

Aus dem Institut für Pathologie, Campus Benjamin Franklin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

### **Expression des Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziierten Faktors 1 in neoplastischen und reaktiven lymphatischen Läsionen**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maria Grünbaum  
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Dürkop

2. Prof. Dr. J. Gerdes

3. Priv.-Doz. Dr. rer. Nat. J. Eberle

Datum der Promotion: 22.02.2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	4
<b>2. Material und Methoden</b> .....	11
2.1 Untersuchungsmaterial .....	11
2.2 Herstellung der Paraffinschnitte .....	12
2.3 Antikörper .....	13
2.4 Die APAAP-Färbemethode .....	13
2.5 Auswertungskriterien und Statistik .....	15
<b>3. Ergebnisse</b> .....	17
3.1 Färbemuster des TRAF1 Antikörpers .....	17
3.2 TRAF1-Expression in Normalgeweben .....	17
3.2.1 TRAF1-Expression in lymphatischen Organen .....	17
3.2.2 TRAF1-Expression in nicht-lymphatischen Normalgeweben .....	17
3.3 TRAF1-Expression in reaktiven, lymphatischen Läsionen.....	19
3.3.1 Infektiöse Mononukleose .....	19
3.3.2 Dermatopathische Lymphadenopathie .....	19
3.4 TRAF1-Expression in lymphatischen Neoplasien .....	20
3.4.1 TRAF1-Expression in Hodgkin-Lymphomen.....	20
3.4.2 TRAF1-Expression in Non-Hodgkin-B-Zell-Lymphomen.....	25
3.4.2.1 Primäre mediastinale B-Zell-Lymphome:.....	25
3.4.2.2 Anaplastische Variante der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome: .....	26
3.4.2.3 Primäre diffuse großzellige B-Zell-Lymphome, weitere Subtypen .....	27
3.4.2.4 T-Zell-reiches B-Zell-Lymphom.....	28
3.4.2.5 Plasmoblastisches Lymphom .....	29
3.4.2.6 B-lymphoblastisches Lymphom vom Vorläufertyp .....	29
3.4.2.7 Plasmozytom .....	29
3.4.2.8 Burkitt-Lymphom.....	29
3.4.2.9 Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ .....	29
3.4.2.10 Weitere kleinzellige B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome.....	30
3.4.3 TRAF1-Expression in EBV-assoziierten Lymphoproliferationen .....	32
3.4.4 TRAF1-Expression in Non-Hodgkin-T-Zell-Lymphomen .....	33
3.4.4.1 Anaplastisches großzelliges T-Zell-Lymphom ohne Expression des ALK- Fusionsproteins.....	33
3.4.4.2 Anaplastisches großzelliges T-Zell-Lymphom mit Expression des ALK- Fusionsproteins.....	33
3.4.4.3 Primäres kutanes anaplastisches großzelliges T-Zell-Lymphom.....	34
3.4.4.5 NK-Zell-Lymphom .....	35
3.4.4.6 Mycosis fungoides und Sézary Syndrom .....	35
3.4.4.7 Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom .....	36
3.5 TRAF1-Expression in der Lymphomatoiden Papulose .....	37
3.6 TRAF1-Expression in nicht-lymphatischen Tumoren .....	40
3.6.1 Langerhanssche Histiozytose .....	40
<b>4. Diskussion</b> .....	42
<b>5. Zusammenfassung:</b> .....	52
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	53
<b>7. Abkürzungen und Erläuterungen der vorstehenden Tabellen</b> .....	63
<b>8. Danksagungen:</b> .....	64
<b>9. Lebenslauf:</b> .....	65
<b>10. Erklärung</b> .....	66

# 1. Einleitung

Die Auslösung eines Zelltods kann nach heutiger Auffassung auf zwei Wegen zustande kommen: durch Nekrose und Apoptose.

Die Nekrose, der induzierte Zelltod, tritt nach stärkerer Schädigung einer Zelle auf. Im Gegensatz dazu steht die Apoptose, der so genannte programmierte Zelltod. Sie wird charakterisiert durch einen weitgehend stereotypen Ablauf: eine Fragmentation der DNA, eine Kondensation des Kernchromatins, eine Zellschrumpfung und eine Abschnürung von Membranzusammenhängenden Vesikeln (apoptotic bodies) (1, 2). Die Apoptose spielt eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung, bei der Homöostase der Gewebe sowie auch bei der Erhaltung der Funktionen des Immunsystems (3-6). Zellen sterben durch Apoptose zum Beispiel im Rahmen der embryonalen Bildung des Nervensystems oder auch im Zusammenhang mit der Erneuerung der Wechselgewebe (3, 7). Vielzellige Organismen können mittels Apoptose überflüssige, beschädigte oder infizierte Zellen eliminieren (1).

Angesichts der Beteiligung an der Regulation derartiger zentraler Funktionen ist es leicht vorstellbar, dass sich Störungen dieses Vorgangs fatal auswirken können.

Ein Ausbleiben des programmierten Zelltods kann an der Bildung von malignen Tumoren oder Autoimmunerkrankungen beteiligt sein (8-14).

Umgekehrt steht eine Aktivierung zur falschen Zeit möglicherweise im Zusammenhang mit der Alzheimerschen Erkrankung (15, 16) und mit dem Absterben von bestimmten cerebralen Neuronen nach ischämischer Schädigung im Rahmen eines Apoplex (17, 18).

Die Apoptose ist ein komplexes genetisches Programm, dessen Abläufe bislang nicht vollständig verstanden werden. Eine zentrale Komponente am Ende des Prozesses stellt offenbar ein kaskadisch aufgebautes, im Rahmen der Evolution stark konserviertes, proteolytisches System von Proteinen dar, den so genannten Caspasen (19, 20). Sie liegen meist als inaktive Proenzyme vor, werden durch proteolytische Spaltung aktiviert und sind offenbar auf letztlich noch nicht endgültig geklärtem Weg für die oben beschriebenen morphologischen Effekte verantwortlich.

Eine weitere Schlüsselrolle scheinen die Mitochondrien zu spielen (21, 22, 23). Es sind heute zumindest drei Mechanismen bekannt, die die Mitochondrien in die Apoptose involvieren. Ein Mechanismus ist die Freisetzung von Caspasen-aktivierenden Proteinen, z.B. Cytochrom C (24-28). Dieses bildet einen Komplex unter anderem mit der Procaspase-9, das so genannte

Apoptosom (25). Eine zweite Möglichkeit bildet die Unterbrechung des Elektronentransportes und des Energiestoffwechsels (22, 29). Zum dritten kann das zelluläre Redoxpotential gestört werden über eine Vermehrung der Superoxidanionen-Produktion (30).

Nur teilweise bekannt sind die Mechanismen, die den apoptotischen Prozess einleiten. Eine Möglichkeit der Initiation besteht in der Signalübermittlung über so genannte Todesrezeptoren (death receptors), ein Weg, der insbesondere im Immunsystem eine wichtige Rolle spielt (31, 32, 33). Diese Rezeptoren befinden sich an der Zelloberfläche und können Signale von verschiedenen, spezifischen Liganden aufnehmen. Die Todesrezeptoren sind Mitglieder einer Proteinfamilie, der Tumor-Nekrose-Factor-Rezeptor(TNFR)-Superfamilie, die über untereinander ähnlich aufgebaute, Zystein-reiche, extrazelluläre Abschnitte definiert wird (34, 35, 36). Die Untergruppe der Todesrezeptoren verfügt darüber hinaus zusätzlich über eine homologe, circa 80 Aminosäuren lange zytoplasmatische Sequenz, die Todesdomäne (death domain) (37, 38). Diese Domäne befähigt die Rezeptoren teils unter Mitwirkung weiterer Faktoren, die Caspasen-Kaskade und damit die Apoptose zu aktivieren, kann aber unter Umständen auch andere, mitunter antiapoptotische Wirkungen haben (39-43).

Die Liganden der TNFR-Proteinfamilie gehören zu der Gruppe der Tumor-Nekrose-Factor-(TNF)-Superfamilie und tragen ebenfalls untereinander strukturelle Ähnlichkeiten (34, 35, 36). Sie bilden eine Familie von Zytokinen, die circa 20 Mitglieder umfasst. Sie werden überwiegend von aktivierten Monozyten und Makrophagen exprimiert, aber auch von vielen anderen Zelltypen, einschließlich B- und T-Lymphozyten und Fibroblasten (44-48). Diese Zytokine spielen aber nicht nur bei der Regulation der Apoptose eine Rolle (beispielsweise durch TNF, LT, CD95L, TRAIL) (38, 49-54). Sie führen darüber hinaus zu unterschiedlichen Effekten wie Zelldifferenzierung (beispielsweise TNF, RANKL, DR6) (49) oder Proliferation (beispielsweise TNF, CD70, CD30L, CD40L, OX40L) (49) und sind damit involviert unter anderem in die Regulation des Immunsystems und in die Hämopoese (55-59), in den Schutz vor Infektionen (60), in die Proliferation, Invasion und Metastasierung von Tumoren (53, 61) und in den Knochenstoffwechsel (62-64).

Viele dieser Effekte werden offenbar über zwei zentrale Reaktionswege vermittelt: die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B- und der AP-1-Familie (36, 46, 49, 50). NF- $\kappa$ B führt zur Expression von Genen, die an inflammatorischen und antiapoptotischen Reaktionen beteiligt sind (67,68). Die AP-1-Aktivität spielt im Rahmen der Stressreaktionen eine Rolle und

kann sowohl zum Zellüberleben als auch zum Zelltod führen (70, 71). AP-1 wird aktiviert über bestimmte Kinasen (MAP-Kinasen), unter anderem auch die Jun NH2-terminal-Kinase (JNK) (67).

Neben den oben beschriebenen Todesrezeptoren gibt es unter den TNF-Rezeptoren noch eine zweite Gruppe, der die Todesdomäne fehlt (beispielsweise TNFR2). Diese Rezeptoren haben keine eigene enzymatische Aktivität. Deren Effekte werden über unterschiedliche Adapterproteine übermittelt. Im Wesentlichen sind dies die TNFR-assoziierten Faktoren (TRAFs) (69).

Die ersten beiden TRAFs wurden 1994 anhand ihrer Interaktion mit TNFR2 identifiziert (70). Heute sind sechs verschiedene TRAF-Proteine (TRAF1 bis TRAF6) beim Menschen und bei der Maus bekannt (70-76). Zusätzlich sind vier verwandte, einfacher gebaute Proteine beschrieben, für die bislang allerdings keine Bindung an die TNFR-Superfamilie nachgewiesen worden ist (77).

Bis auf TRAF4, das ein nukleäres Protein ist und für das bisher keine Interaktion mit einem TNF-Rezeptor nachgewiesen werden konnte, sind alle TRAFs im Zytoplasma zu finden (78). Die TRAF-Moleküle sind zwischen 409 (TRAF1) und 567 (TRAF3) Aminosäuren lang (36) und weisen ein gemeinsames strukturelles Motiv auf: Am C-terminalen Ende des Proteins befindet sich die so genannte TRAF-Domäne (70), die offenbar unter anderem für die Übermittlung der Protein-Rezeptor-Interaktionen und für eine Oligomerisation von TRAF-Molekülen verantwortlich ist (79).

Zwei weitere Gemeinsamkeiten teilen alle TRAF-Moleküle mit Ausnahme von TRAF1 in ihrer aminoterminalen Hälfte: zum ersten das RING-(really interesting new gene)-Finger-Motiv nahe am N-terminalen Ende (79). Dieses enthält eine Bindungsstelle für Zink-Ionen und ist bedeutsam für die Protein-Protein-Interaktionen. Es spielt offenbar eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung der oben erwähnten Reaktionswege über NF- $\kappa$ B oder JNK. Die zweite Gemeinsamkeit bildet die Zink-Finger-Domäne zwischen dem RING-Finger und der TRAF-Domäne, die zumeist aus fünf Zink-Finger Strukturen besteht. Zink-Finger-Strukturen sind involviert in die Bindung von Proteinen an DNA (79).

Das TRAF1-Protein nimmt eine Sonderstellung unter den Mitgliedern der TRAF-Familie ein: Das RING-Finger-Motiv fehlt, und das Zink-Finger-Motiv kommt nur einfach vor (69). Dies legt

den Gedanken nahe, dass TRAF1 eventuell eine negativ regulatorische Funktion erfüllen könnte (80).

Um die Funktion von TRAF1 zu klären, ist eine Vielzahl von Experimenten ausgearbeitet worden. Aus diesen teils in vivo, teils in vitro durchgeführten Untersuchungen ergaben sich unterschiedliche, mitunter widersprüchlich erscheinende Beobachtungen. Die Frage nach der Funktion des TRAF1-Proteins ist offenbar nicht auf einfache Weise zu beantworten.

Insgesamt gibt es sowohl Hinweise auf negativ regulatorische Funktionen von TRAF1 (80) als auch auf proapoptotische (81, 82) sowie des Weiteren auch auf antiapoptotische Effekte (83). Offenbar ist dies abhängig von der Zellart, von dem Zustand der intrazellulären Signaltransduktion und von dem assoziierten TNFR. TRAF1 führt in Verbindung mit einigen TNFRs zu stimulatorischen, in Kombination mit anderen TNFRs zu inhibitorischen Effekten. Einige dieser Beobachtungen sollen im Folgenden kurz skizziert werden.

Aus Experimenten, die allerdings auf einer Überexpression von TRAF1 beruhen, stammen Hinweise auf direkte Assoziationen von TRAF1 mit einer Reihe der TNFR wie CD30 (81, 82), 4-1BB (84), HVEM (herpes virus entry mediator) (85), RANK (receptor activator of NF- $\kappa$ B) (86, 87), CD40 (88), AITR (activation-inducible TNFR family member) (87), mit LMP1 (latentes Membranprotein des Epstein Barr Virus) (89) und BCMA (B cell maturation protein) (90). Des Weiteren soll es eine indirekte Assoziation mit TNFR1 und TNFR2 geben (36, 69, 70). Darüber hinaus soll TRAF1 verschiedene zytoplasmatische Proteine binden, zum Beispiel TANK (TRAF-associated and NF- $\kappa$ B activator, bzw. I-TRAF) (91, 92), TRIP (TRAF-interacting protein) (93), A20 (ein NF- $\kappa$ B inhibitorisches Protein) (94), RIP4 (95), CARDIAK (CARD-containing interleukin (IL)-1 beta converting enzyme (ICE) associated kinase) (96), das Caspase-8 bindende Protein vFLIP (FLICE inhibitory protein) (97), NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase) (101,102) sowie cIAP1 und cIAP2 (apoptosis-suppressor inhibitor of apoptosis) (83).

Diese Fülle von Interaktionen würde erwarten lassen, dass das Fehlen des TRAF1-Gens zu erheblichen Defekten führt, wie dies bei den anderen TRAFs in entsprechenden Experimenten gezeigt wurde (99). Überraschenderweise sind aber TRAF1-/- Mäuse phänotypisch normal. Sie haben keine offensichtlichen Defekte in der Entwicklung der T- oder B-Zellen, weisen normale Lymphozytenzahlen in den peripheren lymphatischen Organen auf, und die Antikörperantwort ist unbeeinflusst (80). Lediglich die inguinalen Lymphknoten zeigen ein erhöhtes T/B-Zell-Verhältnis (80).

Allerdings werden bei TRAF1<sup>-/-</sup> Mäusen TNF-Signale verstärkt weitergegeben (80), was die oben genannte Vermutung einer negativ regulatorischen Funktion von TRAF1 stützt.

Zudem zeigen Lymphozytenkulturen von TRAF1<sup>-/-</sup>-Mäusen *in vitro* eine hyperproliferative Antwort nach Stimulation durch den T-Zell-Antigen Rezeptor Komplex (TCR) mit Antikörpern gegen CD3 (80).

Scheinbar im Widerspruch hierzu stehen Ergebnisse aus Experimenten mit transgenen Mäusen, die das TRAF1-Gen überexprimieren. Diese Mäuse zeigen normale T-Zell-Populationen (100). Aus diesen Mäusen isolierte T-Zellen weisen eine unveränderte Proliferation von T-Lymphozyten auf bei Stimulation von CD3 (100). Eine Überproduktion von TRAF1 scheint in diesem Fall die CD3-vermittelte T-Zell-Proliferation nicht zu stören.

Hinweise auf eine inhibitorische Wirkung bezüglich der NF- $\kappa$ B-Aktivierung stammen aus Experimenten, in denen gezeigt werden konnte, dass TRAF1 Heteromere mit TRAF2 bilden kann (70, 101) und auf diese Weise die Bindung von TRAF2 an CD40 und die konsekutive Aktivierung von NF- $\kappa$ B abschwächen kann. Zusätzlich könnte die NF- $\kappa$ B-Aktivierung über eine negative Rückkopplung inhibiert werden, denn TRAF1 ist im Unterschied zu den anderen TRAFs induzierbar durch NF- $\kappa$ B (102). Durch diesen Mechanismus wird möglicherweise eine übermäßige Aktivierung verhindert oder nur ein kurzfristiger starker Anstieg erlaubt.

Spekuliert wurde auch über eine Sequestrierung von Kinasen wie NIK, die ebenfalls an der Aktivierung von NF- $\kappa$ B beteiligt sind. Diese binden an die TRAF-Domäne, benötigen aber zur Aktivierung die RING-Domäne, die dem TRAF1-Molekül fehlt (98).

Weitere Versuche erbrachten Hinweise auf proapoptotische Wirkungen von TRAF1: Es konnte gezeigt werden, dass TRAF1 in ein proapoptotisches Protein umgewandelt werden kann durch Spaltung mittels der Caspase-8 im Rahmen einer durch TNF- $\alpha$  oder Fas-Liganden induzierten Apoptose (103,104,105). Von den zwei entstehenden Fragmenten hat das COOH-terminale Ende offenbar eine proapoptotische Wirkung durch Inhibition der NF- $\kappa$ B-Aktivierung.

Im Gegensatz dazu sind antiapoptotische Effekte beschrieben worden im Rahmen einer Komplexbildung von TRAF1 mit TRAF2 und den beiden Caspase-Inhibitoren cIAP1 und cIAP2. Dieser Komplex kann offenbar die durch TNF- $\alpha$  induzierte Apoptose unterdrücken (83). In Einklang mit diesen antiapoptotischen Effekten steht auch die Beobachtung, dass TRAF1 die Apoptose supprimieren kann bei transgenen Mäusen mit Überexpression von TRAF1 in CD8-positiven T-Zellen. Hier ist die über den T-Zell-Rezeptor vermittelte Apoptose reduziert (100).



In Zusammenschau dieser Befunde kann man spekulieren, dass es vielleicht gerade die gegensätzlichen, potentiellen Wirkungen von TRAF1 sind, die zu dem normalen Phänotypus bei TRAF1-defizienten Mäusen führen. Möglicherweise ist dadurch TRAF1 befähigt, eine Schlüsselrolle zu spielen in der Balance zwischen Zelltod und –überleben.

Bezüglich der molekularen Struktur und Funktion der TRAF-Moleküle konnten bislang viele Informationen gewonnen werden, weniger ist jedoch bekannt über ihre Expression in vivo. TRAF2, 3, 5 und 6 sollen ubiquitär exprimiert werden (78). TRAF4 wurde anhand seiner selektiven Expression im Mammakarzinom entdeckt, es kann in normalem Thymusgewebe des Menschen (Epithelien) und in dendritischen Zellen des Lymphknotens und in der Basalzellschicht der meisten Epithelien im Körper nachgewiesen werden (106).

Eine Expression von TRAF1 wurde in der Milz, in der Lunge und im Hoden bei der Maus beschrieben (70). Anhand von in situ Hybridisierung wurde eine Überexpression von TRAF1-Transkripten in den Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen (HRS) des Hodgkin-Lymphoms nachgewiesen, bei Epstein-Barr-Virus-assoziierten Erkrankungen und in anaplastischen großzelligen Lymphomen bei überwiegender TRAF1-Negativität der in die Untersuchungen einbezogenen Non-Hodgkin-Lymphome (107).

Eine andere Publikation beschreibt eine deutlich breiter gefächerte TRAF1-Expression, die eine Reihe von B-Zell-Lymphomen umfasst (50% der untersuchten Fälle), insbesondere auch die chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ sowie auch unterschiedliche Epithelarten (78). Gemäß einer weiteren Veröffentlichung sollen die primären mediastinalen B-Zell-Lymphome TRAF1-positiv sein im Gegensatz zu den anderen diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen (108). Die gleiche Arbeitsgruppe beschreibt auch in weiteren Arbeiten die diagnostische Verwendbarkeit von TRAF1 in Kombination mit dem Molekül c-Rel zur Erkennung der primären mediastinalen B-Zell-Lymphome (109, 110).

In Zusammenfassung der bekannten Daten zeigt es sich, dass TRAF1 im Hinblick auf Struktur und Funktion einzigartig ist unter den TRAF-Molekülen. Die Ergebnisse der bislang durchgeführten Experimente weisen daraufhin, dass sich diese Sonderstellung von TRAF1 auch im Verteilungsmuster in gesunden und kranken Geweben widerspiegelt, allerdings sind die Informationen diesbezüglich bislang nicht vollständig, beziehungsweise teils nicht übereinstimmend. Es stellt sich somit die Frage nach der Nutzbarkeit von TRAF1 in der diagnostischen Medizin.

### **Fragestellung:**

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die teils widersprüchlichen Aussagen über das Verteilungsmuster der TRAF1-Expression in Normalgeweben und diversen Krankheitsentitäten geprüft, präzisiert und ergänzt werden. Hierfür soll die immunhistochemische Methodik Anwendung finden. Die bislang existierenden Daten beruhen zumindest teilweise auf der Nutzung eines kommerziell erhältlichen Antikörpers für TRAF1 (Santa Cruz, H3) (78, 108, 109, 110). Im Vorfeld dieser Arbeit ergaben sich Hinweise auf eine mangelnde Spezifität dieses Antikörpers. Dies könnte einen Grund darstellen für die teilweise vorhandene Inkongruenz der Untersuchungsergebnisse. Deswegen wurde ein neuer, hochspezifischer, monoklonaler Antikörper generiert und für die vorliegenden Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Mithilfe dieses Antikörpers soll zunächst ein Bild der TRAF1-Expression der unterschiedlichen Normalgewebe, einschließlich der embryonalen Gewebe erstellt werden. Des Weiteren sollen einige reaktive lymphatische Läsionen hinsichtlich ihrer TRAF1-Expression betrachtet werden. Im Anschluss daran sollen insbesondere die verschiedenen Lymphomentitäten, aber auch Tumoren anderer Herkunft untersucht werden.

Die gewonnenen Informationen sollen zusammengefasst, mit den in der Literatur vorliegenden Daten verglichen und bezüglich der diagnostischen Wertigkeit diskutiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Untersuchungsmaterial

Präparate von insgesamt 472 Patienten wurden ausgesucht, die nach der operativen Entnahme zur diagnostischen histopathologischen Beurteilung in das Institut für Pathologie der Charité Berlin, Standort Benjamin Franklin, frisch oder in Formalin-Fixierung eingesandt worden waren.

Die Gewebeproben wurden beurteilt anhand von konventionell-histologischen Färbungen, immunhistologischen Färbungen sowie in einigen Fällen zusätzlich durch molekularpathologische Klonalitätsanalyse. Die Diagnosestellung erfolgte nach den Kriterien der WHO-Klassifikationen (111).

Zur Untersuchung wurden ausgewählt (in Klammern angegeben jeweils die Fallzahl):

Gewebe mit regelhafter Architektur: Tonsillen (4), Thymus (3), Milz (3), Ösophagus (4), Magen (4), Duodenum (2), Kolon (2), Leber (3), Lunge (3), Mamma (4), Uterus (5), Ovar (4), Tube (1), Prostata (3), Hoden (2), Niere (3), Harnblase (4), Haut (3), Nebenschilddrüse (2), Schilddrüse (2), Nebenniere (1), foetales Gewebe (8 und 13 SSW, jeweils 1).

Lymphome: Hodgkin-Lymphome (insgesamt 64 Fälle, davon 33 Hodgkin-Lymphome vom Typ noduläre Sklerose, 22 Hodgkin-Lymphome vom Mischtyp, 4 Hodgkin-Lymphome vom lymphozytenreichen Typ und 5 Lymphozyten-prädominante Hodgkin-Lymphome), B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (insgesamt 130 Fälle, davon 13 primäre mediastinale B-Zell-Lymphome, 20 diffuse großzellige B-Zell-Lymphome, anaplastische Variante, 12 diffuse großzellige B-Zell-Lymphome vom zentroblastischen, zentro-immunoblastischen oder immunoblastischen Typ, 6 plasmoblastische Lymphome, 3 Vorläufer B-Zell-lymphoblastische Lymphome, 6 T-Zell-reiche B-Zell-Lymphome, 6 Plasmozytome, 21 Burkitt Lymphome, 10 chronische lymphatische Leukämien vom B-Zelltyp, 4 Immunozytome, 13 Follikuläre Lymphome Grad I/II/III, 8 Marginalzonenlymphome, 8 Mantelzell-Lymphome), T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (insgesamt 82 Fälle, davon 19 anaplastische großzellige T-Zell-Lymphome ohne Expression des ALK-Proteins, darunter 13 sekundäre kutane Manifestationen eines systemischen anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphoms, 11 anaplastische großzellige T-Zell-Lymphome mit Expression des ALK-Proteins, 28 primäre kutane anaplastische großzellige T-Zell-Lymphome, 3 Vorläufer-

T-Zell-lymphoblastische Lymphome, 9 NK-Zell-Lymphome, 8 Fälle von Mycosis fungoides, 2 Sézary Syndrome und 2 angioimmunoblastische T-Zell-Lymphome).

Folgende weitere Erkrankungen des lymphatischen Systems wurden in die Untersuchungen miteinbezogen: infektiöse Mononukleose (6), EBV-assoziierte Lymphoproliferation (7), dermatopathische Lymphadenopathie (5), Langerhanssche Histiozytose (7), lymphomatoide Papulose (49, davon 41 Fälle lymphomatoide Papulose Typ A, 8 Fälle lymphomatoide Papulose Typ C). Das Material der Fälle der kutanen anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphome sowie der lymphomatoiden Papulose stammte zum Teil von Patienten der dermatologischen Klinik, Charité Berlin, in der die Behandlung durchgeführt und der weitere klinische Verlauf verfolgt wurde.

Des Weiteren wurden die Untersuchungen ausgeweitet auf die folgenden, nicht-lymphatischen Tumoren (insgesamt 58 Fälle): Oropharynxkarzinom (1), Ösophaguskarzinom (2), Magenkarzinom (4), Kolonkarzinom (7), Hepatozelluläres Karzinom (4), Cholangiozelluläres Karzinom (1), Bronchialkarzinom (2), Mammakarzinom (5), Fibroadenom der Mamma (1), Endometriumkarzinom (3), Prostatakarzinom (2), Seminom (5), embryonales Karzinom des Hodens (5), Nierenzellkarzinom (4), Urothelkarzinom (3), Nebennierenrindenadenom (1), Phäochromozytom (1), malignes Melanom (2), Lipom (1) und Mesotheliom (4).

## **2.2 Herstellung der Paraffinschnitte**

Zur Herstellung der Paraffinschnitte wurde das Formalin-fixierte Material im ersten Schritt in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Danach folgte die Einbettung in Paraffin. Das paraffinierte Material wurde mit einem Mikrotom geschnitten (Schnittdicke 6-8µm). Die Schnitte wurden im Wasserbad gestreckt (40°C), auf APES-beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37 °C getrocknet.

Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgten sequentiell für jeweils 10 Minuten in Xylol, Azeton und einem 1:2 Gemisch aus Azeton und Tris-Puffer (TBS). Im Anschluss wurden die Schnitte in Tris-Puffer gespült bei pH 7,4.

## 2.3 Antikörper

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde ein im Hause hergestellter, monoklonaler primärer Antikörper zur Verfügung gestellt. Die hohe Spezifität dieses Antikörpers wurde im Vorfeld dieser Arbeit mittels ELISA an rekombinantem TRAF1-Antigen und mithilfe eines Westernblots gesichert.

Ein Teil der hier zusammengetragenen Fälle wurde im Anschluß an die Färbungen mit dem eigens hergestellten Antikörper auch mittels des kommerziell erhältlichen Antikörpers für TRAF1 (H3, Santa Cruz) gefärbt.

## 2.4 Die APAAP-Färbemethode

### Immunhistologische Färbung und APAAP-Methode:

Die Darstellung von Antigenepitopen mit der immunhistologischen Methode erfolgt mittels spezifischer Antikörper. Diese werden an das Antigen gebunden. Nicht gebundene Antikörper werden durch Abspülen entfernt. Die gebundenen Antikörper werden durch eine enzymatische Reaktion sichtbar gemacht.

In dieser Arbeit fand die APAAP-Methode (Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase) Anwendung (112). Der primäre Antikörper wird über einen Brückenantikörper mit einem Komplex aus alkalischer Phosphatase und dem Antikörper gegen alkalische Phosphatase gebunden. Die durch den Antikörper gebundene alkalische Phosphatase spaltet Naphtol-as-bisphosphat, das Substrat. Naphtol reagiert mit Neufuchsin und Natriumnitrit unter Bildung eines roten, unlöslichen Farbkomplexes. Die Hemmung der zelleigenen alkalischen Phosphatase geschieht durch Levamisol.

### Verlaufsprotokoll der APAAP-Färbung:

Die Paraffinschnitte wurden als Vorbehandlung in einer Mikrowelle in 0,1 M Citratpuffer bei einem pH-Wert von 6,0 für 2 Minuten bei 600 W behandelt zur Antigenfreilegung.

1. 30 min. Inkubation mit dem primären Antikörper, verdünnt in TBS/RPMI-Lösung, pH 7,4-7,6.  
Ansatz TBS (0,05 M Tris Base/Tris H Cl; 0,15 M NaCl, pH 7,6): 4,5 g Tris-Base (Sigma) + 34,25 g Tris-HCL (Sigma) + 43,9 g NaCl (Merck) + 5000 ml aqua bidest gelöst.  
Ansatz RPMI: 50 ml RPMI (Seromed; 10-fach konz.) + 450 ml aqua bidest + 50 ml inaktiviertes Rinderserum + 0,5 g Azid (Natriumazid Merck), pH 7,4-7,6.
2. Spülen in TBS.
3. 30 min. Inkubation mit dem Kaninchen-Anti-Maus Brückenantikörper (Dako), 1:20 verdünnt in TBS/RPMI-Lösung mit Zusatz von Humanserum im Verhältnis 1:8.
4. Spülen in TBS.
5. 30 min. Inkubation mit dem APAAP-Komplex (DAKO) 1:30 verdünnt in TBS/RPMI-Lösung. Der APAAP-Komplex ist ein gegen alkalische Phosphatase gerichteter Mausantikörper (Kulturüberstand), dem alkalische Phosphatase (Sigma) in einer Konzentration von 10 mg/ml zugesetzt wurde.
6. 30 min. Farbentwicklung in der Entwicklungslösung:  
Ansatz APAAP-Entwicklungspuffer (0,05 M Tris Base/0,15 M NaCl, pH 9,7): 8,7 g NaCl (Sigma) + 1,5 g Tris-HCL + 4,9 g Tris-Base in 1000 ml Aqua bidest.  
Mischung von 175 ml Entwicklungspuffer mit 62,5 ml Propandiol (Propandiol, 0,2 M: 21g Propandiol (2-Amino-2,2 Methyl-Propan-1,3-Diol, Merck)/1 aqua bidest) und 100 mg Levamisol (Sigma) und Einstellung auf pH 9,75.  
50 mg Natriumnitrit (Merck) wurden in 1250 µl aqua bidest gelöst und mit 500 µl Neufuchsin (5 g Neufuchsin (Merck) in 100 ml 2N HCL gelöst) 1 min. inkubiert.

125 mg Naphtol As-Bi-Phosphat (Sigma) wurde in 1500 µl N-N-Dimethylformamid (DMF, Merck) gelöst.

Alle Lösungen wurden in der oben angegebenen Reihenfolge zusammengegeben. Nach Homogenisierung wurden der pH auf 8,8 mit 2N HCl eingestellt und die Lösungen filtriert.

7. Spülen mit TBS.
8. 5 min. Gegenfärbung mit Hämalaunlösung:  
1 g Hämatoxylin (Merck), 0,2 g NaJo<sub>3</sub> (Merck) und 50 g Kalialaun (Merck) wurden über Nacht in aqua bidest gelöst. Danach wurden 50 g Chloralhydrat (Merck) und 1 g Citratlösung (2,1 g Zitronensäure-Monohydrat (Merck) und 5000 ml aqua bidest gelöst) zugegeben.
9. Spülen in TBS
10. Eindecken mit Kaisers Glycerin-Gelatine (Merck), 50-60°C.

## 2.5 Auswertungskriterien und Statistik

Die Anzahl der markierten Zellen in den immunhistologischen Färbungen wurde an einem Lichtmikroskop ausgezählt bei 400-facher Vergrößerung und als Prozentangabe dokumentiert. Im Rahmen der tabellarischen Auswertung wurden drei Gruppen bezüglich der TRAF1-Expression definiert:

- +: TRAF1-Expression vorhanden in mehr als 80% der Tumorzellen
- +/-: partielle TRAF1-Expression, 10-80% der Tumorzellen markiert
- : keine TRAF1-Expression, weniger als 10% der Tumorzellen markiert

Zusätzlich wurde die Färbeintensität semiquantitativ ausgewertet unter der Annahme einer Korrelation der Färbeintensität mit der Stärke der TRAF1-Expression. Hierfür wurden drei Intensitätsgrade unterschieden: stark, mittelgradig und schwach. Als Vergleichsmaß diente dabei die Stärke der Anfärbung der interdigitierenden Retikulumzellen in regelhaftem lymphatischem Gewebe, die auch als intrinsische Kontrolle verwendet wurde. Diese reproduzierbare, kräftige Anfärbbarkeit wurde als starke Färbeintensität definiert. Demgemäß wurden die untersuchten

Fälle eingeordnet entsprechend der Färbintensität der Mehrzahl der angefärbten Zellen. Für die tabellarische Auswertung wurden die Färbintensitäten der Fälle einer Entität zusammengefasst in der Art, dass an erster Position angegeben wurde, welche Färbintensität die meisten Fälle aufwiesen, gefolgt von der Angabe, welche Färbintensität am zweithäufigsten auftrat.

Die statistischen Berechnungen erfolgten unter Anwendung des  $\chi^2$ -Tests.



## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Färbemuster des TRAF1 Antikörpers**

Bei der immunhistologischen Untersuchung mit dem TRAF1 Antikörper zeigte sich ein weitgehend homogenes, teils membranös betontes, zytoplasmatisches Färbemuster.

### **3.2 TRAF1-Expression in Normalgeweben**

#### **3.2.1 TRAF1-Expression in lymphatischen Organen**

Hinsichtlich der Frage nach der TRAF1-Expression in normalen lymphatischen Geweben wurden Präparate von regulär aufgebauten Gaumentonsillen, der Milz und des Thymus ausgewählt (insgesamt 10 Fälle). Die TRAF1-Färbungen zeigten im Wesentlichen das gleiche Muster: Die Lymphozyten erwiesen sich ganz überwiegend als negativ bis auf einzelne lymphatische Zellen von blastärer Morphologie und zumeist interfollikulärer, seltener intrafollikulärer Lokalisation. Diese färbten sich schwach oder mittelkräftig in der TRAF1-Darstellung. Eine starke Anfärbbarkeit und somit eine kräftige TRAF1-Expression wiesen regelmäßig die interdigitierenden Retikulumzellen auf.

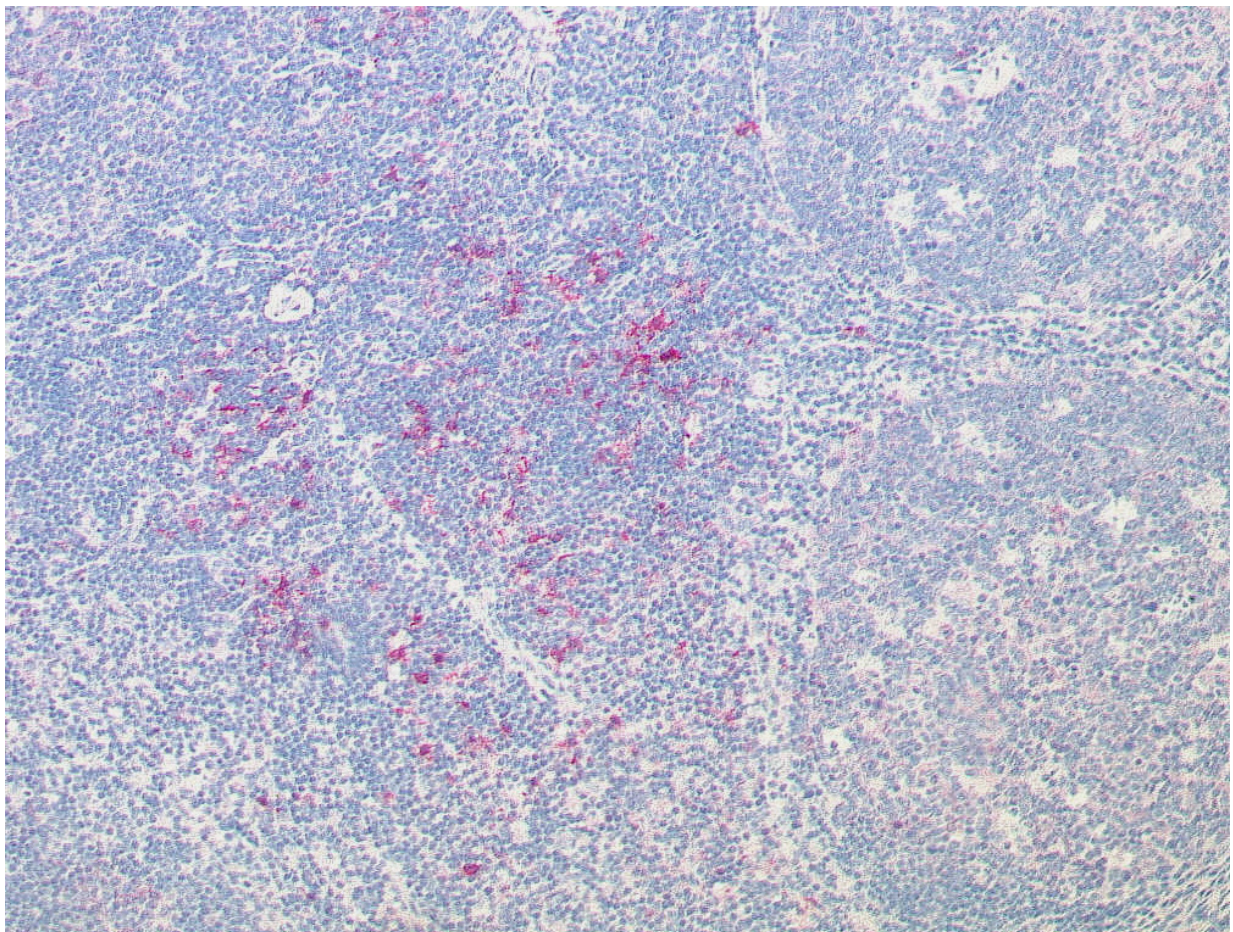
#### **3.2.2 TRAF1-Expression in nicht-lymphatischen Normalgeweben**

Neben den lymphatischen Normalgeweben sollten in den durchgeführten Untersuchungen bezüglich der TRAF1-Expression auch die nicht-lymphatischen Gewebe in möglichst großem Umfang erfasst werden. Daher wurden Gewebe von nahezu allen Organsystemen in die Färbungen einbezogen (insgesamt 64 Fälle): das Respirationssystem (Lungenparenchym, Bronchien), das Verdauungssystem (Ösophagus, Magen, Duodenum, Kolon, Leber), der weibliche Genitaltrakt (Uterus, Ovar, Tube, Mamma), der männlicher Genitaltrakt (Hoden, Prostata), das harnbildende und harnableitende System (Niere, Harnblase), die endokrinen Organe (Schilddrüse, Nebenschilddrüse und Nebenniere) und die Haut. Zusätzlich wurden die

embryonalen Gewebe zweier Foeten der achten und dreizehnten Schwangerschaftswoche komplett untersucht.

Soweit in diesen Organen ortsständiges lymphatisches Gewebe miterfasst war, entsprachen die Färbeargebnisse dem, was bereits oben bei den lymphatischen Organen beschrieben wurde: das heißt, es zeigte sich eine kräftige Anfärbung der interdigitierenden Retikulumzellen sowie gelegentlich auftretende, blastäre lymphatische Zellelemente von meist schwacher TRAF1-Positivität.

Davon abgesehen ließ sich weder in den Zellen epithelialer Natur noch in den mesenchymalen Zellen aller untersuchten Gewebe eine TRAF1-Expression darstellen. Auch die Langerhanszellen der Haut zeigten sich TRAF1-negativ. Dasselbe Ergebnis fand sich in allen foetalen Geweben, auch hier blieben die TRAF1-Färbungen negativ.



**Abbildung 1:** TRAF1-Expression in einer normalen Tonsille. Rechts im Bild Anschnitt zweier aktivierter Lymphfollikel. Die Lymphozyten zeigen sich ganz überwiegend TRAF1-negativ. Im interfollikulären Bereich Anfärbung der interdigitierenden Retikulumzellen. Vergrößerung 100fach.

### 3.3 TRAF1-Expression in reaktiven, lymphatischen Läsionen

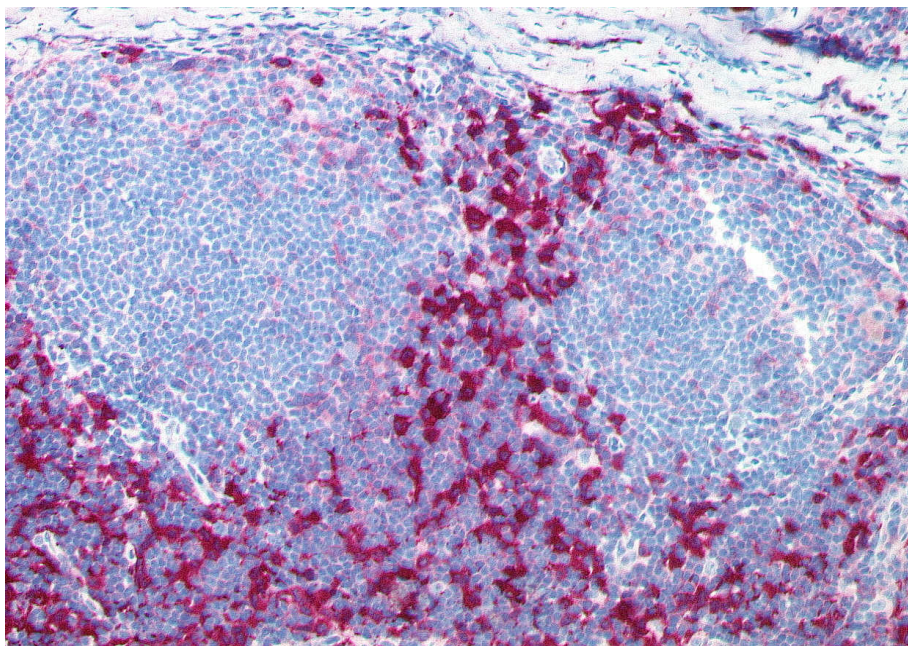
Untersucht wurden hier die infektiöse Mononukleose (6 Fälle) und die dermatopathische Lymphadenopathie (5 Fälle).

#### 3.3.1 Infektiöse Mononukleose

In allen untersuchten Fällen (6 Fälle) der infektiösen Mononukleose ließ sich TRAF1 in dem gemischten, entzündlichen Infiltrat nachweisen. Positiv reagierten Zellen von blastärer Morphologie. Diese Zellpopulation ließ sich auch anfärben mit einem CD30-Antikörper. Ein Teil dieser Zellen kam auch zur Darstellung in der Färbung des latenten Membranproteins des Epstein-Barr-Virus. Die Färbeintensität war durchschnittlich mittelgradig (2 Fälle starke Intensität, 2 Fälle mittelgradige Intensität, 2 Fälle schwache Intensität).

#### 3.3.2 Dermatopathische Lymphadenopathie

In allen Fällen der dermatopathischen Lymphadenopathie (5 Fälle) zeigte sich eine starke TRAF1-Expression der im Parakortex gelagerten Zellen dendritischen Ursprungs, die auch das S100-Protein und CD1A kräftig exprimierten.



**Abbildung 2:**  
TRAF1-Expression in der dermatopathischen Lymphadenopathie. Kräftige Anfärbung der im Parakortex gelagerten Zellen. Vergrößerung ca 100fach.

## 3.4 TRAF1-Expression in lymphatischen Neoplasien

### 3.4.1 TRAF1-Expression in Hodgkin-Lymphomen

Insgesamt wurden 64 Hodgkin-Lymphome untersucht. Diese setzten sich zusammen aus 33 Fällen des Typs der nodulären Sklerose, 22 Fällen des Mischtyps, 4 Fällen des lymphozytenreichen Hodgkin-Lymphoms und 5 Fällen des lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphoms.

Grundsätzlich zeigten alle untersuchten Hodgkin-Lymphome eine TRAF1-Expression, wobei sich ein Unterschied hinsichtlich der Färbeintensität fand zwischen den Typen des klassischen Hodgkin-Lymphoms und dem lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphom.

Bei den Fällen der klassischen Hodgkin-Lymphome ließen sich in den meisten Fällen nahezu alle Tumorzellen (>95%) anfärben mit dem TRAF1-Antikörper (52 von 59 Fällen). Die Färbeintensität war meist stark oder mittelgradig (17 von 59 Fällen mit starker Intensität, 33 Fälle mit mittelgradiger Intensität, 9 Fälle mit schwacher Intensität). Dabei stellte sich die Intensität der Färbung überwiegend homogen dar, das heißt, die meisten Tumorzellen eines Falles zeigten eine gleich starke Anfärbbarkeit. In einem Teil der Fälle, die insgesamt als mittelgradig eingestuft wurden hinsichtlich der Färbeintensität, fand sich ein kleinerer Prozentsatz an stark angefärbten Tumorzellen.

Weder bei der Zahl der TRAF1-positiven Fälle noch bei der Färbeintensität war ein wesentlicher Unterschied zwischen den Subtypen des klassischen Hodgkin-Lymphoms zu vermerken.

Im Gegensatz dazu erbrachten die Färbungen des lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphoms (LPHL) ein etwas differentes Ergebnis: Zwar ließ sich auch hier in allen Fällen (5 Fälle) eine Expression von TRAF1 nachweisen, zumeist lag der Anteil der positiven Tumorzellen jedoch nur zwischen 50 und 70 Prozent. Die Färbeintensität war schwach bis mittelgradig (von 5 Fällen: 3 mit schwacher, 2 mit mittelgradiger Intensität).

Ein Teil der untersuchten Hodgkin-Lymphome war assoziiert mit einer latenten Infektion durch das Epstein-Barr-Virus (EBV). Betroffen hiervon waren 8 Fälle des klassischen Hodgkin-Lymphoms vom Typ der nodulären Sklerose, 14 Fälle des klassischen Hodgkin-Lymphoms vom Mischtyp sowie 1 Fall des lymphozytenreichen Hodgkin-Lymphoms.

Die EBV-assoziierten Fälle wurden verglichen mit den Fällen ohne EBV-Assoziation bezüglich der Zahl der angefärbten Tumorzellen und der Färbeintensität: Bei den EBV-positiven Hodgkin-

Lymphomen vom Typ der nodulären Sklerose zeigten sich in 7 von 8 Fällen über 95% der Tumorzellen TRAF1-positiv, ein Fall war partiell positiv (ca. 70% der Tumorzellen gefärbt). Bei den Fällen des gleichen Subtyps ohne EBV-Assoziation waren über 95% der Tumorzellen gefärbt bei 22 von 25 Fällen, 3 Fälle waren partiell positiv (zwischen 60 und 80% der Tumorzellen gefärbt). Bei den Hodgkin-Lymphomen vom Mischtyp mit EBV-Assoziation ergab sich die Verteilung wie folgt: 12 von 14 Fällen mit über 95% anfärbbaren Tumorzellen, 2 Fälle mit partieller Anfärbbarkeit (zwischen 70 und 80% der Tumorzellen), sowie bei den Fällen ohne EBV-Assoziation 7 von 8 Fällen mit über 95% anfärbbaren Tumorzellen, 1 Fall mit partieller Anfärbbarkeit (70% der Tumorzellen). Die untersuchten Fälle des lymphozytenreichen Hodgkin-Lymphoms zeigten alle eine Anfärbbarkeit von über 95% der Tumorzellen, einschließlich des EBV-positiven Falles. Unter Zusammenfassung dieser Daten ergibt sich kein signifikanter Unterschied bei den Fällen des klassischen Hodgkin-Lymphoms mit und ohne EBV-Assoziation hinsichtlich der Anzahl der positiven und partiell positiven Fälle ( $p=0,8$ ).

Das gleiche Ergebnis erbrachte der Vergleich der Färbeintensitäten zwischen den Fällen mit und ohne EBV-Assoziation. In der Gruppe der Hodgkin-Lymphome vom Typ der nodulären Sklerose mit EBV-Assoziation ließ sich bei 2 von 8 Fällen eine starke Intensität, bei 5 von 8 Fällen eine mittelgradige sowie bei einem Fall eine schwache Intensität nachweisen. Bei den Hodgkin-Lymphomen vom Typ der nodulären Sklerose ohne EBV-Assoziation wurden 7 von 25 Fällen der starken Färbeintensität zugeordnet, 14 von 25 Fällen einer mittelgradigen Intensität sowie 4 von 25 Fällen einer schwachen Intensität. Bei den Hodgkin-Lymphomen vom Mischtyp mit EBV-Assoziation fielen 3 von 14 Fällen in die Kategorie starke Färbeintensität, 9 von 14 Fällen zeigten mittelgradige, 2 Fälle eine geringe Färbeintensität. Bei den Hodgkin-Lymphomen vom Mischtyp ohne EBV-Assoziation fanden sich 3 Fälle mit starker Färbeintensität, 4 Fälle mit mittelgradiger Intensität und 1 Fall mit schwacher Färbeintensität. In der Gruppe der lymphozytenreichen Hodgkin-Lymphome wies der EBV-assoziierte Fall eine mittelgradige Färbeintensität auf, die 3 nicht EBV-assoziierten Fälle teilten sich in 2 von mittelgradiger und 1 Fall von starker Intensität auf. In der Auswertung dieser Daten ergibt sich kein signifikanter Unterschied der Färbeintensität, beziehungsweise der Stärke der TRAF1-Expression der Subtypen des klassischen Hodgkin-Lymphoms in Abhängigkeit vom EBV-Status ( $p=0,7$ ).

Dies zusammenfassend lässt sich somit kein signifikanter Unterschied des Färbeverhaltens der klassischen Hodgkin-Lymphome mit und ohne EBV-Assoziation in der TRAF1-Färbung nachweisen.

Zusätzlich war zu beobachten, dass in den TRAF1-Färbungen sowohl der klassischen Hodgkin-Lymphome wie auch der lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphome im Hintergrund der Tumorzellen eine variable Anzahl von zumeist blastären Zellen in der Regel schwach zur Darstellung kamen, sowie auch in kräftiger Anfärbung die bereits beschriebenen interdigitierenden Retikulumzellen.

Entität	TRAF1 Expression (Anzahl der Fälle/Gesamtzahl)			Färbeintensität
	+	+/-	-	
HL, ns, EBV-positiv	7/8	1/8	0/8	++/+++
HL, ns, EBV-negativ	22/25	3/25	0/25	++/+++
HL, mc, EBV-positiv	12/14	2/14	0/14	++/+++
HL, mc, EBV-negativ	7/8	1/8	0/8	++/+++
HL, lrc, EBV-positiv	1/1	0/1	0/1	++
HL, lrc, EBV-negativ	3/3	0/3	0/3	++/+++
LPHL	1/5	4/5	0/5	+ / ++

**Tabelle 1:** TRAF1-Expression in Hodgkin-Lymphomen

Abkürzungen:

- HL, ns: Hodgkin-Lymphom, nodulär sklerosierender Typ
- HL, mc: Hodgkin-Lymphom, Mischtyp
- HL, lrc: Hodgkin-Lymphom, lymphozytenreicher Typ
- LPHL: Lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom
- EBV: Epstein-Barr-Virus

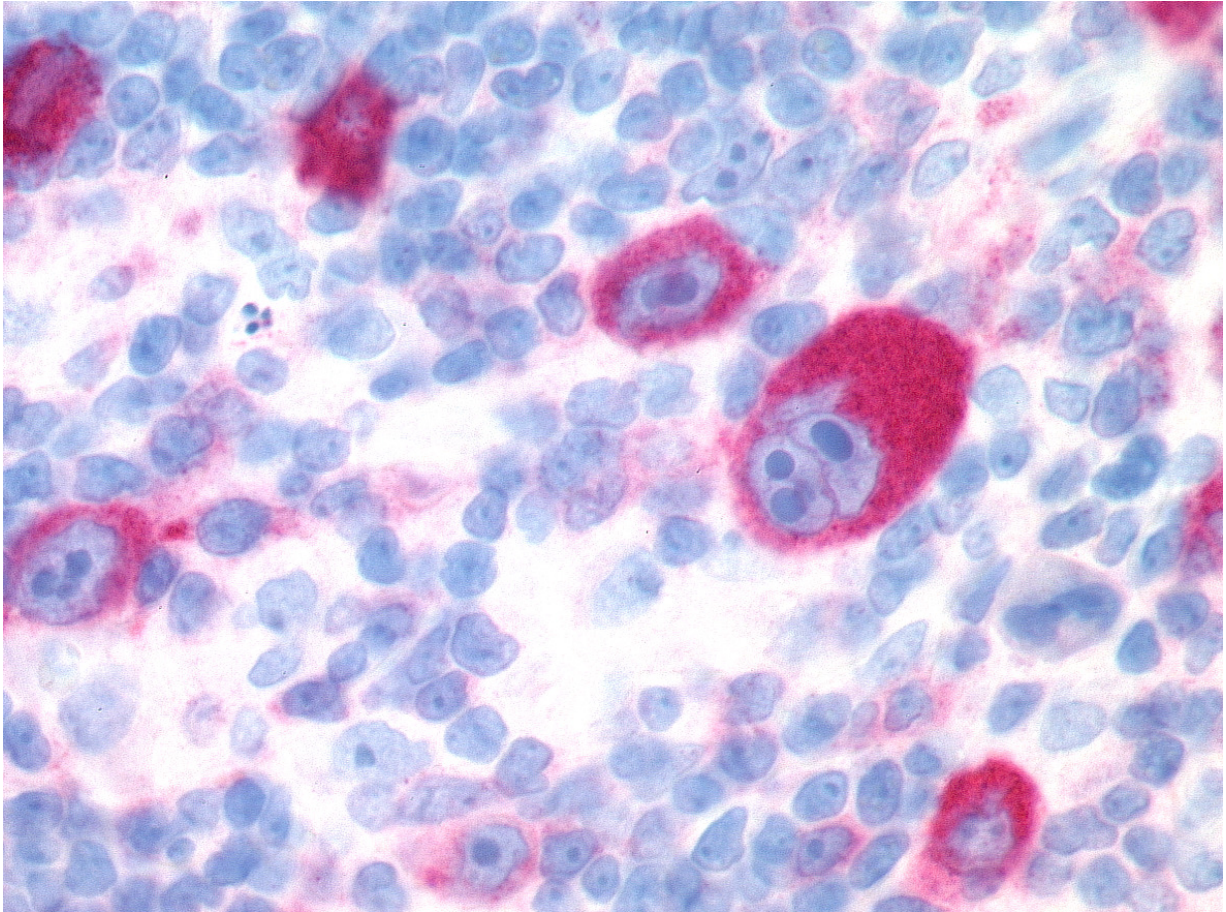


Abbildung 3

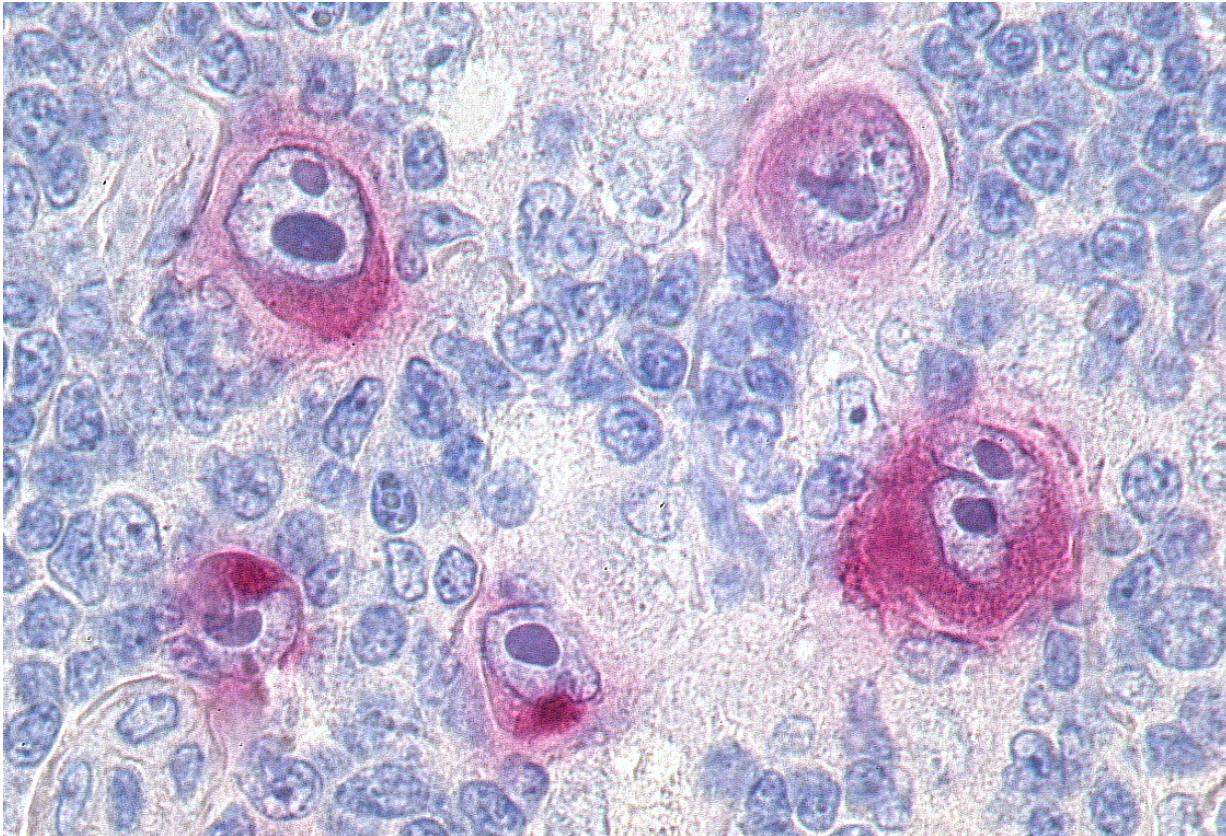
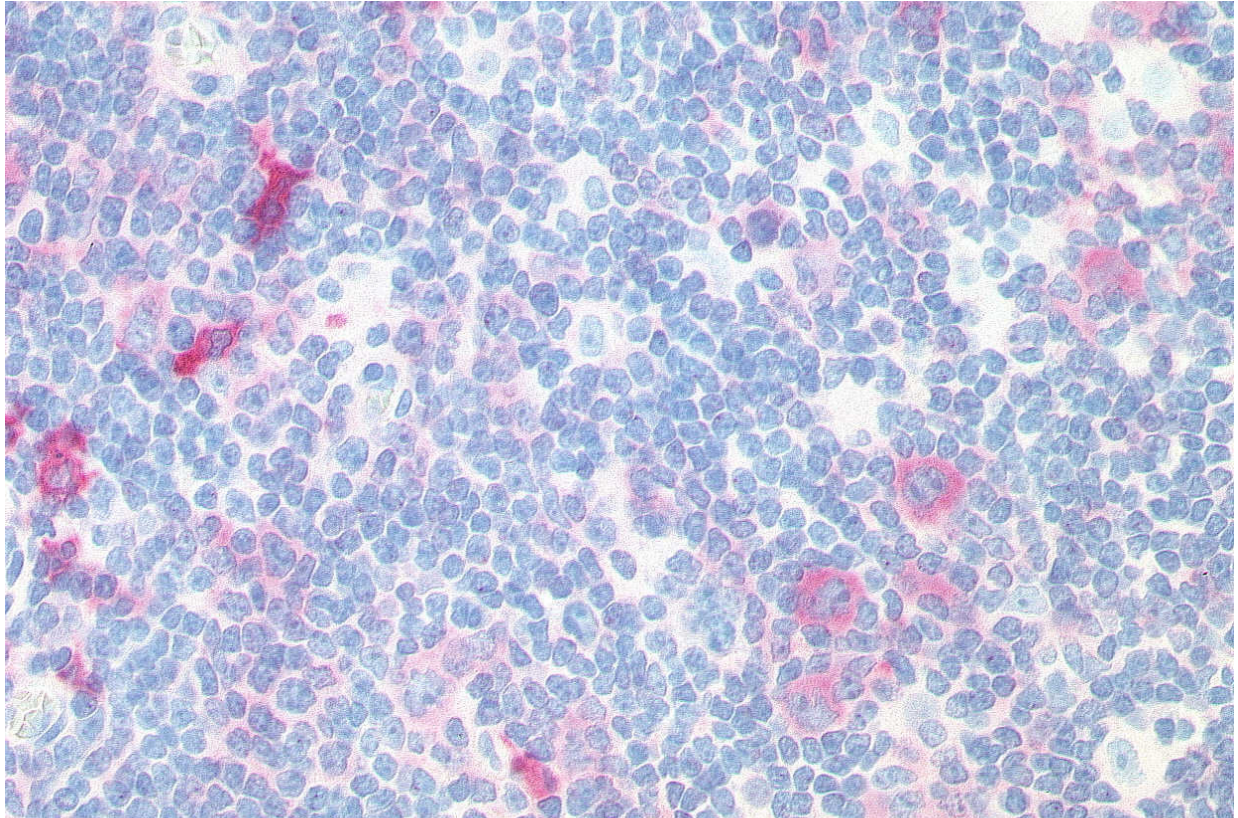


Abbildung 4



**Abbildung 5**

**Abbildungen 3 und 4:** TRAF1-Expression in einem klassischen Hodgkin-Lymphom vom Mischtyp ohne EBV-Assoziation (Abbildung 3) und mit EBV-Assoziation (Abbildung 4). Kräftige Anfärbung der Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen. Zusätzlich einzelne schwach angefärbte blastäre Zellen im gemischten Zellhintergrund. Vergrößerung ca. 600fach.

**Abbildung 5:** TRAF1-Expression in einem lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphom. Schwache TRAF1-Anfärbbarkeit der Tumorzellen in der rechten Bildhälfte. Deutlich stärkere Anfärbung von miterfassten interdigitierenden Retikulumzellen in der linken Bildhälfte. Vergrößerung ca. 300fach.



### **3.4.2 TRAF1-Expression in Non-Hodgkin-B-Zell-Lymphomen**

Zur Darstellung der TRAF1-Expression in Non-Hodgkin-B-Zell-Lymphomen wurden insgesamt 130 Fälle der unterschiedlichen Entitäten ausgewählt.

In Zusammenfassung aller dieser Fälle zeigten 42 von 130 Fällen eine Positivität für TRAF1 in der überwiegenden Zahl der Tumorzellen. 7 von 130 Fällen erwiesen sich als partiell TRAF1-positiv. Die restlichen 81 Fälle waren TRAF1-negativ.

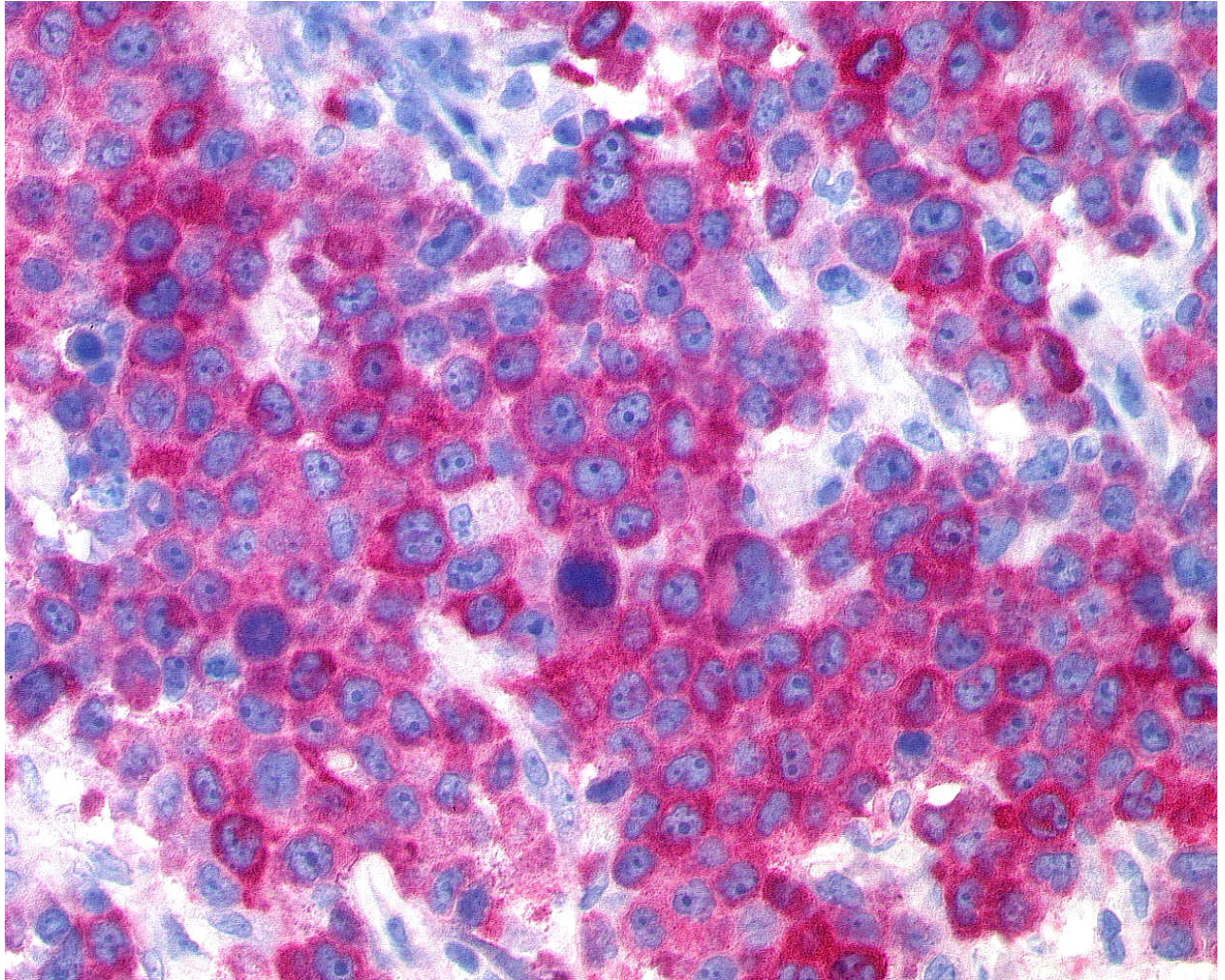
Differenziert man die Färbeargebnisse im Hinblick auf die verschiedenen Entitäten der Non-Hodgkin-B-Zell-Lymphome, so waren die TRAF1-positiven Fälle ganz überwiegend in einigen wenigen Entitäten anzutreffen. Einige weitere Entitäten zeigten eine teils partielle und immer schwache TRAF1-Expression, die meist nicht mehr als ein Drittel der jeweils untersuchten Fälle betraf. Eine größere Zahl von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Typen war komplett als TRAF1-negativ einzustufen.

Die TRAF1-positiven B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome fanden sich ganz überwiegend unter den hochmalignen, großzelligen Lymphomen. Eine häufige TRAF1-Expression zeigten die primären mediastinalen B-Zell-Lymphome, die anaplastische Variante der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome sowie auch das T-Zell-reiche B-Zell-Lymphom.

#### **3.4.2.1 Primäre mediastinale B-Zell-Lymphome:**

Die primären mediastinalen B-Zell-Lymphome stellten unter den B-Zell-Lymphomen die Gruppe dar, die am regelmäßigsten eine TRAF1-Expression aufwies. In dieser Gruppe wurden 13 Fälle untersucht. Von diesen exprimierten 11 Fälle in über 95% der Tumorzellen TRAF1, ein Fall war partiell TRAF1-positiv mit ungefähr 70% angefärbten Tumorzellen, ein Fall erwies sich als TRAF1-negativ. Bezüglich der Anfärbbarkeit überwog eine mittelgradige Färbeintensität. Dabei war das Färbemuster weitgehend homogen, teils fand sich eine stärkere Färbeintensität im Grenzbereich des Tumors zu dem umliegenden, residuellen, originären lymphatischen Gewebe. Insgesamt zeigten 3 von 13 Fällen eine starke Färbeintensität, 7 von 13 eine mittelgradige und 2 von 13 Fällen eine schwache Intensität.

Die Untersuchung dieser Fälle erfolgte parallel auch mittels des kommerziell erhältlichen Antikörpers der Firma Santa Cruz. Dabei zeigten sich im Wesentlichen vergleichbare Befunde, wobei sich die Färbungen des kommerziellen Antikörpers insgesamt tendenziell mit etwas schwächerer Färbeintensität präsentierten.



**Abbildung 6:** TRAF1-Expression in einem primären mediastinalen B-Zell-Lymphom. Kräftige Anfärbung der Tumorzellen bei Negativität des Zellhintergrundes. Vergrößerung ca. 350fach

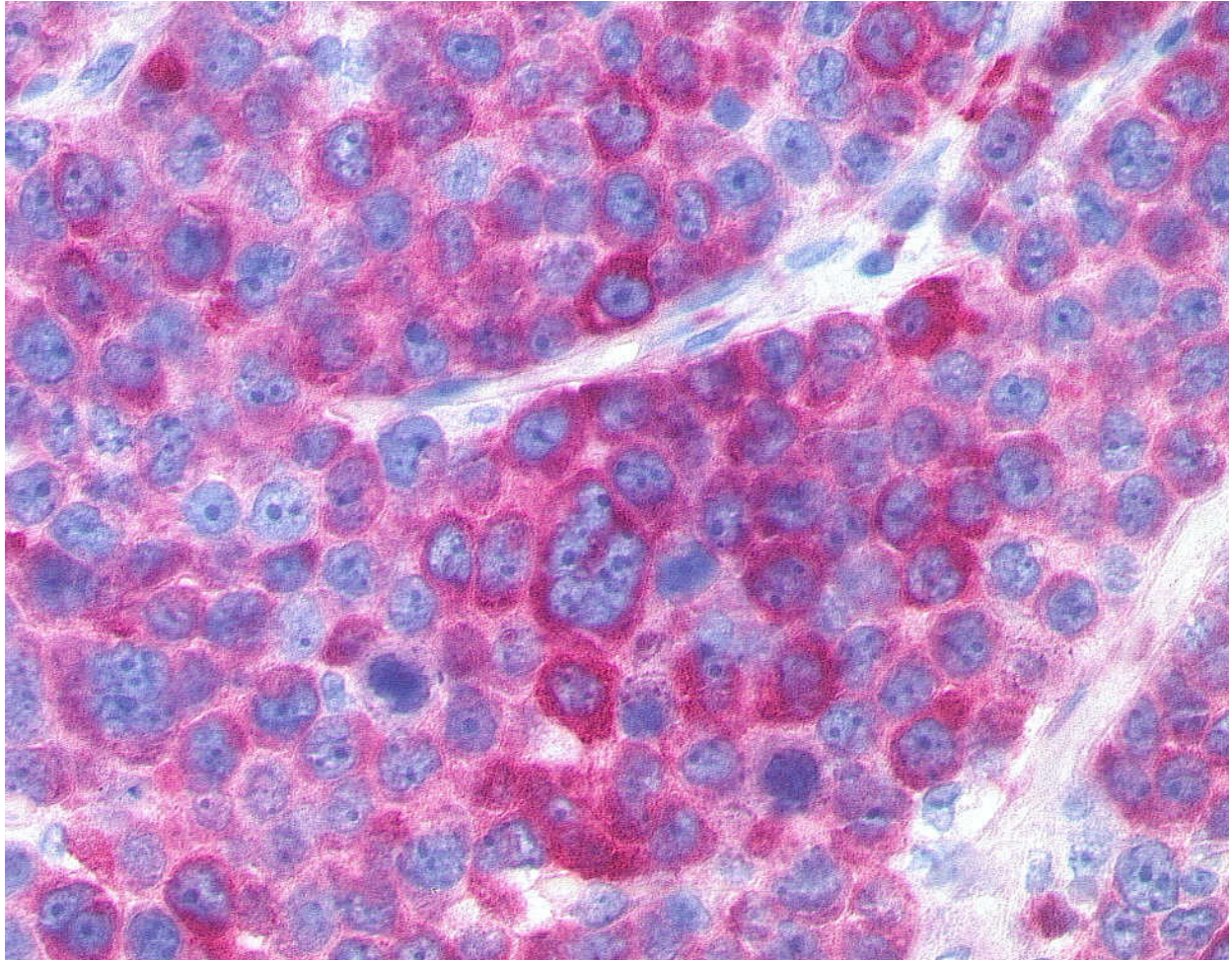
#### **3.4.2.2 Anaplastische Variante der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome:**

Unter den primären diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen nahm der Subtyp der anaplastischen Variante eine Sonderstellung ein hinsichtlich der TRAF1-Expression.

In dieser Arbeit wurden 20 Fälle dieses Subtyps untersucht. In 15 dieser Fälle waren über 90% der Tumorzellen markiert in der TRAF1-Färbung, bei 2 Fällen zwischen 30 und 50% der Tumorzellen, bei 3 Fällen ließ sich keine TRAF1-Expression nachweisen.

Im Hinblick auf das Färbemuster zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den primären mediastinalen B-Zell-Lymphomen: Der Tumorrandbereich wies teils eine stärkere Färbeintensität auf als die zentralen Tumorabschnitte. Zusammenfassend war die Färbeintensität in der Mehrzahl der Fälle als mittelgradig einzustufen (10 von 20 Fällen). 3 Fälle fielen in die Kategorie starke Färbeintensität, 4 Fälle waren einer schwachen Intensität zuzuordnen. Die Färbungen der anaplastischen Variante des primären diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms

wurden parallel auch mit dem kommerziell erhältlichen Antikörper durchgeführt. Die Ergebnisse erwiesen sich als im Wesentlichen vergleichbar, bei einzelnen Fällen waren die Zahl der markierten Tumorzellen sowie auch die Färbeintensität mit dem kommerziellen Antikörper etwas geringer.

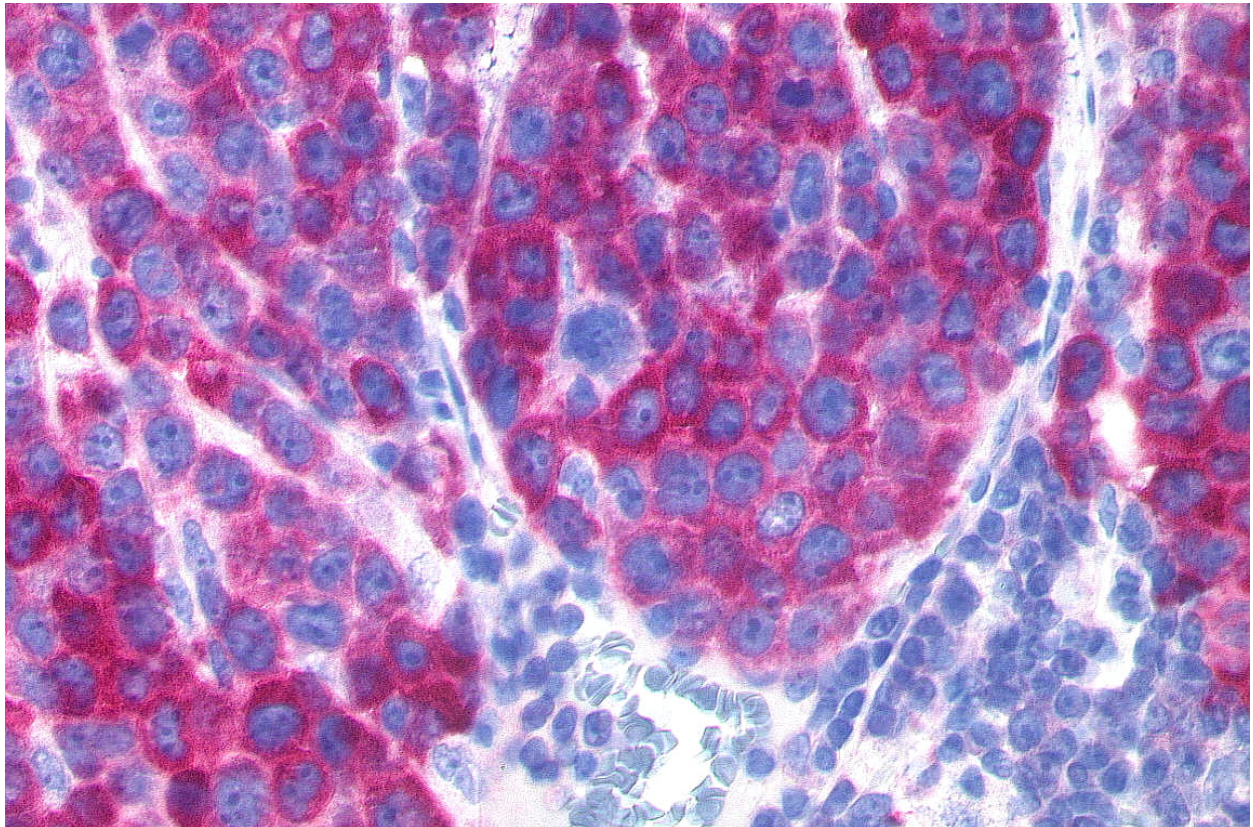


**Abbildung 7:** TRAF1-Expression in einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom der anaplastischen Variante. Teils mittelgradige, teils starke Anfärbung der Tumorzellen, miterfasst zwei Kapillaren mit TRAF1-negativen Endothelien. Vergrößerung ca. 400fach.

### **3.4.2.3 Primäre diffuse großzellige B-Zell-Lymphome, weitere Subtypen**

Neben der anaplastischen Variante wurden auch 12 Fälle der weiteren Subtypen (zentroblastische, zentro-immunoblastische und immunoblastische Variante) der primären diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome für diese Arbeit ausgewählt. Auch in diesen Fällen war zum Teil eine TRAF1-Expression nachweisbar, betroffen waren jedoch deutlich weniger Fälle als bei den zwei zuvor beschriebenen Gruppen. In 4 von 12 Fällen ließen sich über 90% der Tumorzellen in der TRAF1-Färbung markieren. Es handelte sich um zwei zentroblastische

Varianten, eine zentro-immunoblastische Variante sowie eine immunoblastische Variante des primären diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms, dabei wies ein Fall eine Assoziation mit dem Epstein-Barr-Virus auf. Bezüglich der Färbeintensität war bei diesen Fällen eine insgesamt als mittelgradig einzustufende Stärke zu beobachten, meist mit etwas schwächer gefärbten zentralen Tumorbereichen. In den weiteren 8 von 12 Fällen zeigten sich entweder keine oder nur einzelne wenige Tumorzellen, die eine schwache Expression von TRAF1 erkennen ließen.



**Abbildung 8:** TRAF1-Expression in einem primären diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom der zentroblastischen Variante. Mittelkräftige, teils kräftige Anfärbung der Tumorzellen bei negativem Zellhintergrund. Vergrößerung ca. 400fach.

#### **3.4.2.4 T-Zell-reiches B-Zell-Lymphom**

Auch das T-Zell-reiche B-Zell-Lymphom gehört zu den B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen, bei denen der überwiegende Teil der Fälle eine komplette oder partielle TRAF1-Expression zeigte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 6 Fälle untersucht. Von diesen exprimierten 3 Fälle in der überwiegenden Zahl der Tumorzellen TRAF1. Bei 2 weiteren Fällen lag der Anteil der in der TRAF1-Färbung markierten Tumorzellen jeweils circa bei 50%. Bei dem 6. Fall waren lediglich einzelne positive Tumorzellen erkennbar. Die Färbeintensität war meist gering (bei 4 von 6 Fällen) oder mittelgradig (bei 2 von 6 Fällen).

#### **3.4.2.5 Plasmoblastisches Lymphom**

6 Fälle dieser Entität wurden mit dem TRAF1-Antikörper untersucht. In keinem Fall zeigte sich ein relevanter Teil der Tumorzellen positiv. In 2 Fällen kamen vereinzelte Tumorzellen schwach zur Darstellung (unter 1% der Tumorzellen).

#### **3.4.2.6 B-lymphoblastisches Lymphom vom Vorläufertyp**

3 Fälle des B-lymphoblastischen Lymphoms vom Vorläufertyp wurden mit dem TRAF1-Antikörper untersucht. Alle Fälle erwiesen sich als komplett TRAF1-negativ.

#### **3.4.2.7 Plasmozytom**

6 Fälle des Plasmozytoms wurden in diese Arbeit integriert. Von diesen ließen sich bei 2 Fällen circa 90% der Tumorzellen in der TRAF1-Färbung markieren. Allerdings war die Intensität der Färbung durchgängig sehr schwach. Ein Fall zeigte einzelne, schwach positive Tumorzellen (unter 1% der Tumorzellen). Die weiteren 3 Fälle wiesen keine TRAF1-Expression auf.

#### **3.4.2.8 Burkitt-Lymphom**

21 Fälle des Burkitt-Lymphoms wurden mit dem TRAF1-Antikörper untersucht. Bei 6 von 21 Fällen betrug der Anteil der TRAF1-markierten Zellen 80% bis 90%. 2 Fälle stellten sich mit partieller TRAF1-Expression dar bei circa 30% angefärbten Tumorzellen. Die weiteren Fälle zeigten sich überwiegend komplett TRAF1-negativ (11 von 21 Fällen) bzw. ließen vereinzelte Tumorzellen mit schwacher TRAF1-Färbung erkennen (2 von 21 Fällen). Die Färbeintensität der TRAF1-positiven Fälle war durchgängig als gering einzustufen, lediglich bei 2 Fällen lag in den Tumorrandbereichen stellenweise eine leichte bis mittelgradige Färbeintensität vor.

#### **3.4.2.9 Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ**

10 Fälle dieser Entität wurden gefärbt, sowohl mit dem eigens hergestellten Antikörper als auch mit dem kommerziell verfügbaren Antikörper. Diese parallel durchgeführten Färbungen erbrachten die gleichen Ergebnisse. In der Auswertung dieser Fälle fiel auf, dass die kleinzelligen Tumorelemente, die die Hauptmasse des Tumors ausmachten, häufig ein anderes Färbeverhalten zeigten als disseminiert eingestreute blastäre Tumorzellen (meist weniger als 1 % des Tumors). Bei 7 von 10 Fällen zeigten sich die kleinen Tumorzellen TRAF1-negativ, während die blastären Tumorzellen eine Anfärbung von teils geringer, teils mittelgradiger Intensität aufwiesen.

Entsprechend den definierten Auswertungskriterien wurden diese Fälle insgesamt als TRAF1-negativ eingestuft. Bei 3 Fällen fand sich auch eine TRAF1-Positivität von über 80-90% der kleinzelligen Tumoranteile, die allerdings jeweils von schwacher Färbeintensität war.

#### **3.4.2.10 Weitere kleinzellige B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome**

Neben den bereits beschriebenen Entitäten wurden auch das Immunozytom, das folliculäre Lymphom, das Marginalzonenlymphom und das Mantelzelllymphom in die Untersuchungen bezüglich TRAF1 einbezogen. Dabei wurden insgesamt 33 Fälle untersucht. In keinem dieser Fälle war eine TRAF1-Expression in einer relevanten Zahl von Tumorzellen nachweisbar.

Bei den meisten Entitäten ließen sich in einigen Fällen, wie nachfolgend aufgeschlüsselt, einzelne Zellen, teils von blastärer Morphologie (unter 1% der Tumorzellen) mit schwacher Intensität anfärben: 1 von 4 Fällen des Immunozytoms, 5 von 13 Fällen des folliculären Lymphoms und 4 von 8 Fällen des Marginalzonenlymphoms. Die 8 Mantelzelllymphome zeigten keine Anfärbbarkeit in der TRAF1-Färbung.

Entität	TRAF1 Expression (Anzahl der Fälle/Gesamtzahl)			Färbeintensität
	+	+/-	-	
PMBCL	11/13	1/13	1/13	++/+++
DLBCL(ana)	15/20	2/20	3/20	++/+
DLBCL(zb/ib/zib)	4/12	0/12	8/12	++
Plasmobl. Lymphom	0/6	0/6	6/6	--
Vorläufer B-ALL	0/3	0/3	3/3	--
TCRBCL	3/6	2/6	1/6	+ /+++
Plasmozytom	2/6	0/6	4/6	+
Burkitt-Lymphom	6/21	2/21	13/21	+
B-CLL	3/10	0/10	7/10	+
Immunozytom	0/4	0/4	4/4	--
Folikuläres Lymphom	0/13	0/13	13/13	--
Marginalzonenlymphom	0/8	0/8	8/8	--
Mantelzelllymphom	0/8	0/8	8/8	--

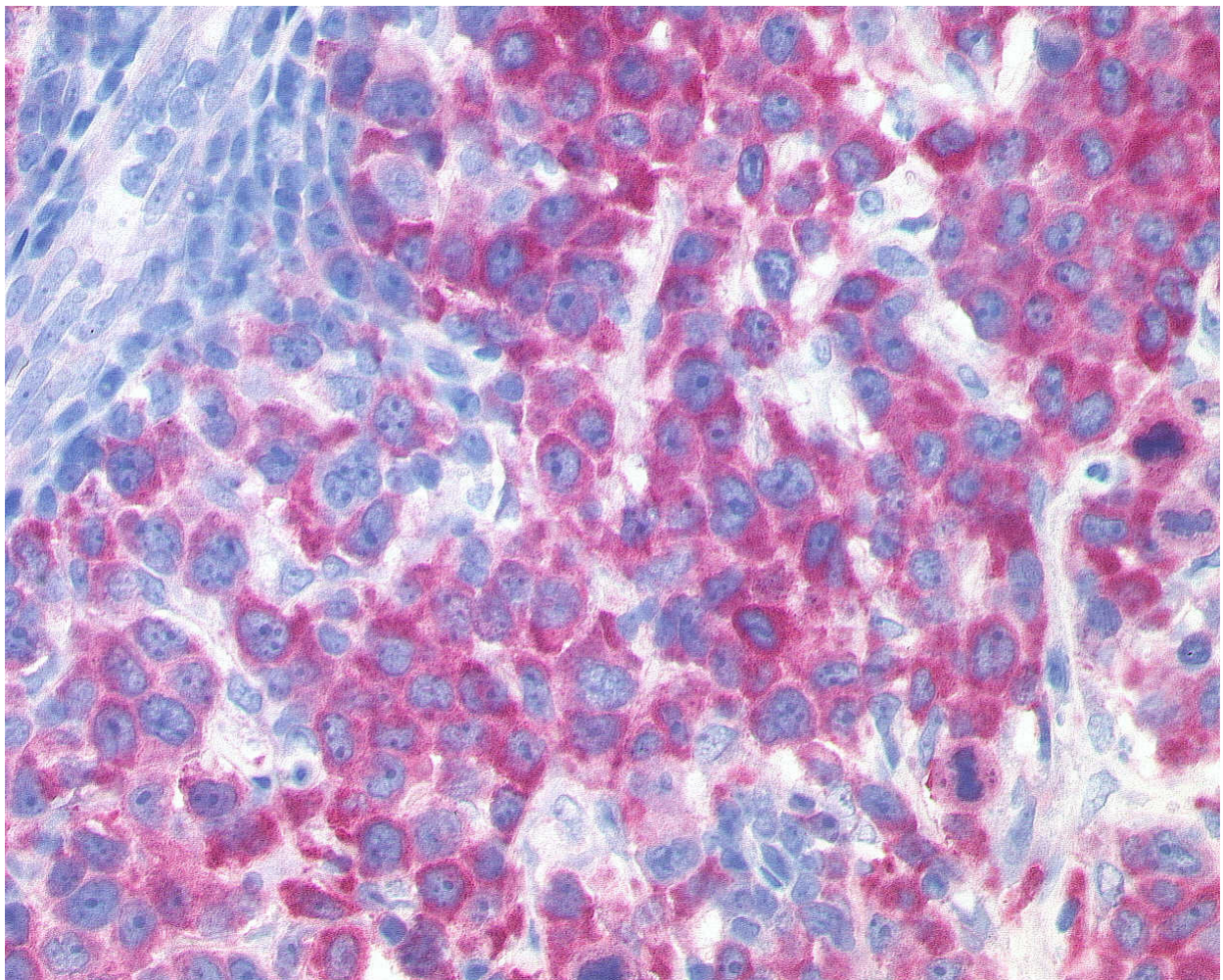
**Tabelle 2:** TRAF1-Expression in B-Zell-Lymphomen

Abkürzungen:

PMBCL:	Primäres mediastinales B-Zell-Lymphom
DLBCL :	Primäres diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
ana:	anaplastische Variante
ib:	immunoblastische Variante
zb:	zentroblastische Variante
zib:	zentro-immunoblastische Variante
Plasmobl.:	plasmoblastisch
Vorl. B-ALL	B-lymphoblastisches Lymphom vom Vorläufertyp
TCRBCL:	T-Zell-reiches B-Zell-Lymphom
B-CLL:	Chronische lymphatische B-Zell-Leukämie

### 3.4.3 TRAF1-Expression in EBV-assoziierten Lymphoproliferationen

Im Zusammenhang mit den oben beschriebenen Non-Hodgkin-B-Zell-Lymphomen wurden auch 7 Fälle der EBV-assoziierten Lymphoproliferationen bezüglich ihres Verhaltens in der TRAF1-Färbung untersucht. Dabei zeigten durchgängig alle Fälle eine Expression von über 95% der CD30-positiven lymphatischen Blasten. In 5 dieser Fälle entsprach das Färbeergebnis einer mittelgradigen Färbeintensität, bei 2 Fällen einer geringen Färbeintensität.



**Abbildung 9:** TRAF1-Expression in einer EBV-assoziierten Lymphoproliferation. Mittelkräftige Anfärbung der blastären Zellen. Dazwischen TRAF1-negative Kapillaren und eingestreute kleine Lymphozyten. Vergrößerung ca. 400fach.



### **3.4.4 TRAF1-Expression in Non-Hodgkin-T-Zell-Lymphomen**

82 Non-Hodgkin-T-Zell-Lymphome unterschiedlicher Entitäten wurden zur TRAF1-Färbung zusammengetragen. In Zusammenfassung der unterschiedlichen T-Zell-Lymphomentitäten waren insgesamt 5 von 82 Fällen TRAF1-positiv in der Mehrzahl der Tumorzellen (über 80 %). Weitere 17 von 82 Fällen wiesen eine partielle Expression von TRAF1 auf. Die restlichen 60 von 82 Fällen waren negativ in der TRAF1-Färbung. Damit lag der Anteil der TRAF1-positiven T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome deutlich niedriger als dies in der Zusammenfassung der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome der Fall war. Des Weiteren war bei keiner der untersuchten T-Zell-Lymphomentitäten die überwiegende Zahl der Fälle einer Entität TRAF1-positiv, wie dies zum Beispiel bei den primären mediastinalen B-Zell-Lymphomen der Fall war. Zudem kamen Lymphome mit starker Färbeintensität in der TRAF1-Färbung bei den untersuchten T-Zell-Lymphomen nicht vor. Soweit eine TRAF1-Expression nachweisbar war, war die Färbeintensität in der Regel schwach.

#### **3.4.4.1 Anaplastisches großzelliges T-Zell-Lymphom ohne Expression des ALK-Fusionsproteins**

19 Fälle dieser Entität wurden untersucht. Bei 13 dieser Fälle handelte es sich um sekundäre kutane Manifestationen eines systemischen anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphoms. 2 von 19 Fällen wiesen eine Anfärbbarkeit von mindestens 90% der Tumorzellen auf. Bei 4 weiteren Fällen wurde ein Anteil von 30-50% der Tumorzellen in der TRAF1-Färbung markiert. Die 13 weiteren Fälle waren TRAF1-negativ. Die Färbeintensität war bei den zwei erstgenannten Fällen als mittelgradig einzustufen. Die Färbungen der Fälle mit partieller TRAF1-Expression entsprachen einer geringen Färbeintensität. Wie auch schon bei einigen B-Zell-Lymphomen beschrieben, zeigte sich die Färbeintensität innerhalb eines Falles teils ungleichmäßig ausgeprägt mit stärkerer Anfärbbarkeit der Tumorgrenzbereiche zum Normalgewebe.

#### **3.4.4.2 Anaplastisches großzelliges T-Zell-Lymphom mit Expression des ALK-Fusionsproteins**

11 großzellige anaplastische T-Zell-Lymphome mit Expression des ALK-Fusionsproteins wurden mit dem TRAF1-Antikörper untersucht. Unter diesen fand sich kein Fall, in dem die Mehrzahl der Tumorzellen mit dem TRAF1-Antikörper zu markieren war. Eine partielle TRAF1-Positivität ließ sich in 4 von 11 Fällen nachweisen, wobei sich 10-30% der Tumorzellen

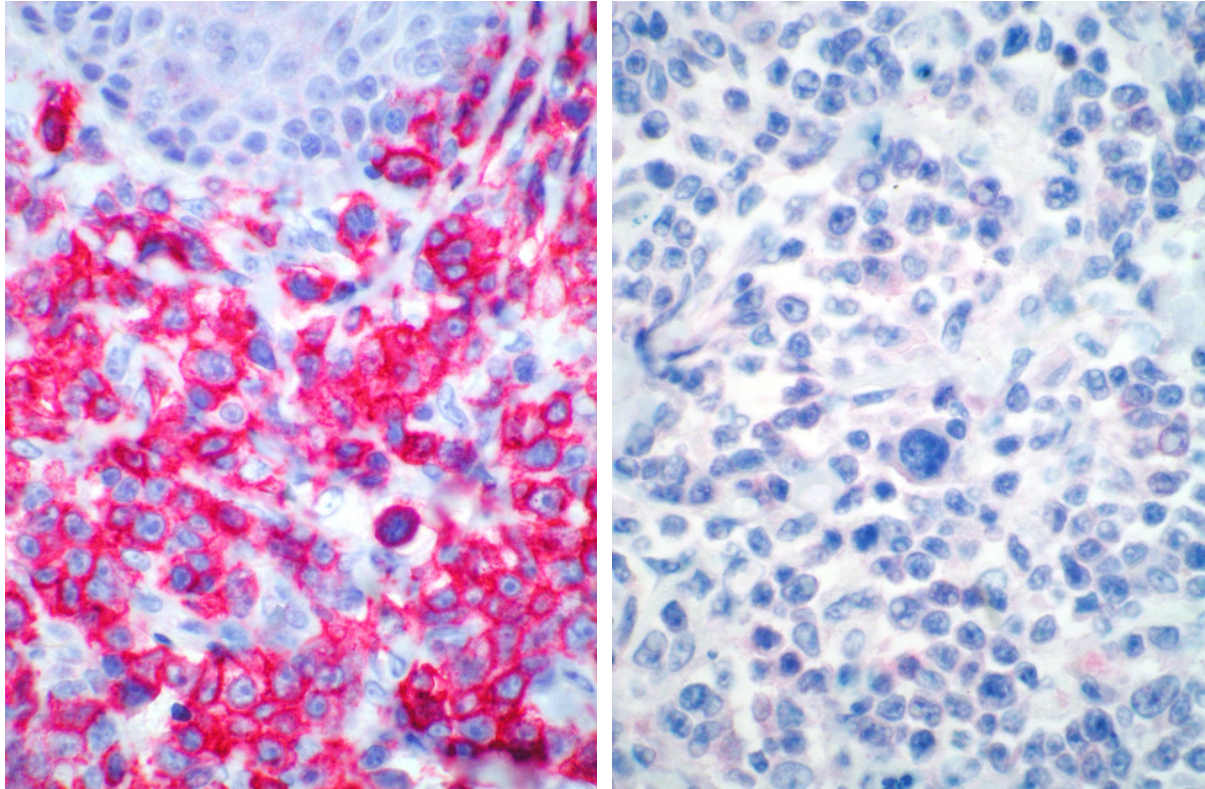
anfärbten. In 7 von 11 Fällen war eine TRAF1-Expression nicht nachweisbar. Dabei zeigten sich 4 dieser Fälle komplett negativ, die weiteren 3 Fälle ließen vereinzelte Tumorzellen mit schwacher TRAF1-Färbung erkennen. Die Färbeintensität war durchgängig als gering einzustufen. Auch hier waren die TRAF1-positiven Zellen meist im Randbereich des Tumors anzutreffen.

Im Vergleich der anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphome mit Expression und ohne Expression des ALK-Fusionsproteins stellte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der TRAF1-Expression dar ( $p=0,9$  unter Zusammenfassung der positiven und partiell positiven Fälle aus Test-technischen Gründen, da sonst der Erwartungswert zu klein wäre).

#### **3.4.4.3 Primäres kutanes anaplastisches großzelliges T-Zell-Lymphom**

28 Fälle, die histomorphologisch und klinisch als primäres kutanes anaplastisches großzelliges T-Zell-Lymphom eingestuft worden waren, wurden mittels des TRAF1-Antikörpers untersucht. Keiner dieser Fälle wies eine Expression des ALK-Fusionsproteins auf. Unter diesen stellte sich ein Fall dar mit Expression von TRAF1 in der Mehrzahl der Tumorzellen und mittelgradiger Färbeintensität. Weitere 6 von 28 Fällen waren mit einer partiellen TRAF1-Expression von geringer Färbeintensität zu verzeichnen. Die Mehrzahl der primären kutanen anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphome (21 von 28 Fällen) erwies sich als TRAF1-negativ.

Im Vergleich der systemischen anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphome mit den primären kutanen anaplastischen T-Zell-Lymphomen stellte sich insgesamt kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der TRAF1-Expression dar ( $p=0,7$  unter Zusammenfassung der positiven und partiell positiven Fälle aus Test-technischen Gründen, weil der Erwartungswert anderenfalls zu klein wäre).



**Abbildungen 10 und 11:** Primäres, kutanes anaplastisches großzelliges T-Zell-Lymphom, linksseitig mit kräftiger Expression von CD30, rechtsseitig mit Negativität in der TRAF1-Färbung. Vergrößerung ca. 200-fach.

#### **3.4.4.4 Vorläufer T-lymphoblastisches Lymphom:**

Drei Fälle dieser Entität wurden für diese Arbeit ausgewählt. In keinem dieser Fälle ließen sich Tumorzellen mit dem TRAF1-Antikörper darstellen.

#### **3.4.4.5 NK-Zell-Lymphom**

Die NK-Zell-Lymphome zeigten überwiegend keine Expression von TRAF1. Von 9 untersuchten Fällen erwiesen sich 6 als komplett TRAF1-negativ. Bei 2 Fällen färbten sich einzelne Tumorzellen schwach an (unter 1% der Tumorzellen). Somit fielen auch diese der TRAF1-negativen Kategorie zu, so dass insgesamt 8 von 9 Fällen als TRAF1-negativ einzustufen waren. Nur 1 Fall war TRAF1-positiv mit 90% angefärbten Tumorzellen und mittelgradiger Färbeintensität.

#### **3.4.4.6 Mycosis fungoides und Sézary Syndrom**

Die Mycosis fungoides gehörte zu den T-Zell-Lymphomen, die teilweise eine TRAF1-Expression aufwiesen, die zumeist nur einen Teil der Tumorzellen betraf.

8 Fälle dieser Entität wurden in dieser Arbeit untersucht. Von diesen zeigte nur ein Fall eine Expression von TRAF1 in über 90% der Tumorzellen, die Färbeintensität war als mittelgradig einzuordnen. Bei drei weiteren Fällen markierten sich die Tumorzellen teilweise in der TRAF1-Färbung, der Anteil an positiven Zellen lag zwischen 50% und 60%. Die Stärke der Färbung entsprach bei zwei dieser Fälle einer geringen, bei einem Fall einer mittelgradigen Intensität. Die übrigen 4 von 8 Fällen ließen nur sehr vereinzelte, schwach angefärbte Tumorzellen erkennen (unter 1% der Tumorzellen) und wurden dementsprechend als TRAF1-negativ dokumentiert. Die untersuchten Fälle des Sézary Syndroms (2 Fälle) erwiesen sich als komplett TRAF1-negativ.

#### **3.4.4.7 Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom**

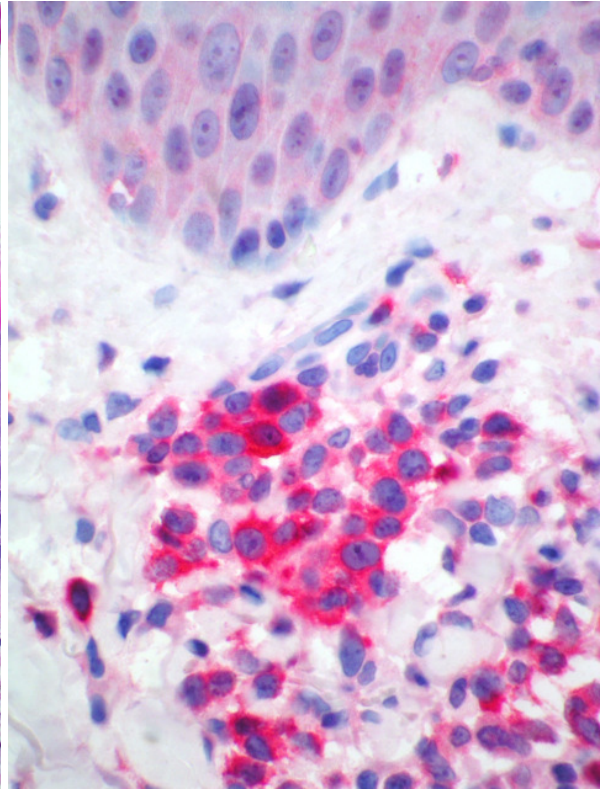
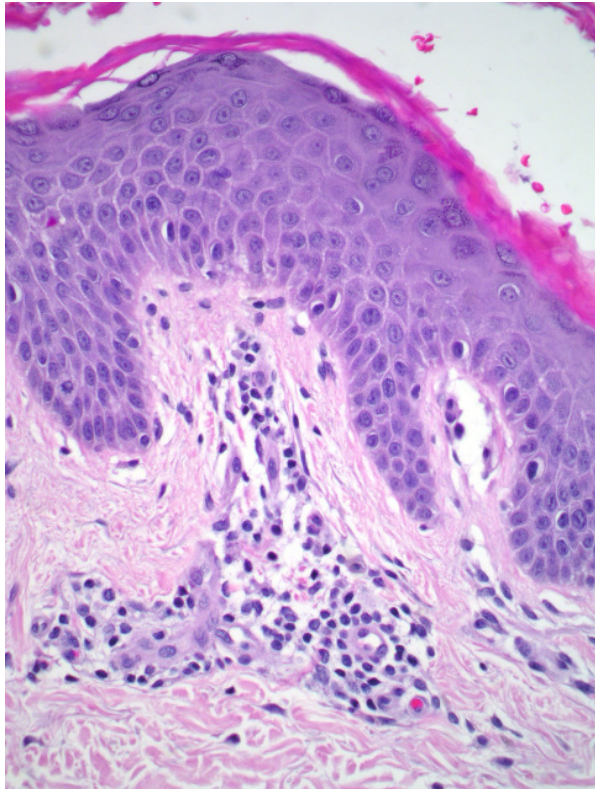
In den zwei untersuchten angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphomen traten einzelne, schwach TRAF1-positive Tumorzellen auf, entsprechend den Kriterien dieser Arbeit waren sie insgesamt als TRAF1-negativ einzustufen.

### 3.5 TRAF1-Expression in der Lymphomatoiden Papulose

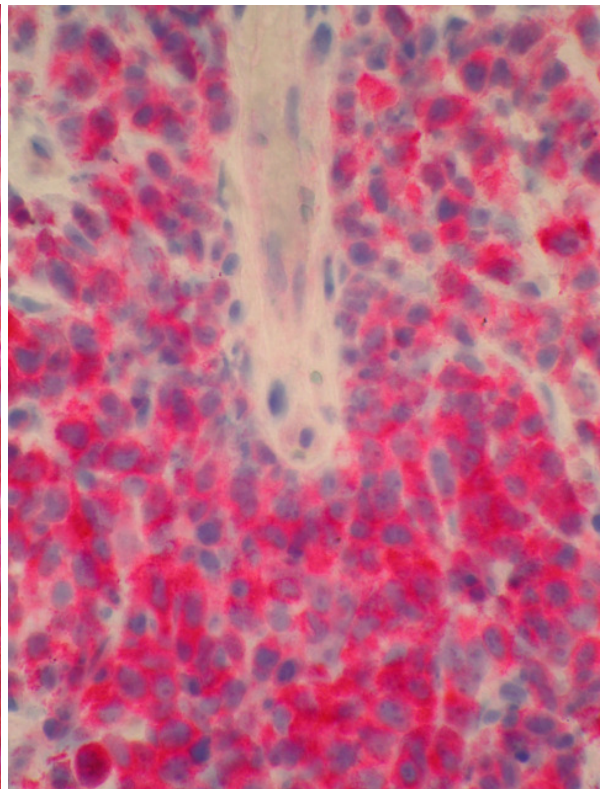
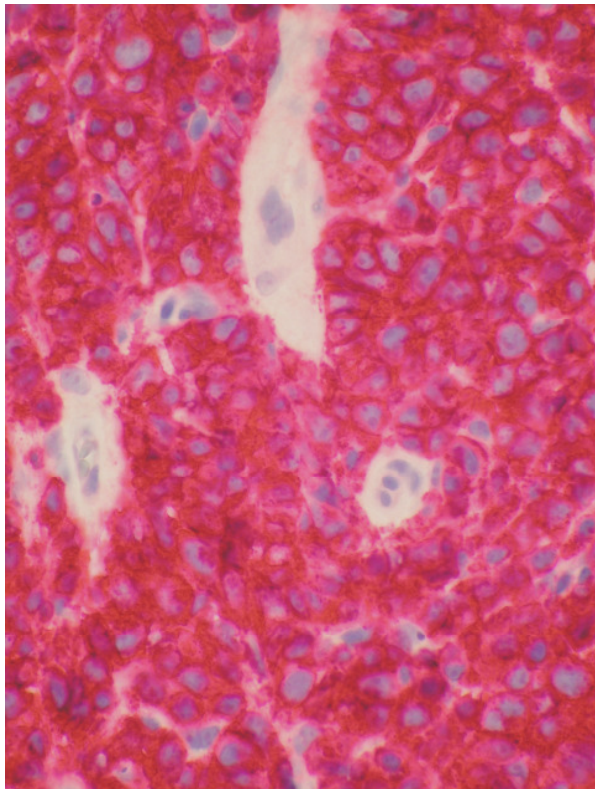
Die lymphomatoide Papulose wurde ebenfalls in die Untersuchungen mit dem TRAF1-Antikörper eingeschlossen. Insbesondere sollte die lymphomatoide Papulose hinsichtlich der TRAF1-Expression verglichen werden mit den kutanen anaplastischen T-Zell-Lymphomen, denn diese Entitäten sind bislang auch unter Zusammenfassung von konventionell-histologischer, immunhistologischer und molekularpathologischer Untersuchung schwer diagnostisch abgrenzbar.

49 Fälle der lymphomatoiden Papulose wurden untersucht, die in der dermatologischen Klinik der Charité diagnostiziert worden waren und deren weiterer klinischer Verlauf auch dort dokumentiert worden war. Darunter befanden sich 41 Fälle des Subtyps A (definitionsgemäß verstreute, CD30-positive T-Zellen mit morphologischer Ähnlichkeit mit den Reed-Sternberg-Zellen) sowie 8 Fälle des Subtyps C (definitionsgemäß Rasen von CD30-positiven, atypischen T-Zellen). Die TRAF1-Färbungen der lymphomatoiden Papulose ergaben ein deutlich anderes Bild als die Untersuchungen der oben beschriebenen T-Zell-Lymphome. Der größte Teil der Fälle (41 von 49 Fällen, darunter 35 Fälle des Subtyps A, 6 Fälle des Subtyps C) zeigte eine TRAF1-Positivität in den morphologisch atypischen, CD30-positiven Zellen des Infiltrates. Dabei war nahezu durchgängig eine starke Färbeintensität zu verzeichnen. Weiteren 5 von 49 Fällen (darunter 3 Fälle des Subtyps A, 2 Fälle des Subtyps C) war eine partielle TRAF1-Expression zuzuordnen, auch diese mit starker Färbeintensität. 3 von 49 Fällen (3 Fälle des Subtyps A) verhielten sich negativ in der TRAF1-Färbung. Damit fand sich kein wesentlicher Unterschied der TRAF1-Färbungen bezüglich der untersuchten Subtypen A und C der lymphomatoiden Papulose.

Unter Auswertung der geschilderten Daten ist die TRAF1-Expression der lymphomatoiden Papulose signifikant höher als die der untersuchten primären und systemischen kutanen großzelligen anaplastischen T-Zell-Lymphome ( $p < 0,001$ ).



**Abbildungen 12 und 13:** Lymphomatoide Papulose Typ A, linksseitig Hämatoxylin-Eosin, rechtsseitig TRAF1-Färbung; hier kräftige Markierung der blastären Zellen. Vergrößerung Abb. 10. ca. 100fach, Abb11. ca. 200fach.



**Abbildungen 14 und 15:** Lymphomatoide Papulose Typ C, linksseitig CD30-Färbung, rechtsseitig TRAF1-Färbung. In beiden Färbungen kräftige Markierung der blastären Zellen. Vergrößerung jeweils ca. 200fach.

Entität	TRAF1 Expression (Anzahl der Fälle/Gesamtzahl)			Färbeintensität
	+	+/-	-	
ALCL (ALK-)	2/19	4/19	13/19	++/+
ALCL (ALK+)	0/11	4/11	7/11	+
cALCL	1/28	6/28	21/28	+/>++
LyP	41/49	5/49	3/49	+++
Vorl.-T.-ALL	0/3	0/3	3/3	--
NK-Zell-Lymphom	1/9	0/9	8/9	++
Mycosis fungoides	1/8	3/8	4/8	++/+
Sézary Syndrom	0/2	0/2	2/2	--
AILD	0/2	0/2	2/2	--

**Tabelle 3:** TRAF1-Expression in T-Zell-Lymphomen und in der lymphomatoiden Papulose

Abkürzungen:

ALCL:	Systemisches anaplastisches großzelliges T-Zell-Lymphom
ALK-:	Keine Expression des ALK-Fusionsproteins
ALK+ :	Expression des ALK-Fusionsproteins
cALCL :	Primäres kutanes anaplastisches großzelliges T-Zell-Lymphom
LyP	Lymphomatoide Papulose
Vorl.-T.-ALL :	Vorläufer T-lymphoblastisches Lymphom
AILD:	Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom

## **3.6 TRAF1-Expression in nicht-lymphatischen Tumoren**

Neben den Neoplasien lymphatischer Herkunft galt das Interesse dieser Arbeit auch den nicht-lymphatischen Tumoren. Um hier ein möglichst umfassendes Bild zu erhalten, wurde analog zu den unter 3.2. beschriebenen Untersuchungen der Normalgewebe ein breiter Querschnitt aus überwiegend epithelialen und einigen nicht-epithelialen Tumoren zusammengetragen. Ausgewählt wurden: Tumoren des Verdauungstraktes (Ösophaguskarzinom, Magenkarzinom, Kolonkarzinom, hepatozelluläres Karzinom, cholangiozelluläres Karzinom), Tumoren des Respirationstraktes (Bronchialkarzinom, Mesotheliom), Tumoren des weiblichen Genitaltraktes (Endometriumkarzinom, Mammakarzinom, Fibroadenom der Mamma), Tumoren des männlichen Genitaltraktes (Prostatakarzinom, Seminom, embryonales Karzinom des Hodens), Tumoren des harnbildenden und harnableitenden Systems (Nierenzellkarzinom, Urothelkarzinom), Tumoren der endokrinen Organe (Nebennierenrindenadenom, Phäochromozytom), ein Tumor des Fettgewebes (Lipom), die Langerhanssche Histiozytose und das maligne Melanom. Insgesamt handelte es sich dabei um 58 Fälle. In dieser stark heterogenen Gruppe waren die Färberegebnisse weitgehend einheitlich. Bis auf die Fälle der Langerhansschen Histiozytose waren alle anderen Entitäten als TRAF1-negativ einzustufen. Dabei zeigten sich die meisten Tumoren komplett TRAF1-negativ. Lediglich bei 2 von 5 Fällen des embryonalen Karzinoms des Hodens sowie auch in einem klarzelligen Nierenzellkarzinom fanden sich einzelne schwach angefärbte Tumorzellen (weniger als 10 % der Tumorzellen). Sofern auf den entsprechenden Paraffinschnitten Normalgewebe erfasst war, entsprach das Färbemuster den bereits oben beschriebenen Ergebnissen. In einigen Fällen war in Tumorumgebung ein lymphatisches Begleitinfiltrat erfasst, in dem sich die bereits beschriebenen interdigitierenden Retikulumzellen sowie auch vereinzelte lymphatische Blasten markieren ließen, was das bereits dokumentierte Färbemuster des nicht-neoplastischen lymphatischen Gewebes bestätigte und zugleich als positive, intrinsische Kontrolle zu nutzen war.

### **3.6.1 Langerhanssche Histiozytose**

In allen untersuchten Fällen der Langerhansschen Histiozytose (7 Fälle) ließ sich eine TRAF-1-Expression nachweisen. Betroffen waren die CD1A-positiven Langerhans-Zellen. Der Anteil der markierbaren Zellen variierte allerdings stark. In 3 Fällen färbten sich circa 60-70 Prozent der Zellen mit schwacher oder mittelgradiger Intensität. Bei den weiteren 4 Fällen kamen nur circa 10-20 Prozent der Langerhans-Zellen schwach zur Darstellung.



Entität	TRAF1 Expression (Anzahl der Fälle/Gesamtzahl)			Färbeintensität
	+	+/-	-	
Langerhanssche Histiozytose	0/7	7/7	0/7	+ / ++
Bronchialkarzinom	0/2	0/2	2/2	--
Oropharynxkarzinom	0/1	0/1	1/1	--
Ösophaguskarzinom	0/2	0/2	2/2	--
Magenkarzinom	0/4	0/4	4/4	--
Kolonkarzinom	0/7	0/7	7/7	--
Hepatozelluläres Karzinom	0/4	0/4	4/4	--
Cholangiozelluläres Karzinom	0/1	0/1	1/1	--
Endometriumkarzinom	0/3	0/3	3/3	--
Mammakarzinom	0/5	0/5	5/5	--
Fibroadenom	0/1	0/1	1/1	--
Prostatakarzinom	0/2	0/2	2/2	--
Nierenzellkarzinom	0/4	0/4	4/4	--
Urothelkarzinom	0/3	0/3	3/3	--
Nebennierenrindenadenom	0/1	0/1	1/1	--
Phäochromozytom	0/1	0/1	1/1	--
Malignes Melanom	0/2	0/2	2/2	--
Lipom	0/1	0/1	1/1	--
Mesotheliom	0/4	0/4	4/4	--
Seminom	0/5	0/5	5/5	--
Embryonales Karzinom	0/5	0/5	5/5	--

**Tabelle 4:** TRAF1-Expression in nicht-lymphatischen Tumoren

## 4. Diskussion

Die Tumor-Nekrose-Faktor assoziierten Faktoren (TRAFs) sind eine Gruppe von Adapterproteinen, die über zahlreiche Interaktionen in die Regulation von Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose involviert sind. Dies sind Mechanismen, die bei der Tumorentstehung eine Schlüsselrolle spielen. Da die maligne Transformation von Zellen zumeist eine Änderung des Antigenprofils mit sich bringt, ist die Untersuchung des Expressionsmusters eines Antigens in Normal- und Tumorgewebe anhand immunhistologischer Methodik von großer Bedeutung, unter anderem auch im Hinblick auf die diagnostische Nutzbarkeit des Moleküls. Das Ziel dieser Arbeit war daher die Zusammenstellung des Expressionsmusters von TRAF1 mit einem eigens hergestellten Antikörper.

Der für diese Arbeit verwendete, im Hause hergestellte Antikörper wurde vor Durchführung dieser Untersuchungen mittels Western-Blot-Untersuchung getestet und die hohe Spezifität belegt. Die in der Literatur vorhandenen Daten wurden mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper generiert, soweit sie auf immunhistologischer Methodik beruhten. Dieser Antikörper wurde im Vorfeld der hier dargestellten Untersuchungen ebenfalls einer Westernblot-Untersuchung unterzogen. Hier zeigten sich mehrere Banden als Hinweis auf eine mangelnde Spezifität beziehungsweise Kreuzreaktionen mit anderen Molekülen. Das deutet auf eine Verzerrung von Untersuchungsergebnissen aus der Literatur hin, die sich auf TRAF1 beziehen sollten. So haben zum Beispiel andere Mitglieder der TRAF-Familie bekanntermaßen ein breites Expressionsmuster (78). Ein Teil der hier zusammengestellten Fälle wurde im Anschluß an die Färbungen mit dem hauseigenen Antikörper auch mit dem kommerziell erhältlichen Antikörper untersucht. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Western-Blot-Untersuchung dieses Antikörpers wiederholt. Hier zeigte sich eine Erhöhung der Spezifität, so dass von einer zwischenzeitlichen Weiterentwicklung des Antikörpers auszugehen ist.

Der im Hause hergestellte Antikörper ergab in den Färbungen stets ein zytoplasmatisches, teils membranös betontes Färbemuster von unterschiedlich starker Färbeintensität. Die Funktion des TRAF1-Moleküls in der Zelle ist im Einzelnen noch nicht geklärt, dies steht jedoch zumindest im Einklang damit, dass eine Assoziation von TRAF1 an die Zellmembran bekannt ist (113). Da die Färbeintensität von der Zahl der gebundenen Antikörper abhängt und sich somit gleichsinnig mit der Zahl der TRAF1-Moleküle verändert, wurde die Stärke der Färbung dieser

Untersuchungen semiquantitativ ausgewertet und mit einer geringen, mittelgradigen und starken TRAF1-Expression gleichgesetzt.

Die Ergebnisse der TRAF1-Färbungen sollen im Folgenden zusammengefasst, diskutiert und mit den Daten der Literatur verglichen werden.

Um ein möglichst umfassendes Bild des TRAF1-Expressionsmusters zu erhalten, wurden in diese Arbeit eine große Zahl von unterschiedlichen normalen Gewebsarten, reaktiver Läsionen und verschiedener Tumorentitäten integriert. Bezüglich der nicht-lymphatischen, normalen Gewebe zeigen die Ergebnisse, dass keines der untersuchten Gewebe eine wesentliche TRAF1-Expression aufweist. In den regelhaften lymphatischen Geweben findet sich ebenfalls keine TRAF1-Expression in den kleinzelligen, lymphatischen Zellen. Dahingegen stellen sich in der Regel einzelne blastäre Zellelemente TRAF1-positiv dar, die zumeist interfollikulär, seltener intrafollikulär lokalisiert sind. Des Weiteren ist in den lymphatischen Geweben eine Zellart anzutreffen, die regelmäßig eine TRAF1-Expression aufweist. Hierbei handelt es sich um die interdigitierenden Retikulumzellen, die stets kräftig TRAF1 exprimieren.

Als reaktive Läsionen wurden für diese Arbeit die dermatopathische Lymphadenopathie und die infektiöse Mononukleose ausgewählt. Im Fall der dermatopathischen Lymphadenopathie zeigt sich eine starke TRAF1-Expression der im Parakortex gelagerten Zellen dendritischen Ursprungs. Auch bei der infektiösen Mononukleose ist eine starke TRAF1-Expression darstellbar, die sich in den CD30-positiven Zellen findet, die teils auch das latente Membranprotein des Epstein-Barr-Virus exprimieren.

Das Hauptinteresse dieser Arbeit galt jedoch den neoplastischen Läsionen. Im Fall der nicht-lymphatischen Neoplasien wiederholt sich in den TRAF1-Färbungen im Wesentlichen das Bild der nicht-lymphatischen, normalen Gewebe. Eine nennenswerte TRAF1-Expression ist nicht nachweisbar. Deutlich anders verhalten sich die malignen Lymphome bezüglich der TRAF1-Expression. Hier gibt es einige Entitäten, die nahezu immer TRAF1 exprimieren. Grundsätzlich ist hierbei zu beobachten, dass diese in der Regel großzellige Lymphome sind. Die kleinzelligen Lymphome sind ganz überwiegend TRAF1-negativ.

Die Entität, die am regelmäßigsten (in 100% der Fälle) TRAF1 exprimiert, ist das klassische Hodgkin-Lymphom. Dabei ist die TRAF1-Expression in nahezu allen Fällen mindestens mittelgradig oder stark. Ein Unterschied zwischen den 3 Subtypen des klassischen Hodgkin-Lymphoms ist nicht zu belegen. Dahingegen findet sich zwar auch in allen Fällen des lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphoms eine TRAF1-Expression, die aber im Vergleich mit den Subtypen des klassischen Hodgkin-Lymphoms deutlich geringer ist in Bezug

auf den Prozentsatz der positiven Tumorzellen und auf die Färbeintensität. Unter den B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen fallen bei der TRAF1-Untersuchung in erster Linie drei Entitäten auf: das primäre mediastinale B-Zell-Lymphom, die anaplastische Variante des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms und das T-Zell-reiche B-Zell-Lymphom. Bei diesen Erkrankungen kann in einem hohen Anteil der Fälle eine meist mittelgradige TRAF1-Expression nachgewiesen werden. Diese Lymphome sind allerdings nicht die einzigen B-Zell-Lymphome, bei denen eine TRAF1-Expression auftritt. Zwar ist der Anteil an positiven Fällen deutlich geringer, jedoch exprimierten auch immerhin 4 von 12 Fällen der weiteren Subtypen des primären diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms TRAF1, daneben einige Fälle des Plasmozytoms und des Burkitt-Lymphoms. Die weiteren untersuchten B-Zell-Lymphome zeigen keine oder nur eine geringe TRAF1-Expression, die zumeist nur einzelne Fälle betrifft, schwach ausgeprägt ist oder oft nur auf einzelne blastäre Tumorzellen beschränkt ist. Darunter befinden sich die kleinzelligen B-Zell-Lymphome sowie auch das plasmoblastische Lymphom und die Vorläufer B-lymphoblastische Leukämie.

Bei den T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen ist eine TRAF1-Expression insgesamt deutlich seltener als bei den B-Zell-Lymphomen. Keine Entität der T-Zell-Lymphome zeigt eine TRAF1-Expression in der Mehrzahl der Fälle. Es finden sich nur Einzelfälle mit TRAF1-Positivität. Auch hier stellt sich dar, dass TRAF1-positive Fälle zumeist unter den großzelligen Lymphomen anzutreffen sind, so finden sich einzelne Fälle mit TRAF1-Expression unter den anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphomen. Im Zusammenhang insbesondere mit den kutanen anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphomen wurde auch die lymphomatoide Papulose untersucht aufgrund der teilweise extrem schwierigen differentialdiagnostischen Abgrenzung zum kutanen anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphom. Hier zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied: Der größte Teil der pathomorphologisch und im klinischen Verlauf als lymphomatoide Papulose eingestuft Fälle weist eine starke Expression von TRAF1 auf, wohingegen die primären kutanen anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphome ganz überwiegend TRAF1-negativ sind.

In Betrachtung der neu gewonnenen Daten im Vergleich mit den bekannten Daten finden sich teils Übereinstimmungen, teils Widersprüche. So wird in der Literatur angegeben, dass in verschiedenen normalen Geweben eine TRAF1-Expression zu finden ist, so zum Beispiel in der Epidermis, im Hoden, in manchen mesenchymalen Zellen und in einigen Drüsenepithelien (78). In der gleichen Veröffentlichung wird auch ein deutlich höherer Prozentsatz an TRAF1-positiven B-Zell-Lymphomen angegeben (ungefähr 50%), einschließlich der überwiegend kleinzelligen

Entitäten, wie insbesondere der chronischen lymphatischen B-Zell-Leukämie, dem folliculären Lymphom oder dem Mantelzelllymphom. Dies kann in den vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden. Auch bei der chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Zell-Typ zeigten sich die meisten Fälle TRAF1-negativ, eine TRAF1-Expression fand sich zumeist nur in einzelnen blastären Tumorzellen. Die Ursache für diese Diskrepanzen liegt möglicherweise in den oben beschriebenen Kreuzreaktionen, beziehungsweise der mangelnden Spezifität des zur Zeit jener Untersuchungen erhältlichen kommerziellen Antikörpers. Auch die anschließend durchgeführten Färbungen mit dem zwischenzeitlich offenbar verbesserten, kommerziell erhältlichen Antikörper belegen die überwiegende TRAF1-Negativität der chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Zell-Typ.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene TRAF1-Positivität des klassischen Hodgkin-Lymphoms bestätigt die zuvor bekannten, anhand der in-situ-Hybridisierung gewonnenen Daten (107). Eine andere Publikation beschreibt allerdings eine Abhängigkeit der TRAF1-Expression in den Hodgkin-Lymphomen vom EBV-Status (114). Hier wird dargestellt, dass der Prozentsatz an TRAF1-positiven Fällen bei den EBV-positiven Hodgkin-Lymphomen signifikant höher liegt als bei den EBV-negativen Hodgkin-Lymphomen (61% TRAF1-positive Fälle bei EBV-positiven Hodgkin-Lymphomen gegenüber 33% TRAF1-positiven Fällen bei EBV-negativen Hodgkin-Lymphomen) (114). Dies kann mittels der hier zusammengestellten Daten nicht bestätigt werden. Alle untersuchten Hodgkin-Lymphome zeigten sich hier TRAF1-positiv, und bei semiquantitativer Auswertung ließ sich auch kein Unterschied bezüglich der Stärke der TRAF1-Expression darstellen bei den Epstein-Barr-Virus-assoziierten Hodgkin-Lymphomen im Vergleich mit den Epstein-Barr-Virus-negativen Hodgkin-Lymphomen.

Eine weitere Veröffentlichung widmet sich den Eigenschaften der primären mediastinalen großzelligen Lymphome. In dieser Arbeit wird dargestellt, dass die primären mediastinalen großzelligen B-Zell-Lymphome durchgängig eine TRAF1-Positivität aufweisen, während diese den Subtypen des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms fehlen soll (108). Zwei weitere Veröffentlichungen (109, 110) der gleichen Arbeitsgruppe beschäftigen sich weiter mit der TRAF1-Expression in primären mediastinalen B-Zell-Lymphomen. Hier wurde als weiteres Molekül c-Rel untersucht, ein Protoonkogen, das zur NF- $\kappa$ B/Rel-Transkriptionsfaktor-Familie gehört (115). Die Autoren beschreiben in einer dieser beiden Arbeiten (109), dass eine Expression von TRAF1 in 62% der Fälle der primären mediastinalen B-Zell-Lymphome zu finden ist, während bei den primären diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen nur 12% TRAF1-positiv sein sollen. Eine ähnliche Verteilung geben sie für die Expression von c-Rel an mit einer Positivität von 65% der Fälle des primären mediastinalen B-Zell-Lymphoms gegenüber

einer Positivität von 18% der Fälle der primären diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass eine Koexpression von TRAF1 und c-Rel hochspezifisch für die Unterscheidung zwischen primären mediastinalen B-Zell-Lymphomen und primären diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen ist. Die andere der erwähnten Arbeiten (110) befasst sich mit der Expression von TRAF1 und c-Rel bezüglich der Abgrenzung der klassischen Hodgkin-Lymphome von anaplastischen, großzelligen Lymphomen, von dem lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphom und den diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen. Hier wird beschrieben, dass eine starke TRAF1-Expression in einer relevanten Zahl von Fällen nur im klassischen Hodgkin-Lymphom nachweisbar ist. Eine Expression von c-Rel wird in dieser Arbeit beschrieben in den klassischen Hodgkin-Lymphomen sowie in den primären diffusen, großzelligen B-Zell-Lymphomen. Hier wird der Schluss gezogen, dass eine Koexpression von TRAF1 und c-Rel hochsensitiv und spezifisch ist für die klassischen Hodgkin-Lymphome.

Diese Untersuchungen werden durch die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten nur teilweise gestützt. Die hier untersuchten primären mediastinalen B-Zell-Lymphome zeigen sich tatsächlich ganz überwiegend TRAF1-positiv mit einem Prozentsatz von 84% TRAF1-positiven Fällen (11 von 13 Fällen). Damit liegt der Prozentsatz niedriger als in der ersten zitierten Arbeit, die sich allerdings nur auf 6 Fälle stützte, jedoch höher als in der Nachfolgearbeit (hier sind 62% positive Fälle angegeben) (109).

Eine wesentliche diskrepante Beobachtung der hier dargelegten Untersuchungen ist jedoch, dass die TRAF1-Expression nicht auf die primären mediastinalen B-Zell-Lymphome und die Hodgkin-Lymphome beschränkt ist. Unter den primären diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen ist vor allem die anaplastische Variante zu nennen, die in 15 von 20 Fällen eine TRAF1-Expression von mittelgradiger Färbeintensität aufwies. Des Weiteren zeigte sich in unseren Untersuchungen ein Drittel der Fälle der weiteren Subtypen des primären diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms TRAF1-positiv, daneben auch ein großer Teil der T-Zell-reichen-B-Zell-Lymphome. Diese Diskrepanzen könnten mit der bereits beschriebenen mangelnden Spezifität des verwendeten kommerziellen Antikörpers zusammenhängen. Der direkte Vergleich mit den zitierten Arbeiten ist jedoch schwierig. Die erste Arbeit (108) beruht auf einer nur geringen Fallzahl (5 TRAF1-negative Fälle von primären diffusen großzelligen Lymphomen). In der Publikation bezüglich der Unterscheidung der primären mediastinalen B-Zell-Lymphomen von den primären diffusen, großzelligen B-Zell-Lymphomen (109) wurden zwar 173 Fälle der letzteren Kategorie untersucht, hier wurde aber nicht nach Subtypen unterschieden, so dass unklar ist, ob und in welchem Umfang insbesondere die anaplastische

Variante und das T-Zell-reiche-B-Zell-Lymphom integriert wurden. In der dritten Arbeit (110), die sich in erster Linie mit der Abgrenzung der klassischen Hodgkin-Lymphome beschäftigt, werden anaplastische großzellige Lymphome genannt, die meist TRAF1-negativ waren, darunter nur wenige Fälle mit schwacher, fokaler TRAF1-Expression. Hierbei ist allerdings nicht ganz klar zu erkennen, ob es sich um B-Zell- oder T-Zell-Lymphome handelt. An einer Stelle wird von einer Untergruppe der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome gesprochen, tabellarisch ist jedoch eine Negativität für das B-Zell-Antigen CD20 und die bei T-Zell-Lymphomen auftretende Translokation des ALK-Proteins bei einem Teil der Fälle angegeben (109). Die untersuchten lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphome wurden in dieser Arbeit als TRAF1-negativ eingestuft mit nur wenigen Fällen von schwacher fokaler TRAF1-Positivität. Dies korreliert nicht mit unseren Untersuchungen, in denen sich in allen lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphomen eine TRAF1-Expression darstellen ließ, allerdings von schwacher Intensität. Dieser Unterschied sowie die vorher beschriebenen Diskrepanzen sind möglicherweise auch durch den verwendeten, kommerziellen Antikörper erklärbar. Dieser erbrachte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten parallelen Untersuchungen teils eine schwächere Färbung. Andere Ursachen für die beschriebenen Diskrepanzen liegen möglicherweise in technischen Gründen bei der Fixierung und Prozessierung des Gewebes.

Daraus ist zu folgern, dass eine Abgrenzung der primären mediastinalen B-Zell-Lymphome mittels TRAF1 von den primären diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen und von dem T-Zell-reichen-B-Zell-Lymphom nicht zuverlässig möglich ist. Dies trifft ebenfalls für die Unterscheidung der klassischen Hodgkin-Lymphome von den genannten Entitäten zu.

Ob diese Abgrenzungen unter Zuhilfenahme des Moleküls c-Rel möglich sind, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht beurteilt werden. Um zu prüfen, ob die in den genannten Publikationen gefundene Sensitivität und Spezifität der Markerkombination TRAF1 und c-Rel nachvollziehbar ist, sollen die hier zusammengetragenen Fälle zukünftig einer Untersuchung bezüglich der c-Rel-Expression unterzogen werden.

Des Weiteren ist aus den gewonnenen Daten Folgendes zu schließen: Eine stetige TRAF1-Expression findet sich in normalen Geweben nur in interdigitierenden Retikulumzellen des lymphatischen Gewebes. Eine Expression von TRAF1 in anderen Zellen ist offenbar induzierbar. In der Literatur ist bekannt, dass TRAF1 induzierbar ist durch eine Stimulation von TNFRs über eine Aktivierung von NF- $\kappa$  und damit die TRAF1-Expression NF- $\kappa$ B-abhängig ist (102).

Eine Expression von TRAF1 findet sich in aller Regel in blastären, lymphatischen Zellen. Die meisten in dieser Arbeit untersuchten kleinzelligen Läsionen sind TRAF1-negativ. Die TRAF1-Expression in Blasten in normalen lymphatischen Geweben ist in der Art zu erklären, dass es sich hier um offenbar aktivierte Zellen handelt. In Bezug auf die neoplastischen Erkrankungen spielt eine TRAF1-Expression offensichtlich nur bei den lymphatischen Neoplasien eine Rolle. Zum größten Teil korreliert die TRAF1-Expression mit der Expression bestimmter TNFRs, für die aus der Literatur eine Assoziation mit TRAF1 bekannt ist (81, 82, 89). Dies gilt in erster Linie für CD30 (81,82), das beim Hodgkin-Lymphom, bei der anaplastischen Variante des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms oder bei den mediastinalen B-Zell-Lymphomen gefunden werden kann. Doch bedeutet eine CD30-Expression nicht in jedem Fall, dass auch TRAF1 exprimiert wird. Dies zeigt sich beispielsweise bei dem embryonalen Karzinom des Hodens, das nur gelegentlich einzelne TRAF1-positive Zellen enthält, oder auch bei den großzelligen anaplastischen T-Zell-Lymphomen, die in der Mehrzahl TRAF1-negativ sind. Möglicherweise wird hier CD30 zwar exprimiert, aber nicht stimuliert, so dass es nicht zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B kommt und damit nicht zu der oben beschriebenen NF- $\kappa$ B-abhängigen Induktion von TRAF1 (102). Unter den TRAF1-positiven Entitäten finden sich weitere, in denen teils zusätzlich zu CD30 andere bekannte Interaktionspartner von TRAF1 beteiligt sind, so zum Beispiel das latente Membranprotein des Epstein-Barr-Virus bei der infektiösen Mononukleose und der EBV-assoziierten Lymphoproliferation. Bei wieder anderen Entitäten ist der Interaktionspartner für TRAF1 noch nicht klar, beispielsweise bei dem lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphom, das CD30-negativ ist oder bei den CD30-negativen Subtypen der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome. Bei der TRAF1-Expression der Zellen dendritischen Ursprungs kommen in erster Linie CD40, TNFR2 sowie eventuell auch OX40 und CD27 als Partner von TRAF1 in Frage. Die Erkrankungen, die auf Zellen dendritischen Ursprungs beruhen, verhalten sich unterschiedlich in Bezug auf die TRAF1-Expression. Bei der dermatopathischen Lymphadenopathie findet sich eine kräftige TRAF1-Expression der parakortikalen, dendritischen Zellpopulation, die sich zusammensetzt aus interdigitierenden Retikulumzellen und Langerhanszellen. Eine TRAF1-Expression in den interdigitierenden Retikulumzellen entspricht dem Bild der regelhaften lymphatischen Gewebe. Die Langerhanszellen der Haut jedoch stellten sich in den hier beschriebenen Untersuchungen TRAF1-negativ dar. In der Literatur wird spekuliert, dass das Auftreten der Langerhanszellen in der dermatopathischen Lymphadenopathie durch eine Migration aus chronisch irritierten Hautläsionen zu erklären ist (116). Möglicherweise ist die TRAF1-Expression der Langerhanszellen hier durch eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B verursacht, die wiederum die TRAF1-



Expression induziert (102). Dagegen liegt bei der Langerhansschen Histozytose offenbar nur eine geringe Aktivität von NF- $\kappa$ B vor und nur eine partielle und schwache TRAF1-Expression. Die Induzierbarkeit von TRAF1 bietet auch eine Erklärung für die immer wieder auftretende Beobachtung, dass bei TRAF1-positiven Lymphomen der Grenzbereich zum originären lymphatischen Gewebe stärker TRAF1 exprimiert als die zentralen Tumorabschnitte. Bedingt sein könnte dies durch eine Vermittlung über TNFRs ohne Todesdomäne über eine Stimulation mit Liganden der umliegenden Zellen.

Von besonderem Interesse sind die geschilderten Ergebnisse der Untersuchungen bei den primären kutanen lymphoproliferativen T-Zell-Erkrankungen mit Expression von CD30. Hierbei handelt es sich um das primäre kutane anaplastische großzellige T-Zell-Lymphom und die lymphomatoide Papulose. Das primäre kutane anaplastische großzellige T-Zell-Lymphom kommt in der Haut älterer Patienten (117) vor mit leichter Bevorzugung des männlichen Geschlechtes. Bei Diagnosestellung liegt häufig eine solitäre, umschriebene tumorös-knotige Hautläsion vor. 20% der Fälle zeigen multizentrische Läsionen (118). Im weiteren Verlauf der Erkrankung kann es zu einer partiellen oder kompletten Regression kommen, jedoch treten häufig Rezidive auf. Darüber hinaus entwickeln 10% der Patienten eine progrediente systemische Lymphomerkkrankung (118, 119, 120). Die lymphomatoide Papulose ist eine chronische, rezidivierende Hauterkrankung (121, 122). Hier treten papulöse und knotige Hautinfiltrate auf, die im weiteren Verlauf eine spontane Regression zeigen (118, 121). Der Krankheitsverlauf der lymphomatoiden Papulose insgesamt ist in der Regel benigne und geht mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von nahezu 100% einher. Betroffen sind in der Regel ältere Patienten mit leichter Bevorzugung des männlichen Geschlechtes (117, 118). Beide Erkrankungen zeigen also zum Teil vergleichbare epidemiologische Daten und klinische Erscheinungsbilder. Diese Übereinstimmung spiegelt sich auch auf mikroskopischer Ebene wieder. Bei beiden Erkrankungen findet sich ein dermales Infiltrat atypischer T-Lymphozyten, die immunhistologisch CD30 exprimieren und in einem gemischt zusammengesetzten, entzündlichen Hintergrund liegen. Bei den primären kutanen anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphomen stellen sich Rasen von atypischen, blastären Zellen dar. Die bei einem Teil der systemischen anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphomen auftretende Expression des ALK-Fusionsproteins ist bei der überwiegenden Mehrzahl der primären kutanen anaplastischen T-Zell-Lymphome nicht nachweisbar (123, 124). Bei der lymphomatoiden Papulose können histologisch drei Untergruppen unterschieden werden (117): der Typ A mit locker verteilten, Reed-Sternberg-ähnlichen Zellen, der Typ B mit cerebriformen Zellen oft ohne Expression von

CD30, ähnlich denen der Mycosis fungoides, sowie der Typ C. Bei diesem Subtyp finden sich diffuse, CD30-positive Infiltrate atypischer, blastärer T-Zellen und damit ein ähnliches Bild wie bei dem oben beschriebenen primären, kutanen, anaplastischen, großzelligen T-Zell-Lymphom. Auch mittels molekularpathologischer Analytik ist keine eindeutige Abtrennung möglich (125). Der größte Teil der primären kutanen anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphome zeigt eine klonale Umlagerung der Gene des T-Zell-Rezeptors (117). Eine solche lässt sich jedoch auch bei vielen Fällen der Lymphomatoiden Papulose nachweisen, einschließlich aller drei Subtypen (126, 127, 128). Wegen der genannten erheblichen Überschneidungen des klinischen, epidemiologischen und histologischen Bildes wird in der WHO-EORTC-Klassifikation die lymphomatoide Papulose Typ C auch als Grenzläsion eingestuft, deren Verhalten nicht sicher vorhergesagt werden kann, so dass entsprechende Läsionen oft erst im klinischen Verlauf korrekt eingeordnet werden können. Eine frühzeitige diagnostische Abtrennung dieser Erkrankungen ist jedoch extrem wichtig im Hinblick auf die weiteren therapeutischen Entscheidungen. Das primäre kutane anaplastische großzellige T-Zell-Lymphom bedarf meist einer kombinierten Chemotherapie, eine Fehleinschätzung kann hier fatale Folgen haben. Umgekehrt kann eine als CD30-positives Lymphom eingestufte lymphomatoide Papulose unter systemischer Chemotherapie ein Rezidiv entwickeln, was zu dem falschen Eindruck einer progredienten Lymphomerkkrankung führt und den Patienten unnötigerweise mit einer aggressiveren Therapie belastet.

Die diesbezüglich in diesen Untersuchungen gewonnenen Daten zeigen einen hochsignifikanten Unterschied der TRAF1-Expression. Der größte Teil der pathomorphologisch und im klinischen Verlauf als lymphomatoiden Papulose eingestuftten Fälle weist eine starke Expression von TRAF1 auf. Dahingegen findet sich in den primären und sekundären kutanen anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphomen in der ganz überwiegenden Zahl der Fälle keine Expression von TRAF1. Auch die systemischen großzelligen anaplastischen T-Zell-Lymphome ohne kutane Beteiligung sind in der Mehrzahl der Fälle TRAF1-negativ. Findet sich eine TRAF1-Expression, so ist sie meist inkomplett und schwach.

Dieser Unterschied in der TRAF1-Expression könnte durch einen unterschiedlichen Status der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in beiden Erkrankungen bedingt sein. Dies würde bedeuten, dass in den Zellen der lymphomatoiden Papulose NF- $\kappa$ B stark aktiviert wird, während die Tumorzellen der kutanen anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphome eine geringe NF- $\kappa$ B-Aktivität aufweisen müssten. Denkbar ist hier eine Induktion der TRAF1-Expression der lymphomatoiden Papulose durch Zytokinstimulation oder über eine starke Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Mutationen von NF- $\kappa$ B-Inhibitoren, wie dies beispielsweise bei einigen Hodgkin-Lymphomen gezeigt wurde

(129). Die Annahme einer geringen NF- $\kappa$ B-Aktivität bei den anaplastischen großzelligen Lymphomen korreliert gut mit Daten der Literatur, die darauf hin deuten, dass in unstimulierten Zelllinien der kutanen und systemischen großzelligen anaplastischen T-Zell-Lymphome die NF- $\kappa$ B-Aktivität gering ist (130, 131, 132). Derartige Untersuchungen für die lymphomatoide Papulose liegen zurzeit noch nicht vor.

In Zusammenschau der hier dargelegten Untersuchungsergebnisse lässt sich abschließend feststellen, dass sich die eingangs beschriebene molekulare Einzigartigkeit von TRAF1 im Vergleich mit den anderen Mitgliedern der TRAF-Familie auch in der Expression in vivo widerspiegelt. Die Erstellung des Expressionsprofils von TRAF1 mittels eines eigens hergestellten, monoklonalen Antikörpers führt teils zu einer Einschränkung und Modifizierung der in der Literatur bekannten Daten, zum Beispiel was die TRAF1-Expression in normalen, nicht-lymphatischen Geweben und in kleinzelligen B-Zell-Lymphomen betrifft oder bezüglich der Nutzbarkeit von TRAF1 bei der Diagnose der primären mediastinalen B-Zell-Lymphome. Teilweise lassen sich Ergebnisse, die mittels anderer Untersuchungsmethoden erstellt worden waren, bestätigen (107). Als wesentlichstes Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt sich jedoch eine Erweiterung der bisherigen Datenlage hinsichtlich der diagnostischen Wertigkeit der TRAF1-Expression in Bezug auf die bislang problematische Differenzierung der CD30-positiven, kutanen lymphatischen Läsionen.

## 5. Zusammenfassung:

TRAF1 ist eins von 6 Adapterproteinen der TRAF-Familie, die über zahlreiche Interaktionen in wesentliche zelluläre Prozesse des Zellüberlebens und des Zelltods involviert ist. Die Darstellung der TRAF1-Expression im Gewebe mittels Immunhistologie ist von besonderem Interesse, weil die Expression von TRAF1 beschränkt ist auf bestimmte Entitäten lymphatischer Erkrankungen. Da die bis dato vorliegenden Daten der Literatur teils unvollständig und teils widersprüchlich waren, wurde für diese Arbeit ein im Hause hergestellter, hochspezifischer, monoklonaler Antikörper zur Verfügung gestellt und das Expressionsprofil anhand von insgesamt 472 Proben von zahlreichen regelhaften und erkrankten Geweben ermittelt.

Hierbei ergibt sich, dass eine TRAF1-Expression in nicht-lymphatischen Geweben nicht in nennenswertem Umfang nachweisbar ist, und zwar unabhängig davon, ob es sich um regelhafte Gewebe oder Neoplasien handelt.

In einigen lymphatischen reaktiven Läsionen ist eine kräftige TRAF1-Expression darstellbar, die teils erklärbar ist über in der Literatur bekannte Assoziationen mit TNF-Rezeptoren wie CD30 oder das latente Membranprotein des Epstein-Barr-Virus. In anderen Fällen ist noch nicht bekannt, welcher TNFR an der Hochregulierung von TRAF1 beteiligt ist.

Bei den untersuchten Lymphomen kann die bereits in der Literatur bekannte kräftige und konstante Expression von TRAF1 in allen Typen des Hodgkin-Lymphoms bestätigt werden, einschließlich der etwas schwächeren Positivität der LPHLs. Eine Beeinflussung der TRAF1-Expression durch den EBV-Status bei den Hodgkin-Lymphomen ist nicht zu belegen.

Unter den B-Zell-Lymphomen sind die primären mediastinalen B-Zell-Lymphome überwiegend TRAF1-positiv. Die in der Literatur angegebene Abgrenzung zu anderen diffusen, großzelligen B-Zell-Lymphomen mittels TRAF1 ist jedoch nicht ohne weiteres möglich, da auch insbesondere die anaplastischen großzelligen B-Zell-Lymphome, die T-Zell-reichen B-Zell-Lymphome, so wie auch ein Teil der restlichen diffusen, großzelligen B-Zell-Lymphome TRAF1 exprimieren.

Bei den T-Zell-Lymphomen ist von besonderem Interesse, dass sowohl die systemischen als auch die kutanen großzelligen anaplastischen T-Zell-Lymphome überwiegend TRAF1-negativ sind, während die lymphomatoide Papulose in den meisten Fällen kräftig TRAF1 exprimiert. Ungeklärt ist hierbei bislang die pathogenetische Relevanz, jedoch könnte TRAF1 ein neuer Marker in der Differenzierung dieser beiden Entitäten sein und helfen, eine frühzeitige adäquate Therapie zu ermöglichen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
2. Martin SJ, Green DR, Cotter TG. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci.* 1994;19:26-30.
3. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-1449.
4. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell.* 1997;88:347-354.
5. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature.* 1992;356:397-400.
6. Vaux DL, Haeccker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell.* 1994;76:777-779.
7. Bredesen DE. Neural apoptosis. *Ann Neurol.* 1995;38:839-851.
8. Cory S, Strasser A, Jacks T, et al. Enhanced cell survival and tumorigenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1994;59:365-375
9. Cory S. Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:513-543.
10. Strasser A, Huang DC, Vaux DL. The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 1997;1333:F151-178
11. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996;88:386-401.
12. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:395-419.
13. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-1462.
14. Reed JC. Bcl-2 family proteins: strategies for overcoming chemoresistance in cancer. *Adv Pharmacol.* 1997;41:501-532
15. Cotman CW, Anderson AJ. A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 1995;10:19-45.
16. Kim TW, Pettingwell WH, Jung YK, et al. Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease. *Science.* 1997;277:373-376.

17. Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, et al. Inhibition of interleukin 1 $\beta$  converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2007-2012.
18. Namura S, Zhu J, Fink K, et al. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neuroscience* 1998;18:3659-68.
19. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, et al. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993;75:641-652.
20. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. *Science* 1998;281:1312-1316
21. Green DR, Reed JC. Mitochondria and Apoptosis. *Science* 1998;281:1309-1312
22. Newmeyer DD, Farschon DM, Reed JC. Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell*. 1994;79:353-364.
23. Liu X, Kim CN, Yang J, et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996;86:147-157.
24. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997;275:1132-1126.
25. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;9:479-489.
26. Mancini M, Nicholson DW, Roy S, et al. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol*. 1998;140:1485-1495.
27. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, et al. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 1996 ;184:1331-1341.
28. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, et al. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med*. 1997;186:25-37.
29. Adachi S, Cross AR, Babior BM, Gottlieb RA. Bcl-2 and the outer mitochondrial membrane in the inactivation of cytochrome c during Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:21878-21882.

30. Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, et al. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem.* 1997;272:11369-11377.
31. Boise LH, Thompson CB. Hierarchical control of lymphocyte survival. *Science* 1996;274:67-68.
32. Osborne BA. Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system. *Curr Opin Immunol.* 1996;8:245-254.
33. Winoto A. Cell death in the regulation of immune responses. *Curr Opin Immunol.* 1997;9:365-70.
34. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell.* 1994;76:959-962.
35. Gruss HJ, Dower SK. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood.* 1995;85:33783-404.
36. Baker JS, Premkumar Reddy E. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 1998;17:3261-3270.
37. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GHW, et al. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993;74:845-853.
38. Itoh N, et al. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol chem* 1993;268:10932-10937.
39. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997;88:355-365.
40. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, et al. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science.* 1996;274:990-992.
41. Marsters S, Sheridan JP, Donahue CJ, et al. Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B. *Curr Biol.* 1996;6:1669-1676.
42. Kitson J, Raven T, Jiang YP, et al. A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* 1996;384:372-375.
43. Bodmer JL, Burns K, Schneider P, et al. TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas (Apo-1/CD95). *Immunity.* 1997;6:79-88.
44. Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992;13:151-153.
45. Locksley Rm, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501

46. MacEwan DJ. TNF ligands and receptors – a matter of life and death. *British J of Pharmacology* 2002;135:855-875.
47. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3666-3670.
48. Williams TW, Granger GA. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: lymphotoxins of several mammalian species. *Natur* 1968;7:1076-1077.
49. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003;3:745-756.
50. Ashkenazi A, Dixit VM. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science* 1998;281:1305-1308.
51. Nagata S. Apoptosis regulated by a death factor and its receptor: Fas ligand and Fas. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1994;345:281-287.
52. Song K, Chen Y, Göke R, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis –inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *J Exp Med* 2000;191:1095-1104.
53. Cretney E, Takeda K, Yagita H, et al. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol* 2002;168:1356-1361.
54. Lamhamedi-Cherradi SE, Zhenq SJ, Maquschak KA, Peschon J, Chen YH. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL  $-/-$  mice. *Nature Immunol* 2003;4:255-260.
55. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2000;104:487-501.
56. Kishimoto H, Surh CD, Sprent J. A role for Fas in negative selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med.* 1998;187:1427-1438.
57. Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 1999;33:29-55.
58. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995;270:1189-1192.
59. Adams AB, Larsen CP, Pearson TC, Newell KA. The role of TNF receptor and TNF superfamily molecules in organ transplantation. *Am J Transplant* 2002; 2:12-18.
60. Gardam MA, Keystone EC, Menzies R, et al. Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. *Lancet Infect Dis* 2003;3:148-155.



61. Moore RJ, Owens DM, Stamp G, et al. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med.* 1999;5:828-31
62. Romas E, Gillespie MT, Martin TJ. Involvement of receptor activator of NF-kappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone* 2002;30:340-346.
63. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999;397:315-323.
64. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;12:1260-1268.
65. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996;87:13-20.
66. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 1996;274:782-784.
67. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1996;351:127-134.
68. Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001;20:2390-2400.
69. Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) a family of adaptor proteins that regulates life and death. *Genes Dev* 1998;12:2821-2830.
70. Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, et al. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1994;78:681-692.
71. Hu HM, O'Rourke K, Bogusi MS, et al. A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. *J Biol Chem* 1994;269:30069-30072.
72. Sato T, Irie S, Reed JC. A novel member of the TRAF family of putative signal transducer proteins binds to the cytosolic domain of CD40. *FEBS Lett* 1995;358:113-118.
73. Régnier CH, Tomasetto C, Moog-Lutz C, et al. Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the TRAF protein family, which is expressed in breast carcinoma. *J Biol Chem* 1995;270:25715-25721.
74. Nakano H, Oshima H, Chung W, et al. TRAF5, an activator of NF-kappaB and putative signal transducer of the lymphotoxin-beta receptor. *J Biol Chem* 1996;271:14661-14664.
75. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, et al. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996;383:443-446.

76. Ishida T, Mizushima S, Azuma S, et al. Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J Biol Chem* 1996;271:28745-28748.
77. Zapata JM, Pawlowski E, Haas E, et al. A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated domains. *J Biol Chem* 2001;276:24242-24252.
78. Zapata JM, Krajewska M, Krajewski S, et al. TNFR-associated factor family protein expression in normal tissues and lymphoid malignancies. *J Immunol* 2000;165:5084-5096.
79. Rothe M, Sarma V, Dixit VM, et al. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 1995;269:1424-1427.
80. Tsitsikov EN, Laouini D, Dunn IF, et al. TRAF1 is a negative regulator of TNF signaling ; enhanced TNF signaling in TRAF1-deficient mic. *Immunity* 2001;15:647-657.
81. Gedrich RW, Gilfillan Mc, Duckett CS, et al. CD30 contains two binding sites with different specificities for members of the tumor necrosis factor receptor-associated family of transducing proteins. *J Biol Chem* 1996;271:12852-12858.
82. Lee SY, Park CG, Choi Y. T cell receptor-dependent cell death of T cell hybridomas mediated through the CD30 cytoplasmic domain in association with tumor necrosis receptor-associated factors. *J Exp Med* 1996;183:669-674.
83. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS. NF- $\kappa$ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF1 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998;281:1680-1683.
84. Arch RH, Thompson CB. 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF) growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Mol Cell Biol* 1998;18:558-565.
85. Marsters SA, Ayres TM, Skubatch M, Gray CL, Rothe M, Ashkenazi A. Hervesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 1997;272:14029-14032.
86. Wong BR, Josien R, Lee SY, et al. The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem* 1998;273:28355-28359.
87. Galibert L, Tometsko ME, Anderson DM, et al. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor(TNFR) associated factors in the signaling mechanisms of

- receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem* 1998;273:34120-34127.
88. Pullen SS, Miller HG, Everdeen DS. CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *Biochemistry* 1998;37:11836-11845.
  89. Devergne O, Hatzivassiliou E, Izumi KM et al. Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 1996;16:7098-7108.
  90. Hatzoglou A, Roussel J, Bourgeade MF, et al. TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* 2000;165:1322-1330.
  91. Cheng G, Baltimore D. TANK, a co-inducer with TRAF2 of TNF- and CD 40L-mediated NF-kappaB activation. *Genes Dev.* 1996;10:963-973.
  92. Rothe M, Xiong J, Shu HB, Williamson K, Goddard A, Goeddel DV. I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8241-8246.
  93. Lee SY, Lee SY, Choi Y. TRAF-interacting protein (TRIP): a novel component of the tumor necrosis factor receptor (TNFR)- and CD30-TRAF signaling complexes that inhibits TRAF2-mediated NF-kappaB activation. *J Exp Med.* 1997;185:1275-85.
  94. Song HY, Rothe M, Goeddel DV. The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6721-6725.
  95. Meylan E, Martinon F, Thome M, Gschwendt M, Tschopp J. RIP4 (DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family, activates NF-kappa B and is processed during apoptosis. *EMBO Rep* 2002;3:1201-1208.
  96. Thome M, Hofmann K, Burns K, et al. Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr Biol.* 1998;8:885-888
  97. Chaudhary PM, Jasmin A, Eby MT, Hood L. Modulation of the NF-kappa B pathway by virally encoded death effector domains-containing proteins. *Oncogene* 1999;18:5738-5746.
  98. Song HY, Régnier, CH, Kirschning CJ, Goeddel DV, Rothe M. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-

- terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9792-9796.
99. Bradley JR, Pober JS. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 2001;20:6482-6491.
  100. Speiser DE, Lee SY, Wong B, et al. A regulatory role for TRAF1 in antigen-induced apoptosis of T cells. *J Exp Med* 1997;185:1777-1783.
  101. Fotin-Mleczek M, Henkler F, Hausser A, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 1 regulates CD40-induced TRAF2-mediated NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 2004;279:677-685.
  102. Schwenzler R, Siemienski K, Liptay S, et al. The human tumor necrosis factor (TNF) Receptor-associated factor 1 gene (TRAF1) is up-regulated by cytokines of the TNF ligand family and modulates TNF-induced activation of NF- $\kappa$ B and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 1999, 274:19368-19374.
  103. Irmeler M, Steiner V, Ruegg C, Tschopp J. Caspase-induced inactivation of the anti-apoptotic TRAF1 during Fas ligand-mediated apoptosis. *J FEBS Lett* 2000;468:19-133.
  104. Leo E, Deveraux QI, Buchholtz C, et al. TRAF1 is a substrate of caspases activated during tumor necrosis factor receptor-alpha-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:8087-8093.
  105. Jang HD, Chung YM, Baik JH, et al. Caspase-cleaved TRAF1 negatively regulates the antiapoptotic signals of TRAF2 during TNF-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:499-505.
  106. Krajewska M, Krajewski S, Zapata JM, et al. TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues. *Am J Pathol.* 1998;152:1549-1561.
  107. Dürkop H, Foss HD, Demel G, Klotzbach H, Hahn C, Stein H. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 is overexpressed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus-transformed lymphoid cells. *Blood* 1999;93:617-623.
  108. Savage KJ, Monti S, Kutok JL, et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2003;102:3871-3879.
  109. Rodig SJ, Savage KJ, Nguyen V, et al. TRAF1 Expression and c-Rel activation are useful adjuncts in distinguishin classical Hodgkin lymphoma from a subset of morphologically or immunophenotpically similar lymphomas. *Am Surg Pathol,* 2005;29:196-203.

110. Rodig SJ, Savage KJ, LaCasce AS, et al. Expression of TRAF1 and Nuclear c-Rel distinguishes primary mediastinal large cell lymphoma from other types of diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2007;31:106-112.
111. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. *Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 1<sup>st</sup> ed. Lyon, France: IARC Press 2001.
112. Cordell JL, Falini B, Erber W, et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984;32:219-229.
113. Inoue JI, Ishida T, Tsukamoto N, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res* 2000;254:14-24.
114. Murray PG, Flavell JR, Baumforth KR, et al. Expression of the tumour necrosis factor receptor-associated factors 1 and 2 in Hodgkin's disease. *J Pathol* 2001;194:158-164.
115. Liou HC, Hsia CY. Distinctions between c-Rel and other NF-kappaB proteins in immunity and disease. *Bioessays* 2003;25:767-780.
116. Shamoto M, Osada A, Shinzato M, Kaneko C, Yoshida A. Do epidermal Langerhans cells, migrating from skin lesions, induce the paracortical hyperplasia of dermatopathic lymphadenopathy? *Pathol Int* 1996;46:348-354.
117. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005;105:3768-3785.
118. Bekkenk MW, Geelen FA, van Voorst Vader PC, et al. Primary and secondary cutaneous CD30(+) lymphoproliferative disorders: a report from the Dutch Cutaneous Lymphoma Group on the long-term follow-up data of 219 patients and guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 2000;95:3653-3661.
119. Liu HL, Hoppe RT, Kohler S et al. CD30+ cutaneous lymphoproliferative disorders: the Stanford experience in lymphomatoid papulosis and primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* 2003;49:1049-1058.
120. Willemze R, Beljaards RC. Spectrum of primary cutaneous CD30 (Ki-1) positive lymphoproliferative disorders. A proposal for classification and guidelines for management and treatment. *J Am Acad Dermatol* 1993;28:973-980.
121. Macaulay WL. Lymphomatoid papulosis. A continuing self-healing eruption, clinically benign – histologically malignant. *Arch Dermatol* 1968;97:23-30.
122. Willemze R, Meyer CJ, van Vloten WA, Scheffer E. The clinical and histological spectrum of lymphomatoid papulosis. *Br J Dermatol* 1982;107:131-144.

123. DeCoteau JF, Butmarc JR, Kinney MC, Kadin ME. The t(2;5) chromosomal translocation is not a common feature of primary cutaneous CD30+ lymphoproliferative disorders: comparison with anaplastic large cell lymphoma of nodal origin. *Blood* 1996;87:3437-3441.
124. Herbst H, Sander C, Tronnier M et al. Absence of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and Epstein-Barr virus gene products in primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma and lymphomatoid papulosis. *Br J Dermatol* 1997;137:680-686.
125. Chott A, Vonderheid EC, Olbricht S, Miao NN, Balk SP, Kadin ME. The dominant T cell clone is present in multiple regressing skin lesions and associated T cell lymphomas of patients with lymphomatoid papulosis. *J Invest Dermatol* 1996;106:696-700.
126. Weiss LM, Wood GS, Trela M, Warnke RA, Sklar J. Clonal T-cell populations in lymphomatoid papulosis. Evidence of a lymphoproliferative origin for a clinically benign disease. *N Engl J Med* 1986;315:475-479.
127. Whittaker S, Smith N, Jones RR, Luzzatto L. Analysis of beta, gamma and delta T-cell receptor genes in lymphomatoid papulosis: cellular basis of two distinct histologic subsets. *J Invest Dermatol* 1991;96:786-791.
128. Steinhoff M, Hummel M, Anagnostopoulos I, et al. Single-cell analysis of CD30+ cells in lymphomatoid papulosis demonstrates a common clonal T-cell origin. *Blood* 2002;100:578-584.
129. Dürkop H, Hirsch B, Hahn C, Stein H. cIAP2 is highly expressed in Hodgkin-Reed-Sternberg cells and inhibits apoptosis by interfering with constitutively active caspase-3. *J mol med* 2006;84:132-141.
130. Levi E, Wang Z, Petrogiannis-Haliotis T, et al. Distinct effects of CD30 and Fas signaling in cutaneous anaplastic lymphomas : a possible mechanism for disease progression. *J Invest Dermatol* 2000;115:1034-1040.
131. Mir SS, Richter BW, Duckett CS. Differential effects of CD30 activation in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin disease cells. *Blood* 2000;96:4307-4312.
132. Dürkop H, Hirsch B, Hahn C, Foss HD, Stein H. Differential expression and function of A20 and TRAF1 in Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma and their induction by CD30 stimulation. *J Pathol* 2003;200:229-239.

## 7. Abkürzungen und Erläuterungen der vorstehenden Tabellen

### TRAF1-Expression:

+	Expression vorhanden (über 80% der Tumorzellen)
+/-	partielle Expression (10-80% der Tumorzellen)
-	keine Expression (<10% der Tumorzellen)

### Färbeintensität:

+++	stark
++	mittelgradig
+	schwach

AILD :	Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom
ALCL:	Anaplastisches großzelliges Lymphom
ALK - :	keine Expression des ALK-Fusionsproteins
ALK + :	Expression des ALK-Fusionsproteins
B-CLL:	Chronische lymphatische B-Zell-Leukämie
cALCL:	Primäres kutanes anaplastisches großzelliges T-Zell-Lymphom
DLBCL:	Primäres, diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
ana:	Anaplastische Variante
ib:	Immunoblastische Variante
zb:	Zentroblastische Variante
zib:	Zentro-immunoblastische Variante
HL, ns:	Hodgkin-Lymphom, nodulär sklerosierender Typ
HL,mc:	Hodgkin-Lymphom, Mischtyp
HL, lrc:	Hodgkin-Lymphom, lymphozytenreicher Typ
LPHL:	Lymphozyten-prädominantes Hodgkin-Lymphom
LyP:	Lymphomatoide Papulose
Plasmobl. Lymphom:	Plasmoblastisches Lymphom
PMBCL:	Primäres mediastinales B-Zell-Lymphom
TCRBCL:	T-Zell-reiches B-Zell-Lymphom
Vorl.-B.-ALL:	Vorläufer B-lymphoblastisches Lymphom
Vorl.-T.ALL:	Vorläufer T-lymphoblastisches Lymphom

## 8. Danksagungen:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Horst Dürkop für die freundliche Überlassung des Themas, für seine Zuwendung und für die engagierte Anleitung während der Durchführung meiner Arbeit. Ich danke ihm besonders für seine Bereitschaft, trotz eigener höchster Arbeitsbelastung für meine Belange immer ansprechbar zu sein. Seine fachliche und menschliche Kompetenz haben mich sehr beeindruckt.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. H. Stein und Herrn Prof. Dr. I. Anagnostopoulos für die freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Für die Herstellung und Austestung des verwendeten Antikörpers im Vorfeld dieser Arbeit danke ich Herrn Burkhard Hirsch, Herrn Lothar Lucka, Frau Ines Puschendorf, Frau Edda von der Wall und Herrn Florian Wagner.

Herrn Dr. K. Assaf danke ich für die gute Zusammenarbeit mit der dermatologischen Klinik der Charité im Hinblick auf die Fälle der lymphomatoiden Papulose und der primären kutanen anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphome.

Außerdem gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen des immunhistologischen Labors, insbesondere Frau Constanze Cieluch und Frau Erika Berg, für die große Hilfe, die sie bezüglich der immunhistologischen Färbungen geleistet haben

Allen Mitarbeitern des Institutes für Pathologie des Standortes Benjamin Franklin der Charité danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Zuletzt danke ich für das Verständnis und die Unterstützung meiner Familie, die mir den Raum und die Zeit ermöglicht haben, diese Arbeit durchzuführen.



## **9. Lebenslauf:**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## 10. Erklärung

„Ich, Maria Grünbaum, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „TRAF1-Expression in neoplastischen und reaktiven lymphatischen Läsionen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Einige der in der vorliegenden Dissertation präsentierten Ergebnisse wurden publiziert:

Assaf C, Hirsch B, Wagner F, Lucka L, Grünbaum M, Gellrich S, Lukowsky A, Sterry W, Stein H, Dürkop H. Differential expression of TRAF1 aids in the distinction of cutaneous CD30-positive lymphoproliferations. *J Invest Dermatol* 2007; 127:1898-1904.