

# **Biologie nodaler peripherer T-Zell-Lymphome**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Irina Bonzheim

aus Pforzheim

Würzburg, 2007

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin Müller

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Thomas Rüdiger

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Raabe

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die Wissenschaft ist ewig in ihrem Quell, unermesslich in ihrem Umfang, endlos in ihrer Aufgabe, unerreichbar in ihrem Ziel.

Karl Ernst von Baer (1792 – 1876)

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b><u>THEORETISCHER HINTERGRUND</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>T-ZELL ENTWICKLUNG</b>	<b>1</b>
1.1.1	T-ZELLEN	1
1.1.2	DER T-ZELL-REZEPTOR (TCR)	2
1.1.2.1	Die Umordnung der T-Zell-Rezeptor-Gene	2
1.1.2.2	Modelle zur Bestimmung der $\alpha/\beta$ - bzw. $\gamma/\delta$ -Linienzugehörigkeit	5
1.1.2.3	T-Zell-Rezeptor Signalübertragungswege	6
1.1.3	T-ZELL-DIFFERENZIERUNG/-AKTIVIERUNG	7
1.1.3.1	T-Zell-Reifung im Thymus	7
1.1.3.2	Antigenerkennung und Bildung von Effektorzellen	8
1.1.3.3	Funktionelle T-Zell-Populationen	10
1.1.4	DER FAS-SIGNALWEG	13
1.1.5	DER CTLA-4-SIGNALWEG	14
<b>1.2</b>	<b>PERIPHERE T-ZELL-LYMPHOME (PTCL)</b>	<b>16</b>
1.2.1	ÄTIOLOGIE	17
1.2.2	KLASSIFIKATION PERIPHERER NK/T-ZELL-LYMPHOME	18
1.2.3	WICHTIGE SUBTYPEN NODALER PTCL	22
1.2.3.1	Großzellig anaplastisches Lymphom (ALCL)	22
1.2.3.2	Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom (AILT)	23
1.2.3.3	PTCL-not otherwise specified (PTCL-NOS)	25
<b>2</b>	<b><u>MOLEKULARBIOLOGISCHE UND IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN ALCL, AILT UND PTCL-NOS – KURZDARSTELLUNG UND DISKUSSION DER PUBLIZIERTEN ERGEBNISSE</u></b>	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>IDENTIFIZIERUNG DER TUMORZELLEN IN PTCL (PUBLIKATION 1)</b>	<b>27</b>
<b>2.2</b>	<b>UNTERSUCHUNGEN ZUM TCR-REARRANGEMENT UND ZUR TCR-EXPRESSION IN ALCL (PUBLIKATION 2)</b>	<b>30</b>
<b>2.3</b>	<b>IDENTIFIZIERUNG DER KORRESPONDIERENDEN NORMALZELLE VON ALCL, AILT UND PTCL-NOS (PUBLIKATION 3)</b>	<b>35</b>
<b>2.4</b>	<b>FOXP3 EXPRESSION IN PTCL (PUBLIKATION 4)</b>	<b>39</b>

<b>2.5 MOLEKULARGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN DES FAS- UND CTLA-4-GENS IN AILT UND PTCL-NOS (PUBLIKATION 5)</b> .....	<b>41</b>
<b>3 ZUSAMMENFASSUNG/AUSBLICK</b> .....	<b>49</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>51</b>
<b>4 LITERATUR</b> .....	<b>54</b>
<b>5 ANHANG</b> .....	<b>70</b>
5.1 ABKÜRZUNGEN .....	70
5.2 LEBENSLAUF .....	73
5.3 DANKSAGUNG .....	74
5.4 ERKLÄRUNG .....	76
5.5 PUBLIKATIONEN .....	77
5.5.1 PUBLIKATION 1 .....	77
5.5.2 PUBLIKATION 2 .....	78
5.5.3 PUBLIKATION 3 .....	79
5.5.4 PUBLIKATION 4 .....	80
5.5.5 PUBLIKATION 5 .....	81

# 1 Theoretischer Hintergrund

## 1.1 T-Zell Entwicklung

### 1.1.1 T-Zellen

T-Lymphozyten (oder T-Zellen) spielen eine zentrale Rolle bei der zellulären Immunantwort. Sie erkennen Fremdanigene, die auf der Oberfläche von körpereigenen Zellen präsentiert werden und entwickeln nach Antigenkontakt verschiedene Effektorfunktionen. Man unterscheidet zwei Klassen von T-Zellen: Die sog. zytotoxischen T-Zellen eliminieren virusinfizierte Zellen und die sog. T-Helfer-Zellen aktivieren B-Zellen und Makrophagen.

T-Zellen, die im Thymus gereift sind, aber noch keinen Kontakt mit einem Antigen hatten (naive T-Zellen), wandern fortwährend vom Blut in die peripheren lymphatischen Gewebe aus um dann erneut zu rezirkulieren. Nach Erkennung eines Antigens in Form eines kleinen Peptidfragments, das an ein Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Molekül gebunden ist, verbleiben sie in den lymphatischen Geweben und proliferieren und differenzieren dort zu sog. Effektorzellen.

Die meisten T-Zellen sind  $\alpha/\beta$ -T-Zellen (siehe 1.1.2) und halten sich in sekundären lymphatischen Organen auf, wo sie eine zentrale Rolle bei der adaptiven Immunantwort spielen, während  $\gamma/\delta$ -T-Zellen, nur einen sehr viel kleineren Anteil (1-5%) der T-Zellen in peripheren lymphatischen Organen und im Blut ausmachen, jedoch bis zu 50% der intraepithelialen T-Zell-Population darstellen. Die Funktion der  $\gamma/\delta$ -T-Zellen ist noch weitgehend unklar, ihnen wird bislang eine Rolle bei der Immunregulation, speziell bei parasitären Erkrankungen, wie auch bei der Einleitung einer Immunantwort durch  $\alpha/\beta$ -T-Zellen zugesprochen<sup>1-3</sup>.

Da für die hier vorliegende Arbeit hauptsächlich  $\alpha/\beta$ -T-Zellen relevant sind, soll im Folgenden vor allem auf diese weiter eingegangen werden.

Unter den reifen  $\alpha/\beta$ -T-Zellen unterscheidet man im Wesentlichen  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen.  $CD4$  bindet auf antigenpräsentierenden Zellen an das MHC-II-Molekül, während  $CD8$  das MHC-I-Molekül erkennt. Mit Viren oder intrazellulären Bakterien infizierte Zellen präsentieren Peptide dieser Krankheitserreger, die sich im Zytosol vermehren, über ihre MHC-I-Moleküle zytotoxischen  $CD8^+$  T-Zellen, die diese Zellen

nach spezifischer Antigenerkennung eliminieren.  $CD4^+$  T-Zellen hingegen sind spezialisiert auf die Erkennung von Krankheitserregern, die sich in intrazellulären Vesikeln von Makrophagen vermehren oder aus der extrazellulären Flüssigkeit aufgenommen wurden und von den befallenen Zellen präsentiert werden. Sie können andere Effektorzellen des Immunsystems, wie B-Zellen und Makrophagen aktivieren<sup>1</sup>.

### 1.1.2 Der T-Zell-Rezeptor (TCR)

T-Zellen sind durch heterodimere membrangebundene Rezeptoren ( $\alpha/\beta$  und  $\gamma/\delta$ ) gekennzeichnet, die mit dem CD3-Komplex assoziiert exprimiert werden. Vom TCR hängen Entwicklung, Aktivierung und Lebensdauer der T-Zellen ab.

Die meisten T-Zellen besitzen einen  $\alpha/\beta$ -TCR, der aus den beiden entsprechenden Untereinheiten zusammengesetzt ist. Dieser erkennt ein Antigen nicht im nativen Zustand, sondern nur, wenn es an ein MHC-Molekül gebunden ist. Als Korezeptor zur Verstärkung der T-Zell-Antwort agiert CD4 oder CD8.

Der aus den  $\gamma/\delta$ - Untereinheiten zusammengesetzte TCR bindet andere Liganden, darunter Nichtpeptidliganden, und unterliegt wahrscheinlich auch nicht der MHC-Restriktion.

Jeder Mensch besitzt eine große Vielfalt an verschiedenen TCR, die durch Umordnung von Gensegmenten der verschiedenen TCR-Untereinheiten (TCR-Ketten) zustande kommt<sup>1</sup>, um das große Spektrum an verschiedenen Antigenen erkennen zu können.

#### 1.1.2.1 Die Umordnung der T-Zell-Rezeptor-Gene

Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des TCR bestehen aus einer variablen (V-) Region am Aminoterminus und daran anschließend einer verbindenden (J(joining)-) und einer konstanten (C-) Region. Die TCR $\beta$ -Kette enthält zusätzlich noch eine „diversity“ (D-) Region. Diese Regionen werden von Gruppen von Gensegmenten kodiert, aus denen jeweils ein Segment während der Entwicklung der T-Zelle durch somatische Rekombination ausgewählt und miteinander verknüpft wird (das sog. Rearrangement)<sup>1</sup>.

Das Gen für die TCR $\beta$ -Kette, die für die hier vorliegende Arbeit von Bedeutung ist, besteht aus 65 V-, 2 D-, 13 J- und 2 C-Segmenten. Aufgrund der Ähnlichkeit auf Nukleotidebene werden die 65 V-Segmente in 32 Subfamilien unterteilt, die zwischen



einem und 9 Mitgliedern besitzen. Von diesen sind 46 Segmente aus 25 Subfamilien funktionell, die übrigen sog. Pseudogene. Aufgrund dieser Variabilität sind die einzelnen Mitglieder der Subfamilien durchschnittlich in etwa 5% der peripheren reaktiven T-Zellen nachweisbar. (Tabelle 1, Abbildung 1)<sup>4,5</sup>.

An der Verbindungsstelle zwischen dem V- und D-, bzw. dem D- und J-Gensegment werden zudem noch Nukleotide eingefügt bzw. deletiert, was zu der eigentlichen Vielfalt der TCR führt, weshalb dieser Bereich als hypervariable Region (CDR3-Region) des TCR bezeichnet wird und das Zentrum der Antigenbindungsstelle bildet. Dieses Prinzip der Genumlagerung gilt im Wesentlichen für alle TCR-Ketten. Der TCR $\alpha$ -Locus enthält ebenfalls eine große Anzahl von V-Segmenten, jedoch viel mehr J- und keine D-Segmente (Tabelle 1). Die Kombination aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette trägt zusätzlich zu der hohen Gesamtvielfalt dieser TCR bei. Die hierdurch mögliche Anzahl verschiedener  $\alpha/\beta$ -TCR beträgt rechnerisch  $10^{18}$ <sup>1</sup>.

Element	$\alpha$	$\beta$
V-Segmente	54 (44 funktionell)	65 (46 funktionell)
D-Segmente	0	2
J-Segmente	61	13
Verbindungsstellen	1	2
Junktionale Diversität ( $\alpha/\beta$ gemeinsam)	$\sim 2 \times 10^{11}$	
Gesamtvielfalt ( $\alpha/\beta$ gemeinsam)	$\sim 10^{18}$	

Tabelle 1: Anzahl der verschiedenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -TCR-Gensegmente und die daraus entstehende TCR-Vielfalt<sup>4,6,1</sup>.

Bei der  $\beta$ -Umlagerung werden zuerst die D- mit den J-Gensegmenten und anschließend die V- mit den DJ-Gensegmenten verknüpft. Wird auf Anhieb keine funktionelle Kette gebildet, hat die Zelle die Möglichkeit zu drei weiteren Umstrukturierungen, da es zwei D-Gensegmente und zwei Sätze von J-Gensegmenten gibt. Offenbar findet bei nicht-funktioneller TCR $\beta$ -Umlagerung zuerst ein komplettes Rearrangement auf dem anderen Allel statt, bevor auf dem ersten erneut umgelagert wird<sup>7</sup>. Eine funktionelle Umlagerungen der  $\beta$ -Kette führt in den allermeisten Fällen zum sog. Allelausschluss, d.h. ein weiteres Rearrangement auf dem anderen Allel wird unterbunden, womit eine duale TCR-Expression und damit das Vorhandensein bispezifischer T-Zellen verhindert werden soll.

Eine funktionell (mit dem Leseraster kompatibel) rearrangierte  $\beta$ -Kette wird zunächst mit einer  $\alpha$ -Ersatzkette ( $pT\alpha$ ) als sog. prä-TCR an der Zelloberfläche exprimiert. Dies unterbindet weitere Umlagerungen und gibt das Signal zur Proliferation, zur Expression der Korezeptoren und schließlich zur Umordnung der  $\alpha$ -Kettengene<sup>1,3</sup>.

Aufgrund der vielen verschiedenen V- und J-Gensegmente der  $\alpha$ -Kette können hier zahlreiche aufeinander folgende Genumordnungen stattfinden, so dass nach und nach verschiedene  $\alpha$ -Ketten mit ein und derselben  $\beta$ -Kette als Partner exprimiert werden. Dabei wird überprüft, ob der jeweilige  $\alpha/\beta$ -TCR den körpereigenen MHC erkennt. Dieser Vorgang, wird so lange fortgesetzt bis entweder eine positive Selektion erreicht wird, oder die Zelle in Apoptose geht<sup>1</sup>.

Die Organisation und Umlagerung der TCR $\gamma$ - und TCR $\delta$ -Loci, auf die im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht näher eingegangen werden soll, ähnelt derjenigen der TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Loci, sie besitzen jedoch beide wesentlich weniger V-Segmente. Die Gene der  $\delta$ -Kette befinden sich innerhalb des  $\alpha$ -Locus, so dass jede  $\alpha$ -Umordnung zum Verlust des  $\delta$ -Locus auf dem entsprechenden Allel führt.

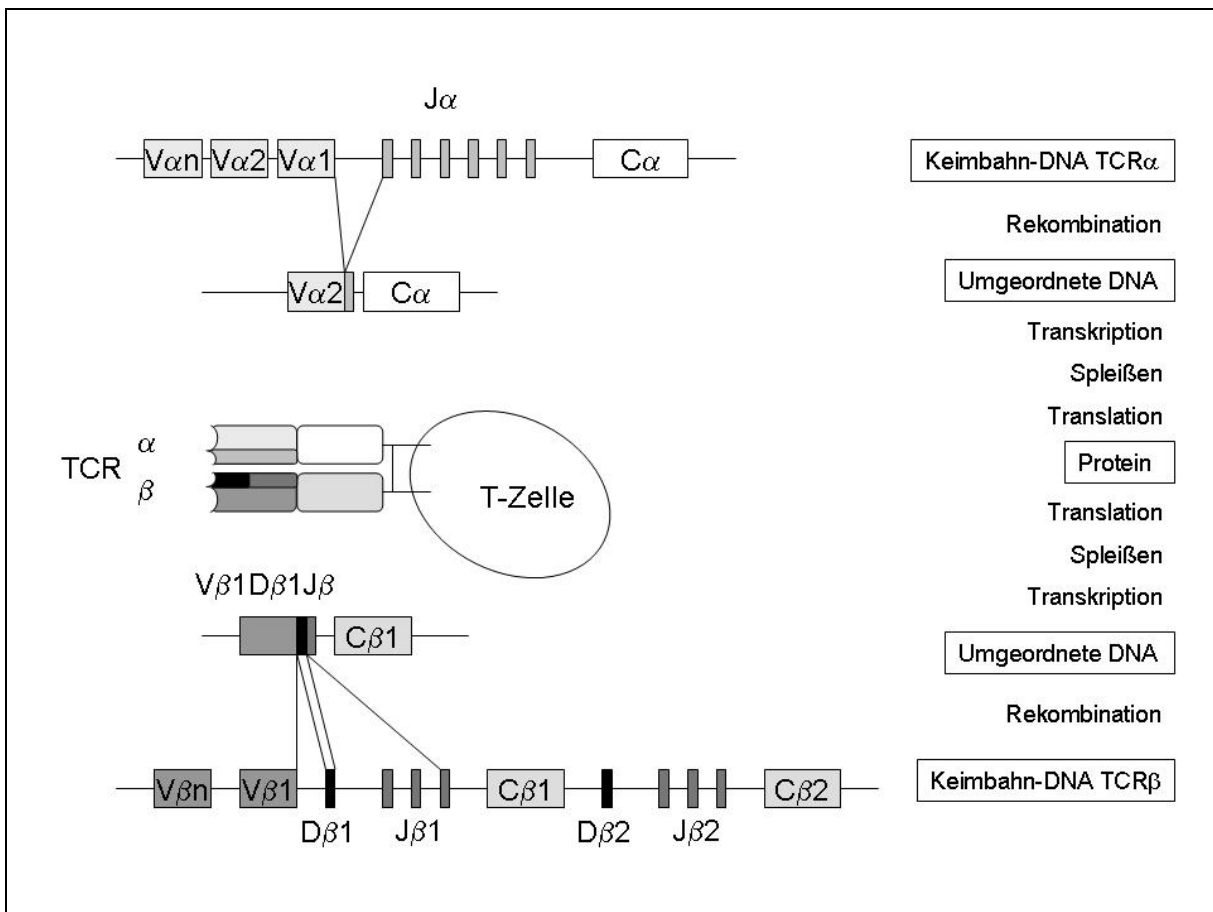


Abbildung 1: Umordnung und Expression der Gene für die TCR  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette. Überarbeitet nach Janeway et al.<sup>1</sup>

### 1.1.2.2 Modelle zur Bestimmung der $\alpha/\beta$ - bzw. $\gamma/\delta$ -Linienzugehörigkeit

Im Hinblick auf die Regulationsmechanismen, die dafür verantwortlich sind, ob sich eine T-Zelle zu einer  $\alpha/\beta$ - oder einer  $\gamma/\delta$ -T-Zelle entwickelt, gibt es verschiedene Theorien, aber noch kein allgemeingültiges Konzept<sup>1,2,8,9,3</sup>.

Derzeit werden im Wesentlichen drei Modelle, wie T-Zellen sich zu  $\alpha/\beta$ - oder  $\gamma/\delta$ -T-Zellen entwickeln, diskutiert, wobei verschiedene Untersuchungsergebnisse jeweils für, aber auch gegen die einzelnen Theorien sprechen.

Das erste Modell geht davon aus, dass ein funktionelles Rearrangement der entsprechenden Ketten bzw. die Expression des prä- $\alpha/\beta$ -TCR oder des  $\gamma/\delta$ -TCR die Linienzugehörigkeit bestimmt. Variationen dieser Theorie sind einerseits, dass die  $\beta$ -Kette erst rearrangiert wird, wenn das  $\gamma/\delta$ -Rearrangement nicht erfolgreich war, und andererseits, dass die Loci simultan rearrangiert werden, und das zuerst erfolgreiche Rearrangement die Zugehörigkeit definiert. Allerdings müssten im ersten Fall in  $\alpha/\beta$ -T-Zellen vorwiegend nicht-funktionelle  $\gamma/\delta$ -Rearrangements vorliegen und in  $\gamma/\delta$ -T-Zellen kein rearrangiertes  $\beta$ -Gen, während im zweiten Fall überwiegend nicht-funktionelle Rearrangements der irrelevanten Loci zu erwarten wären. Zu beiden Varianten passt, dass kaum funktionelle  $\gamma/\delta$ -Rearrangements in  $\alpha/\beta$ -T-Zellen gefunden wurden. Gegen diese Theorie spricht allerdings, dass abhängig von der Zellpopulation in 30-70% der  $\gamma/\delta$ -T-Zellen funktionell rearrangierte  $\beta$ -Gene und mitunter sogar intrazelluläre TCR $\beta$ -Proteine in  $\gamma/\delta$ -T-Zellen nachgewiesen werden können<sup>8,9,3</sup>.

Das zweite Modell besagt, dass die Vorläuferzellen schon vor den Rearrangements auf eine Linie festgelegt sind. Hierbei müssten funktionelle Rearrangements der anderen Linie zufällig verteilt sein, was Rearrangementanalysen jedoch nicht belegen konnten<sup>8,9,2,3</sup>.

Nach dem dritten Modell, für das insbesondere neuere Untersuchungsergebnisse sprechen, hängt die Entwicklungsrichtung von der Signalstärke des TCR ab. Starke Signale begünstigen nach dieser Theorie eine  $\gamma/\delta$ -, schwächere Signale eine  $\alpha/\beta$ -Linienzugehörigkeit<sup>3,2</sup>.

Zusammenfassend ist derzeit allgemein akzeptiert, dass die Entwicklung der  $\gamma/\delta$ -Linie ein funktionelles TCR $\gamma$ - und TCR $\delta$ -Rearrangement sowie ein TCR $\gamma/\delta$ -Signal erfordert, während die Entwicklung der  $\alpha/\beta$ -Linie eine funktionelle  $\beta$ -Umlagerung mit anschließendem prä-TCR Signal voraussetzt<sup>3</sup>.

### 1.1.2.3 T-Zell-Rezeptor Signalübertragungswege

Bindet ein Antigen, das vom TCR erkannt wird (siehe 1.1.3), an den Rezeptorkomplex, wird eine Signalkaskade aktiviert.

Signale für eine effiziente Reaktion der T-Zelle kann der TCR-Komplex nur aussenden, wenn er mit den Korezeptoren CD4 oder CD8 interagiert, die ihrerseits an MHC-II- bzw. MHC-I-Moleküle binden. Dadurch können CD4 bzw. CD8 und die Tyrosinphosphatase CD45 in räumliche Nähe zueinander gebracht und die rezeptorständigen Proteintyrosinkinasen Lck und Fyn aktiviert werden, die Tyrosinreste in den Carboxytermini des TCR- und CD3-Moleküls phosphorylieren. Die phosphorylierten Tyrosinreste dienen als Bindungsstellen für weitere Kinasen und andere Signaltransduktionsmoleküle, wie ZAP-70, LAT und SLP-76, die das Signal verstärken und weiterleiten. Dabei bindet zum Beispiel SLP-76 an die Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) sowie an GEFs und Tec-Kinasen, die dadurch aktiviert werden.

PLC- $\gamma$  spaltet ihrerseits Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>). DAG und Ca<sup>2+</sup> aktivieren die Proteinkinase C und diese wiederum den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B. IP<sub>3</sub> erhöht die Ca<sup>2+</sup> Konzentration in der Zelle und aktiviert so die Phosphatase Calcineurin, die ihrerseits den Transkriptionsfaktor NFAT aktiviert. Die aktivierten GEFs aktivieren Ras, wodurch eine MAP-Kinasen-Kaskade induziert wird, die wiederum zur Aktivierung von Fos, einem Element des Transkriptionsfaktors AP-1, führt.

Die am Ende der Signalkaskade stehenden Transkriptionsfaktoren induzieren eine spezifische Gentranskription, die letztlich zur Proliferation und Differenzierung der T-Zelle führt (Abbildung 2)<sup>1</sup>.

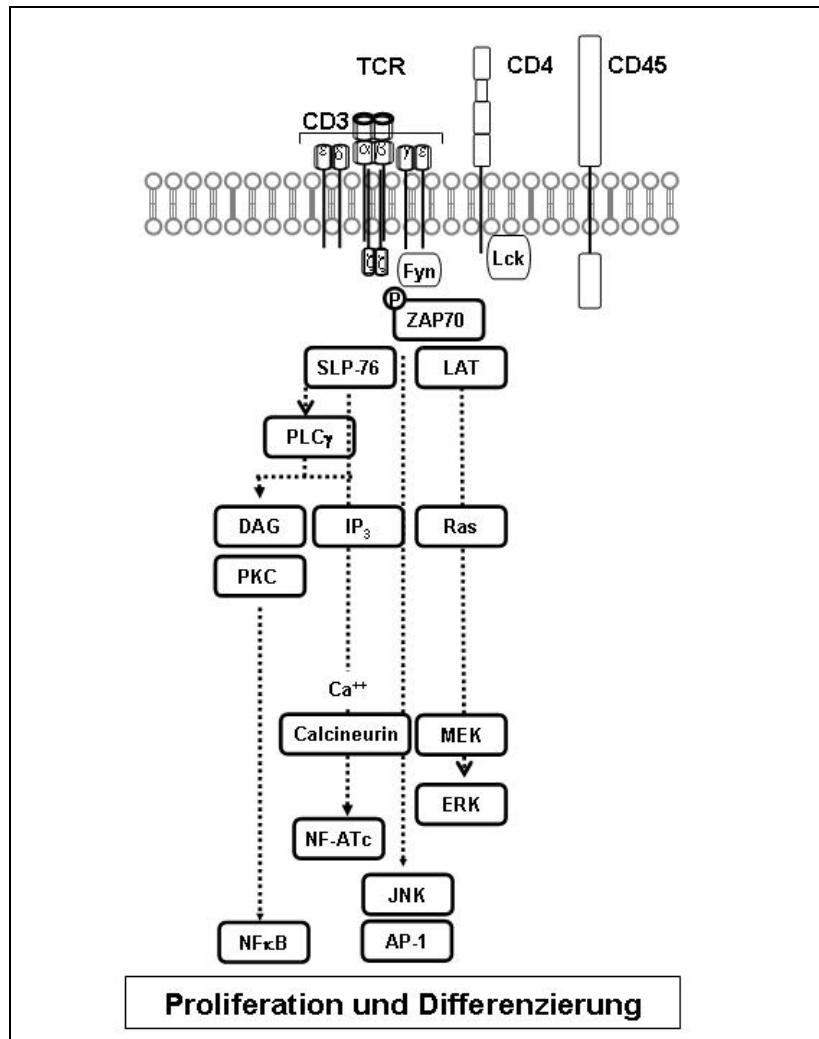


Abbildung 2: Vereinfachtes Schema der intrazellulären Signalübertragungswege, die durch Aktivierung des TCR-Komplexes induziert werden.

### 1.1.3 T-Zell-Differenzierung/-Aktivierung

#### 1.1.3.1 T-Zell-Reifung im Thymus

T-Zellen entstehen primär im Knochenmark, verlassen dieses jedoch noch als Vorläuferzellen und reifen im Thymus. Bei der Reifung der T-Zellen durchlaufen diese bestimmte Stadien, die durch das sukzessive Rearrangement und die Expression der verschiedenen TCR-Gene sowie durch ein spezifisches Expressionsmuster verschiedener anderer Oberflächenantigene (CD2, CD3, CD4, CD8, CD44, CD25 und c-Kit) gekennzeichnet sind. Bestimmte Kombinationen von Zelloberflächenmolekülen können folglich als Marker für die verschiedenen T-Zell-Entwicklungsstadien angesehen werden.

Die Vorläuferzellen im Thymus entwickeln sich durch Wechselwirkungen mit dem

Thymusstroma zu Thymozyten der T-Zelllinie. Diese Zellen exprimieren zunächst CD44 und etwas später CD25. Anschließend beginnt die Umlagerung der TCR-Gene (siehe 1.1.2.1) und CD44 bleibt schwach exprimiert, bis ein funktioneller TCR exprimiert wird. Im Fall einer  $\alpha/\beta$ -Linienzugehörigkeit der T-Zelle, die für die vorliegende Arbeit relevant ist, wird zunächst eine  $\beta$ -Kette zusammen mit einer  $\alpha$ -Ersatzkette ( $pT\alpha$ ) und CD3 an der Zelloberfläche exprimiert. Der Zusammenschluss zum CD3/Prä-TCR-Komplex führt dazu, dass die Zellen mit der Umlagerung des Gens für die  $\beta$ -Kette aufhören, in den Zellzyklus eintreten und proliferieren. Darüber hinaus kommt es zum Expressionsverlust von CD25 und c-Kit und zur Expression von CD2 sowie später von CD4 und CD8. Diese  $CD4^+CD8^+$  „doppelt“ positiven Zellen lagern das TCR $\alpha$ -Gen um und exprimieren den  $\alpha/\beta$ TCR-CD3-Komplex, woraufhin sie selektioniert werden können (siehe unten). Die Zellen verlassen letztlich als  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  Zellen den Thymus. Die Thymozyten werden dabei nach der CD4-/CD8-Expression grob in die Stadien: Doppelt negativ, doppelt positiv und einfach positiv eingeteilt.

Nach der Expression des TCR wird der Rezeptor auf seine Antigen-erkennungseigenschaften gegenüber Molekülen in seiner unmittelbaren Umgebung hin überprüft. Die Spezifität und Affinität des Rezeptors für diese Antigene entscheidet darüber, ob die Zelle überlebt und sich weiterentwickelt, oder ob sie in Apoptose geht, ohne das Reifestadium erlangt zu haben. TCR, die mit körpereigenen Antigenen nur schwach interagieren, überleben durch positive Selektion, die durch Erkennung von Selbst-MHC/Selbst-Peptidkomplexen auf Thymusepithelzellen zustande kommt und die Übermittlung eines Überlebenssignals zur Folge hat. Autoreaktive TCR hingegen, die hoch spezifisch an körpereigene Antigene binden, senden ein Signal aus, das zur Apoptose führt, entsprechend einer negativen Selektion. Die meisten T-Zellen sterben durch negative Selektion im Thymus, es verlassen nur etwa 2-4% der T-Zellen den Thymus als reife T-Zellen<sup>1</sup>.

### **1.1.3.2 Antigenerkennung und Bildung von Effektorzellen**

Positiv selektionierte T-Zellen reifen heran, verlassen den Thymus und rezirkulieren im Blut bzw. den peripheren lymphatischen Organen, wo sie auf ihr spezifisches Fremdantigen treffen und aktiviert werden können. Treffen sie dort nicht auf ihr spezifisches Antigen und werden nicht aktiviert, verlassen sie das Gewebe und werden erneut durch Lymphe und Blut transportiert. Zytokine und Chemokine steuern

die Fähigkeit der T-Zellen ihre verschiedenen Zielorte zu finden. Wenn eine naive T-Zelle ihren Peptid/MHC-Liganden erkennt, wird die Assoziation zwischen den beiden Zellen stabilisiert und die klonale Proliferation sowie die Differenzierung induziert. Die hierdurch entstehenden Tochterzellen sind „bewaffnete“ T-Effektorzellen, die schnell in Aktion treten können, wenn sie auf der Oberfläche einer anderen Zelle (Zielzelle) auf ihr spezifisches Antigen stoßen.

Das Erkennen des Peptid/MHC-Liganden durch den TCR reicht aber für die T-Zellaktivierung nicht aus, zusätzlich wird der kostimulatorische Rezeptor CD28 benötigt. Die antigenpräsentierenden Zellen sind dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen und exprimieren ihrerseits kostimulatorische Faktoren (vor allem B7.1 und B7.2) die an CD28 binden. Die naive T-Zelle wird nur dann aktiviert, wenn zur gleichen Zeit dem TCR das spezifische Antigen und CD28 ein B7 Molekül präsentiert wird. Dadurch wird die Synthese von IL-2 sowie des IL-2-Rezeptors induziert, was zu einem vollständigen Durchlaufen des Zellzyklus führt, der durch Antigenkontakt nur bis zur G<sub>1</sub>-Phase gelangt. Auf diese Weise können sich die aktivierten T-Zellen so häufig teilen, dass aus einer Zelle Tausende von Tochterzellen entstehen. Darüber hinaus fördert IL-2 auch die Differenzierung dieser Zellen zu bewaffneten T-Effektorzellen.

Die wichtigsten Aufgaben von T-Zellen sind die Elimination Virus-infizierter Zellen durch zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und die Aktivierung von Makrophagen durch T-Helfer-(T<sub>H</sub>)<sub>1</sub>-Zellen, die zusammen die zellvermittelte Immunität bilden sowie die Aktivierung von B-Zellen durch T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen. Letzteres führt dazu, dass verschiedene Antikörpertypen für die humorale Immunreaktion gebildet werden können. Naive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung entweder zu T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Zellen, die jeweils unterschiedliche Zytokine synthetisieren und sich daher in ihrer Funktion unterscheiden. Welche Entwicklungsrichtung eine T-Zelle einschlägt, hängt unter anderem davon ab, welche Zytokinexpressionsmuster durch den Erreger induziert werden, welche Kostimulatoren benutzt werden und wie der Peptid-MHC-Ligand aussieht.

Die Effektorfunktionen werden ihrerseits von dem Spektrum an Effektormolekülen, die von den T-Zellen exprimiert werden, bestimmt. Zytotoxische T-Zellen synthetisieren zytotoxische Effektormoleküle (Perforin, Granzyme, FAS-Ligand (FASL)) und Zytokine (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha/\beta$ ), während T<sub>H</sub>1- bzw. T<sub>H</sub>2-Zellen Makrophagen- bzw. B-Zell-aktivierende Effektormoleküle (GM-CSF, CD40-Ligand, IL-4, IL-5) und

andere Zytokine (IL-3, IL-10) exprimieren bzw. sezernieren.

Die wichtigsten Signale, die eine T-Zelle empfängt, und die über ihre Entwicklung, Aktivierung und Lebensdauer entscheiden, hängen von ihrem TCR ab. Diese Vorgänge werden aber auch noch durch die Aktivierung weiterer Rezeptoren beeinflusst, beispielsweise den IL-1-Rezeptor, den Toll-Rezeptor, oder andere Zytokin-Rezeptoren, die ihrerseits den JAK/STAT-Signalweg aktivieren.

Nach der Elimination des jeweiligen Erregers werden die aktivierten T-Effektorzellen nicht mehr benötigt und das Ausbleiben der Antigenstimulation führt dann letztlich zur Apoptose<sup>1</sup>.

### 1.1.3.3 Funktionelle T-Zell-Populationen

Geleitet durch lymphoide Chemokine, die ihre entsprechenden Rezeptoren auf der T-Zelloberfläche finden, zirkulieren reife naive T-Zellen kontinuierlich durch das Blut und lymphatische Organe<sup>10,11</sup>. Die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 ermöglicht den T-Zellen den Eintritt in die T-Zonen der Lymphknoten über hochendotheliale Venolen<sup>12,13</sup>. Diese und weitere, durch Antigenstimulation hervorgerufene<sup>14,15</sup> Veränderungen in der Expression bestimmter Oberflächenantigene, betreffen auch die CD45-Isoformen. Naive T-Zellen exprimieren CD45RA aber nicht CD45RO, während T-Zellen, die bereits auf ihr Antigen getroffen sind, das umgekehrte Expressionsmuster zeigen<sup>16-18</sup>. Die CD27-Expression charakterisiert weitere Untergruppen (Abbildung 3). CD27 ist in naiven T-Zellen schwach exprimiert und wird nach Antigenerkennung hochreguliert. Im Verlauf der weiteren Differenzierung geht die Expression irreversibel verloren<sup>18-21</sup>. Während späterer Differenzierungsstadien wird die CD45-Spleißvariante CD45RA in manchen Zellen, vor allem in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, erneut exprimiert, während CD45RO nicht mehr exprimiert wird<sup>20-22,14</sup>.

Der Differenzierungsprozess hängt hierbei letztlich von der Art der Stimulation ab. Wenn die T-Zelle mit einer Antigenmenge stimuliert wird, die den Schwellenwert nicht erreicht<sup>23</sup>, oder polarisierende Zytokine wie IL-4 oder IL-12 - durch die sich die T-Zelle entweder zu einer T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Zelle entwickelt - fehlen, dann proliferiert die naive T-Zelle und entwickelt sich zur zentralen Gedächtniszelle (central memory, T<sub>CM</sub>). Diese Zellen expandieren klonal und exprimieren kontinuierlich CD27 und CCR7, was dazu führt, dass sie in die T-Zonen der Lymphknoten gelangen, wo sie von weiteren professionellen antigenpräsentierenden Zellen stimuliert werden können<sup>14</sup>. Nach einer zweiten Begegnung mit dem Antigen können T<sub>CM</sub> dendritische



Zellen aktivieren, antigenspezifische B-Zellen unterstützen oder eine neue Reihe von Effektorzellen produzieren<sup>10</sup>. Diese Zellen besitzen somit die Eigenschaft sich selbst zu erneuern und zu Effektorzellen zu differenzieren<sup>14,15,24</sup>.

T-Zellen können durch entsprechende TCR Stimulation auch direkt zu Effektorzellen differenzieren, die später in Apoptose gehen oder sich zu Effektor-Gedächtniszellen ( $T_{EM}$ ) entwickeln. Effektorzellen und  $T_{EM}$  exprimieren weder CD27 noch CCR7. Aus diesem Grund zirkulieren sie nicht in die Lymphknoten zurück, sondern verlassen das Blut am Ort der Entzündung<sup>10</sup>. Effektorzellen können auf Antigene direkt reagieren, während  $T_{EM}$ , die keine unmittelbaren Effektorfunktionen besitzen, von nicht-professionellen antigenpräsentierenden Zellen aktiviert werden müssen. Diese beiden Zelltypen exprimieren eine identische Kombination von Oberflächenantigenen und unterscheiden sich nur durch diese funktionellen Charakteristika, so dass sie allein anhand ihres Phänotyps nicht voneinander unterschieden werden können. Lediglich graduelle Unterschiede der Bcl-2-Expression, die in  $T_{EM}$  zunimmt bzw. in der Expression von FAS, die in  $T_{EM}$  abnimmt, können trotzdem Hinweise auf den einen oder anderen Zelltyp geben<sup>14</sup>.

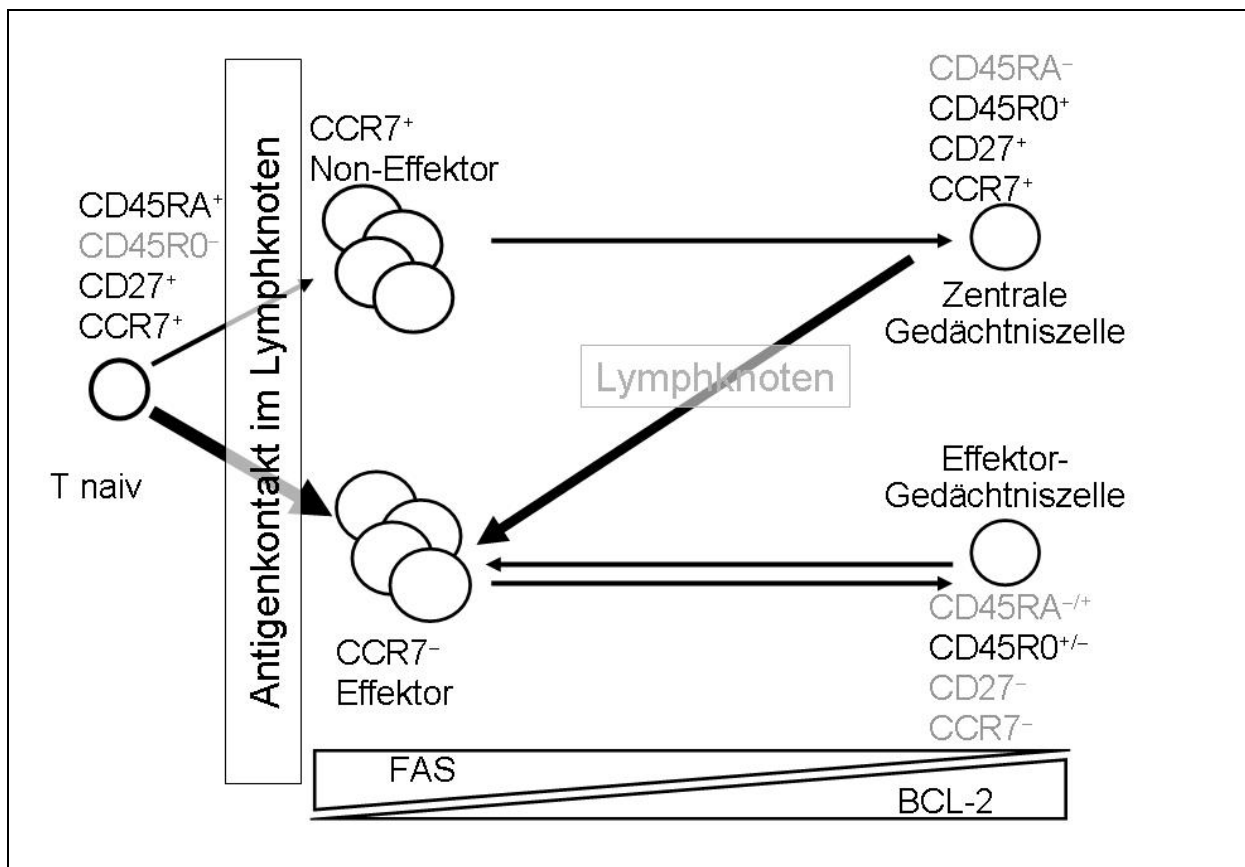


Abbildung 3: Veränderungen im Phänotyp von reifen T-Zellen nach Antigenerkennung. Überarbeitet nach Sallusto und Geginat et al.<sup>14</sup>.

Eine weitere Gruppe funktioneller T-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen (Treg) (früher Suppressor-T-Zellen). Diese können die Proliferation und Funktion autoreaktiver Zellen, wie aktivierte T- und B-Zellen und antigenpräsentierende Zellen, die die Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen/Antigenen verloren haben, unterdrücken<sup>25</sup>. Neben ihrem suppressiven Potential bei Autoimmunreaktionen, können Treg, von denen eine erhöhte Anzahl und Aktivität in verschiedenen Tumoren gefunden wurde<sup>26-30</sup>, auch an der Progression maligner Neoplasien beteiligt sein, indem sie die körpereigene Immunantwort gegenüber sog. Tumorantigenen unterdrücken<sup>31,25,32</sup>.

Treg exprimieren CD4, CD25 (IL-2R $\alpha$ ), FoxP3, CTLA4, CD62L, OX40, GITR, TGF- $\beta$ , CD95, PD-L1, HLA-DR, CD122 (IL-2R $\gamma$ ), CD45RO und einen  $\alpha/\beta$ -TCR<sup>32,33,25,34</sup>. FoxP3 ist ein Transkriptionsfaktor, der ausschließlich von Treg exprimiert wird<sup>35-37</sup>, als transkriptioneller Repressor fungiert<sup>38</sup> und dem eine Schlüsselfunktion in der Entwicklung und Funktion von Treg beigemessen wird<sup>32</sup>.

Neben natürlichen Treg existieren auch adaptive Treg, die erst nach Aktivierung suppressive Eigenschaften erlangen. Adaptive Treg entwickeln sich in der Peripherie und sind gewebe- bzw. fremdantigenspezifisch. Sie entwickeln sich durch niedrige Antigendosen, Immuntherapie oder orale Toleranz, ein Mechanismus, der verhindert, dass fremde Nahrungsproteine vom Immunsystem wie echte Pathogene behandelt werden<sup>39,33,40-45</sup>. Natürliche Treg entstehen offenbar vorwiegend im Thymus und zeigen eine Spezifität für Autoantigene, die von Thymusepithelien präsentiert werden. Beide Treg-Populationen agieren wahrscheinlich Zellkontakt- und Zytokin-abhängig, wobei als mögliche suppressive Mechanismen dieser Zellen die Herunterregulation kostimulatorischer Moleküle auf dendritischen Zellen, eine Sekretion bestimmter Zytokine (vor allem IL-10 und TGF $\beta$ ), aber auch zytolytische Mechanismen (FAS) diskutiert werden.

Als Hauptunterscheidungsmerkmal zwischen natürlichen und adaptiven Treg wird der immunologische Kontext angesehen: Es wird angenommen, dass natürliche Treg am effektivsten lokal antigenspezifisch an nicht-entzündlichen, autoreaktiven, sich selbstlimitierenden Immunreaktionen mitwirken, während adaptive Treg induziert werden, um pathologische Immunantworten zu unterdrücken und selbstzerstörerischen Entzündungsreaktionen (z.B. durch Mikroben, Transplantate, Autoimmunerkrankungen) entgegenzuwirken<sup>46-49</sup>.

### 1.1.4 Der FAS-Signalweg

Nach Beendigung der Immunantwort gehen die klonal expandierten T-Zellen in Apoptose<sup>1</sup>. Die am besten untersuchte Art der Apoptose in T-Zellen wird über den FAS-Rezeptor, der zur Familie der TNF-Rezeptoren gehört<sup>50</sup>, vermittelt. Im Verlauf einer adaptiven Immunantwort wird in den T-Zellen normalerweise sowohl die Expression von FAS als auch von seinem Liganden induziert, was autokrin oder parakrin Apoptose auslöst<sup>51</sup>.

Alle Signalübertragungswege, die den programmierten Zelltod auslösen, führen zur Aktivierung einer Reihe von Cysteinproteasen, den Caspasen<sup>1</sup>, die Peptidketten hinter Asparaginsäureresten abspalten. Durch Wechselwirkungen des monomeren FAS mit dem homotrimeren FAS-Liganden wird die Bildung von FAS-Trimeren induziert,<sup>1</sup>. Im intrazytoplasmatischen Anteil besitzt der FAS-Rezeptor die sog. „death domain“ (DD), an die dann das intrazelluläre Adaptermolekül FADD über seine DD binden kann. Die Effektor-domäne von FADD rekrutiert die Procaspase 8 und/oder die Procaspase 10. Damit ist der „death inducing signaling complex“ (DISC) entstanden. Wird genügend aktive Caspase 8 generiert, kann diese die Procaspase 3 direkt aktivieren und die Effektor-Caspase 3 entstehen lassen (Apoptosetyp I). Wird Apoptose in Lymphozyten durch Glukokortikoide, DNA-Schädigung oder intrazelluläre Signale ausgelöst, bildet sich der DISC nur eingeschränkt (Apoptosetyp II). Das schwache proapoptotische Signal kann dann über einen mitochondrialen Weg verstärkt werden. Caspase 8 spaltet das proapoptotische Molekül Bid, das daraufhin in der Mitochondrienmembran die Oligomerisation von Bax und/oder Bak induziert. Dadurch werden proapoptotische Moleküle, wie Cytochrom c, aus dem mitochondrialen Membranzwischenraum freigesetzt. Cytochrom c kann mit Apaf-1, dATP und Procaspase 9 assoziieren und ein sogenanntes Apoptosom bilden. In diesem Komplex wird die Procaspase 9 gespalten und aktiviert ihrerseits Caspase 3. Dieser Signalweg wird von pro- und antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie reguliert. Während Bcl-2 antiapoptotisch wirkt, kann das proapoptotische Molekül Bim mit Bcl-2 oder seinen Homologen interagieren und deren antiapoptotische Wirkung neutralisieren. Ein irreversibler Schritt der Apoptose ist die Aktivierung des Caspase-Substrats DFF, das als Endonuklease die DNA degradiert<sup>52-57</sup>.

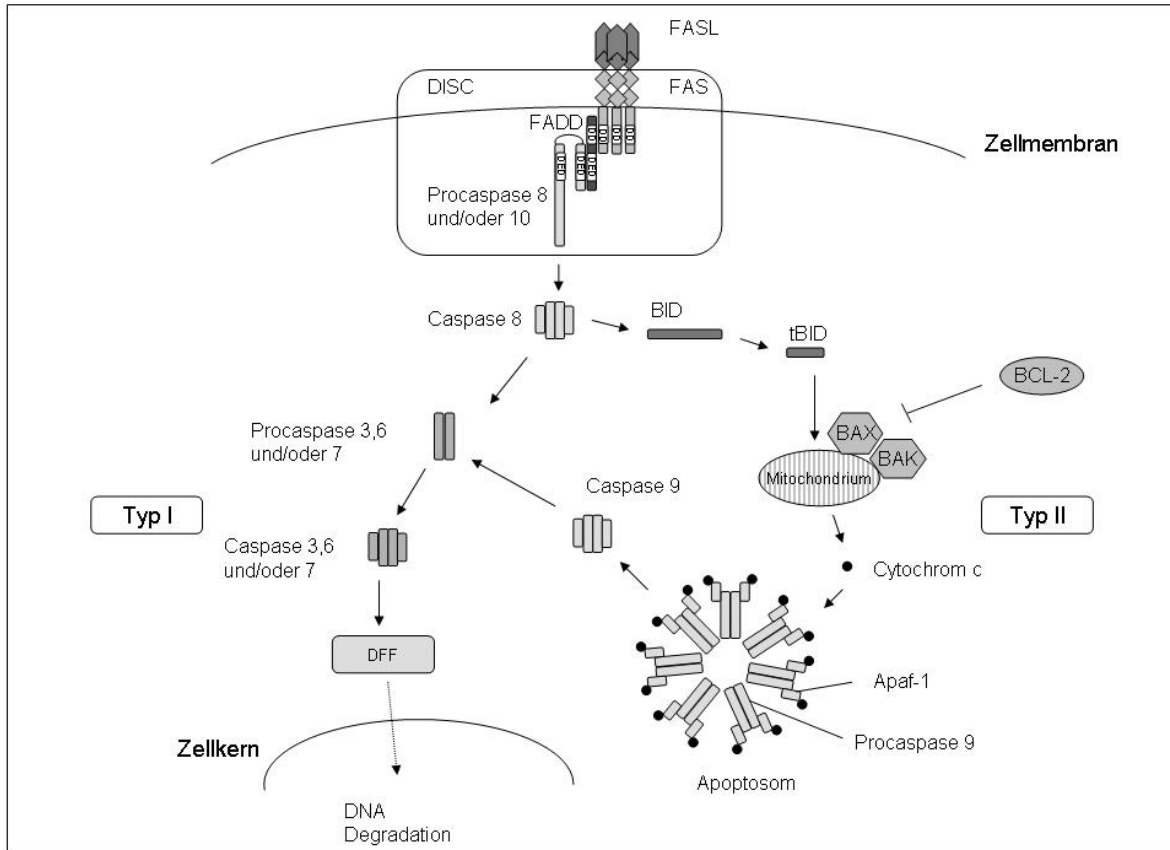


Abbildung 4: Schematische Darstellung der FAS-Signalwege. Apoptosotyp I (links) und II (rechts). Überarbeitet nach Kramer et al.<sup>58</sup>.

### 1.1.5 Der CTLA-4-Signalweg

Ein weiterer wichtiger Signalweg zur Herunterregulation der T-Zellantwort ist der CTLA-4-Signalweg. CTLA-4, ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie (CD28-Familie), deren variable, immunglobulinähnliche extrazelluläre Domänen an Liganden auf antigenpräsentierenden Zellen binden, vermittelt koinhibitorische Effekte<sup>59,60</sup>. Die Aminosäuresequenz von CTLA-4 zeigt eine etwa 30%ige Homologie zu CD28, dessen Kostimulation für die T-Zellaktivierung unerlässlich ist (siehe 1.1.3.2). CTLA-4 lässt sich in ruhenden T-Zellen nicht nachweisen und wird erst auf aktivierten T-Zellen nach Antigenkontakt proportional zur Stärke des TCR-Signals für etwa 1-2 Tage<sup>61</sup> exprimiert. Dadurch dass CTLA-4 die Liganden B7.1/B7.2 von CD28 mit sehr viel höherer Affinität bindet<sup>62,63</sup> wird eine kompetitive Hemmung der Immunantwort erreicht; ein Regulationsmechanismus, der zur peripheren Toleranz und zur Beendigung einer T-Zell-Antwort beiträgt<sup>59</sup>.

CTLA-4 ist auch für die Apoptose terminal differenzierter Lymphozyten verantwortlich, wobei die genauen molekularen Mechanismen, die zur

Apoptoseinduktion und Hemmung aktivierter T-Zellen führen, noch nicht vollständig geklärt sind. Wenn CTLA-4 nach Ligandenbindung mit dem TCR ligiert<sup>64</sup>, phosphorylieren Kinasen der Src-Familie (Lck, Fyn, Lyn) Tyrosinreste im intrazytoplasmatischen Anteil von CTLA-4. Die entstanden Phosphotyrosine rekrutieren u.a. die Phosphatasen SHP-2 und PP2A, die TCR-abhängige Signalwege inhibieren, indem sie den CD3-Komplex und MAP-Kinasen dephosphorylieren. Durch die Dissoziation von PP2A vom intrazellulären CTLA-4-Ende wird wahrscheinlich der Proteinkinase B (PKB/Akt) Signalweg inhibiert und/oder die Aktivität von Cbl-b und Rap1 gesteigert. In der Folge werden die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, AP-1 und NFAT nicht aktiviert und die Immunantwort supprimiert. Insbesondere PP2A scheint ein attraktiver Kandidat für die Transduktion der CTLA-4 vermittelten Signale zu sein, da diese Phosphatase die Aktivität der Proteinkinase B hemmen kann und damit einen gut etablierten negativen Effekt auf Differenzierung und Zellwachstum hat<sup>65,62,60,61</sup> (Abbildung 5).

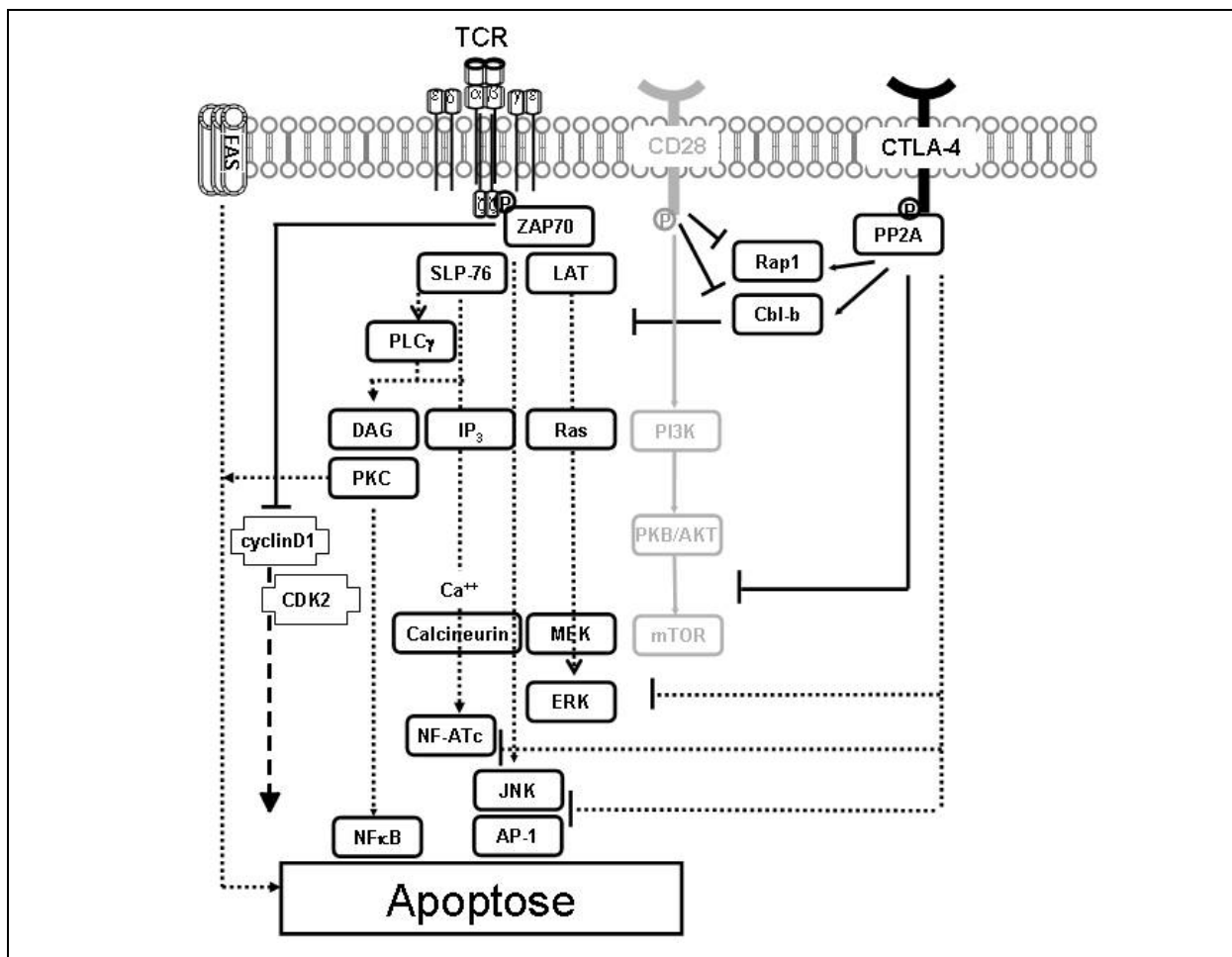


Abbildung 5: TCR-Signalwege in Kombination mit kostimulatorischen (CD28- hellgrau) und inhibitorischen (CTLA-4-) Signalwegen.

Im Tiermodell entwickeln CTLA-4-defiziente Mäuse eine bereits in den ersten 3-5 Lebenswochen zum Tode führende lymphoproliferative Erkrankung, die durch eine zunehmende Akkumulation von T-Lymphozyten in peripheren lymphatischen Organen charakterisiert ist. Diese zeigen einen Phänotyp von aktivierten T-Zellen und sind größer als die T-Zellen in Wildtyp-Mäusen. Das Verhältnis von CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist allerdings normal<sup>66,67</sup>. Interessanterweise wird dieses Krankheitsbild in CTLA-4<sup>-/-</sup> Mäusen, die kein CD4 exprimieren oder deren CD28-abhängige Kostimulation gestört ist, nicht beobachtet<sup>61</sup>.

### 1.2 Periphere T-Zell-Lymphome (PTCL)

Periphere T-Zell-Lymphome (PTCL) sind Neoplasien des lymphatischen Systems, die sich von reifen, postthymischen T-Lymphozyten ableiten. Da natürliche Killerzellen (NK-Zellen) ontogenetisch nahe mit den T-Zellen verwandt sind, werden Tumoren der NK-Zellen gemeinsam mit den T-Zell-Lymphomen klassifiziert<sup>68</sup>.

An PTCL erkranken meist ältere Patienten, Männer sind häufiger betroffen als Frauen<sup>69-71</sup>. Die einzige Ausnahme ist das ALK1<sup>+</sup> (anaplastic lymphoma kinase) großzellig anaplastische Lymphom (ALCL), das vor allem bei Kindern und jungen Erwachsenen beobachtet wird<sup>72</sup>.

Die Patienten präsentieren sich üblicherweise mit einer generalisierten Lymphadenopathie im bereits fortgeschrittenen Stadium III oder IV, das Mediastinum ist aber, im Gegensatz zu den T-lymphoblastischen Lymphomen der Vorläuferzellen, selten involviert. Bei mehr als der Hälfte der Patienten sind neben den Lymphknoten auch extranodale Lokalisationen (Knochenmark, Milz, Leber) befallen<sup>71</sup>. Ein Teil der PTCL entstehen primär außerhalb der Lymphknoten in der Haut, dem Gastrointestinaltrakt, dem Respirationstrakt, der Leber, der Milz, den Knochen oder dem Zentralnervensystem.

PTCL sind in Europa und der westlichen Welt mit einem Anteil von ungefähr 8% aller Lymphome selten<sup>71</sup>. Im Konsultations- und Referenzzentrum für Lymphknotenpathologie des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg wurden zwischen 1986 und 2001 2753 der insgesamt 23881 untersuchten Lymphome (11,5%) als PTCL diagnostiziert. Hiervon waren 36% periphere T-Zell-Lymphome, nicht weiter spezifiziert (PTCL-NOS), 27% angioimmunoblastische T-Zell-Lymphome (AILT) und 10% ALCL.

### 1.2.1 Ätiologie

Die Ätiologie der PTCL ist in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle noch ungeklärt. Bei etwa 15% der Patienten mit PTCL sind jedoch anamnestisch Erkrankungen des Immunsystems oder lymphoproliferative Erkrankungen bekannt. Beispielsweise liegt einem Teil der Enteropathie-assoziierten T-Zell-Lymphome eine glutensensitive Zöliakie, bei der es sich um eine Autoimmunerkrankung handelt, als auslösender Faktor zugrunde<sup>73,74</sup>. Auch bei immunsupprimierten Patienten, beispielsweise nach Organtransplantationen, werden gehäuft T-Zell-Lymphoproliferationen beobachtet (Übersicht in<sup>75</sup>).

Auch bestimmte Viren können in der Pathogenese von T-Zell-Lymphomen eine große Rolle spielen. So ist zum Beispiel das adulte T-Zell-Lymphom/Leukämie (ATLL) mit dem humanen T-lymphotropen Virus 1 (HTLV-1) assoziiert. Insbesondere in bestimmten Regionen Südjapans und in der karibischen Bevölkerung afrikanischer Abstammung ist ein großer Teil der Einwohner mit HTLV-1 infiziert. In den japanischen Endemiegebieten haben 8-10% der Bevölkerung Antikörper gegen HTLV-1, wobei das Risiko seropositiver Patienten, an einem HTLV-1-assoziierten ATLL zu erkranken, für Männer bei 7% und für Frauen bei 3% liegt<sup>76</sup>.

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) kann in fast 100% der insbesondere in Asien und Mittel- bzw. Südamerika häufigen nasalen T/NK-Zell-Lymphome nachgewiesen werden, wenngleich seine genaue Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankungen noch nicht verstanden ist.<sup>77-81</sup>. Auch nodale PTCL sind in Südostasien häufiger EBV-assoziiert, als in Europa. Während in einer Serie von 205 nodalen PTCL unseres eigenen Materials lediglich zwei (1%) EBV-assoziiert waren, findet sich in einer jüngeren japanischen Studie unter 136 nodalen T-Zell-Lymphomen in 16% eine EBV-Assoziation<sup>82</sup>.

Genetische Aberrationen sind in zahlreichen PTCL zu finden. PTCL-NOS und ALK<sup>+</sup> ALCL unterscheiden sich zwar hinsichtlich ihrer genetischen Aberrationen vom Enteropathie-Typ des T-Zell-Lymphoms, von der T-Zell prolymphozytischen Leukämie und vom ATLL, zeigen jedoch untereinander neben gemeinsamen auch differente Aberrationen. Auch zwischen AILT und PTCL-NOS konnten unterschiedliche genetische Aberrationen gefunden werden, während sich unter den PTCL-NOS eine Gruppe abzeichnet, die rekurrente chromosomale Verluste von 5q, 12q und 10q aufweist<sup>83-86</sup>. Für hepatosplenische  $\gamma/\delta$ -Lymphome ist ein Isochromosom 7q als primäre genetische Aberration typisch<sup>87</sup>.

Eine Analogie zu den B-Zell-Lymphomen, in denen die Immunglobulinleicht- oder Schwereketten Gene häufig Partner von Translokationen und einer konsekutiven molekularen Dysregulation bestimmter Proteine sind, findet sich für die TCR-Gene nicht. Die chromosomalen Loci des TCR $\alpha/\delta$ -Gens (14q11), des TCR $\beta$ -Gens (7q34~q36) und des TCR $\gamma$ -Gens (7q15) sind nur selten Partner chromosomaler Translokationen in PTCL<sup>88,89</sup>. In lymphoblastischen Lymphomen der Vorläuferreihe sind die TCR-Gene hingegen in 30% der Fälle an chromosomalen Translokationen beteiligt<sup>90</sup>.

Eine typische genetische Alteration in ALCL ist das Rearrangement t(2;5)(p23;q35), das zu einer Überexpression der ALK-Kinase führt (siehe Abschnitt 1.2.3.1).

### 1.2.2 Klassifikation peripherer NK/T-Zell-Lymphome

In der Vergangenheit wurden verschiedene Klassifikationen<sup>91-95,68</sup> für maligne Lymphome vorgeschlagen, die das zum jeweiligen Zeitpunkt verfügbare Wissen systematisch zusammengefasst haben. Die Prinzipien, nach denen klassifiziert wurde, waren dabei durchaus unterschiedlich und änderten sich im Laufe der Zeit. Idealerweise sind die Kategorien einer Klassifikation biologisch „richtig“, in der Praxis unterscheidbar (also diagnostizierbar) und therapeutisch/prognostisch relevant.

Nach der Entdeckung der Dichotomie des Immunsystems und der Unterscheidung von T- und B-Zellen empfahl zuerst Cooper 1966, auch die Klassifikation maligner Lymphome an dieser Unterscheidung zu orientieren<sup>96</sup>. Bis sich diese biologische Einteilung durchsetzte, vergingen jedoch noch mehrere Jahre.

Die in Europa gebräuchliche KIEL-Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) klassifizierte in ihrer ursprünglichen Form von 1974 die NHL ausschließlich anhand morphologischer Kriterien. Innerhalb der so definierten Kategorien wurde dann die Abstammung von T- und B-Lymphozyten, soweit das damals möglich war, berücksichtigt<sup>91,97</sup>.

Erst als die KIEL-Klassifikation 1988 überarbeitet wurde, wurde die konsequente Trennung der T- und B-Zell-Lymphome als ein grundlegendes Prinzip der Klassifikation eingeführt<sup>94,98</sup>. Dieser Ansatz war vorher auch durch Lukes und Collins<sup>99,100</sup> vertreten worden. Damit orientierte sich die Lymphom-Klassifikation an den biologischen Verhältnissen reaktiver Lymphozyten. Lymphome wurden anhand der postulierten korrespondierenden Normalzelle klassifiziert und benannt, und B- und T-Zell-Lymphome wurden einander hypothetisch gegenübergestellt. Von den



Autoren selbst wurde jedoch die Klassifikation insbesondere für die T-Zell-Lymphome als präliminar angesehen<sup>98</sup>, da keine ausreichenden Kenntnisse der postthymischen T-Zell-Entwicklung vorhanden waren. Die relevanten Lymphozytenpopulationen wurden erst in jüngerer Zeit durch Antikörper gegen Differenzierungsmoleküle immunhistochemisch unterscheidbar.

Einige grundlegende Konzepte der KIEL-Klassifikation waren anhand der häufigeren B-Zell-Lymphome erarbeitet worden und ließen sich nicht ohne weiteres auf die T-Zell-Lymphome übertragen. Insbesondere war die klinische Gruppierung in niedrig- und hochmaligne Lymphome für die T-Zell-Lymphome umstritten. Anteile mit „Zyten“ und „Blasten“, also mit morphologisch niedrig- und hochmalignen Anteilen, können in PTCL auch simultan vorkommen. Ferner wurde die bei B-Zell-Lymphomen beobachtete Progression eines „zytischen“ (niedrigmalignen) Tumors in einen „blastischen“ (hochmalignen) Tumor nicht gefunden, vielmehr sind PTCL durch eine starke Variabilität ihrer Morphologie und auch ihres Immunphänotyps charakterisiert<sup>98</sup>. Während die klinische Gruppierung in niedrig- und hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) für die B-Zell-Lymphome eine große klinisch-therapeutische Relevanz hatte und bis heute die Struktur klinischer Studien in Deutschland beherrscht, war das für PTCL nicht der Fall. Darüber hinaus war die KIEL-Klassifikation anhand nodaler Lymphome erarbeitet worden, so dass extranodale Lymphome nur analog klassifiziert werden konnten, was die Erkennung ihrer Besonderheiten erschwerte.

Die in den achtziger und frühen neunziger Jahren in Nordamerika vorherrschend verwendete Lymphomklassifikation, die „Working Formulation for Clinical Usage“<sup>93</sup>, basierte konzeptionell darauf, das Wachstumsmuster und die Zytologie der Lymphominfiltrate am HE-Schnitt retrospektiv mit dem klinischen Verlauf zu korrelieren. Inzwischen haben sich aber die Therapiemodalitäten für Lymphome geändert, so dass diese Kategorien nicht mehr prognostisch relevant sind. Da in dieser Klassifikation der Immunphänotyp der Tumorzellen keine Rolle spielte, waren T-Zell-Lymphome keiner eigenständigen Kategorie zuzuordnen. Die diagnostische Reproduzierbarkeit und die therapeutische Relevanz für diese Lymphome war deshalb gering<sup>71</sup>, so dass dieses Konzept inzwischen verlassen wurde.

Die derzeit gültige „World Health Organisation“ (WHO) -Klassifikation maligner Lymphome (Tabelle 2) aus dem Jahr 2001<sup>68</sup> basiert auf einem Vorschlag einer internationalen Gruppe von Hämatopathologen, der „Revised European-American

Lymphoma“ (REAL) -Klassifikation<sup>95</sup>. Sie lehnt sich konzeptionell stark an die Kiel-Klassifikation an, da eine Klassifikation der malignen Lymphome anhand der korrespondierenden Normalzelle angestrebt wird, allerdings werden jetzt neben den Neoplasien der Lymphknoten auch extranodale Lymphome mit aufgelistet.

Die REAL- und WHO-Klassifikation vertreten das Konzept, unterscheidbare Entitäten zu definieren. Die einzelnen Entitäten sind durch ihre morphologischen, immunphänotypischen, genetischen und klinischen Eigenschaften charakterisiert. Zusätzlich zur Morphologie werden also auch die klinische Präsentation und moderne Untersuchungsmethoden wie die Immunhistochemie und molekulare Genetik in die Krankheitsdefinitionen integriert<sup>101,102,68</sup>. Entitäten haben damit auch therapeutische und prognostische Implikationen.

Innerhalb dieser Entitäten werden morphologische Varianten, klinische Subtypen und verschiedene prognostische Faktoren beschrieben<sup>101,102</sup>.

Die Klassifikation der PTCL gestaltet sich aber auch in der WHO-Klassifikation bis heute schwierig, da Funktion und Entwicklungsstadien der postthymischen T-Lymphozyten im Lymphknoten nur unzureichend zur Morphologie korreliert werden können. Funktio-morphologische Einheiten, ähnlich den Follikeln des B-Zell-Systems, bei denen die einzelnen Entwicklungsstadien der B-Zellen in ihrer Morphologie und Lokalisation gut definiert sind, sind für die T-Zellen nicht bekannt<sup>103</sup>.

So dominiert für die Klassifikation der PTCL die klinische Präsentation, da andere Parameter häufig unspezifisch sind und insbesondere Morphologie und Immunphänotyp allein keine klinisch relevanten Gruppen definieren<sup>104,68</sup>. Anhand der primären klinischen Präsentation kann man innerhalb der T-Zell-Lymphome drei Gruppen unterscheiden (Tabelle 2), nämlich solche mit dominant nodaler, extranodaler oder leukämischer Präsentation<sup>101,105,104,102</sup>.

<p><b>Prädominant nodal</b></p> <p>PTCL-NOS</p> <p>AILT</p> <p>ALCL</p>
<p><b>Prädominant extranodal</b></p> <p>Extranodales NK/T-Zell-Lymphom, nasaler Typ</p> <p>Enteropathie-Typ des T-Zell-Lymphoms (± Enteropathie)</p> <p>Hepatosplenisches T-Zell-Lymphom</p> <p>Subkutanes Panniculitis-ähnliches T-Zell-Lymphom</p> <p>Mycosis fungoides</p> <p>Primäre kutane CD-30<sup>+</sup> T-Zell Lymphoproliferationen</p>
<p><b>Prädominant leukämisch, disseminiert</b></p> <p>T-Zell Prolymphozytische Leukämie</p> <p>T-Zell granuläre lymphozytische Leukämie</p> <p>Aggressive NK-Zell Leukämie</p> <p>Sézary Syndrom</p> <p>Adulte T-Zell-Lymphom/Leukämie (HTLV-1<sup>+</sup>)</p>

Tabelle 2: WHO-Klassifikation der PTCL, mit Unterteilung nach der dominanten klinischen Präsentation.

Die REAL- und WHO-Klassifikation verzichten auf zahlreiche morphologisch definierte Kategorien der Kiel-Klassifikation, da sich diese als mangelhaft reproduzierbar<sup>106,95</sup> und klinisch nicht relevant<sup>70,107</sup> herausgestellt hatten. Stattdessen wurde eine „Entität“ der sogenannten nicht weiter spezifizierten PTCL (PTCL-NOS) eingeführt, die als „Sammeltopf“ alle nicht besser definierten PTCL umfasst. Sie korrespondiert zu zahlreichen eigenständigen Kategorien der Kiel-Klassifikation, wie dem kleinzelligen, gemischten klein- und großzelligen und großzelligen T-Zell-Lymphomen, dem T-Zonen-Lymphom und dem lymphoepithelioiden (Lennert) Lymphom. Diese Kategorien werden als morphologische Varianten weitergeführt. Zusammen stellen sie die größte Gruppe in unserem Material dar. Weitere häufige Entitäten sind das AILT und das ALCL.

## 1.2.3 Wichtige Subtypen nodaler PTCL

### 1.2.3.1 Großzellig anaplastisches Lymphom (ALCL)

ALCL wurden erstmals 1985 als distinkte Entität der PTCL, die CD30 exprimiert, beschrieben<sup>108</sup>. Die WHO-Klassifikation der malignen Lymphome<sup>68</sup> unterscheidet systemische und primär kutane Formen, wobei die systemischen 26% aller PTCL ausmachen<sup>109</sup>. Morphologisch ähneln die großen polymorphen Tumorzellen den sog. Reed-Sternberg-Zellen in Hodgkin-Lymphomen und ihr Wachstumsmuster unterscheidet sich von dem der meisten anderen PTCL (Abbildung 6). ALCL werden aufgrund eines TCR-Rearrangements in den Tumorzellen als T-Zell-Lymphome definiert<sup>110</sup>.

Inzwischen unterscheidet man ALCL mit einer Überexpression der ALK-Tyrosinkinase von Tumoren, die dieses Molekül nicht exprimieren. Diese Überexpression entsteht in den meisten Fällen durch die Translokation t(2;5)(p23;q35), bei der das konstitutiv exprimierte Nucleophosmin-Gen mit dem ALK-Kinase-Gen fusioniert<sup>111</sup>. Das entstehende Fusionsprotein führt zu einer unregulierten Überexpression der ALK-Kinase, einer Tyrosinkinase der Insulinrezeptor-Superfamilie<sup>112-114</sup>. In einem kleineren Teil der Fälle können auch andere Translokationspartner für das ALK-Kinase-Gen nachgewiesen werden (Übersicht in<sup>115</sup>), eine Überexpression führt jedoch unabhängig von der zugrunde liegenden Aberration zum gleichen Tumor und ist in etwa 50% der ALCL nachweisbar<sup>116,114</sup>. Die pathologische Expression der ALK-Kinase kann auch an Paraffinmaterial immunhistochemisch mit dem Antikörper ALK1, der gegen die ALK-Kinase Domäne der Fusionsproteine gerichtet ist, detektiert werden.

ALK1<sup>+</sup> ALCL unterscheiden sich von den ALK1<sup>-</sup>, morphologisch identischen Tumoren: ALK1<sup>+</sup> ALCL treten überwiegend bei Kindern auf und haben im Gegensatz zu anderen systemischen T-Zell-Lymphomen bei aggressiver Chemotherapie eine extrem gute Prognose mit einem 5-Jahres-Überleben von etwa 80%. Demgegenüber treten ALK1<sup>-</sup> ALCL überwiegend bei älteren Patienten auf und haben eine ähnlich schlechte Prognose wie andere PTCL<sup>116-118</sup>.

Die wissenschaftlichen Ansätze vieler Arbeitsgruppen konzentrieren sich in den letzten Jahren auf die molekularen Mechanismen der ALK-Überexpression und ihre biologischen Konsequenzen, während in ALK<sup>-</sup> Fällen der exakte Transformationsmechanismus noch unbekannt ist<sup>119</sup>. Somit fehlt ein einheitliches Konzept für ALK<sup>+</sup> und ALK<sup>-</sup> ALCL.

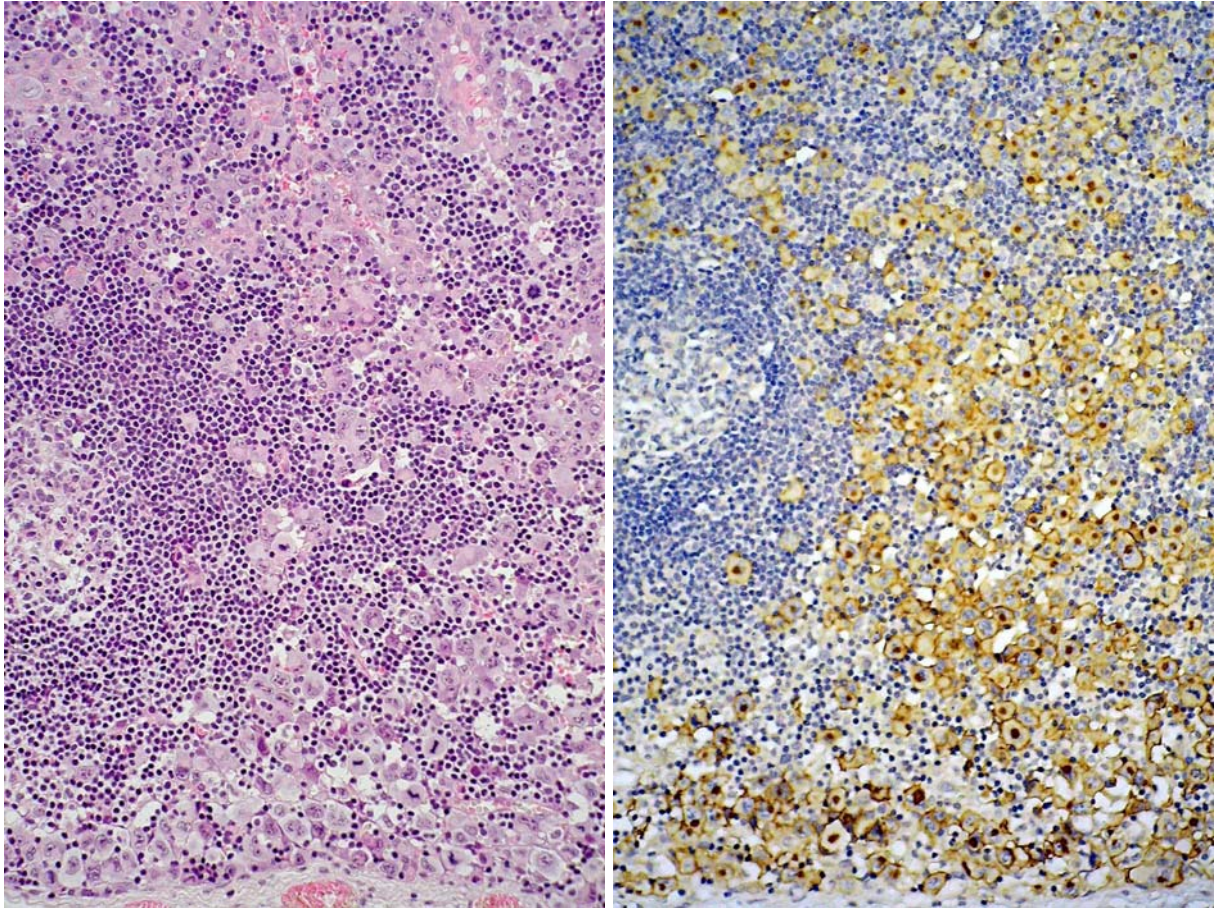


Abbildung 6: Typisches histologisches Bild eines nodalen ALCL (HE, links) mit Expression von CD30 in den Tumorzellen (CD30, rechts).

### 1.2.3.2 Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom (AILT)

Eine neben dem ALCL ebenfalls gut definierte Entität der nodalen PTCL ist das AILT. Dieses Lymphom wurde ursprünglich als angioimmunoblastische Lymphadenopathie mit Dysproteinämie (AILD) beschrieben<sup>120-124</sup> und zeichnet sich klinisch durch eine generalisierte Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie, Fieber, Hautausschläge, Anämie und immunologische Abnormalitäten aus<sup>121</sup>. Histologisch ist die normale Lymphknotenarchitektur durch ein diffuses Infiltrat aus kleinen, mittelgroßen und großen atypischen Lymphozyten, Plasmazellen, eosinophilen Granulozyten und Histiozyten aufgehoben. Zusätzlich findet sich eine ausgeprägte Proliferation von hochendothelialen Venolen (Abbildung 7). Diagnostisch ist insbesondere die Proliferation von Netzwerken follikulärer dendritischer Zellen bedeutsam, die die AILT von den PTCL-NOS unterscheidet<sup>120,121</sup> (siehe Abbildung 7).

Lange Zeit gab es eine Kontroverse, ob die Erkrankung als Lymphom<sup>123,125,126,124</sup> oder pathologische Immunreaktion<sup>121,122</sup> anzusehen ist, da die Patienten meist an

schweren Infektionen und nicht am Lymphom selbst versterben<sup>121,122,127</sup>. In den achtziger Jahren wurden jedoch chromosomale Aberrationen<sup>127-129</sup> und klonal rearrangierte TCR-Gene nachgewiesen<sup>130-136</sup>, so dass die Erkrankung als „T-Zell-Lymphom vom AILD-Typ“ in die Kiel-Klassifikation<sup>94</sup> und als AILT in spätere Klassifikationen<sup>95,68</sup> aufgenommen wurde (siehe 1.2.2).

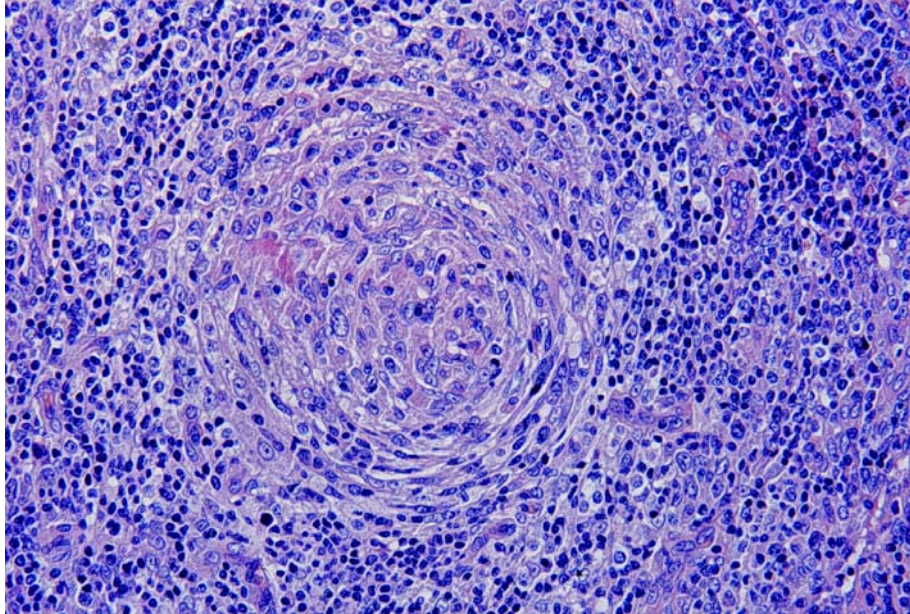


Abbildung 7: AILT (HE) mit prominenter „ballen-artiger“ Proliferation der folliculären dendritischen Zellen im Zentrum des Bildes.

Immunhistochemische Untersuchungen dieser Lymphome gestalteten sich jedoch schwierig, da neben den Tumorzellen auch zahlreiche reaktive T-Zellen im Infiltrat enthalten sind, und sich die ohnehin meist subtilen zytologischen Atypien speziell an Gefriermaterial kaum dem immunhistochemischen Signal zuordnen lassen<sup>70,137-143</sup>. Deshalb verwundert es nicht, dass unterschiedliche Phänotypen der Tumorzellen beschrieben wurden, wobei in der Mehrzahl der Untersuchungen, die Tumorzellen als CD4<sup>+</sup> und nur sehr selten als CD8<sup>+</sup> angesehen wurden<sup>144,145,134,146,135,147,70,148,137-139,149,140-143,136</sup>.

Weitere Untersuchungen zur Phänotypisierung des AILT basieren auf Arbeiten von Peter Isaacson und Ahmed Dogan<sup>150</sup>, die in 19 von 20 Fällen eine Expression von CD10 in den Tumorzellen beobachtet haben. CD10 ist ein Molekül, das üblicherweise in unreifen T- und B-Lymphozyten, in folliculären B-Zellen, aber auch in T-Zellen in frühen Stadien der Apoptose nachgewiesen wurde. CD10 hat eine Endopeptidaseaktivität, für die verschiedene Funktionen diskutiert werden: CD10 könnte einerseits Proteine mit proinflammatorischer Aktivität spalten, die von

apoptotischen Zellen freigesetzt werden und so vor einer Entzündungsreaktion schützen. Andererseits könnte CD10 aber auch proapoptotisch wirken, indem es Zytokine degradiert, die einen Apoptose-protectiven Effekt haben<sup>151,152</sup>.

### **1.2.3.3 PTCL-not otherwise specified (PTCL-NOS)**

Die verschiedenen Erkrankungen, die in der Gruppe der PTCL-NOS zusammengefasst sind, haben ein sehr unterschiedliches morphologisches Bild<sup>95</sup>. Die Tumorzellen weisen irreguläre, pleomorphe Zellkerne auf, die auch innerhalb desselben Tumors variabel geformt sind und embryonenartig gefaltet sein können. Manchmal sind die zytologischen Atypien jedoch so gering, dass die Tumorzellen von aktivierten T-Lymphozyten kaum oder gar nicht unterschieden werden können<sup>98</sup>. Als recht spezifisches Merkmal kommen in PTCL häufig Zellen mit klarem Zytoplasma vor, das sich in der PAS-Reaktion nicht anfärbt. Diese sog. Klarzellen lassen bereits morphologisch an ein PTCL denken. Das inflammatorische Begleitinfiltrat ist variabel, es enthält aktivierte Venolen, eosinophile Granulozyten und Histiozyten, aber auch zahlreiche kleine und aktivierte T-Zellen<sup>153,95,154,155</sup>.

Da die PTCL-NOS mit 36% aller T- und NK-Zell-Lymphome die größte Gruppe darstellen, wäre eine Subklassifizierung wünschenswert. An Versuchen dazu hat es nicht gemangelt. Wie oben ausgeführt (siehe 1.2.2), wurden in der Kiel-Klassifikation<sup>156,94</sup> zahlreiche Entitäten unterschieden, die nach der Zellgröße (kleinzellige, mittelgroßzellige und großzellige pleomorphe T-Zell-Lymphome), nach dem Infiltrationsmuster (T-Zonen-Lymphom) oder nach einem prominenten Hintergrundinfiltrat (lymphoepithelioides (Lennert-) Lymphom) bezeichnet wurden. Auch wenn diese Kategorien weder ausreichend reproduzierbar, noch klinisch relevant sind, um als diagnostizierbare Krankheitsentitäten in der WHO-Klassifikation aufgelistet zu sein, handelt es sich doch um morphologische Spielarten innerhalb der PTCL-NOS. Diese Varianten sind u.a. wichtig, um die verschiedenen histologischen Erscheinungsformen der entsprechenden Entität zuordnen zu können.

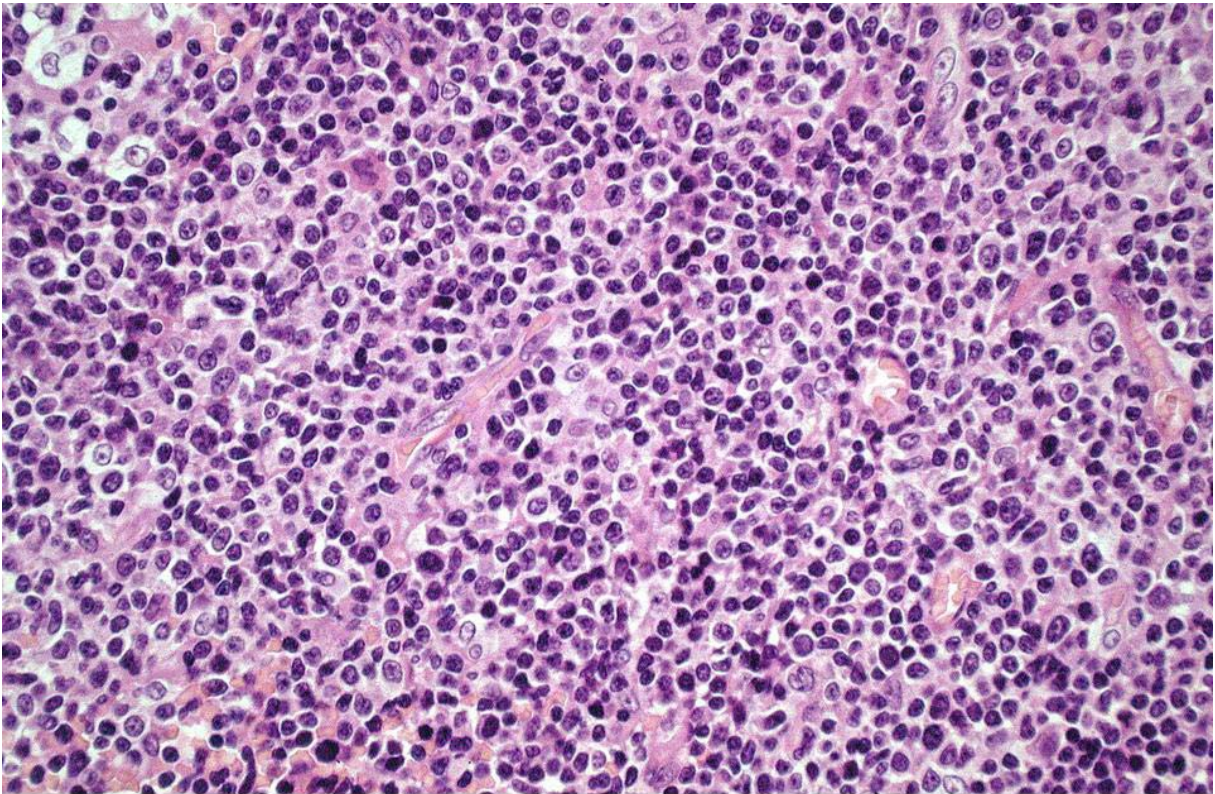


Abbildung 8: Typische Morphologie eines PTCL-NOS (HE) mit einem gemischten Infiltrat von Tumorzellen, die zum Teil ein typisches klares Zytoplasma aufweisen, und relativ wenigen reaktiven Zellen.



## **2 Molekularbiologische und immunhistologische Untersuchungen an ALCL, AILT und PTCL-NOS – Kurzdarstellung und Diskussion der publizierten Ergebnisse**

### **2.1 Identifizierung der Tumorzellen in PTCL (Publikation 1)**

PTCL wurden immunhistochemisch meist hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zur CD4- bzw. CD8-Subpopulation und hinsichtlich zytotoxischer Eigenschaften untersucht. Die publizierten Serien, die inzwischen mehr als 600 PTCL umfassen, zeigen eine heterogene Datenlage<sup>157,70,158-160,140,161,162</sup>. Um die Einteilung in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Tumoren vornehmen zu können, wurden die beiden Populationen häufig quantitativ miteinander verglichen und die dominierende Population als neoplastisch angesehen<sup>163,70</sup>. Allerdings war in mehreren Serien das Verhältnis zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen ausgeglichen<sup>164</sup>, so dass sich in einer Serie von 174 PTCL in 36% der Fälle die Linienzugehörigkeit des Tumors nicht definieren ließ<sup>160</sup>. In einer durchflusszytometrischen Untersuchung konnte in sechs von 31 PTCL keine Prädominanz eines Subtyps festgestellt werden<sup>165</sup>.

Bereits in den späten 80er und frühen 90er Jahren wurden an Gefriermaterial immunhistochemische Doppelfärbungen durchgeführt, um die Proliferationsfraktionen der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Populationen zu bestimmen. Hintergrund dieser Untersuchungen war die Annahme, dass die neoplastische T-Zell-Population eine höhere Proliferation aufweisen sollte<sup>166,137,138</sup>. Diese Studien, bei denen für die Mehrzahl der PTCL ein CD4<sup>+</sup> Phänotyp ermittelt wurde, waren allerdings dadurch erschwert, dass man bei der bekanntermaßen schlechten morphologischen Auflösung am Gefriermaterial, das immunhistochemische Signal häufig nicht eindeutig einzelnen Zellen zuordnen konnte<sup>167</sup>.

Auch hinsichtlich der Expression zytotoxischer Proteine (TIA-1, Granzym B oder Perforin) in bestimmten T-Zell-Lymphom-Entitäten kommen die verschiedenen Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen<sup>110,168</sup>

Die unterschiedlichen Ergebnisse sind im Wesentlichen darauf zurückzuführen, dass reaktive und neoplastische T-Zellen morphologisch schwer voneinander zu unterscheiden sind<sup>153,95,154,155,169</sup>, zumal leichte zytologische Atypien auch in

reaktiven T-Lymphozyten beobachtet werden können<sup>170</sup>.

Untersuchungen an AILT verdeutlichen die Problematik des Tumordinfiltrats: Klonalitätsanalysen, basierend auf einer PCR-Amplifikation der TCR $\gamma$ -Kette, ergaben ein monoklonales Amplifikat in 69% der Fälle, wobei der quantitative Anteil dieses Amplifikates an allen PCR-Produkten derselben Multiplex-PCR zwischen 11% und 78% lag. Obwohl diese Untersuchungen nicht mit einer streng quantitativen Methode durchgeführt wurden, geben sie einen Hinweis darauf, dass in relativ vielen AILT nur ein kleiner Teil der T-Lymphozyten im Infiltrat dem neoplastischen Klon zuzuordnen ist<sup>155</sup>.

Eine numerische Dominanz einer T-Zell-Subpopulation (CD4 oder CD8) definiert also nicht zwingend einen neoplastischen Klon, zumal die Verteilung der T-Zell-Subpopulationen auch im reaktiven Lymphknoten stark schwanken kann<sup>105,155</sup>.

Eine eindeutige Unterscheidung der Tumorzellen von reaktiven T-Zellen gelingt jedoch über den TCR, der in den Tumorzellen klonal rearrangiert ist und auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Bekanntermaßen leiten sich die meisten PTCL von  $\alpha/\beta$ -T-Zellen ab<sup>68,171</sup>, so dass neben einer rearrangierten TCR $\gamma$ -Kette auch ein Rearrangement der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette nachgewiesen werden kann (siehe 1.1.3). Aufgrund der hohen Variabilität des TCR (siehe 1.1.2.1) ist das Vorliegen einer identischen Nukleotidsequenz der CDR3-Region in den Tumorzellen und T-Zellen des reaktiven Begleitinfiltrates statistisch betrachtet praktisch unmöglich. Allein durch die hohe Variabilität der V-Segmente der TCR $\beta$ -Kette wird bereits eine gute Unterscheidung von Tumorzellen und reaktiven T-Zellen möglich, so dass mit Antikörpern, die gegen die verschiedenen V-Segmente der TCR $\beta$ -Kette gerichtet sind, eine Identifizierung der Tumorzellen immunhistochemisch möglich sein sollte. Derartige Antikörper sind für etwa zwei Drittel der verschiedenen V-Segmente der TCR $\beta$ -Kette, jedoch nicht der TCR $\alpha$ -Kette, verfügbar.

Um eine spezifische Identifizierung und Phänotypisierung der Tumorzellen in PTCL vornehmen zu können, haben wir deshalb einen kombinierten molekularbiologischen und immunhistochemischen Ansatz entwickelt, der im Wesentlichen auf der genetischen Heterogenität der TCR $\beta$ -Kette basiert. Mittels eines PCR-Ansatzes, der aus einer Kombination von 25 verschiedenen V $\beta$ -Primern mit zwei verschiedenen J $\beta$ -Primersets besteht, lässt sich die in den Tumorzellen klonal rearrangierte V $\beta$ -Subfamilie des TCR identifizieren. Handelt es sich hierbei um eine Subfamilie, die aus mehreren Segmenten besteht, lässt sich das rearrangierte V $\beta$ -Segment

durch Sequenzierung des PCR-Produkts weiter spezifizieren. Ist ein entsprechender Antikörper gegen dieses V $\beta$ -Segment verfügbar, lassen sich die Tumorzellen mit hoher Spezifität immunhistochemisch detektieren (Abbildung 9). Diese Untersuchung ist allerdings nur am Gefrierschnitt möglich, da die hierfür kommerziell erhältlichen Antikörper generell nicht paraffingängig sind. In immunhistochemischen Mehrfachfärbungen kann die Expression beliebiger weiterer Antigene in Kombination mit dem jeweiligen V $\beta$ -Antikörper untersucht und so der Tumorzellphänotyp bestimmt werden, ohne dass das Ergebnis durch das Expressionsmuster der reaktiven T-Zellen verfälscht wird (Publikation 1<sup>172</sup>).

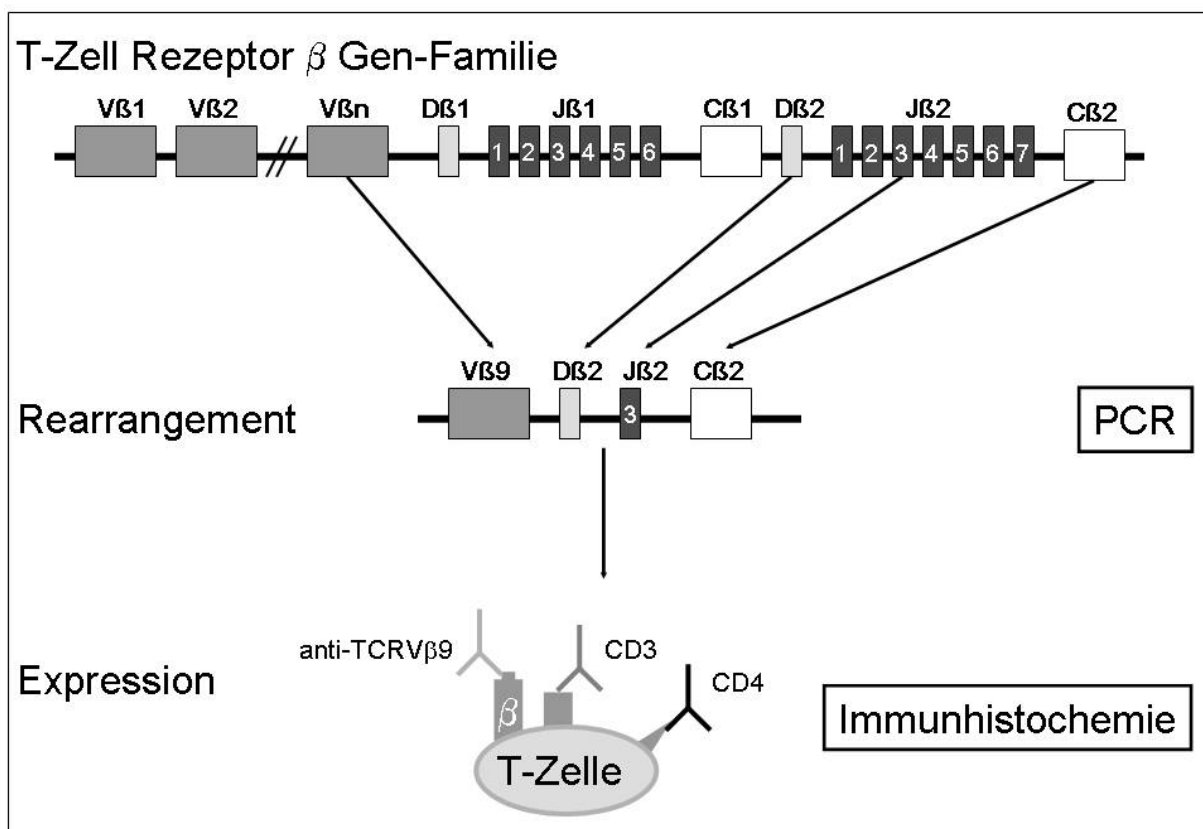


Abbildung 9: Molekulare Typisierung von PTCL mittels PCR und Verwendung der Ergebnisse (hier Familie V $\beta$  9), um die Tumorzellen in der Mehrfachfluoreszenz-Immunhistochemie zu identifizieren und zu phänotypisieren.

Mit dieser Methode konnten wir das in den Tumorzellen rearrangierte V $\beta$ -Segment in allen untersuchten PTCL-NOS (13/13) und in 11 von 13 AILTs definieren. In den beiden übrigen AILT-Fällen zeigte sich ein oligoklonales Rearrangement. In beiden Gruppen waren jeweils gegen sieben der rearrangierten V $\beta$ -Segmente Antikörper

erhältlich, mit denen wir diese Fälle in Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen CD3, CD5, CD4, CD8 und gegen zytotoxische Moleküle mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert haben. In 9 der 14 Fälle lag die Anzahl der mit dem entsprechenden V $\beta$ -Antikörper angefärbten Tumorzellen bei weniger als 50% des gesamten CD3<sup>+</sup> T-zellulären Infiltrates. Dieses Ergebnis zeigt deutlich die Überlegenheit der von uns gewählten Methode zur Phänotypisierung der Tumorzellen gegenüber früheren, allein auf quantitativen Unterschieden basierenden Untersuchungen. In allen 14 Fällen konnte ein einheitlicher Phänotyp für den jeweiligen Tumor bestimmt werden. Alle ALIT und 4 von 7 PTCL-NOS waren CD4<sup>+</sup>, während die drei übrigen PTCL-NOS doppelt negativ (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) waren. Hinsichtlich der Expression von CD3 und CD5 ergab sich innerhalb der beiden Entitäten kein einheitliches Bild. Eine Expression zytotoxischer Moleküle ließ sich nur in einem ALIT-Fall nachweisen.

Die Phänotypen der Tumorzellen, die sich aus den Doppelfärbungen ergeben haben, wichen in 11 von 14 Fällen von den Phänotypen ab, die zuvor von uns mit konventioneller Immunhistochemie (Einfachfärbungen und morphologischer Identifizierung der Tumorzellen) ermittelt worden waren.

Somit kann durch Kombination der TCRV $\beta$ -PCR mit immunhistochemischen Mehrfachfärbungen eine erheblich zuverlässigere Detektion und Charakterisierung der Tumorzellen in PTCL erreicht werden. Vor allem zur Charakterisierung von Tumoren, die nur relativ wenige oder nur gering atypische Tumorzellen enthalten, ist diese Methode derzeit die einzige, mit der valide Ergebnisse zu erzielen sind.

### **2.2 Untersuchungen zum TCR-Rearrangement und zur TCR-Expression in ALCL (Publikation 2)**

Im Rahmen der oben beschriebenen Untersuchungen zur Tumorzellphänotypisierung in PTCL (siehe 2.1) haben wir auch ALCL analysiert. Allerdings zeigte sich in den entsprechenden Färbungen mit dem Antikörper, der gegen das mittels PCR definierte, in den Tumorzellen rearrangierte V $\beta$ -Segment gerichtet sein sollte, kein spezifisches Signal in den Tumorzellen. Lediglich einzelne reaktive T-Zellen, in denen das entsprechende V $\beta$ -Segment ebenfalls rearrangiert ist, ließen eine spezifische, membrangebundene Positivität erkennen (Abbildung 10, links). In den Fluoreszenzmehrfachfärbungen ließ sich den Tumorzellen, die im Gegensatz zu anderen PTCL durch ihre anaplastische Zytologie auch am Gefrierschnitt zweifelsfrei

erkennbar sind, zwar ein eindeutiger Phänotyp zuordnen, dieser korrelierte aber nie einheitlich mit dem der V $\beta$ -positiven Zellen (Abbildung 10, links, CD4 grün CD8 blau, V $\beta$  rot). Weitere immunhistochemische Untersuchungen der ALCL mit zwei Antikörpern ( $\beta$ F1 bzw.  $\delta$ F1), die alle  $\alpha/\beta$ - bzw.  $\gamma/\delta$ -TCR - unabhängig vom jeweiligen Rearrangement - erkennen (Abbildung 10, rechts) zeigten lediglich eine Anfärbung kleiner reaktiver T-Zellen.

Diese Befunde veranlassten uns, in 19 ALCL-Fällen (9 ALK $^{-}$  und 10 ALK $^{+}$ ), von denen uns Gefriermaterial vorlag, systematisch das Rearrangement der  $\beta$ - und  $\gamma$ -TCR-Gene und ihre Expression zu untersuchen. Hierfür haben wir die im Rahmen des Biomed-2 Projekts<sup>173</sup> entwickelten Clonality Assays, mit denen in einem Multiplex-PCR-Ansatz das Rearrangement der TCR $\beta$ -, TCR $\gamma$ - und TCR $\delta$ -Kette dargestellt werden kann sowie die oben beschriebenen Antikörper  $\beta$ F1 und  $\delta$ F1 verwendet. Darüber hinaus haben wir die Expression von CD3, das mit dem TCR eng assoziiert ist, und von Molekülen, die eine Rolle in der TCR-abhängigen Signaltransduktion spielen, wie beispielsweise LAT und ZAP-70, untersucht und mit der Expression in anderen PTCL verglichen (Publikation 2<sup>174</sup>).

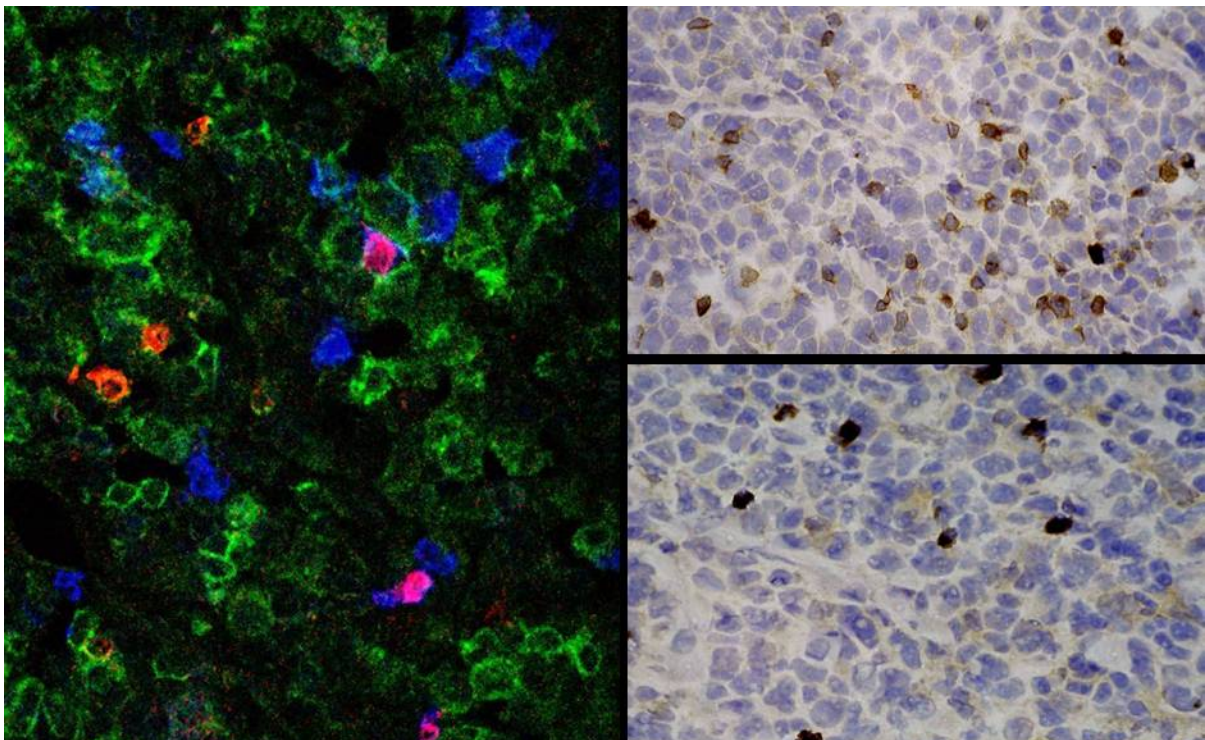


Abbildung 10: ALCL: Links: Dreifachfärbung,(CD4 grün, CD8 blau, TCRV $\beta$  rot). Die CD4-CD8-TCRV $\beta$ - Tumorzellen kommen in dieser Abbildung nicht zur Anfärbung.  $\beta$ F1-Färbung (rechts oben) und  $\delta$ F1-Färbung (rechts unten) mit Positivität lediglich in kleinen reaktiven T-Zellen des Hintergrundinfiltrates. Weitere Erläuterungen siehe Text.

In 14 (74%) der 19 untersuchten ALCL waren sowohl die TCR $\beta$ - als auch die TCR $\gamma$ -Gene klonal umgelagert. In jeweils einem Fall war die TCR $\beta$ -, nicht aber die TCR $\gamma$ -Kette rearrangiert, bzw. umgekehrt. Lediglich drei Fälle - alle ALK<sup>+</sup> ALCL - zeigten kein Rearrangement der TCR-Gene. Allerdings stellten die Tumorzellen in diesen Fällen nur eine recht kleine Population des Gesamtinfiltrates dar, die möglicherweise für die Detektion eines vorhandenen Rearrangements nicht ausreichend war. Demgegenüber konnten wir in den allermeisten PTCL-NOS und AILT (siehe 2.3) klonale TCR-Rearrangements und die Expression des entsprechenden TCR nachweisen.

Trotz des in der Mehrzahl der Fälle auf genomischer Ebene nachweisbaren TCR-Rearrangements war eine Expression des  $\alpha/\beta$ -TCR nur in 2 von 46 (4%) immunhistochemisch untersuchten ALCL mit dem  $\beta$ F1-Antikörper detektierbar. Diese beschränkte sich bei den beiden Fällen allerdings jeweils nur auf eine Subpopulation der Tumorzellen. Darüber hinaus ließ sich in beiden Fällen weder eine Expression von CD3 noch von ZAP-70 zeigen, was eine TCR-vermittelte Signaltransduktion ebenfalls unmöglich macht (siehe Abbildung 11 links). Eine Expression des  $\gamma/\delta$ -TCR mit dem  $\delta$ F1-Antikörper war in keinem der Fälle nachweisbar. Im Gegensatz dazu wurde der  $\alpha/\beta$ -TCR in allen AILT und in 86% aller PTCL-NOS exprimiert, während in einem PTCL-NOS die Expression des  $\gamma/\delta$ -TCR nachgewiesen werden konnte.

Interessanterweise konnten in keinem ALCL sämtliche untersuchte Komponenten (TCR, CD3, ZAP-70) des proximalen TCR Signalweges gemeinsam nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11 rechts) und nur in wenigen der untersuchten ALCL konnten überhaupt TCR-assoziierte Signaltransduktionsmoleküle detektiert werden. Im Gegensatz dazu waren der TCR, CD3 und assoziierte Signaltransduktionsmoleküle in den meisten PTCL-NOS und AILT vollständig exprimiert.

Weiterführend haben wir die Expression des mit ZAP-70 interagierenden Moleküls LAT untersucht (siehe Abbildung 2), welches in über 85% der ALCL Fälle ebenfalls nicht nachgewiesen werden konnte. Auch der Transkriptionsfaktor NFATc1, ein weit distal in der Signalkaskade des TCR gelegenes Molekül, fehlt in ALCL (persönliche Mitteilung, Arbeitsgruppe Prof. Serfling), während eine starke Expression von NFATc1 in anderen PTCL detektiert werden kann. Interessanterweise zeichnen sich auch klassische Hodgkin-Lymphome und plasmoblastische Lymphome, also Tumoren der B-Zell Reihe, die ebenfalls keinen spezifischen Antigenrezeptor exprimieren, durch eine fehlende Expression von NFATc1 aus<sup>175</sup>.

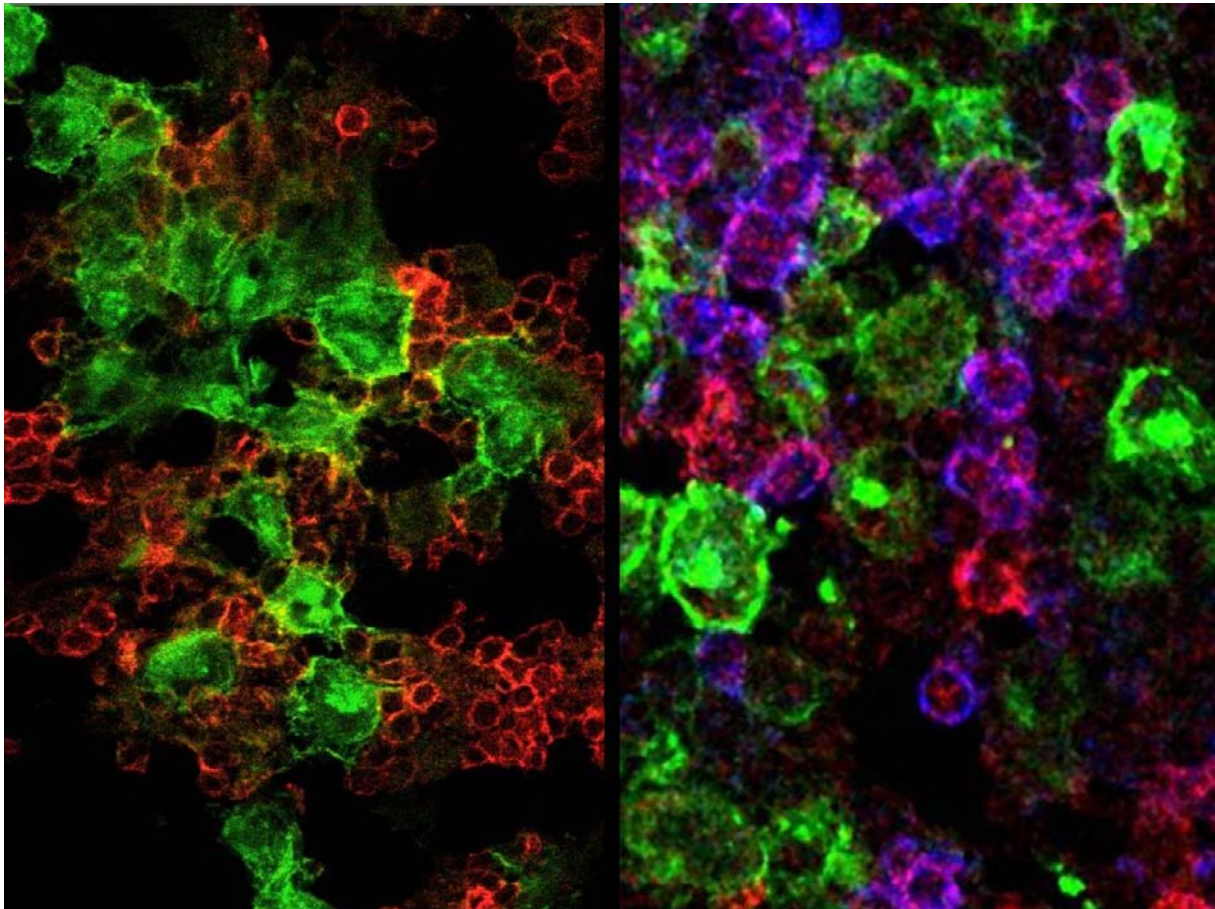


Abbildung 11: ALCL: Links: Doppelfärbung mit CD30 (grün) und  $\beta$ F1 (rot). Rechts: Dreifachfärbung mit CD30 (grün), CD3 (blau) und ZAP-70 (rot). Erläuterungen siehe Text.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass sowohl in  $ALK1^+$  als auch in  $ALK1^-$  ALCL die Expression des TCR-Komplexes bzw. assoziierter Signaltransduktionsmoleküle gestört ist, und dieser Befund somit unabhängig von der Transformation durch eine  $ALK1$ -Translokation ein gemeinsames Merkmal dieser Lymphome darstellt.

Ursachen können in Mutationen der kodierenden oder regulierenden Regionen der TCR-Gene oder im Fehlen von TCR-spezifischen Transkriptionsfaktoren liegen. Auch posttranskriptionelle Mechanismen, die die RNA Prozessierung oder die Proteinstabilität betreffen, sind denkbar<sup>176,177</sup>. Befunde in ALCL-Zelllinien lassen insbesondere Störungen auf DNA- oder Transkriptionsebene vermuten, da häufig keine vollständige TCR $\beta$ -mRNA nachgewiesen wurde<sup>178,179</sup>.

Während Signale über den TCR in naiven T-Zellen zur Aktivierung und Differenzierung führen, vermitteln sie in bereits aktivierten Zellen Wachstumsstop

und Apoptose<sup>180</sup>. Sie hemmen Zykline, unterstützen die FAS-vermittelte Apoptose<sup>181</sup> und blockieren Zytokinsignale, die über den JAK/STAT-Weg vermittelt werden<sup>182</sup>.

Die Tumorzelltransformation beinhaltet in ALK<sup>+</sup> ALCL auch mitogene Signale durch eine direkte Phosphorylierung von STAT3 durch ALK1<sup>183,184</sup>. In denselben Mechanismus greift auch der Verlust des TCR-Signals ein. Während physiologischerweise die STAT3-Aktivierung durch das TCR-Signal negativ beeinflusst wird, wird diese Hemmung bei fehlendem TCR aufgehoben. Dadurch kann das Fehlen des TCR-Signalwegs auch für sich genommen in ALK<sup>-</sup> ALCL zur Transformation beitragen (Abbildung 12).

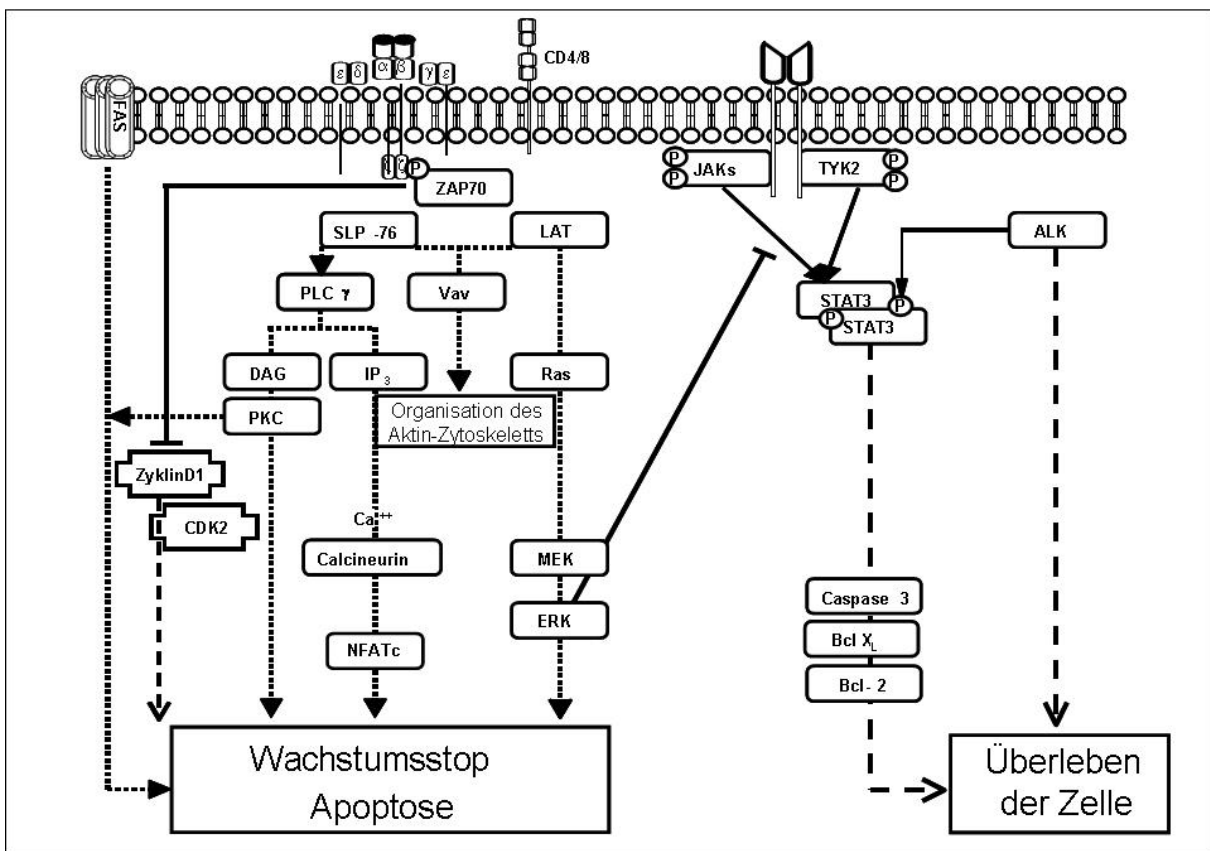


Abbildung 12: TCR-Signalwege in aktivierten T-Zellen. Weitere Erläuterungen siehe Text.

In der Praxis kann die fehlende TCR-Expression genutzt werden, um ALCL von anderen CD30<sup>+</sup> PTCL abzugrenzen, da CD30<sup>+</sup> PTCL-NOS und intestinale T-Zell-Lymphome im Gegensatz zu ALCL einen TCR bzw. NK-Zell-Rezeptoren exprimieren<sup>95,68</sup> und unter Verwendung des paraffingängigen  $\beta$ F1-Antikörpers diese Untersuchung auch in der Routinediagnostik möglich ist.

Neben den oben beschriebenen Konsequenzen der TCR-Signaltransduktion auf die



Zelle, führen sowohl die Signalwege des T-Zell-, als auch des B-Zell-Rezeptors zu einer Modellierung des Aktin-Zytoskeletts<sup>185-189</sup>. Dieser Zusammenhang kann möglicherweise eine biologische Erklärung dafür bieten, dass die Tumorzellen des Hodgkin-Lymphoms und des ALCL, denen der Ausfall dieser Signalwege gemeinsam ist, sich in ihrer anaplastischen Morphologie so ähnlich sehen.

### **2.3 Identifizierung der korrespondierenden Normalzelle von ALCL, AILT und PTCL-NOS (Publikation 3)**

Mit Hilfe unseres kombinierten Ansatzes zur Identifikation der Tumorzellen (vgl.2.1) sollte die Expression weiterer Antigene in PTCL-NOS und AILT bestimmt werden, um diese Lymphome, analog zur Klassifikation der B-Zell-Lymphome (vgl. 1.2.2), einem bestimmten Differenzierungsstadium der T-Zell-Entwicklung zuordnen zu können. Wie unter 1.1.3.3 beschrieben, sind bereits viele Antigenkombinationen, die eine bestimmte Differenzierungsstufe der T-Zellentwicklung definieren, bekannt. Die Expression verschiedener differenzierungsassoziierter Marker wurde in PTCL zwar schon untersucht, allerdings nicht mit dem Ziel, diese mit den normalen T-Zell-Populationen zu korrelieren<sup>190-195</sup>. Aufgrund unserer Ergebnisse zur fehlenden TCR-Expression in ALCL wurden die Mehrfachfärbungen in diesen Tumoren mit CD30 als spezifischem Tumorzellmarker durchgeführt (Publikation 3<sup>196</sup>).

Die hierarchische Clusteranalyse der entsprechenden Antigenexpression ergab drei Gruppen, die den AILT, den ALCL und einem Teil der PTCL-NOS entsprachen.

Alle AILT zeigten einen homogenen Effektorzellphänotyp ( $CD45RA^-/CD45RO^+/CD27^-/CCR7^-$ ), mit positiver FAS- und negativer Bcl-2-Expression, die die Abgrenzung der Effektorzellen von  $T_{CM}$  ermöglichen. Die Mehrheit der Fälle exprimierte CXCR3 und CD69<sup>190</sup>, was auf eine  $T_H1$ -Differenzierung hinweist. Dieses Differenzierungsstadium liefert möglicherweise eine Erklärung für einige der AILT-typischen morphologischen Eigenschaften, wie die Proliferation follikulär dendritischer Zellen und hochendothelialer Venolen, und auch für die große Anzahl eosinophiler Granulozyten und anderer nicht-neoplastischer Zellen im Hintergrundinfiltrat<sup>155,120</sup>. Hinsichtlich der klinischen Eigenschaften von AILT korreliert die Rezirkulation von Effektorzellen in peripherem Gewebe mit der stärkeren extranodalen Beteiligung in AILT verglichen mit PTCL-NOS. Die generalisierte Lymphadenopathie lässt sich damit allerdings nicht erklären. CTLA-4 war in dieser Studie nur in AILT, jedoch in keinem PTCL-NOS exprimiert.

Auch den ALCL konnte ein Effektorzellphänotyp zugeordnet werden, wobei CD27, CD45RA und CCR7 durchweg negativ und Bcl-2 in den meisten Fällen negativ waren. Zusätzlich zu der Negativität für CD45RA wurde CD45RO in 6 von 15 Fällen ebenfalls nicht exprimiert, was ungewöhnlich für reaktive T-Zellen ist. Die Expression von zytotoxischen Molekülen und von Aktivierungsmarkern (z.B. Negativität des T<sub>H</sub>1-assoziierten Aktivierungsmarkers CD69 in ALCL) unterschieden sich allerdings von den Ergebnissen in AILT. Da ALCL TCR und TCR-Signalmoleküle fehlen (siehe 2.2), können die Tumorzellen nicht über ihren TCR aktiviert werden und zeigen eventuell deshalb auch kein normales Expressionsmuster eines bestimmten T-Zell-Differenzierungsstadiums. Ob diese Tumoren alle zu einem ganz bestimmten T-Zell-Entwicklungsstadium gehören oder als gemeinsames Merkmal nur das Fehlen der funktionellen TCR-Signale teilen, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Bei den insgesamt 8 untersuchten PTCL-NOS konnten lediglich 5 einem gemeinsamen Cluster zugeordnet werden. Diese Fälle waren alle CD4<sup>+</sup> und zeigten einen Phänotyp (CD45RA<sup>-</sup>/CD45RO<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>), der charakteristisch für T<sub>CM</sub> ist. Zudem exprimierten diese Fälle Bcl-2 und waren fast alle (80%) CCR7<sup>+</sup>. Unter den PTCL-NOS zeichnet sich somit eine Gruppe von Tumoren ab, die sich im Entwicklungsstadium von AILT und ALCL unterscheidet, und die durch eine homogenen Phänotyp charakterisiert ist, der langlebigen T<sub>CM</sub> entspricht.

Die übrigen drei PTCL-NOS konnten bei Negativität für CD4, CD8 und CD27 sowie uneinheitlicher Expression von CD45RA und CD45RO nicht eindeutig einem Differenzierungsstadium zugeordnet werden. Grundsätzlich kann es sich hierbei um einen simplen Verlust dieser kostimulatorischen Moleküle im Sinn eines aberranten Phänotyps handeln, wobei doppelt negative reaktive T-Zellen generell noch nicht gut charakterisiert sind. Für diese Möglichkeit spricht die einheitliche Negativität von CD27 in allen drei Tumoren, die nur bei T-Zellen nach Antigenkontakt beobachtet wird<sup>18,19,21</sup>. Andererseits lässt sich aber auch nicht ausschließen, dass sich diese Tumoren von „echten“ doppelt negativen T-Zellen ableiten, bei denen sich nur die Expression von CD45RA, CD45RO und CD27 unabhängig von der MHC-Restriktion verändert hat.

Auch von anderen Arbeitsgruppen wurden durch immunhistochemische oder cDNA-Microarray-Studien bestimmte Subgruppen von PTCL-NOS identifiziert. Dabei wurden durch die Untersuchung von Aktivierungs- bzw. T<sub>H</sub>-Zellmarkern verschiedene prognostische Subgruppen definiert, die aktivierten funktionellen oder nicht-

funktionellen T-Zellen bzw. T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Entwicklungsstadien zugeordnet werden konnten<sup>197,194,198</sup>. Weiterhin wurden PTCL-NOS in Abhängigkeit von ihrer CCR3-CCR4- bzw. CXCR3-Expression in drei Gruppen eingeteilt, deren Prognose jeweils der von ALCL, ATLL bzw AILT, ähnelte<sup>199</sup>. Im Rahmen einer anderen Arbeit wurden zwei Gruppen mit und ohne Expression zytotoxischer Marker gebildet, die ebenfalls eine unterschiedliche Prognose aufwiesen<sup>200</sup>. Eine Analyse von Genexpressionsprofilen ergab ebenfalls drei Subgruppen von PTCL-NOS: Die erste zeigte eine Überexpression von Genen, die bereits in anderen Tumoren (z.B. diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen) mit einer schlechten Prognose assoziiert waren. Die zweite Gruppe zeigte eine Überexpression von Genen, deren Proteine bei der T-Zellaktivierung und der Apoptose beteiligt sind, während die dritte, histiozytenreiche Gruppe vor allem durch Gene, die der Makrophagen-/Histiozytenlinie zugeordnet werden konnten, charakterisiert war<sup>201</sup>. Weiterhin wurde in PTCL-NOS im Vergleich zu normalen T-Zellen eine Überexpression von Genen nachgewiesen, die eine Rolle bei der Antiapoptose, Proliferation, Zelladhäsion und Zell-Matrix-Interaktion spielen<sup>202,203</sup>. Wesentliche weiterführende Schlussfolgerungen wurden jedoch aus den bislang vorliegenden Genexpressionsdaten von beiden Arbeitsgruppen nicht gezogen. Für die Genexpressionsstudien wurde allerdings mRNA aus Gesamtgewebe verwendet, das, wie oben beschrieben, neben den Tumorzellen auch einen unterschiedlich großen Gehalt an reaktiven Zellen enthält, wodurch sich derzeit nicht sagen lässt, ob das Expressionsmuster den Tumorzellen oder den reaktiven Infiltratzellen zuzuordnen ist<sup>204</sup>.

In den letzten Jahren wurden neben PTCL-NOS auch andere T-Zell-Lymphomentitäten (z.B. AILT, ALCL, ATLL, NK-Zell-Lymphome, intestinale, lymphoblastische, angiozentrische und kutane T-Zell-Lymphome) anhand von Tumorgewebe und teilweise auch anhand von Tumorzelllinien im Hinblick auf allgemeine Expressionsmuster, T<sub>H</sub>-Differenzierungsmarker, T-Zell-Aktivierungsmarker, Chemokine, Chemokinrezeptoren und Zytokine untersucht<sup>197,199,205,206,192,207,201,208</sup>. Im Rahmen dieser Arbeiten wurde auch über die Zuordnung von AILT zu T<sub>H</sub>1-Zellen, von ALCL zu T<sub>H</sub>2-Zellen und von lymphoblastischen Lymphomen und ATLL zu nicht-funktionellen T-Zellpopulationen spekuliert<sup>194,197,199</sup>. Diese Ergebnisse zeigen somit hinsichtlich der AILT eine Übereinstimmung mit unseren Daten. Im Gegensatz dazu konnten wir in keinem ALCL die T<sub>H</sub>2-typische Markerkonstellation CCR4<sup>+</sup>/CXCR3<sup>-</sup> nachweisen, wenngleich CD69, ein Marker der in erster Linie mit einer T<sub>H</sub>1-

Differenzierung in Verbindung gebracht wird<sup>190,194</sup>, in allen ALCL Fällen negativ war. Bei den Untersuchungen der oben genannten Arbeitsgruppen zeigte jedoch die Mehrzahl der ALCL eine für T<sub>H</sub>2 typische Expression von CCR4 und CXCR3.

Eine unterschiedliche Expression von einzelnen Markern oder Gruppen von Genen kann Hinweise auf die Mechanismen der Tumorzelltransformation geben, wobei insbesondere die Kenntnis der zur Tumorzelle korrespondierenden Normalzelle und Kenntnis und Vergleich von funktionellen Eigenschaften von Normal- und Tumorzellen zusätzliche wesentliche Anhaltspunkte geben können.

Auf dem Boden unserer Ergebnisse lassen sich Hypothesen zur Tumorzelltransformation aufstellen: Die Tumorzellen des AILT, die einen Effektorzellphänotyp aufweisen, entgehen im Gegensatz zu normalen Effektorzellen der Apoptose, was einen starken Hinweis auf einen Apoptosedefekt als entscheidenden Mechanismus der neoplastischen Transformation liefert (siehe 2.5). Die PTCL-NOS, die zu T<sub>CM</sub> korrespondieren, zeigen oft eine hohe Proliferationsrate, wohingegen T<sub>CM</sub> normalerweise sehr langsam proliferieren. Ein wesentlicher Transformationsmechanismus bei diesen Lymphomen könnte somit in die Regulation des Zellzyklus eingreifen.

Zusammenfassend kann die Korrelation nodaler PTCL zu den verschiedenen Entwicklungsstadien reaktiver T-Zellen Forschungsansätze liefern, mit denen sich die Biologie von PTCL weiter klären und verstehen lässt.

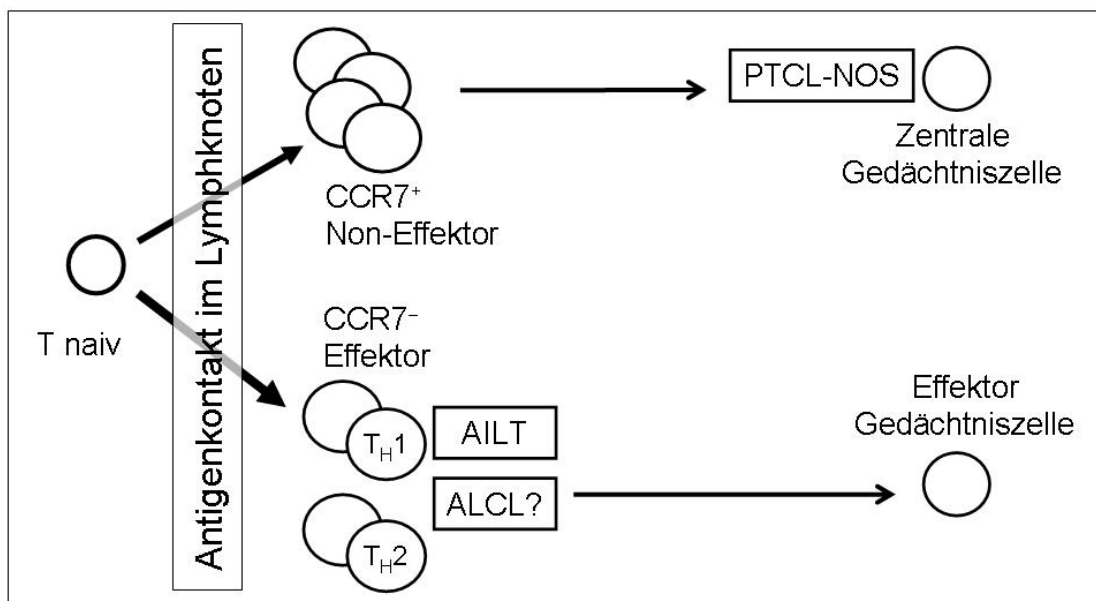


Abbildung 13: Zuordnung von AILT, ALCL und PTCL-NOS zu den Entwicklungsstadien der korrespondierenden Normalzelle. Weitere Erläuterungen siehe Text

## 2.4 FoxP3 Expression in PTCL (Publikation 4)

Da die große Gruppe der PTCL-NOS bekanntermaßen aus morphologisch und klinisch sehr heterogenen T-Zell-Lymphomen besteht und wir bislang nur einen Teil der Fälle den sog. T<sub>CM</sub> zuordnen konnten, besteht weiterhin ein großes Interesse daran, innerhalb der PTCL-NOS weitere homogene Untergruppen definieren zu können. In diesem Zusammenhang haben wir untersucht, ob es innerhalb dieser Entität Fälle gibt, die sich von sog. regulatorischen T-Zellen (Treg) ableiten. Wie unter 1.1.3.3 ausgeführt, eignet sich hierfür insbesondere der Transkriptionsfaktor FoxP3, der ausschließlich von diesem Zelltyp exprimiert wird<sup>35-37</sup>. (Publikation 4, Bonzheim et al., Manuskript eingereicht).

Wir konnten in 63 PTCL (23 AILT, 32 PTCL-NOS, zwei primär kutane T-Zell-Lymphome, vier T-Zell-Lymphome vom Enteropathietyp, ein hepatosplenisches T-Zell-Lymphom und ein T/NK-Zell-Lymphom vom nasalen Typ) lediglich einen Fall identifizieren, der FoxP3 exprimiert. In den übrigen Fällen fanden sich lediglich FoxP3<sup>+</sup> Zellen im Hintergrundinfiltrat.

Das FoxP3<sup>+</sup> PTCL-NOS zeichnete sich durch ein ungewöhnlich tumorzellreiches, diffuses Infiltrat verschieden großer, atypischer Zellen, bei weitgehend fehlendem reaktiven Hintergrundinfiltrat aus, was im Gegensatz zu der typischen Morphologie der meisten anderen PTCL steht.

In den immunhistochemischen Doppelfärbungen mit dem tumorzellspezifischen Vβ-Antikörper (V5s1) zeigte sich ein Phänotyp, der sehr gut zu Treg passt: FoxP3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>-</sup>, CD45RO<sup>+</sup>, CTLA-4<sup>+</sup>, und FAS<sup>+</sup>. Wenngleich die Mehrzahl der Treg CD25<sup>+</sup> ist, wurden auch CD25<sup>-</sup> humane und murine Treg beschrieben<sup>40-42,209,43,210-212</sup>, so dass die CD25 Negativität der Tumorzellen keinen Widerspruch zum Treg-Phänotyp darstellt.

Der klinische Verlauf des Patienten mit dem FoxP3<sup>+</sup> PTCL-NOS war in der Zusammenschau mit unseren Untersuchungen höchst interessant: Bei dem 59 Jahre alten Mann, der in verschiedenen Lokalisationen pathologisch vergrößerte Lymphknoten aufwies, wurde seinerzeit (1996) die Diagnose eines immunoblastischen NHL (Kiel-Klassifikation) gestellt, welches nach der aktuellen WHO-Klassifikation zu den PTCL-NOS gehört. Fünf Tage nach Beginn der Chemotherapie verschlechterte sich sein Allgemeinzustand, er überstand die aplastische Phase und zwei Infektionen, verstarb aber bereits einen Monat nach Diagnosestellung.

Insbesondere aufgrund von zwei Überlegungen liegt es nahe, dass einige der morphologischen und klinischen Eigenschaften des von uns beschriebenen Falles mit den regulatorischen Eigenschaften der Tumorzellen erklärt werden könnten. Zum einen zeigte der Tumor ein beinahe kohäsives Wachstumsmuster, das sehr selten in PTCL beobachtet wird, da gewöhnlich zahlreiche reaktive T- und B-Zellen zwischen den Tumorzellen liegen<sup>172</sup>. Im vorliegenden Fall könnten die den Treg eigenen, immunsuppressiven Eigenschaften der Tumorzellen die Ursache des fehlenden reaktiven Hintergrundinfiltrates sein. Zum anderen könnten diese immunsuppressiven Eigenschaften die normalerweise vorhandene antitumorale Immunität unterdrückt und damit zu dem ungewöhnlich schnellen Versterben des Patienten beigetragen haben. Folglich könnte der regulatorische Phänotyp der Tumorzellen die besondere Aggressivität dieses Lymphoms erklären.

PTCL, die sich von Treg ableiten, scheinen zumindest in der kaukasischen Bevölkerung sehr selten zu sein. Nach unserem Wissen wurde ein solcher Fall bisher nicht beschrieben.

Allerdings wurden bereits einige extranodale PTCL beschrieben, die sich von Treg ableiten. Darunter waren Fälle von HTLV-1-assoziierten ATLL, die FoxP3 exprimieren<sup>213,214,198,215</sup> und sich interessanterweise auch durch eine schlechte Prognosen auszeichnen<sup>216,68,217</sup>. Der regulatorische Phänotyp korreliert weitgehend mit der HTLV-1-Infektion. In einer Serie kutaner T-Zell-Lymphome waren 3 von 3 HTLV<sup>+</sup> Fällen FoxP3<sup>+</sup>, während nur 3 von 12 HTLV<sup>-</sup> Fällen Foxp3<sup>+</sup> waren. Da mit diesem Retrovirus infizierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen einen regulatorischen Phänotyp entwickelten<sup>218</sup>, könnte die Expression von FoxP3 in diesen Lymphomen Folge der Virusinfektion sein. In dem von uns beschriebenen FoxP3<sup>+</sup> Fall konnten wir jedoch eine HTLV-1 Infektion als Ursache des regulatorischen Phänotyps mittels PCR ausschließen. In einer anderen Studie wurde für kutane T-Zell-Lymphome die Induktion eines regulatorischen Phänotyps nach Interaktion mit Autoantigen-präsentierenden dendritischen Zellen, beschrieben<sup>219</sup>.

In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung wurde eine FoxP3-Expression in ALK<sup>+</sup> ALCL Zelllinien nachgewiesen<sup>220</sup>. Um diese Daten anhand von primärem Patientenmaterial überprüfen zu können, haben wir sechs ALK<sup>+</sup> und 15 ALK<sup>-</sup> ALCL auf eine FoxP3 Expression hin untersucht. Dabei konnten wir in 4 von 6 ALK<sup>+</sup> ALCL und in einem von 15 ALK<sup>-</sup> ALCL eine FoxP3 Expression detektieren, die in letzterem jedoch meist nur schwach und nicht in allen Tumorzellen nachweisbar war. Somit ist

der Unterschied in der FoxP3-Expression zwischen ALK<sup>+</sup> und ALK<sup>-</sup> ALCL signifikant. Darüber hinaus haben wir in diesen Lymphomen auch die Expression von CD4, CD25, CD45RO, FAS und CTLA-4 untersucht, wobei sich hier eine heterogene und nicht mit dem regulatorischen Phänotyp korrelierbare Expression zeigte. Auch durch eine Clusteranalyse dieser Treg-Marker konnten die FoxP3-positiven ALK<sup>+</sup> ALCL-Fälle nicht einer gemeinsamen Subgruppe zugeordnet werden.

Die FoxP3-Expression in ALK<sup>+</sup> ALCL scheint somit aufgrund der ungleich starken und nicht in allen Tumorzellen nachweisbaren Expression von FoxP3 und der heterogenen Expression der anderen Treg-Marker, im Gegensatz zu dem oben beschriebenen FoxP3<sup>+</sup> PTCL-NOS, reguliert zu sein. Die Induzierbarkeit von FoxP3 in ALCL wird durch das Fehlen anderer regulatorischer Eigenschaften untermauert. Der regulatorische Phänotyp ist demnach in erster Linie als ein Epiphänomen und nicht als inhärente Eigenschaft dieser Tumoren anzusehen. Dies passt zu den kürzlich veröffentlichten Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass der regulatorische Phänotyp (die FoxP3-Expression) in ALK<sup>+</sup> ALCL Zelllinien durch ALK induziert wird, indem STAT3, das durch NPM/ALK aktiviert wird, die FoxP3-, IL-10- und TGFβ-Expression aktiviert. IL-10 und TGFβ sind immunsuppressive Zytokine, die einerseits von Treg sezerniert werden können, andererseits aber auch einen Treg-Phänotyp und eine Treg-Funktion induzieren können<sup>220-223</sup>.

Im Gegensatz zu den HTLV-1-assoziierten Lymphomen und den ALCL, bei denen der regulatorische Phänotyp in erster Linie sekundär durch abberante Aktivierung induziert wird, spricht das histologische, immunhistochemische und klinische Bild des von uns beschriebenen FoxP3<sup>+</sup> PTCL-NOS dafür, dass der Treg-Phänotyp eine wesentliche, determinierende Eigenschaft dieser Tumorzellen darstellt und sich diese somit tatsächlich von natürlichen Treg ableiten.

### **2.5 Molekulargenetische Untersuchungen des FAS- und CTLA-4-Gens in AILT und PTCL-NOS (Publikation 5)**

Unsere Untersuchungen zur Identifizierung der korrespondierenden Normalzelle von ALCL, AILT und PTCL-NOS (siehe Publikation 3) haben gezeigt, dass die Tumorzellen des AILT mit terminal differenzierten T<sub>H</sub>1-Effektorzellen korrespondieren, Zellen deren natürliches Schicksal die Apoptose ist. Dieser programmierte Zelltod ist für die Beendigung physiologischer Immunreaktionen unabdingbar<sup>224</sup>.

Störungen physiologischer Apoptosemechanismen können bekanntermaßen wesentlich zur Entstehung maligner Lymphome beitragen, so stellt beispielsweise die unregulierte Überexpression von Bcl-2 aufgrund einer Translokation den primären Transformationsmechanismus in folliculären B-Zell-Lymphomen dar<sup>225</sup>.

Wie bei folliculären B-Zell-Lymphomen wird auch von den neoplastischen T-Zellen der AILT CD10 exprimiert<sup>150</sup> (1.2.3.2). Diese neutrale Peptidase wird in reaktiven T-Zellen frühzeitig nach Induktion der Apoptose exprimiert<sup>151,152</sup>. Auch in akuten lymphatischen Leukämien der Vorläufer T-Zellen markiert CD10 Zellen, die auf dem Weg in die Apoptose sind<sup>226</sup>.

CD10 kann also als Indikator dafür angesehen werden, dass in einer Zelle Apoptose induziert wurde. Allerdings kann in CD10<sup>+</sup> Zellen die Apoptose durch physiologische oder pathologische Mechanismen noch verhindert werden, beispielsweise durch eine positive Selektion über den Antigenrezeptor oder durch eine Überexpression des Bcl-2-Proteins. So war in einer untersuchten Serie die Apoptoserate in AILT niedriger als in anderen nodalen PTCL<sup>227</sup>. Nach unseren eigenen Untersuchungen ist Bcl-2 in den Tumorzellen der AILT allerdings nicht exprimiert. Eine andere Arbeitsgruppe fand eine Expression von Bcl-2 in 6 von 14 AILT, konnte allerdings nicht ausschließen, dass es sich bei den Bcl-2<sup>+</sup> Zellen um untermischte reaktive Zellen handelte<sup>228</sup>. Andere Proteine der Bcl-2-Familie wurden bisher nicht untersucht.

Aufgrund des T-Zell-Entwicklungsstadiums (siehe oben) und der CD10-Expression haben wir begonnen, Untersuchungen zur Apoptose in AILT durchzuführen. Zunächst haben wir verschiedene Proteine, die bei der Apoptose eine wichtige Rolle spielen, untersucht und mit der CD10 Expression, die in 12 von 20 Fällen in den Tumorzellen nachweisbar war, korreliert.

Bei diesen Untersuchungen haben wir Hinweise darauf gefunden, dass eine Interaktion zwischen FAS und FAS-Ligand (FASL) in der Pathogenese der AILT eine Rolle spielen kann<sup>229</sup>: In immunhistochemischen Mehrfachfärbungen konnten wir zeigen, dass die Tumorzellen der AILT in 19 von 20 Fällen den FAS-Rezeptor exprimieren, ein Molekül, das durch Bindung des FASL die Apoptosemaschinerie in Gang setzt. In AILT liegen die Tumorzellen, die in allen Fällen selbst FASL<sup>-</sup> waren, typischerweise inmitten der proliferierten Netzwerke folliculärer dendritischer Zellen, die ihrerseits FASL exprimieren (Abbildung 14).



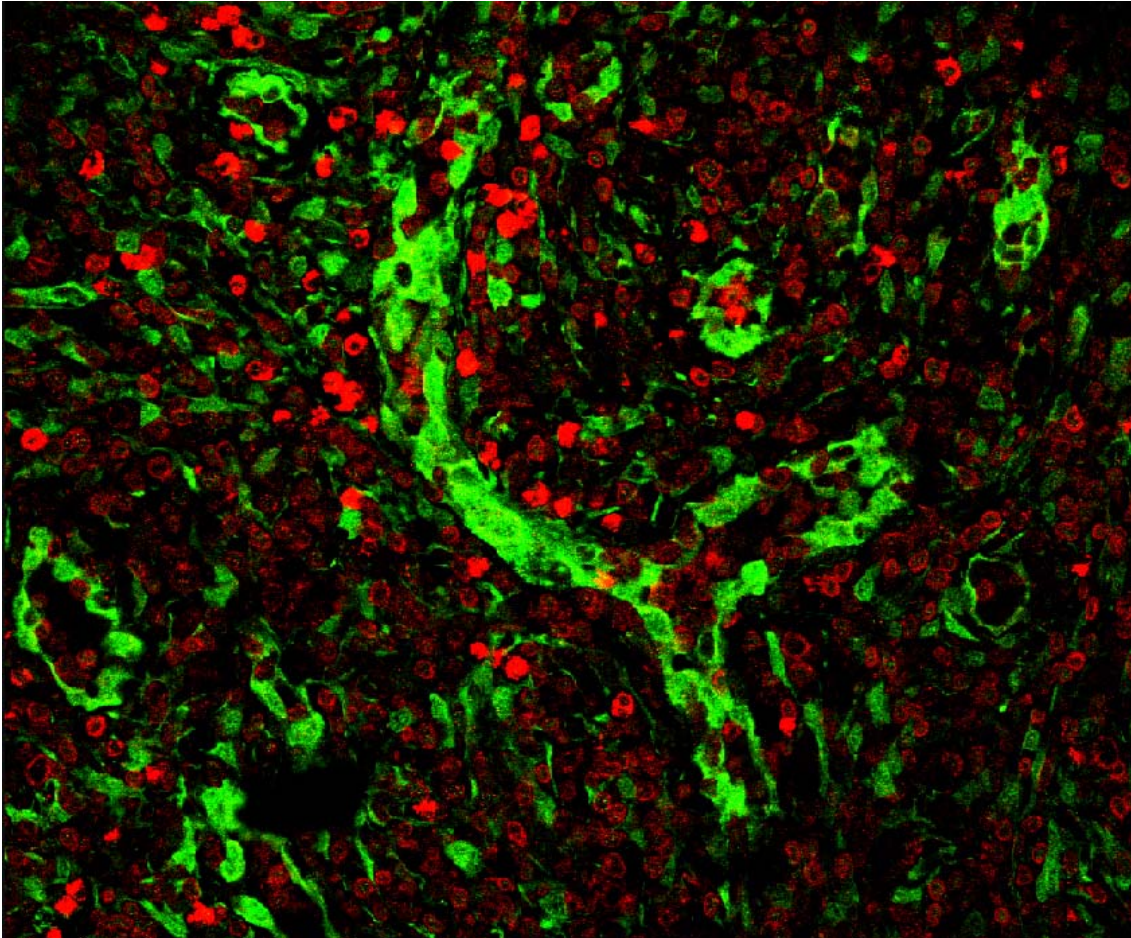


Abbildung 14: Doppelfärbung für FASL (grün) und CD3 (rot): Die CD3<sup>+</sup> Tumorzellen liegen inmitten der FASL positiven Netzwerke folliculärer dendritischer Zellen. In der Mitte der Abbildung ist ein Gefäß zu sehen, dessen Endothelien ebenfalls FASL exprimieren.

Wegen diesen engen räumlichen Verhältnissen besteht die Möglichkeit einer Interaktion zwischen FAS und FASL, und damit einer Übermittlung des Apoptosesignals an die Tumorzellen der AILT. Die frühe Effektor-Caspase 3, die im Signalweg der FAS-Aktivierungskaskade gelegen ist und normalerweise die FAS-getriggerte Apoptose vermittelt, liegt in den Tumorzellen jedoch nur als inaktive Procaspase vor.

Zu dieser Beobachtung passt, dass die Apoptose sowohl morphologisch als auch in TUNEL-Untersuchungen kein wesentliches Phänomen bei AILT darstellt<sup>143</sup>. Aus diesem Grund lässt sich vermuten, dass die FASL-induzierte Apoptose in einem frühen Stadium durch einen bisher unbekanntem Mechanismus wieder gestoppt wird. Diese Hypothese wird durch eine morphologische Ähnlichkeit früher Formen des AILT zu dem histologischen Bild, das man bei Kindern mit einem autoimmunen Lymphoproliferationssyndrom (ALPS) sieht<sup>230-232</sup>, unterstützt, da diese Erkrankung

auf einem hereditären Defekt des FAS-Gens beruht.

Patienten mit AILT haben derzeit eine sehr schlechte Prognose. Sie sterben in den meisten Fällen nicht an einer Tumorprogression, sondern an den Folgen der Immundysregulation und den damit einhergehenden Infektionen. Krankheitssymptome, die denen der AILT in gewisser Weise ähneln, werden auch bei Mäusen beobachtet, die Defekte des FAS-<sup>233</sup> oder CTLA-4-Gens<sup>234</sup> bzw. von Effektor-Caspase-Genen<sup>235</sup> aufweisen.

Einer Vielfalt von Autoimmunphänomenen liegen Apoptosestörungen, im speziellen auch FAS-Mutationen, in Lymphozyten zugrunde, die mit einer Prädisposition zur Entstehung von Lymphomen, aber auch von anderen malignen Tumoren einhergehen können<sup>236-251</sup>. Interessanterweise wurden somatische Mutationen des FAS-Gens in 16 von 150 verschiedenen Non-Hodgkin-Lymphomen der T- und B-Zell-Reihen, darunter ein ALCL, beschrieben<sup>244</sup>, wobei AILTs in dieser Serie nicht enthalten waren.

Auch eine Assoziation von sogenannten „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) im FAS-Gen mit Autoimmunerkrankungen<sup>252-258</sup> bzw. mit der Tumorprogression bei Neoplasien der Cervix uteri<sup>259</sup> wurde beschrieben.

Wie unter 1.1.5 gezeigt ist CTLA-4 ebenfalls ein Molekül, das an der Beendigung der Immunantwort beteiligt ist. Sowohl eine Expression von FAS, als auch von CTLA-4 ist in den von uns untersuchten AILT immunhistochemisch nachweisbar. Ob diese Proteine jedoch funktionell wirksam sind, konnten wir bislang nicht untersuchen, da für die entsprechenden *in vitro* Experimente große Mengen an viablen Tumorzellen benötigt werden.

Mutationen im codierenden, wie auch im nicht codierenden Bereich des CTLA-4-Gens wurden in verschiedenen Studien ebenfalls als primärer Kandidat für die genetische Suszeptibilität bei Autoimmunerkrankungen angesehen<sup>260-264</sup>. Darüber hinaus sind bestimmte Promotorvarianten beispielsweise mit der Entwicklung von NHL assoziiert<sup>265</sup> und werden zwar nicht mit der initialen Entwicklung, aber mit der Progression beim Mammakarzinom in Verbindung gebracht<sup>266</sup>. Die am häufigsten untersuchten SNPs des CTLA-4-Gens sind im Exon 1 +49A/G, in der Promotor Region -318C/T, -1662, -1722 und in der 3'-untranslatierten Region CT60A/G gelegen.

Diese Daten legen die Hypothese nahe, dass möglicherweise auch bei der Pathogenese des AILT Störungen der Apoptose eine wesentliche Rolle spielen.

Aufgrund der oben beschriebenen immunhistochemischen Untersuchungen kamen diesbezüglich in erster Linie Defekte im FAS- bzw. im CTLA-4-Signalweg in Frage.

Um dieser Hypothese weiter nachzugehen haben wir SNPs des FAS- und des CTLA-4-Gens untersucht und mit PTCL-NOS bzw. Daten aus der Normalbevölkerung verglichen (Publikation 5, Bonzheim et al, Manuskript eingereicht).

SNPs verursachen nicht direkt Erkrankungen, aber sie können dazu beitragen, dass ein Individuum eine bestimmte Krankheit mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit entwickelt. Die meisten SNPs verhalten sich stumm, das heißt sie üben keinen wahrnehmbaren Effekt auf die Genfunktion oder den Phänotyp aus. Nichtsdestotrotz können sie einen wesentlichen Einfluss auf die individuelle Suszeptibilität für bestimmte Erkrankungen und Medikamentenreaktionen haben. Desweiteren wird davon ausgegangen, dass auch bestimmte Kombinationen von SNPs, die mehrere verschiedene Gene betreffen, mit einer Prädisposition für bestimmte Erkrankungen einhergehen können<sup>267</sup>. Derartige Allelvariationen in Promotorregionen können beispielsweise die quantitative und/oder qualitative Expression eines Rezeptors beeinflussen, wenn Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren oder regulatorische Domänen verändert sind.

Wir haben bevorzugt SNPs im FAS-Gen analysiert, die schon im Zusammenhang mit B-Zell-Lymphomen (z.B. multiples Myelom, follikuläres Lymphom, diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom), aber auch Autoimmunerkrankungen (z.B. Diabetes mellitus Typ I, multiple Sklerose, systemischer Lupus erythematodes, Sjögren-Syndrom) untersucht wurden<sup>268,269,255,270,258,256,257</sup>. Ebenfalls untersucht wurden SNPs im CTLA-4-Gen, die bereits im Zusammenhang mit Lymphomen (z.B. Marginalzonen-Lymphom, follikuläres Lymphom, Mantelzell-Lymphom, diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, Burkitt-Lymphom und T-Zell-Lymphom), anderen malignen Tumoren (z.B. Mammakarzinom) und auch mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen (z.B. M. Basedow, rheumatoide Arthritis, multiple Sklerose, systemischer Lupus erythematodes, Asthma bronchiale, Diabetes mellitus Typ I, Thymom-assoziierte Myasthenia Gravis, M. Addison, Zöliakie, primäre biliäre Sklerose) beschrieben wurden<sup>266,265,264,263,271,272,262,273-275,261,276,277</sup>.

Nach Literaturangaben führen ein Teil dieser CTLA-4-SNPs zu einer veränderten Promotoraktivität, einer ineffizienten Protein-Prozessierung, einer reduzierten CTLA-4-Expression, insbesondere auch von der löslichen CTLA-4-Isoform, und haben insgesamt eine Auswirkung auf die durch CTLA-4 ausgeübte Kontrolle der T-

Zellproliferation<sup>278,279,277,261</sup>.

Wir haben an 10 AILT und 10 PTCL-NOS insgesamt 29 SNPs und drei Mutationen in den codierenden und flankierenden Regionen des FAS-Gens untersucht (6 Promotor-, 13 Exon-, 10 Intron-, 3 3'UTR-SNPs) und die Allelfrequenzen sowie die Genotypen mit denen gesunder Kontrollindividuen verglichen, sofern Kontrolldaten in der Population PDR90 der SNP-Datenbank zur Verfügung standen.

Zusammenfassend fanden wir beim Vergleich von AILT mit PTCL-NOS signifikante Unterschiede in den Allelfrequenzen von drei Gen-Loci (-691t>c, IVS4+699T>C, IVS7+312C>T). Allerdings liegen die Werte der Allelfrequenzen der Kontrollfälle genau zwischen AILT und PTCL-NOS. Darüber hinaus zeigten sich Unterschiede in den Genotypfrequenzen von vier SNPs (IVS2+176C>T, IVS4+699T>C, A/T(735)G/C, c.699(+82)c>g) zwischen allen drei Gruppen (AILT, PTCL-NOS und Kontrollen). Zu den in unseren Untersuchungen auffälligen SNPs ist in der Literatur bislang eine Assoziation von A/T(735)G/C mit Multipler Sklerose<sup>255</sup> und von (c.699(+82)c>g and IVS2+176C>T) mit dem Sjögren-Syndrom<sup>257</sup> beschrieben.

Eine Clusteranalyse der beiden Lymphomentitäten und Kontrollen mit den Daten der kombinierten Genotypen von 20 der oben erwähnten SNPs ergab eine Gruppe von 7 von 10 AILT, die ein hohes Maß an Ähnlichkeit aufwies, während die anderen drei AILT näher mit PTCL-NOS oder Kontrollen verwandt waren.

Um der Frage nachzugehen, ob der SNP in der Promotorregion (SNP-691t>c), bei dem sich ein signifikanter Unterschied zwischen AILT und PTCL-NOS gezeigt hatte, einen Effekt auf die FAS-Expression haben könnte, haben wir die 10 PTCL-NOS und 9 von 10 AILT immunhistochemisch mit einem FAS-Antikörper untersucht. Hierbei zeigte sich im Vergleich zu den PTCL-NOS eine signifikant stärkere FAS Expression in den Tumorzellen der AILT. Durch eine gemeinsame Clusteranalyse der Expressions- und Promotor-SNP-Daten wurde dies untermauert, da alle AILT in einer Untergruppe clusterten und den gleichen Promotor-Genotyp in Verbindung mit einer FAS-Expression zeigten. Dagegen wiesen PTCL-NOS sowohl eine heterogene FAS-Expression als auch einen uneinheitlichen Genotyp auf.

Zur Frage, ob der SNP in der Promotorregion zu Veränderungen an Transkriptionsfaktorbindungsstellen führt, die jedoch in dieser Lokalisation (noch) nicht beschrieben sind, haben wir die jeweilige Sequenz mit Angaben in einer entsprechenden Datenbank verglichen<sup>280</sup> und hier potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AML-1a und c-Myc gefunden. Während AML-1a mit einem

Score von 83,4 binden könnte, wenn an dieser Stelle Thymin verwendet wird und c-Myc mit einem Score von 80,9, wenn stattdessen Cytosin verwendet wird, erkennen beide Transkriptionsfaktoren die Bindungsstelle mit dem jeweils anderen Nukleotid rein theoretisch nicht mehr. Daraus könnte geschlossen werden, dass der Transkriptionsfaktor c-Myc in AILT, bei denen wir im Gegensatz zu einem Teil der PTCL-NOS stets auf beiden Allelen die Thymin-Variante dieses SNP nachweisen konnten, im Gegensatz zu einem Teil der PTCL-NOS, an diese Promotorregion nicht binden kann.

Die quantitativen Unterschiede in der FAS-Expression, die wir in AILT und PTCL-NOS gesehen haben, auf Unterschiede in den SNPs zurückzuführen, wäre allerdings nach der vorliegenden Datenlage gewagt, da bereits die verschiedenen T-Zell-Entwicklungsstadien, von denen sich diese Tumoren ableiten (siehe 2.3), physiologische Unterschiede in der FAS-Expression aufweisen und sich darüber hinaus zwischen AILT und den Kontrollen keine Unterschiede bezüglich der SNPs nachweisen ließen.

Um dieser Frage weiter nachzugehen, müsste die Stärke der FAS-Expression in den Tumorzellen direkt mit der in reaktiven T-Zellen des entsprechenden Differenzierungsstadiums verglichen werden, was uns allerdings derzeit aus technischen Gründen nicht möglich ist. Bindungsstudien im Hinblick auf eine potentielle Promotorinteraktion mit den Transkriptionsfaktoren AML-1a und c-Myc könnten Hinweise darauf geben, ob der entsprechende Promotor-SNP eventuell doch eine relevante Bedeutung für die FAS-Expression haben könnte.

Bei den fünf untersuchten polymorphen Loci des CTLA-4-Gens konnten wir keine signifikanten Unterschiede zwischen AILT, PTCL-NOS bzw. der Kontrollgruppe nachweisen, wenngleich immunhistochemische Untersuchungen zur CTLA-4 Expression einen signifikanten Unterschied zwischen PTCL-NOS und AILT ergaben. Dies scheint aber in diesem Kontext eher ein Phänomen der unterschiedlichen T-Zell-Differenzierungsstadien zu sein (siehe 2.3), da auch durch Clusteranalysen der kombinierten Genotypen bzw. der CTLA-4 Expression mit den Promotor-SNP-Genotypen keine Assoziationen zu den beiden Lymphomentitäten hergestellt werden konnte.

Die einzige bislang veröffentlichte Arbeit, in der CTLA-4-SNPs in NHL untersucht wurden, ergab zwar Unterschiede in der Häufigkeit des +49AA-Genotyps im Vergleich zur Kontrollgruppe<sup>265</sup>, eine detaillierte Auswertung und insbesondere ein

Vergleich mit unseren Daten ist allerdings bei fehlender Aufschlüsselung nach den einzelnen Lymphomentitäten nicht möglich.

Zusammenfassend konnten wir mittels SNP-Analysen zwar in AILT im Vergleich zu PTCL-NOS Unterschiede in der FAS-Expression in Verbindung mit einem Promotor-SNP bzw. mit kombinierten SNP-Genotypen für das FAS-Gen zeigen, konnten aber weder für das FAS- noch für das CTLA-4-Gen relevante Unterschiede zwischen AILT und Kontrollindividuen nachweisen, die eine Assoziation bestimmter SNPs mit dieser Erkrankung nahelegen.

Um der nach wie vor naheliegenden Hypothese eines Apoptosedefekts als pathogenetisch relevanten Faktor in AILT nachzugehen sind somit weiterführende Untersuchungen der FAS- und CTLA-4-Signalwege und anderer Apoptose-assoziiierter Moleküle nötig.

### 3 Zusammenfassung/Ausblick

Ziel der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen war eine nähere Charakterisierung von peripheren T-Zell-Lymphomen (PTCL). Hierfür wurden im Wesentlichen zwei Ansätze verfolgt:

Im ersten Ansatz sollten für die Tumorzellen der verschiedenen PTCL korrespondierende Normalzellen identifiziert werden, um deren Eigenschaften und Funktionen mit denen der neoplastischen Zellen vergleichen zu können.

Im zweiten Ansatz sollten die hierdurch gewonnenen Erkenntnisse in weiterführende Untersuchungen umgesetzt werden, um Hinweise auf die Mechanismen der Tumorzelltransformation in den verschiedenen PTCL zu erhalten.

Zur Bearbeitung des ersten Ansatzes wurde eine PCR-basierte Methode entwickelt, mit der sich das in den Tumorzellen klonal rearrangierte T-Zell-Rezeptor (TCR)V $\beta$ -Segment bestimmen lässt, um anschließend den Phänotyp der Tumorzellen unter Zuhilfenahme eines gegen dieses Segment gerichteten Antikörpers in immunhistochemischen Mehrfachfärbungen zu definieren. Es konnte gezeigt werden, dass sich angioimmunoblastische T-Zell-Lymphome (AILT) und großzellig anaplastische Lymphome (ALCL) jeweils einer T-Effektorzell-Population und eine Untergruppe der peripheren T-Zell-Lymphome, nicht weiter spezifiziert (PTCL-NOS) einer T-Gedächtniszell-Population zuordnen lassen.

Ausgehend vom Phänotyp bereits bekannter T-Zell-Subpopulationen wurde darüber hinaus versucht, aus der heterogenen Gruppe der PTCL-NOS weitere Untergruppen einem bestimmten T-Zell-Entwicklungsstadium zuzuordnen. Die diesbezüglichen Ergebnisse legen nahe, dass es eine seltene Gruppe von PTCL gibt, die sich von regulatorischen T-Zellen ableitet, und sich durch einen sehr aggressiven Krankheitsverlauf auszeichnet. Diese Erkenntnis könnte in Zukunft Auswirkungen auf das therapeutische Vorgehen, beispielsweise in Form einer individuell abgestimmten, aggressiveren Therapie, haben.

Als wegweisender Nebenbefund der durchgeführten PCR-basierten immunhistochemischen Untersuchungen sind die Ergebnisse der Analysen von ALCL anzusehen. Bei diesen Tumoren konnte gezeigt werden, dass die fehlende Expression von TCR sowie TCR-assoziierten Molekülen trotz des Vorhandenseins klonal rearrangierter TCR ein wesentliches Merkmal dieser Entität darstellt. Diese Erkenntnis stellt eine neue vereinigende Eigenschaft von ALK<sup>-</sup> (anaplastic lymphoma

kinase) und ALK<sup>+</sup> ALCL dar, die insbesondere auch zur Abgrenzung gegenüber anderen CD30<sup>+</sup> PTCL in der Diagnostik herangezogen werden kann. Inwiefern das Fehlen der über den TCR vermittelten Signale, die normalerweise über den JAK/STAT Weg die Proliferation hemmen und letztlich zu Wachstumsstopp und Apoptose führen, auch zur Tumorzelltransformation beiträgt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. TCR-knock-out/down Experimente bzw. die Reexpression eines TCR in entsprechenden ALCL-Zelllinien könnten diese Aspekte weiter beleuchten. Ein weiterer interessanter Aspekt sind die Parallelen zu dem morphologisch ähnlichen Hodgkin-Lymphom, das sich von B-Zellen ableitet, jedoch ebenfalls keinen B-Zellrezeptor (BCR) exprimiert. Das abberante TCR/BCR-Signaling könnte zu der ungewöhnlichen, anaplastischen Morphologie der neoplastischen Zellen in beiden Lymphomen beitragen, da auch Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts durch diese Signalkaskaden vermittelt werden. Hier könnten insbesondere vergleichende Untersuchungen zu einem besseren Verständnis dieser Tumoren beitragen.

Der Befund, dass die Tumorzellen des AILT einen Effektorzellphänotyp aufweisen, hat uns dazu veranlasst, nach Ursachen zu suchen, die in den Tumorzellen die bei diesem Zelltyp zu erwartende Apoptose verhindern. SNP-Analysen und immunhistochemische Untersuchungen der Apoptose-assoziierten CTLA-4- und FAS-Gene bzw. deren Expression haben jedoch keine Hinweise auf einen hier gelegenen Apoptosedefekt ergeben. Es sind somit weiterführende Untersuchungen der FAS- und CTLA-4-Signalwege sowie anderer Apoptose-assoziiierter Moleküle nötig, um der nach wie vor naheliegenden Hypothese eines Apoptosedefekts als pathogenetisch relevanten Faktor in AILT nachzugehen.

Ein anderer Anstoß zu weiterführenden Untersuchungen von AILT, die im Anschluss an die hier beschriebenen Projekte fortgesetzt werden, ergab sich durch Beobachtungen aus den PCR-Experimenten zur Identifizierung der klonal rearrangierten TCRV $\beta$ -Ketten. Die nähere Analyse der PCR-Amplifikate in AILT lässt vermuten, dass in AILT, im Gegensatz zu den anderen PTCL, offenbar relativ häufig mehrere klonale TCR $\beta$ -Rearrangements auftreten, wenngleich noch nicht klar ist inwiefern diese neoplastische oder nicht-neoplastische Klone repräsentieren bzw. nur ein AILT-typisches PCR-Artefakt darstellen.

Diesbezüglich wurde bereits eine umfangreiche PCR-Analyse im Hinblick auf das Vorhandensein mehrerer in AILT, PTCL-NOS und ALCL klonal expandierter T-



Zellpopulationen begonnen.

Aus den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen haben sich zahlreiche neue Aspekte ergeben, die Ausgangspunkt für ein besseres Verständnis der Biologie dieser Erkrankungen sein können. Nicht zuletzt könnten diese Ergebnisse dazu beitragen eine Klassifikation der T-Zell-Lymphome zu erstellen, die sich analog zu der Klassifikation der B-Zell-Lymphome an der korrespondierenden Normalzelle orientiert und letztlich die Diagnostik und Therapie und damit die Prognose dieser Tumoren verbessert.

### **Summary**

The aim of our study was a more specific molecular characterisation of peripheral T-cell lymphomas (PTCL). Towards this goal, we primarily chose two approaches:

The first approach was to identify the normal counterparts of the neoplastic T-cells in different subtypes of PTCL in order to compare the features and functions of normal and neoplastic T-cells.

The second approach dealt with potential mechanisms of tumor cell transformation that may occur in these non-neoplastic counterparts of PTCL during tumorigenesis.

In the first approach, we developed a PCR-based method which allows the identification of the clonally rearranged T-cell receptor (TCR)V $\beta$  segment of the neoplastic T-cells. Subsequent phenotyping of the tumor cells was done with an antibody against this segment performing immunohistochemical double- and triple stains. Angioimmunoblastic T-cell lymphomas (AILT) and anaplastic large cell lymphomas (ALCL) could both be related to effector cells, whereas a subgroup of PTCL not otherwise specified (PTCL-NOS) showed a corresponding memory cell population. Furthermore, based on defined T-cell populations, attempts to assign further subgroups within the heterogeneous group of PTCL-NOS provided evidence of rare cases derived from regulatory T-cells with an aggressive clinical course. In the future, this finding may have implications for the therapeutic management leading to a more individualized therapy.

We gained additional insights from our PCR-based immunohistochemical investigations which may be of major importance for the pathogenesis of ALCL. Specifically, we could demonstrate that the lack of TCR expression and of TCR-associated molecules is an essential feature of this entity, despite the existence of clonally rearranged TCR genes. This perception presents a new unifying feature of

anaplastic lymphoma kinase (ALK)<sup>-</sup> and ALK<sup>+</sup> ALCL, which is particularly useful in discriminating ALCL from other CD30<sup>+</sup> PTCL in the diagnostic setting. Further investigations are needed to clarify to what extent the lack of TCR mediated signals, which normally inhibit proliferation by the JAK/STAT pathway leading to growth arrest and apoptosis, also contributes to tumor cell transformation. TCR-knock-down experiments in normal T-cells and TCR re-expression in corresponding ALCL cell lines might shed additional light on these aspects. The parallels to the morphologically similar Hodgkin lymphoma which is derived from B-cells, are another interesting aspect, since these tumors do not express a B-cell receptor (BCR). The aberrant TCR/BCR signaling could contribute to the abnormal anaplastic morphology of the neoplastic cells in both lymphoma entities, since changes of the cytoskeleton are induced by the TCR/BCR signal cascades as well. Thus, comparative analyses could contribute to a better understanding of these tumors.

The finding of AILT tumor cells showing an effector cell phenotype led us to search for reasons why apoptosis is inhibited in the tumor cells, whereas in normal T-cells of this differentiation state apoptosis generally occurs. Both analyses of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and immunohistochemical studies of the apoptosis-associated CTLA-4 and FAS genes, however, did not provide any evidence of a defective apoptotic pathway based on these SNPs. Therefore, further investigations of the FAS and CTLA-4 pathways as well as other apoptosis-associated molecules are needed to identify factors that result in defective apoptosis of AILT cells.

Additional investigations resulted from our observations of the PCR experiments which we conducted to identify the clonally rearranged TCRV $\beta$  chains in AILT. A detailed analysis of the PCR amplifications in AILT led to the observation that in AILT, in contrast to other PTCL, frequently more than one clonal TCR $\beta$  rearrangement arises. It is not yet clear, however, to what extent these additional clones represent neoplastic or non-neoplastic T-cells or exhibit an AILT typical artefact of the PCR approach, respectively. To address this question, we already started an extensive PCR analysis to search for the existence of multiple clonally expanded T-cell populations in AILT, PTCL-NOS and ALCL.

Our work may help to provide a better understanding of the biology of PTCL and could contribute to the development of an improved classification of T-cell lymphomas, which is based on corresponding normal T-cell counterparts, analogous

to the classification of B-cell lymphomas. An improved molecular characterization of PTCL is a prerequisite for the development of novel therapeutic approaches.

## 4 Literatur

1. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunologie: Spektrum, Akad. Verl.; 2002.
2. Xiong N, Raulet DH. Development and selection of gammadelta T cells. *Immunol Rev.* 2007;215:15-31.
3. Lauritsen JP, Haks MC, Lefebvre JM, Kappes DJ, Wiest DL. Recent insights into the signals that control alphabeta/gammadelta-lineage fate. *Immunol Rev.* 2006;209:176-190.
4. Rowen L, Koop BF, Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science.* 1996;272:1755-1762.
5. Nomenclature for T-cell receptor (TCR) gene segments of the immune system. WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee on TCR Designation. *Immunogenetics.* 1995;42:451-453.
6. Lefranc M, Lefranc G. The T cell receptor facts book. London: Academic Press; 2001.
7. Khor B, Sleckman BP. Intra- and inter-allelic ordering of T cell receptor beta chain gene assembly. *Eur J Immunol.* 2005;35:964-970.
8. Kang J, Raulet DH. Events that regulate differentiation of alpha beta TCR+ and gamma delta TCR+ T cells from a common precursor. *Semin Immunol.* 1997;9:171-179.
9. MacDonald HR, Wilson A. The role of the T-cell receptor (TCR) in alpha beta/gamma delta lineage commitment: clues from intracellular TCR staining. *Immunol Rev.* 1998;165:87-94.
10. Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev.* 2000;177:134-140.
11. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:593-620.
12. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science.* 1998;279:381-384.
13. Campbell JJ, Bowman EP, Murphy K, et al. 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7. *J Cell Biol.* 1998;141:1053-1059.
14. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:745-763.
15. Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol.* 2005;17:326-332.
16. Beverley PC, Daser A, Michie CA, Wallace DL. Functional subsets of T cells defined by isoforms of CD45. *Biochem Soc Trans.* 1992;20:184-187.
17. Michie CA, McLean A, Alcock C, Beverley PC. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature.* 1992;360:264-265.
18. De Jong R, Brouwer M, Hooibrink B, Van der Pouw-Kraan T, Miedema F, Van Lier RA. The CD27- subset of peripheral blood memory CD4+ lymphocytes contains functionally differentiated T lymphocytes that develop by persistent antigenic stimulation in vivo. *Eur J Immunol.* 1992;22:993-999.
19. Hintzen RQ, de Jong R, Lens SM, Brouwer M, Baars P, van Lier RA.

- Regulation of CD27 expression on subsets of mature T-lymphocytes. *J Immunol.* 1993;151:2426-2435.
20. Hamann D, Baars PA, Rep MH, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med.* 1997;186:1407-1418.
  21. Hamann D, Kostense S, Wolthers KC, et al. Evidence that human CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> cells are induced by antigen and evolve through extensive rounds of division. *Int Immunol.* 1999;11:1027-1033.
  22. Tomiyama H, Matsuda T, Takiguchi M. Differentiation of human CD8(+) T cells from a memory to memory/effector phenotype. *J Immunol.* 2002;168:5538-5550.
  23. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999;401:708-712.
  24. Maus MV, Kovacs B, Kwok WW, et al. Extensive replicative capacity of human central memory T cells. *J Immunol.* 2004;172:6675-6683.
  25. Holm TL, Nielsen J, Claesson MH. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells: I. Phenotype and physiology. *Apmis.* 2004;112:629-641.
  26. Somasundaram R, Jacob L, Swoboda R, et al. Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor-beta. *Cancer Res.* 2002;62:5267-5272.
  27. Javia LR, Rosenberg SA. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens. *J Immunother.* 2003;26:85-93.
  28. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10:942-949.
  29. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2004;103:1755-1762.
  30. Viguiier M, Lemaitre F, Verola O, et al. Foxp3 expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>(high)</sup> regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol.* 2004;173:1444-1453.
  31. Janeway CA, Travers P, Walport M. *Immunobiology: B&T*; 2005.
  32. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005;6:345-352.
  33. Dejaco C, Duftner C, Grubeck-Loebenstien B, Schirmer M. Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology.* 2006;117:289-300.
  34. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol.* 2005;6:338-344.
  35. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2006;212:8-27.
  36. Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells. *J Clin Invest.* 2003;112:1437-1443.
  37. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299:1057-1061.

38. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol.* 2005;6:331-337.
39. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 2005;22:329-341.
40. Hori S, Sakaguchi S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect.* 2004;6:745-751.
41. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004;16:1643-1656.
42. Nishimura E, Sakihama T, Setoguchi R, Tanaka K, Sakaguchi S. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004;16:1189-1201.
43. Ono M, Shimizu J, Miyachi Y, Sakaguchi S. Control of autoimmune myocarditis and multiorgan inflammation by glucocorticoid-induced TNF receptor family-related protein(high), Foxp3-expressing CD25+ and CD25-regulatory T cells. *J Immunol.* 2006;176:4748-4756.
44. Gavin M, Rudensky A. Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Curr Opin Immunol.* 2003;15:690-696.
45. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol.* 2002;14:771-778.
46. O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med.* 2004;10:801-805.
47. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:253-257.
48. Ramsdell F. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity.* 2003;19:165-168.
49. Vigouroux S, Yvon E, Biagi E, Brenner MK. Antigen-induced regulatory T cells. *Blood.* 2004;104:26-33.
50. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1989;169:1747-1756.
51. Janssen O, Sanzenbacher R, Kabelitz D. Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell Tissue Res.* 2000;301:85-99.
52. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J.* 1998;17:1675-1687.
53. Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem.* 2001;2:20-29.
54. Strasser A, Puthalakath H, Bouillet P, et al. The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:541-548.
55. Bouillet P, Huang DC, O'Reilly LA, et al. The role of the pro-apoptotic Bcl-2 family member bim in physiological cell death. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;926:83-89.
56. Holtzman MJ, Green JM, Jayaraman S, Arch RH. Regulation of T cell apoptosis. *Apoptosis.* 2000;5:459-471.
57. Houston A, O'Connell J. The Fas signalling pathway and its role in the pathogenesis of cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4:321-326.
58. Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev*

- Immunol. 2007;7:532-542.
59. Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:336-347.
  60. Rudd CE, Schneider H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:544-556.
  61. Saito T, Yamasaki S. Negative feedback of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors. *Immunol Rev.* 2003;192:143-160.
  62. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol.* 2001;1:220-228.
  63. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:116-126.
  64. Pentcheva-Hoang T, Egen JG, Wojnoonski K, Allison JP. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity.* 2004;21:401-413.
  65. Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:65-97.
  66. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*. *Science.* 1995;270:985-988.
  67. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity.* 1995;3:541-547.
  68. Jaffe ES, Hsu T, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.: Lyon: IARC Press; 2001.
  69. Weisenburger DD, Linder J, Armitage JO. Peripheral T-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 42 cases. *Hematol Oncol.* 1987;5:175-187.
  70. Chott A, Augustin I, Wrba F, Hanak H, Ohlinger W, Radaszkiewicz T. Peripheral T-cell lymphomas: a clinicopathologic study of 75 cases. *Hum Pathol.* 1990;21:1117-1125.
  71. Rudiger T, Weisenburger DD, Anderson JR, et al. Peripheral T-cell lymphoma (excluding anaplastic large-cell lymphoma): results from the Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol.* 2002;13:140-149.
  72. Falini B, Bigerna B, Fizzotti M, et al. ALK expression defines a distinct group of T/null lymphomas ("ALK lymphomas") with a wide morphological spectrum. *Am J Pathol.* 1998;153:875-886.
  73. Deleeuw RJ, Zettl A, Klinker E, et al. Whole-genome analysis and HLA genotyping of enteropathy-type T-cell lymphoma reveals 2 distinct lymphoma subtypes. *Gastroenterology.* 2007;132:1902-1911.
  74. Zettl A, deLeeuw R, Haralambieva E, Mueller-Hermelink HK. Enteropathy-type T-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2007;127:701-706.
  75. Müller-Hermelink HK, Ritz M. Malignant Lymphomas and Lymphoproliferative Disorders following Organ Transplantation and Immunomodulatory Therapy. In: Rütger U, Scholl H-J, ed. Secondary Neoplasms following Chemotherapy, Radiotherapy, and Immunosuppression. Vol. 55. Basel: Karger; 2000:117-138.
  76. Kondo T, Kono H, Miyamoto N, et al. Age- and sex-specific cumulative rate and risk of ATLL for HTLV-I carriers. *Int J Cancer.* 1989;43:1061-1064.
  77. Arber DA, Weiss LM, Albuja PF, Chen YY, Jaffe ES. Nasal lymphomas in Peru. High incidence of T-cell immunophenotype and Epstein-Barr virus infection. *Am J Surg Pathol.* 1993;17:392-399.

78. Kanavaros P, Lescs MC, Briere J, et al. Nasal T-cell lymphoma: a clinicopathologic entity associated with peculiar phenotype and with Epstein-Barr virus. *Blood*. 1993;81:2688-2695.
79. Chan JK, Yip TT, Tsang WY, et al. Detection of Epstein-Barr viral RNA in malignant lymphomas of the upper aerodigestive tract. *Am J Surg Pathol*. 1994;18:938-946.
80. Jaffe ES, Chan JK, Su IJ, et al. Report of the Workshop on Nasal and Related Extranodal Angiocentric T/Natural Killer Cell Lymphomas. Definitions, differential diagnosis, and epidemiology. *Am J Surg Pathol*. 1996;20:103-111.
81. Ohshima K, Liu Q, Koga T, Suzumiya J, Kikuchi M. Classification of cell lineage and anatomical site, and prognosis of extranodal T-cell lymphoma -- natural killer cell, cytotoxic T lymphocyte, and non-NK/CTL types. *Virchows Arch*. 2002;440:425-435.
82. Ichimura K, Kagami Y, Suzuki R, et al. Phenotypic analysis of peripheral T/NK cell lymphoma: study of 408 Japanese cases with special reference to their anatomical sites. *Pathol Int*. 2003;53:333-344.
83. Schlegelberger B, Himmler A, Godde E, Grote W, Feller AC, Lennert K. Cytogenetic findings in peripheral T-cell lymphomas as a basis for distinguishing low-grade and high-grade lymphomas. *Blood*. 1994;83:505-511.
84. Schlegelberger B, Feller AC. Classification of peripheral T-cell lymphomas: cytogenetic findings support the updated Kiel classification. *Leuk Lymphoma*. 1996;20:411-416.
85. Zettl A, Rudiger T, Konrad MA, et al. Genomic profiling of peripheral T-cell lymphoma, unspecified, and anaplastic large T-cell lymphoma delineates novel recurrent chromosomal alterations. *Am J Pathol*. 2004;164:1837-1848.
86. Thorns C, Bastian B, Pinkel D, et al. Chromosomal aberrations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma unspecified: A matrix-based CGH approach. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;46:37-44.
87. Alonsozana EL, Stamberg J, Kumar D, et al. Isochromosome 7q: the primary cytogenetic abnormality in hepatosplenic gammadelta T cell lymphoma. *Leukemia*. 1997;11:1367-1372.
88. Lepretre S, Buchonnet G, Stamatoullas A, et al. Chromosome abnormalities in peripheral T-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000;117:71-79.
89. Leich E, Haralambieva E, Zettl A, et al. Tissue microarray-based screening for chromosomal breakpoints affecting the T-cell receptor gene loci in mature T-cell lymphomas. *J Pathol*. 2007.
90. Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23:6306-6315.
91. Gérard-Marchant R HI, Lennert K, Rilke F, Stansfeld AG, van Unnik JAM. Letter: Classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Lancet*. 1974;2:405-408.
92. Lukes RJ. Functional classification of malignant lymphoma of Lukes and Collins. *Recent Results Cancer Res*. 1978;64:19-30.
93. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer*. 1982;49:2112-2135.
94. Stansfeld AG, Diebold J, Noel H, et al. Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet*. 1988;1:292-293.
95. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study



- Group. *Blood*. 1994;84:1361-1392.
96. Cooper MD, Peterson RD, Gabrielsen AE, Good RA. Lymphoid malignancy and development, differentiation, and function of the lymphoreticular system. *Cancer Res*. 1966;26:1165-1169.
  97. Lennert K. *Histopathologie der Non-Hodgkin Lymphome ( nach der Kiel-Klassifikation)*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 1980.
  98. Lennert K, Feller A. *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas (Based on the Updated Kiel Classification) (ed2)*. New York, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1992.
  99. Lukes RJ, Collins RD. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer*. 1974;34:suppl:1488-1503.
  100. Lukes R, Collins R. *Recent Results in Cancer Research*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer; 1974.
  101. Jaffe ES, Harris NL, Diebold J, Muller-Hermelink HK. World Health Organization Classification of lymphomas: a work in progress. *Ann Oncol*. 1998;9 Suppl 5:S25-30.
  102. Jaffe ES, Harris NL, Diebold J, Muller-Hermelink HK. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. A progress report. *Am J Clin Pathol*. 1999;111:S8-12.
  103. De Wolf-Peeters C, Tierens A, Achten R. Normal Histology and Immunoarchitecture of the Lymphohematopoietic system. D M K, ed *Neoplastic Hematopathology (ed2)*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:271-306.
  104. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol*. 1999;10:1419-1432.
  105. Chan JK. Peripheral T-cell and NK-cell neoplasms: an integrated approach to diagnosis. *Mod Pathol*. 1999;12:177-199.
  106. Hastrup N, Hamilton-Dutoit S, Ralfkiaer E, Pallesen G. Peripheral T-cell lymphomas: an evaluation of reproducibility of the updated Kiel classification. *Histopathology*. 1991;18:99-105.
  107. Sng I, Levin A, Jaffe ES, Ng HW, Sim CS, Blattner WB. T-cell lymphoma in Singapore: pathology, clinical findings and association with HTLV-1 antibodies. *Histopathology*. 1992;21:101-113.
  108. Stein H, Mason DY, Gerdes J, et al. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood*. 1985;66:848-858.
  109. Weisenburger DD, Anderson JR, Diebold J, et al. Systemic anaplastic large-cell lymphoma: results from the non-Hodgkin's lymphoma classification project. *Am J Hematol*. 2001;67:172-178.
  110. Foss HD, Anagnostopoulos I, Araujo I, et al. Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and null-cell phenotype express cytotoxic molecules. *Blood*. 1996;88:4005-4011.
  111. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1994;263:1281-1284.
  112. Mason DY, Bastard C, Rimokh R, et al. CD30-positive large cell lymphomas ('Ki-1 lymphoma') are associated with a chromosomal translocation involving 5q35. *Br J Haematol*. 1990;74:161-168.

113. Lamant L, Meggetto F, al Saati T, et al. High incidence of the t(2;5)(p23;q35) translocation in anaplastic large cell lymphoma and its lack of detection in Hodgkin's disease. Comparison of cytogenetic analysis, reverse transcriptase-polymerase chain reaction, and P-80 immunostaining. *Blood*. 1996;87:284-291.
114. Benharroch D, Meguerian-Bedoyan Z, Lamant L, et al. ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood*. 1998;91:2076-2084.
115. Pulford K, Morris SW, Mason DY. Anaplastic lymphoma kinase proteins and malignancy. *Curr Opin Hematol*. 2001;8:231-236.
116. Shiota M, Nakamura S, Ichinohasama R, et al. Anaplastic large cell lymphomas expressing the novel chimeric protein p80NPM/ALK: a distinct clinicopathologic entity. *Blood*. 1995;86:1954-1960.
117. Falini B, Pileri S, Zinzani PL, et al. ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood*. 1999;93:2697-2706.
118. Gascoyne RD, Aoun P, Wu D, et al. Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 1999;93:3913-3921.
119. Kadin ME, Carpenter C. Systemic and primary cutaneous anaplastic large cell lymphomas. *Semin Hematol*. 2003;40:244-256.
120. Frizzera G, Moran EM, Rappaport H. Angio-immunoblastic lymphadenopathy with dysproteinaemia. *Lancet*. 1974;1:1070-1073.
121. Frizzera G, Moran EM, Rappaport H. Angio-immunoblastic lymphadenopathy. Diagnosis and clinical course. *Am J Med*. 1975;59:803-818.
122. Lukes RJ, Tindle BH. Immunoblastic lymphadenopathy. A hyperimmune entity resembling Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 1975;292:1-8.
123. Lukes RJ, Tindle BH. Immunoblastic lymphadenopathy: a prelymphomatous state of immunoblastic sarcoma. *Recent Results Cancer Res*. 1978;64:241-246.
124. Lennert K. [Nature, prognosis and nomenclature of angioimmunoblastic (lymphadenopathy (lymphogranulomatosis X or T-zone lymphoma)]. *Dtsch Med Wochenschr*. 1979;104:1246-1247.
125. Nathwani BN, Rappaport H, Moran EM, Pangalis GA, Kim H. Malignant lymphoma arising in angioimmunoblastic lymphadenopathy. *Cancer*. 1978;41:578-606.
126. Nathwani BN, Rappaport H, Moran EM, Pangalis GA, Kim H. Evolution of immunoblastic lymphoma in angioimmunoblastic lymphadenopathy. *Recent Results Cancer Res*. 1978;64:235-240.
127. Aozasa K, Ohsawa M, Fujita MQ, et al. Angioimmunoblastic lymphadenopathy. Review of 44 patients with emphasis on prognostic behavior. *Cancer*. 1989;63:1625-1629.
128. Schwarze EW, Godde-Salz E, Lennert K. [Cytogenetic findings in Hodgkin's disease, lymphogranulomatosis X and T-zone lymphoma]. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1982;66:127-133.
129. Godde-Salz E, Feller AC, Lennert K. Chromosomal abnormalities in lymphogranulomatosis X (LgrX)/angioimmunoblastic lymphadenopathy (AILD). *Leuk Res*. 1987;11:181-190.
130. Fujita K, Fukuhara S, Nasu K, et al. Recurrent chromosome abnormalities in adult T-cell lymphomas of peripheral T-cell origin. *Int J Cancer*. 1986;37:517-524.
131. O'Connor NT, Crick JA, Wainscoat JS, et al. Evidence for monoclonal T

- lymphocyte proliferation in angioimmunoblastic lymphadenopathy. *J Clin Pathol.* 1986;39:1229-1232.
132. Lipford EH, Smith HR, Pittaluga S, Jaffe ES, Steinberg AD, Cossman J. Clonality of angioimmunoblastic lymphadenopathy and implications for its evolution to malignant lymphoma. *J Clin Invest.* 1987;79:637-642.
  133. Suzuki H, Namikawa R, Ueda R, et al. Clonal T cell population in angioimmunoblastic lymphadenopathy and related lesions. *JpnJCancer Res.* 1987;78:712-720.
  134. Feller AC, Griesser H, Schilling CV, et al. Clonal gene rearrangement patterns correlate with immunophenotype and clinical parameters in patients with angioimmunoblastic lymphadenopathy. *Am J Pathol.* 1988;133:549-556.
  135. Tobinai K, Minato K, Ohtsu T, et al. Clinicopathologic, immunophenotypic, and immunogenotypic analyses of immunoblastic lymphadenopathy-like T-cell lymphoma. *Blood.* 1988;72:1000-1006.
  136. Weiss LM, Strickler JG, Dorfman RF, Horning SJ, Warnke RA, Sklar J. Clonal T-cell populations in angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Am J Pathol.* 1986;122:392-397.
  137. Nakamura S, Suchi T. A clinicopathologic study of node-based, low-grade, peripheral T-cell lymphoma. Angioimmunoblastic lymphoma, T-zone lymphoma, and lymphoepithelioid lymphoma. *Cancer.* 1991;67:2566-2578.
  138. Takagi N, Nakamura S, Ueda R, et al. A phenotypic and genotypic study of three node-based, low-grade peripheral T-cell lymphomas: angioimmunoblastic lymphoma, T-zone lymphoma, and lymphoepithelioid lymphoma. *Cancer.* 1992;69:2571-2582.
  139. Ohshima K, Kikuchi M, Hashimoto M, et al. Genetic changes in atypical hyperplasia and lymphoma with angioimmunoblastic lymphadenopathy and dysproteinaemia in the same patients. *Virchows Arch.* 1994;425:25-32.
  140. Boulland ML, Kanavaros P, Wechsler J, Casiraghi O, Gaulard P. Cytotoxic protein expression in natural killer cell lymphomas and in alpha beta and gamma delta peripheral T-cell lymphomas. *J Pathol.* 1997;183:432-439.
  141. Hodges E, Quin CT, Wright DH, Smith JL. Oligoclonal populations of T and B cells in a case of angioimmunoblastic T-cell lymphoma predominantly infiltrated by T cells of the VB5.1 family. *Mol Pathol.* 1997;50:15-17.
  142. Kanzaki Y, Eura M, Chikamatsu K, et al. Angioimmunoblastic lymphadenopathy-like T-cell lymphoma. A case report and immunologic study. *Auris Nasus Larynx.* 1997;24:199-206.
  143. Ree HJ, Kadin ME, Kikuchi M, et al. Angioimmunoblastic lymphoma (AILD-type T-cell lymphoma) with hyperplastic germinal centers. *Am J Surg Pathol.* 1998;22:643-655.
  144. Knecht H, Odermatt BF, Maurer R, Ruttner JR. Diagnostic and prognostic value of monoclonal antibodies in immunophenotyping of angioimmunoblastic lymphadenopathy/lymphogranulomatosis X. *Br J Haematol.* 1987;67:19-24.
  145. Lakkala Paranko T, Franssila K, Lappalainen K, et al. Chromosome abnormalities in peripheral T-cell lymphoma. *BrJHaematol.* 1987;66:451-460.
  146. Kaneko Y, Maseki N, Sakurai M, et al. Characteristic karyotypic pattern in T-cell lymphoproliferative disorders with reactive "angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia-type" features. *Blood.* 1988;72:413-421.
  147. Doi S, Nasu K, Arita Y, et al. Immunohistochemical analysis of peripheral T-cell lymphoma in Japanese patients. *Am J Clin Pathol.* 1989;91:152-158.

148. Richel DJ, Lepoutre JM, Kapsenberg JG, et al. Epstein-Barr virus in a CD8-positive T-cell lymphoma. *Am J Pathol.* 1990;136:1093-1099.
149. Boni R, Dummer R, Dommann-Scherrer C, et al. Necrotizing herpes zoster mimicking relapse of vasculitis in angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinaemia. *Br J Dermatol.* 1995;133:978-982.
150. Attygalle A, Al-Jehani R, Diss TC, et al. Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. *Blood.* 2002;99:627-633.
151. Cutrona G, Leanza N, Ulivi M, et al. Expression of CD10 by human T cells that undergo apoptosis both in vitro and in vivo. *Blood.* 1999;94:3067-3076.
152. Cutrona G, Ferrarini M. Expression of CD10 by human T cells that undergo apoptosis both in vitro and in vivo. *Blood.* 2001;97:2528.
153. Smith JL, Haegert DG, Hodges E, et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity of peripheral T-cell lymphoma. *Br J Cancer.* 1988;58:723-729.
154. Kagami Y, Suzuki R, Taji H, et al. Nodal cytotoxic lymphoma spectrum: a clinicopathologic study of 66 patients. *Am J Surg Pathol.* 1999;23:1184-1200.
155. Lee SS, Rudiger T, Odenwald T, Roth S, Starostik P, Muller-Hermelink HK. Angioimmunoblastic T cell lymphoma is derived from mature T-helper cells with varying expression and loss of detectable CD4. *Int J Cancer.* 2003;103:12-20.
156. Suchi T, Lennert K, Tu LY, et al. Histopathology and immunohistochemistry of peripheral T cell lymphomas: a proposal for their classification. *J Clin Pathol.* 1987;40:995-1015.
157. Picker LJ, Weiss LM, Medeiros LJ, Wood GS, Warnke RA. Immunophenotypic criteria for the diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol.* 1987;128:181-201.
158. Shih LY, Kuo TT, Dunn P, Liaw SJ. HTLV-I-positive and HTLV-I-negative peripheral T-cell lymphomas in Taiwan Chinese. *Int J Cancer.* 1992;50:186-191.
159. Montalban C, Obeso G, Gallego A, Castrillo JM, Bellas C, Rivas C. Peripheral T-cell lymphoma: a clinicopathological study of 41 cases and evaluation of the prognostic significance of the updated Kiel classification. *Histopathology.* 1993;22:303-310.
160. Nakamura S, Koshikawa T, Koike K, et al. Phenotypic analysis of peripheral T cell lymphoma among the Japanese. *Acta Pathol Jpn.* 1993;43:396-412.
161. Chan JK, Sin VC, Wong KF, et al. Nonnasal lymphoma expressing the natural killer cell marker CD56: a clinicopathologic study of 49 cases of an uncommon aggressive neoplasm. *Blood.* 1997;89:4501-4513.
162. Ng CS, Lo ST, Chan JK. Peripheral T and putative natural killer cell lymphomas commonly coexpress CD95 and CD95 ligand. *Hum Pathol.* 1999;30:48-53.
163. Su IJ, Wang CH, Cheng AL, et al. Characterization of the spectrum of postthymic T-cell malignancies in Taiwan. A clinicopathologic study of HTLV-1-positive and HTLV-1-negative cases. *Cancer.* 1988;61:2060-2070.
164. Krajewski AS, Myskow MW, Cachia PG, Salter DM, Sheehan T, Dewar AE. T-cell lymphoma: morphology, immunophenotype and clinical features. *Histopathology.* 1988;13:19-41.
165. Macon WR, Salhany KE. T-cell subset analysis of peripheral T-cell lymphomas by paraffin section immunohistology and correlation of CD4/CD8 results with flow cytometry. *Am J Clin Pathol.* 1998;109:610-617.
166. Feller AC, Griesser GH, Mak TW, Lennert K. Lymphoepithelioid lymphoma (Lennert's lymphoma) is a monoclonal proliferation of helper/inducer T cells.

- Blood. 1986;68:663-667.
167. Yamashita Y, Yatabe Y, Tsuzuki T, et al. Perforin and granzyme expression in cytotoxic T-cell lymphomas. *Mod Pathol.* 1998;11:313-323.
  168. Krenacs L, Wellmann A, Sorbara L, et al. Cytotoxic cell antigen expression in anaplastic large cell lymphomas of T- and null-cell type and Hodgkin's disease: evidence for distinct cellular origin. *Blood.* 1997;89:980-989.
  169. Geissinger E, Odenwald T, Lee SS, et al. Nodal peripheral T-cell lymphomas and, in particular, their lymphoepithelioid (Lennert's) variant are often derived from CD8(+) cytotoxic T-cells. *Virchows Arch.* 2004;445:334-343.
  170. Rudiger T, Jaffe ES, Delsol G, et al. Workshop report on Hodgkin's disease and related diseases ('grey zone' lymphoma). *Ann Oncol.* 1998;9 Suppl 5:S31-38.
  171. Haioun C, Gaulard P, Bourquelot P, et al. Clinical and biological analysis of peripheral T-cell lymphomas: a single institution study. *Leuk Lymphoma.* 1992;7:449-455.
  172. Geissinger E, Bonzheim I, Krenacs L, et al. Identification of the tumor cells in peripheral T-cell lymphomas by combined polymerase chain reaction-based T-cell receptor beta spectrotyping and immunohistological detection with T-cell receptor beta chain variable region segment-specific antibodies. *J Mol Diagn.* 2005;7:455-464.
  173. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2003;17:2257-2317.
  174. Bonzheim I, Geissinger E, Roth S, et al. Anaplastic large cell lymphomas lack the expression of T-cell receptor molecules or molecules of proximal T-cell receptor signaling. *Blood.* 2004;104:3358-3360.
  175. Marafioti T, Pozzobon M, Hansmann ML, et al. The NFATc1 transcription factor is widely expressed in white cells and translocates from the cytoplasm to the nucleus in a subset of human lymphomas. *Br J Haematol.* 2005;128:333-342.
  176. Kanzler H, Kuppers R, Hansmann ML, Rajewsky K. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med.* 1996;184:1495-1505.
  177. Stein H, Marafioti T, Foss HD, et al. Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood.* 2001;97:496-501.
  178. Fischer P, Nacheva E, Mason DY, et al. A Ki-1 (CD30)-positive human cell line (Karpas 299) established from a high-grade non-Hodgkin's lymphoma, showing a 2;5 translocation and rearrangement of the T-cell receptor beta-chain gene. *Blood.* 1988;72:234-240.
  179. Morgan R, Smith SD, Hecht BK, et al. Lack of involvement of the c-fms and N-myc genes by chromosomal translocation t(2;5)(p23;q35) common to malignancies with features of so-called malignant histiocytosis. *Blood.* 1989;73:2155-2164.
  180. Medema JP, Borst J. T cell signaling: a decision of life and death. *Hum Immunol.* 1999;60:403-411.
  181. Genestier L, Bonnefoy-Berard N, Revillard JP. Apoptosis of activated peripheral T cells. *Transplant Proc.* 1999;31:33S-38S.

182. Lee IH, Li WP, Hisert KB, Ivashkiv LB. Inhibition of interleukin 2 signaling and signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation during T cell receptor-mediated feedback inhibition of T cell expansion. *J Exp Med.* 1999;190:1263-1274.
183. Zamo A, Chiarle R, Piva R, et al. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene.* 2002;21:1038-1047.
184. Zhang Q, Raghunath PN, Xue L, et al. Multilevel dysregulation of STAT3 activation in anaplastic lymphoma kinase-positive T/null-cell lymphoma. *J Immunol.* 2002;168:466-474.
185. Acuto O, Cantrell D. T cell activation and the cytoskeleton. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:165-184.
186. Cannon JL, Burkhardt JK. The regulation of actin remodeling during T-cell-APC conjugate formation. *Immunol Rev.* 2002;186:90-99.
187. Fuller CL, Braciale VL, Samelson LE. All roads lead to actin: the intimate relationship between TCR signaling and the cytoskeleton. *Immunol Rev.* 2003;191:220-236.
188. Allam A, Marshall AJ. Role of the adaptor proteins Bam32, TAPP1 and TAPP2 in lymphocyte activation. *Immunol Lett.* 2005;97:7-17.
189. Hao S, August A. Actin depolymerization transduces the strength of B-cell receptor stimulation. *Mol Biol Cell.* 2005;16:2275-2284.
190. Dorfman DM, Greisman HA, Shahsafaei A. Loss of expression of the WNT/beta-catenin-signaling pathway transcription factors lymphoid enhancer factor-1 (LEF-1) and T cell factor-1 (TCF-1) in a subset of peripheral T cell lymphomas. *Am J Pathol.* 2003;162:1539-1544.
191. Jones D, Dorfman DM. Phenotypic characterization of subsets of T cell lymphoma: towards a functional classification of T cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2001;40:449-459.
192. Jones D, O'Hara C, Kraus MD, et al. Expression pattern of T-cell-associated chemokine receptors and their chemokines correlates with specific subtypes of T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2000;96:685-690.
193. Jones D, Fletcher CD, Pulford K, Shahsafaei A, Dorfman DM. The T-cell activation markers CD30 and OX40/CD134 are expressed in nonoverlapping subsets of peripheral T-cell lymphoma. *Blood.* 1999;93:3487-3493.
194. Dorfman DM, van den Elzen P, Weng AP, Shahsafaei A, Glimcher LH. Differential expression of T-bet, a T-box transcription factor required for Th1 T-cell development, in peripheral T-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol.* 2003;120:866-873.
195. Weng AP, Shahsafaei A, Dorfman DM. CXCR4/CD184 immunoreactivity in T-cell non-Hodgkin lymphomas with an overall Th1- Th2+ immunophenotype. *Am J Clin Pathol.* 2003;119:424-430.
196. Geissinger E, Bonzheim I, Krenacs L, et al. Nodal peripheral T-cell lymphomas correspond to distinct mature T-cell populations. *J Pathol.* 2006;210:172-180.
197. Tsuchiya T, Ohshima K, Karube K, et al. Th1, Th2, and activated T-cell marker and clinical prognosis in peripheral T-cell lymphoma, unspecified: comparison with AILD, ALCL, lymphoblastic lymphoma, and ATLL. *Blood.* 2004;103:236-241.
198. Ishida T, Iida S, Akatsuka Y, et al. The CC chemokine receptor 4 as a novel specific molecular target for immunotherapy in adult T-Cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:7529-7539.
199. Ohshima K, Karube K, Kawano R, et al. Classification of distinct subtypes of

- peripheral T-cell lymphoma unspecified, identified by chemokine and chemokine receptor expression: Analysis of prognosis. *Int J Oncol.* 2004;25:605-613.
200. Asano N, Suzuki R, Kagami Y, et al. Clinicopathologic and prognostic significance of cytotoxic molecule expression in nodal peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:1284-1293.
  201. Ballester B, Ramuz O, Gisselbrecht C, et al. Gene expression profiling identifies molecular subgroups among nodal peripheral T-cell lymphomas. *Oncogene.* 2006;25:1560-1570.
  202. Piccaluga PP, Agostinelli C, Zinzani PL, Baccarani M, Dalla Favera R, Pileri SA. Expression of platelet-derived growth factor receptor alpha in peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified. *Lancet Oncol.* 2005;6:440.
  203. Mahadevan D, Spier C, Della Croce K, et al. Transcript profiling in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, and diffuse large B-cell lymphoma identifies distinct tumor profile signatures. *Mol Cancer Ther.* 2005;4:1867-1879.
  204. Martinez-Delgado B. Peripheral T-cell lymphoma gene expression profiles. *Hematol Oncol.* 2006;24:113-119.
  205. Martinez-Delgado B, Melendez B, Cuadros M, et al. Expression profiling of T-cell lymphomas differentiates peripheral and lymphoblastic lymphomas and defines survival related genes. *Clin Cancer Res.* 2004;10:4971-4982.
  206. Li S, Ross DT, Kadin ME, Brown PO, Wasik MA. Comparative genome-scale analysis of gene expression profiles in T cell lymphoma cells during malignant progression using a complementary DNA microarray. *Am J Pathol.* 2001;158:1231-1237.
  207. Ho JW, Liang RH, Srivastava G. Preferential type 1-1 cytokine gene expressions in peripheral T-cell lymphomas. *Hematol Oncol.* 1999;17:117-129.
  208. Fujii K, Kondo T, Yokoo H, et al. Protein expression pattern distinguishes different lymphoid neoplasms. *Proteomics.* 2005;5:4274-4286.
  209. Uraushihara K, Kanai T, Ko K, et al. Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25+ and CD25- CD4+ glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2003;171:708-716.
  210. Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, et al. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:13031-13036.
  211. Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Bandeira A. On the ontogeny and physiology of regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2001;182:5-17.
  212. Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol.* 2001;166:3008-3018.
  213. Karube K, Ohshima K, Tsuchiya T, et al. Expression of FoxP3, a key molecule in CD4CD25 regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells. *Br J Haematol.* 2004;126:81-84.
  214. Kohno T, Yamada Y, Akamatsu N, et al. Possible origin of adult T-cell leukemia/lymphoma cells from human T lymphotropic virus type-1-infected regulatory T cells. *Cancer Sci.* 2005;96:527-533.
  215. Matsubara Y, Hori T, Morita R, Sakaguchi S, Uchiyama T. Phenotypic and functional relationship between adult T-cell leukemia cells and regulatory T cells. *Leukemia.* 2005;19:482-483.
  216. Gill PS, Harrington W, Jr., Kaplan MH, et al. Treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with a combination of interferon alfa and zidovudine. *N*

- Engl J Med. 1995;332:1744-1748.
217. Taguchi H, Kinoshita KI, Takatsuki K, et al. An intensive chemotherapy of adult T-cell leukemia/lymphoma: CHOP followed by etoposide, vindesine, ranimustine, and mitoxantrone with granulocyte colony-stimulating factor support. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology*. 1996;12:182-186.
  218. Walsh PT, Benoit BM, Wysocka M, Dalton NM, Turka LA, Rook AH. A role for regulatory T cells in cutaneous T-Cell lymphoma; induction of a CD4 + CD25 + Foxp3+ T-cell phenotype associated with HTLV-1 infection. *J Invest Dermatol*. 2006;126:690-692.
  219. Berger CL, Tigelaar R, Cohen J, et al. Cutaneous T-cell lymphoma: malignant proliferation of T-regulatory cells. *Blood*. 2005;105:1640-1647.
  220. Kasprzycka M, Marzec M, Liu X, Zhang Q, Wasik MA. Nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase (NPM/ALK) oncoprotein induces the T regulatory cell phenotype by activating STAT3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:9964-9969.
  221. Thompson C, Powrie F. Regulatory T cells. *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4:408-414.
  222. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389:737-742.
  223. Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets. *J Leukoc Biol*. 2003;74:471-478.
  224. Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev*. 2003;193:70-81.
  225. de Jong D. Molecular pathogenesis of follicular lymphoma: a cross talk of genetic and immunologic factors. *J Clin Oncol*. 2005;23:6358-6363.
  226. Cutrona G, Tasso P, Dono M, et al. CD10 is a marker for cycling cells with propensity to apoptosis in childhood ALL. *Br J Cancer*. 2002;86:1776-1785.
  227. Rassidakis GZ, Jones D, Thomaidis A, et al. Apoptotic rate in peripheral T-cell lymphomas. A study using a tissue microarray with validation on full tissue sections. *Am J Clin Pathol*. 2002;118:328-334.
  228. Rassidakis GZ, Jones D, Lai R, et al. BCL-2 family proteins in peripheral T-cell lymphomas: correlation with tumour apoptosis and proliferation. *J Pathol*. 2003;200:240-248.
  229. Kim J-M, Rüdiger T, Fayyazi A, Müller-Hermelink HK. Distribution of CD10, FAS (CD95) and FASL (CD95L) in Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma--Implications for the Pathogenesis. *J Clin Pathol*. 2002;55:A38.
  230. Lim MS, Straus SE, Dale JK, et al. Pathological findings in human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am J Pathol*. 1998;153:1541-1550.
  231. Ströbel P, Nanan R, Gattenlöhner S, et al. Reversible monoclonal lymphadenopathy in autoimmune lymphoproliferative syndrome with functional FAS (CD95/APO-1) deficiency. *Am J Surg Pathol*. 1999;23:829-837.
  232. Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, et al. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood*. 2001;98:194-200.
  233. Choi Y, Ramnath VR, Eaton AS, et al. Expression in transgenic mice of dominant interfering Fas mutations: a model for human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clin Immunol*. 1999;93:34-45.
  234. Masteller EL, Chuang E, Mullen AC, Reiner SL, Thompson CB. Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. *J Immunol*. 2000;164:5319-5327.



235. Oliveira JB, Fleisher T. Autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2004;4:497-503.
236. Sneller MC, Straus SE, Jaffe ES, et al. A novel lymphoproliferative/autoimmune syndrome resembling murine *lpr/gld* disease. *J Clin Invest.* 1992;90:334-341.
237. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell.* 1995;81:935-946.
238. Puck JM, Sneller MC. ALPS: an autoimmune human lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Semin Immunol.* 1997;9:77-84.
239. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science.* 1995;268:1347-1349.
240. Giordano C, Stassi G, De Maria R, et al. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science.* 1997;275:960-963.
241. Landowski TH, Qu N, Buyuksal I, Painter JS, Dalton WS. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood.* 1997;90:4266-4270.
242. Pensati L, Costanzo A, Ianni A, et al. Fas/Apo1 mutations and autoimmune lymphoproliferative syndrome in a patient with type 2 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology.* 1997;113:1384-1389.
243. Beltinger C, Kurz E, Bohler T, Schrappe M, Ludwig WD, Debatin KM. CD95 (APO-1/Fas) mutations in childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1998;91:3943-3951.
244. Gronbaek K, Straten PT, Ralfkiaer E, et al. Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood.* 1998;92:3018-3024.
245. Jayaraman S, Castro M, O'Sullivan M, Bragdon MJ, Holtzman MJ. Resistance to Fas-mediated T cell apoptosis in asthma. *J Immunol.* 1999;162:1717-1722.
246. Shin MS, Park WS, Kim SY, et al. Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol.* 1999;154:1785-1791.
247. Savinov AY, Tcherepanov A, Green EA, Flavell RA, Chervonsky AV. Contribution of Fas to diabetes development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:628-632.
248. Ma Y, Liu H, Tu-Rapp H, et al. Fas ligation on macrophages enhances IL-1R1-Toll-like receptor 4 signaling and promotes chronic inflammation. *Nat Immunol.* 2004;5:380-387.
249. Maric I, Pittaluga S, Dale JK, et al. Histologic features of sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:903-911.
250. Teachey DT, Manno CS, Axsom KM, et al. Unmasking Evans syndrome: T-cell phenotype and apoptotic response reveal autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Blood.* 2005;105:2443-2448.
251. Mullauer L, Gruber P, Sebinger D, Buch J, Wohlfart S, Chott A. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res.* 2001;488:211-231.
252. Kantarci OH, Hebrink DD, Achenbach SJ, et al. CD95 polymorphisms are associated with susceptibility to MS in women. A population-based study of CD95 and CD95L in MS. *J Neuroimmunol.* 2004;146:162-170.
253. Geleijns K, Laman JD, van Rijs W, et al. Fas polymorphisms are associated

- with the presence of anti-ganglioside antibodies in Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol.* 2005;161:183-189.
254. Nolsoe RL, Kelly JA, Pociot F, et al. Functional promoter haplotypes of the human FAS gene are associated with the phenotype of SLE characterized by thrombocytopenia. *Genes Immun.* 2005;6:699-706.
  255. Lucas M, Zayas MD, De Costa AF, et al. A study of promoter and intronic markers of Apol/Fas gene and the interaction with Fas ligand in relapsing multiple sclerosis. *Eur Neurol.* 2004;52:12-17.
  256. Horiuchi T, Nishizaka H, Yasunaga S, et al. Association of Fas/APO-1 gene polymorphism with systemic lupus erythematosus in Japanese. *Rheumatology (Oxford).* 1999;38:516-520.
  257. Bolstad AI, Wargelius A, Nakken B, Haga HJ, Jonsson R. Fas and Fas ligand gene polymorphisms in primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol.* 2000;27:2397-2405.
  258. Kanemitsu S, Ihara K, Saifddin A, et al. A functional polymorphism in fas (CD95/APO-1) gene promoter associated with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2002;29:1183-1188.
  259. Lai HC, Sytwu HK, Sun CA, et al. Single nucleotide polymorphism at Fas promoter is associated with cervical carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2003;103:221-225.
  260. Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet.* 1996;5:1075-1080.
  261. Ueda H, Howson JM, Esposito L, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature.* 2003;423:506-511.
  262. Braun J, Donner H, Siegmund T, Walfish PG, Usadel KH, Badenhop K. CTLA-4 promoter variants in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *Tissue Antigens.* 1998;51:563-566.
  263. Harbo HF, Celius EG, Vartdal F, Spurkland A. CTLA4 promoter and exon 1 dimorphisms in multiple sclerosis. *Tissue Antigens.* 1999;53:106-110.
  264. Chuang WY, Strobel P, Gold R, et al. A CTLA4<sup>high</sup> genotype is associated with myasthenia gravis in thymoma patients. *Ann Neurol.* 2005;58:644-648.
  265. Monne M, Piras G, Palmas A, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism and susceptibility to non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol.* 2004;76:14-18.
  266. Erfani N, Razmkhah M, Talei AR, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 promoter variants in breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006;165:114-120.
  267. Shastry BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet.* 2002;47:561-566.
  268. Niemela JE, Hsu AP, Fleisher TA, Puck JM. Single nucleotide polymorphisms in the apoptosis receptor gene TNFRSF6. *Mol Cell Probes.* 2006;20:21-26.
  269. Nolsoe RL, Kristiansen OP, Sangthongpitag K, et al. Complete molecular scanning of the human Fas gene: mutational analysis and linkage studies in families with type I diabetes mellitus. *The Danish Study Group of Diabetes in Childhood and The Danish IDDM Epidemiology and Genetics Group. Diabetologia.* 2000;43:800-808.
  270. Do B, Lossos IS, Thorstenson Y, Oefner PJ, Levy R. Analysis of FAS (CD95) gene mutations in higher-grade transformation of follicle center lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2003;44:1317-1323.

271. Torres B, Aguilar F, Franco E, et al. Association of the CT60 marker of the CTLA4 gene with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004;50:2211-2215.
272. Lee SY, Lee YH, Shin C, et al. Association of asthma severity and bronchial hyperresponsiveness with a polymorphism in the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 gene. *Chest.* 2002;122:171-176.
273. Gonzalez-Escribano MF, Rodriguez R, Valenzuela A, Garcia A, Garcia-Lozano JR, Nunez-Roldan A. CTLA4 polymorphisms in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens.* 1999;53:296-300.
274. Bouqbis L, Izaabel H, Akhayat O, et al. Association of the CTLA4 promoter region (-1661G allele) with type 1 diabetes in the South Moroccan population. *Genes Immun.* 2003;4:132-137.
275. Hudson LL, Rocca K, Song YW, Pandey JP. CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a highly significant association with a determinant in the promoter region. *Hum Genet.* 2002;111:452-455.
276. Gough SC, Walker LS, Sansom DM. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2005;204:102-115.
277. Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, Fisfalen ME, Alegre ML, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol.* 2000;165:6606-6611.
278. Ligers A, Teleshova N, Masterman T, Huang WX, Hillert J. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *Genes Immun.* 2001;2:145-152.
279. Anjos S, Nguyen A, Ounissi-Benkalha H, Tessier MC, Polychronakos C. A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *J Biol Chem.* 2002;277:46478-46486.
280. <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>.

## 5 Anhang

### 5.1 Abkürzungen

AILT	„angioimmunoblastic T-cell lymphoma“, angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom
ALCL	„anaplastic large cell lymphoma“, großzellig anaplastisches Lymphom
ALK	„anaplastic lymphoma kinase“
ALPS	autoimmunes Lymphoproliferationssyndrom
AP-1	„activator protein-1“
Apaf-1	„apoptotic protease activating factor-1“
Bak	„Bcl-2 antagonist killer“
Bax	„Bcl-2 associated x protein“
Bcl-2	„B-cell lymphoma 2“
Bid	„BH3-interacting domain death agonist“
Cbl-b	„Cas-Br-M ecotropic retroviral transforming sequence 2“
CCR	„cc-motif receptor“
C-Region	„constant region“, konstante Region
DAG	Diacylglycerin
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
DD	„death domain“
DFF	„DNA fragmentation factor“
DISC	„death inducing signaling complex“
D-Region	„diversity“ Region
EBV	Epstein-Barr Virus
Egr	„early growth response“
ERK	„extracellular-signal regulated kinase“
FADD	„FAS-associated death domain complex“
FASL	FAS-Ligand
Fos	„homologue of Finkel-Biskis-Jenkins murine osteogenic sarcoma virus“
FoxP3	„forkhead box p3“
Fyn	Kinase der Src-Familie
GEF	„guanine-nucleotide exchange factors“
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor

HE	Hämatoxylin-Eosin
HTLV-1	„human T-cell leukaemia virus type 1“, humanes T-Zell-lymphotropes Virus 1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
JAK	Janus Kinase
J-Region	„joining region“, verbindende Region
LAT	„linker of activation in T-cells“
Lck	„leukocyte-specific protein tyrosine kinase“
Lyn	Kinase der Src-Familie
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“
MHC	„major histocompatibility complex“, Haupthistokompatibilitätskomplex
NFAT	„nuclear factor of activated T-cells“
NFκB	„nuclear factor κ-B“
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAS	Perjodsäure Schiff
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKB/AKT	Protein Kinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC-γ	Phospholipase C-γ
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PTCL	„peripheral T-cell lymphoma“, peripheres T-Zell-Lymphom
PTCL-NOS	PTCL „not otherwise specified“, „unspecified“, nicht weiter spezifiziert
Rap1	„Ras related protein 1“
REAL	„Revised European-American Lymphoma“
SHP-2	„Src homology2 (SH2) domain containing protein-tyrosine phosphatase“
SLP-76	„SH2 domain-containing leukocyte-specific phosphoprotein of 76kDa“
SNP	„single nucleotide polymorphism“
SODD	„silencer of death domains“
Src	„v-src avian sarcoma“
STAT	„signal transducers and activators of transcription“

## Anhang

---

T <sub>CM</sub>	„central memory T-cell“, zentrale Gedächtniszelle
TCR	„T-cell receptor“, T-Zell Rezeptor
Tec	„transient erythroblastopenia of childhood“
T <sub>EM</sub>	„effector-memory T-cell“, Effektor-Gedächtniszellen
TF	Transkriptionsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zellen
TUNEL	„terminal transferase dUTP nick end labeling“
V-Region	variable Region
WHO	„World Health Organisation“
ZAP-70	ζ-Ketten assoziiertes Protein mit 70 kDa

## 5.2 Lebenslauf

### Persönliche Information:

Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Geburtstag: 30.04.1978  
Geburtsort: Pforzheim

### Ausbildung:

1984-1988: Grundschule Großvillars  
1988-1997: Melanchthon Gymnasium Bretten, Abschluss Abitur  
1997-2002: Studium der Biologie, Universität Ulm, Abschluss Diplom  
Diplomarbeit in der Abteilung für Humangenetik der  
Universität Ulm, Thema: Untersuchungen zur Induktion  
eine adaptiven Schutzes gegen DNA-schädigende  
Substanzen durch hyperbaren Sauerstoff in menschlichen  
Lymphozyten und kultivierten Lungenzellen  
2002-2003: Geprüfte Hilfskraft in der Abteilung für Humangenetik der  
Universität Ulm  
2003-2007: Dissertation am Pathologischen Institut der Universität  
Würzburg

### Tätigkeiten neben dem Studium:

2000-2002: Wissenschaftliche Hilfskraft im Praktikum Biologie für  
Mediziner, Universität Ulm  
2000: Wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung Allgemeine  
Zoologie und Endokrinologie, Universität Ulm

Würzburg, den 27.03.2008

Irina Bonzheim

### 5.3 Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Thomas Rüdiger. Sein unerschöpflicher Ideenreichtum und seine offene und freundschaftliche Art haben entscheidend zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen. Ganz besonders danke ich ihm auch für seine Großzügigkeit und Verlässlichkeit, sein Vertrauen und sein Verständnis. Er ließ mir bei der Durchführung der Experimente sehr viel Freiraum und hat es verstanden, mir Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten zu vermitteln. Nicht zuletzt möchte ich mich dafür bedanken, dass ich mit ihm zu dem EHA-Kongress nach Thessaloniki fahren konnte, auf dem ich wichtige Eindrücke gesammelt habe und an den ich sehr gerne zurückdenke.

Herrn Prof. Dr. Thomas Raabe danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats und sein Interesse an meiner Arbeit.

Ein besonders großer Dank gebührt Frau Dr. Eva Geissinger für ihre freundschaftliche, kompetente Betreuung und Unterstützung auch ganz besonders in der Endphase der Arbeit. Ihr zu jeder Zeit offenes Ohr, ihre ständige Bereitschaft Hilfestellungen zu geben und die vielen Ideen und Ratschläge während der ganzen Zeit haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Mit ihrer wissenschaftlichen Sorgfalt und ihrem herzlichen Umgang mit Mitarbeitern bleibt sie mir auch weiterhin in meiner beruflichen Laufbahn ein Vorbild.

Herrn Prof. Dr. Hans-Konrad Müller-Hermelink danke ich für die Anstellung am Pathologischen Institut und vor allem für Bereitstellung und Finanzierung meiner Doktorandenstelle im 3. und 4. Jahr.

Ganz besonders herzlich möchte ich auch Frau Sabine Roth danken, für die beste freundschaftliche Zusammenarbeit, die man sich im Labor wünschen kann und für ihre Bereitwilligkeit in verschiedensten Projekten mitzuarbeiten und mit ihrer koordinierten Art Dinge zügig zu Ende zu bringen. Sie hat mich immer mit Rat und Tat unterstützt, und nicht zuletzt hat auch ihre große Kompetenz bezüglich immunhistochemischer Färbungen aller Art sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ein großes Dankeschön auch an Frau Tina Grieb, für die Unterstützung im Labor in der letzten Zeit meiner Arbeit.

Danken möchte ich auch allen anderen Mitarbeitern im Labor für ihre Hilfsbereitschaft und freundschaftliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre, besonders Frau Claudia Siehndel für die Einführung in die Fragmentanalyse und die Kaffeepausen, Frau Margrit Bonengel für molekularbiologische Tips und den Verleih ihrer Gelkammer und Frau Eva Bachmann für die Unterstützung in der Zellkultur.

Frau Helga Seifert hat nie Mühen und Engagement für eine schnelle Literaturbeschaffung gescheut und mir bei verschiedenen Fragestellungen weitergeholfen. Herrn Erwin Schmitt möchte ich für die nette Zusammenarbeit, was die Bildbearbeitung für Poster und Publikationen betrifft, danken.

Weiterhin möchte ich der Arbeitsgruppe Serfling für viele gute Ratschläge und die Möglichkeit, ihrem Literaturseminar beiwohnen zu können, danken. Ich danke vor



allem auch Herrn Priv.-Doz. Dr. Alois Palmethofer für seine Hilfsbereitschaft und dafür, dass er mir immer wieder ein wertvoller Ansprechpartner war.

Vielen lieben Dank an Frau Dr. Martina Hartmann für das Korrekturlesen dieser Arbeit, ihre mentale Unterstützung, viele Ratschläge und viele Kaffeepausen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, dafür dass sie meine Ausbildung immer selbstverständlich unterstützt haben und jeder Zeit hinter mir stehen und bei Marcus für seine liebevolle Unterstützung und kontinuierliche Ermutigung besonders in harten Zeiten, bedanken.

In den ersten zwei Jahren wurde meine Stelle sowie das Verbrauchsmaterial aus Fördermitteln der Dr. Mildred Scheel Stiftung für Krebsforschung der Deutschen Krebshilfe (Antragsnummer 70-3131-Rü 1) finanziert.

## **5.4 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den 27.03.2008

Irina Bonzheim