenesis has so far been identified in this chromosomal region. Notably, small interstitial deletions of exactly the same chromosomal region have occasionally been observed in other types of T-NHL. Tsukasaki and colleagues,¹¹ in their series of aggressive ATCL, report small deletions of the minimal overlapping region 5q21-q22 in 4 of 46 cases studied (9%); similarly, in CGH studies of Sezary syndrome, two of seven cases showed loss of chromosome 5, one of them showing a deletion at 5q14-q23, including the minimally deleted region we first describe in PTCL NOS.¹⁶ Thus, genes located in the chromosomal region 5q21-q22 may play an important role in the pathogenesis of T-NHL, in particular in lymphomagenesis of PTCL NOS.

Twenty-eight percent of PTCL NOS showed deletions on chromosome 12q, with 12q21-q22 representing the minimal overlapping region. The chromosomal region 12q21-q22 harbors several genes potentially involved in T-cell lymphomagenesis, among them the proapoptotic genes *TDAG51* (T-cell death-associated gene 51),¹⁷ and *RAIDD/CRAD* (Casp2 and Ripk1 domain-containing adaptor with death domain),^{18,19} and *BTG1* (B-cell translocation gene 1),^{20,21} a gene negatively regulating lymphocyte proliferation.

Recurrent deletions were also observed on chromosome 10q, with a minimally overlapping region at 10q23-q24. Deletions of 10q have only rarely been observed in classical cytogenetics and CGH in T-cell lymphoma.^{3-6,11,12,16} Several genes potentially involved in T-cell lymphomagenesis have been annotated to this minimal overlapping region, among them the tumor suppressor genes *LG1* (leucine-rich gene 1, located at 10q24),²² *MXI1* (max interacting protein 1),²³ and the apoptosis gene *FAS*. Furthermore, the tumor suppressor gene *PTEN* is located at chromosomal band 10q23.3. *PTEN* has been shown to be an important regulator in T-cell homeostasis.^{24,25} T-cell-specific *PTEN* knockout mice develop CD4⁺ T-cell lymphomas at a very high frequency.²⁴ Similarly, mice with heterozygous mutant *PTEN* show an increased incidence of T-cell lymphomas, characterized by loss of heterozygosity of the wild-type allele.²⁵

The significance of the recurrent deletions of chromosomes 5q, 10q, and 12q in PTCL NOS was further highlighted by shared clinical and immunohistochemical features of lymphomas showing losses at either chromosomal location. In multivariate analysis, this group of lymphomas

segregated from the remaining, histologically not distinguishable PTCL NOS by significantly more frequent expression of CD5 and by negativity for cytotoxic markers. In addition, although based only on a limited number of cases, they showed a better overall survival compared to cases without losses of 5q/10q/12q.

Two other notable correlations were observed between genetic and clinical/immunohistochemical features. First, there was a statistically significant correlation between extranodal lymphoma localization and chromosomal gains at 9q, covering the minimal overlapping region previously reported for ETCL.⁹ Thus, our data suggest that at least some of the T-cell lymphomas comprised in the heterogeneous category of PTCL NOS, most notably those with an extranodal disease presentation, may share genetic features with ETCL. Second, all cases with an amplification at 12p13 showed a cytotoxic phenotype and were CD5-negative, delineating another potential genetic subgroup of T-NHL among PTCL NOS.

The distinction of various T-cell lymphoma entities in the World Health Organization classification is primarily based on morphology, immunohistochemistry, and clinical features.¹ Based on those characteristics, three different types of ALCL are distinguished: ALCL expressing ALK, primary systemic ALK-negative ALCL, and primary cutaneous ALCL.² The genetic relationship of ALK-negative ALCL to PTCL NOS is controversial. The detection of the t(2;5) in 60 to 80% of ALCL and its prognostic implications have raised the discussion whether this primary genetic abnormality alone defines this disease entity, while cases lacking the translocation and ALK-expression should be classified separately, eg, as a subgroup of PTCL NOS.^{1,2} The morphological distinction between PTCL NOS and ALCL, ALK-negative is controversial; however, in the current World Health Organization classification, PTCL NOS and ALCL, ALK-negative are kept separate. Following the criteria forwarded by the World Health Organization, to distinguish between PTCL NOS and ALK-negative ALCL, in this series, the latter diagnosis was only rendered if the lymphoma consisted mostly of large lymphoid cells with abundant cytoplasm, showed pleomorphic, embryo-like hallmark nuclei, and showed a very strong expression of CD30 in the majority of cells with a membrane and Golgi-pattern of staining. Following the World Health Organization classification,¹ lymphoma cases devoid of these morphological features and/or only weak or partial CD30 expression were classified as PTCL NOS. Although only based on a limited number of cases, our data support the distinction of PTCL NOS and ALK-negative ALCL: overall, ALK-negative ALCL showed a degree of genetic instability that differed from both PTCL NOS and ALK-positive ALCL (median of 4 imbalances ALK-negative ALCL in contrast to 7.3 in PTCL NOS and 2 in ALK-positive ALCL; $P < 0.05$); in addition, although both entities shared many recurrent genetic imbalances (such as losses of 6q, 10q, 12q, and 13q and gains of 7q), in this series, ALK-negative ALCL differed genetically from PTCL NOS with regard to losses of 5q and 9p. In our series, losses on chromosome 5q (5q21) and 9p (9p21-pter) were never observed in ALK-negative ALCL (and, of note, losses of 5q21 neither in

ALK+ALCL, cutaneous ALCL, or ETCL with ALCL morphology), while these losses were detected in 25% and 31% of PTCL NOS. Given the limited number of cases analyzed, further genetic studies will be required to highlight the genetic differences between ALK-negative ALCL and PTCL NOS.

Reflecting their distinction as distinct T-cell lymphoma entities in the World Health Organization classification, the genetic features of both PTCL NOS and ALK-negative ALCL significantly differ from those of ETCL, T-PLL, and aggressive ATCL.^{9,11,12} Our comparative study shows that PTCL NOS is characterized by losses of 5q that set this lymphoma apart from all other types of T-cell lymphoma investigated genetically so far, and by losses of 12q segregating it from T-PLL, ETCL, and aggressive ATCL. On the other hand, PTCL NOS and ALK-negative ALCL only rarely show the characteristic genetic features of T-PLL (namely, gains of 8q and 14q, and losses of 8p and 11q), of ETCL (gain of 9q), and of aggressive ATCL (gains of chromosome 3).

In summary, our study shows that among the morphologically and immunohistochemically heterogeneous group of PTCL NOS, genetic features may segregate at least one particular group of noncytotoxic nodal CD5+ T-cell lymphoma characterized by chromosomal losses of 5q, 12q, and 10q. Furthermore, although there is a considerable overlap between the genetic features of ALK-negative ALCL and PTCL NOS, losses of chromosome 5q and 9p and gains of chromosome 1q may segregate PTCL NOS from ALK-negative ALCL. PTCL NOS and ALK-negative ALCL are genetically distinct from other T-cell lymphoma entities investigated genetically so far, among them T-PLL, ATCL, and ETCL.

Acknowledgments

We thank all referring pathologists and hematologists for providing the tumor samples examined in the presented series and Erwin Schmitt for excellent photographic work.

References

1. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW: Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, IARC Press, 2001
2. Stein H, Foss HD, Durkop H, Marafioti T, Delsol G, Pulford K, Pileri S, Falini B: CD30+ anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic and clinical features. *Blood* 2000, 96:3681-3695
3. Schlegelberger B, Himmler A, Gödde E, Grote W, Feller AC, Lennert K: Cytogenetic findings in peripheral T-cell lymphomas as a basis for distinguishing low-grade and high-grade lymphomas. *Blood* 1994, 83:505-511
4. Schlegelberger B, Himmler A, Bartles H, Kuse R, Sterry W, Grote W: Recurrent chromosome abnormalities in peripheral T-cell lymphomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1994, 78:15-22
5. Schlegelberger B, Feller AC: Classification of peripheral T-cell lymphomas: cytogenetic findings support the updated Kiel classification. *Leuk Lymphoma* 1996, 20:411-416
6. Lepetre S, Buchonnet G, Stamatoullas A, Lenain P, Duval C, d'Anjou J, Callat MP, Tilly H, Bastard C: Chromosome abnormalities in peripheral T-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2000, 117:71-79

7. Renedo M, Martinez-Delgado B, Arranz E, Garcia MJ, Urioste M, Martinez-Ramirez A, Rivas C, Cigudosa JC, Benitez J: Chromosomal changes pattern and gene amplification in T cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* 2001, 15:1627-1632
8. Zetti A, Ott G, Makulik A, Katzenberger T, Starostik P, Eichler T, Puppe B, Bentz M, Müller-Hermelink HK, Chott A: Chromosomal gains at 9q characterize enteropathy-type T-cell lymphoma. *Am J Pathol* 2002, 161:1635-1645
9. Rüdiger T, Ott G, Ott MM, Müller-Daubert SM, Müller-Hermelink HK: Differential diagnosis between classic Hodgkin's lymphoma, T-cell-rich B-cell lymphoma and paraneoplasia by paraffin immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 1998, 22:1184-1191
10. Lichter P, Bentz M, Du Manoir S, Joos S: Comparative genomic hybridization. *Human Chromosomes: Principles and Techniques*, ed 2. Edited by RS Verma, A Babu. New York, McGraw-Hill, 1995, pp 191-210
11. Tsukasaki K, Krebs J, Nagai K, Tomonaga M, Koeffler P, Bartram CR, Jauch A: Comparative genomic hybridization analysis in adult T-cell leukemia/lymphoma: correlation with clinical course. *Blood* 2000, 97:3875-3881
12. Soulier J, Pierron G, Vecchione D, Garand R, Brizard F, Sigaux F, Stern MH, Aurias A: A complex pattern of recurrent chromosomal losses and gains in T-cell prolymphocytic leukemia. *Genes Chromosom Cancer* 2000, 31:248-254
13. Zhang Y, Matthiesen P, Harder S, Siebert R, Castoldi G, Calasanz MJ, Wong KF, Rosenwald A, Ott G, Atkin NB, Schlegelberger B: A 3-cM commonly deleted region in 6q21 in leukemias and lymphomas delineated by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 2000, 27:52-58
14. Siu LP, Wong KF, Chan JKC, Kwong YL: Comparative genomic hybridization analysis of natural killer cell lymphoma/leukemia. *Am J Pathol* 1999, 155:1419-1425
15. Rosenwald A, Ott G, Krumdiek AK, Dreyling MH, Katzenberger T, Kalla J, Roth S, Ott MM, Müller-Hermelink HK: A biological role for deletions in chromosomal band 13q14 in mantle cell and peripheral T-cell lymphoma? *Genes Chromosom Cancer* 1999, 26:210-214
16. Karenko L, Kähkönen M, Hyytinen ER, Lindlöf M, Ranki A: Notable losses at specific regions of chromosome 10q and 13q in the Sezary syndrome detected by comparative genomic hybridization. *J Invest Dermatol* 1999, 112:392-395
17. Neef R, Kuske MA, Prols E, Johnson JP: Identification of the human PHLA1/TDAG51 gene: down-regulation in metastatic melanoma contributes to apoptosis resistance and growth deregulation. *Cancer Res* 2002, 62:5920-5929
18. Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Talanian RV, Litwack G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES: CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2 and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res* 1997, 57:615-619
19. Hofmann WK, de Vos S, Tsukasaki K, Wachsman W, Pinkus GS, Said JW, Koeffler HP: Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood* 2001, 98:787-794
20. Rouault JP, Rimokh R, Tessa C, Paranhos G, French M, Duret L, Garocci M, Germain D, Samarut J, Magaud JP: BTG1, a member of a new family of antiproliferative genes. *EMBO J* 1992, 11:1663-1670
21. Sasajima H, Nakagawa K, Yokosawa H: Antiproliferative proteins of the BTG/Tob family are regulated by the ubiquitin-proteasome system. *Eur J Biochem* 2002, 269:3596-3604
22. Chemova OB, Somerville RPT, Cowell JK: A novel gene, LG11, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors. *Oncogene* 1998, 17:2873-2881
23. Wechsler DS, Hawkins AL, Li X, Jabs EW, Griffin CA, Dang CV: Localization of the human Mx1 transcription factor gene (MX1) to chromosome 10q24-q25. *Genomics* 1994, 21:669-672
24. Suzuki A, Yamaguchi MT, Ohteki T, Sasaki T, Kaisho T, Kimura Y, Yoshida R, Wakeham A, Higuchi T, Fukumoto M, Tsubata T, Ohashi PS, Koyasu S, Penninger JM, Nakano T, Mak TW: T cell-specific loss of PTEN leads to defects in central and peripheral tolerance. *Immunity* 2001, 14:523-534
25. Suzuki A, de la Pompa JL, Stambolic V, Elia AJ, Sasaki T, del Barco Barrantes I, Ho A, Wakeham A, Itie A, Khoo W, Fukumoto M, Tak TW: High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol* 1998, 8:1169-1178

Danksagung

Allen, namentlich erwähnt oder unerwähnt, die mich während dieser Arbeit unterstützt und einen Beitrag zu ihrem Gelingen geleistet haben, möchte ich ganz herzlich danken.

Für seine stets geduldige und motivierende Betreuung und Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas und Erstellung der Dissertation bedanke ich mich ganz besonders herzlich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Zettl.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H.-K. Müller-Hermelink für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Materialien und technischen Hilfsmittel.

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats und sein Interesse an meiner Arbeit.

Lieber herzlicher Dank geht auch an Frau Dr. med. Martina Hartmann für das Korrekturlesen und die wichtigen Ratschläge.