

Aus dem Institut für Pathologie
(Direktor: Prof. Dr. med. C. Röcken)
Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister
(Leiter: Prof. Dr. med. W. Klapper)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Das Mikroenvironment des Follikulären Lymphoms
zum Zeitpunkt der Primärdiagnose
und des Rezidivs**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Nina Marlen Böhling

aus Bergisch Gladbach

Kiel 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Klapper

2. Berichterstatter: PD Dr. M. Neumann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2021

Zum Druck genehmigt, den 21.01.2021

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhalt

Abkürzungen	II
1 Einleitung	1
1.1 Follikuläre Lymphome	1
1.2 FoxP3	4
1.3 PD-1	5
1.4 CD-68	7
1.5 CD-21	8
1.6 Fragestellung und Ziele	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Gewebeproben	11
2.2 Immunhistochemische Färbung	12
2.2.1 Manuelle immunhistochemische Färbung	12
2.2.2 Automatisierte immunhistochemische Färbung	14
2.3 Manuelle Auswertung der konventionellen immunhistochemischen Färbungen	17
2.4 Statistische Analyse	18
3 Ergebnisse	19
3.1 Patientenkollektiv	19
3.2 Verteilung FoxP3 und PD-1 positiver Zellen im malignen lymphatischen Gewebe	21
3.3 Dynamik FoxP3 und PD-1 positiver Zellen zwischen Primärdiagnose und Rezidiv	22
3.4 Dynamik CD-68 positiver Zellen zwischen Primärdiagnose und Rezidiv	25
3.5 Verteilung und Dynamik CD-21 positiver follikulär dendritischer Zellen zwischen Primärdiagnose und Rezidiv	26
4 Diskussion	30
5 Zusammenfassung	36
6 Literaturverzeichnis	38
Danksagung	52

Abkürzungen

ADCP	antibody dependent cellular phagocytosis
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
BAX	Bcl2-associated X Protein
Bcl2	B-cell lymphoma 2
°C	Grad Celcius
CD	Cluster of differentiation
CHOEP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Etoposid und Prednisolon
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon
CR	Komplement-Rezeptor
CRSP3	Cysteineandglycine-richprotein 3
CVP	Cyclophosphamid, Vincristin und Prednisolon
DAB	Diaminobenzidin
DHAP	Dexamethason, high dose Ara Cytarabine und Platinol
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
FDC	Follikulär dendritische Zellen
FL	Follikuläres Lymphom
FLIPI	Follicular lymphoma international prognostic index
FoxP3	Forkhead Box Protein 3
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure

H_2O_2	Wasserstoffperoxid
IPEX	Immune dysregulation, polyendocrinopathy, entropathy and x-linked heritage-Syndrom
LAMP	lysosomal-assozierte Membranproteine
LDH	Laktatdehydrogenase
MAP3k7	Mitogen-activatedproteinkinasekinasekinase 7
mg	Milligramm
min.	Minuten
mRNA	Messenger ribonucleicacid
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NSCLC	Non-small Cell Lung Cancer
PD-1	Programmed Death 1
pH	potential Hydrogenii
RCA	Regulators of complement activation
R-CHOP	Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon
R-CVP	Rituximab, Cyclophosphamid, Vincristin und Prednisolon
TAM	Tumor-assozierte Makrophagen
TMA	Tissue Micro Array
T_{FH}	follikuläre T-Helper Zellen
T_{reg}	regulatorische T-Zellen
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

WHO World Health Organisation

XLAAD X-linked autoimmunity-allergic dysregulation-Syndrome

1. Einleitung

1.1 Follikuläre Lymphome

In der WHO-Klassifikation der Tumore des hämatopoetischen Systems wird das follikuläre Lymphom (FL) der Gruppe der reifzelligen B-Zell-Neoplasien zugeordnet und stellt in den westlichen Ländern die zweithäufigste Untergruppe der B-Zell-Lymphome dar (Swerdlow SH et al., 2008). Follikuläre Lymphome gehören zu den indolenten Non-Hodgkin-Lymphomen. Der Krankheitsverlauf ist sehr heterogen. Typischerweise zeigt sich ein langsamer Krankheitsverlauf mit vielen, in Frequenz zunehmenden Rezidiven und abnehmender Therapiesensibilität. Die meisten Lymphome weisen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits ein fortgeschrittenes Stadium auf (Project, 1997), dabei liegt die mittlere Überlebensrate bei 10 Jahren (Horning and Rosenberg, 1984; Johnson et al., 1995). Über 30 Prozent der follikulären Lymphome transformieren histologisch innerhalb von 15 Jahren in ein diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, welches mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf assoziiert ist (Montoto et al., 2007). Klinisch kann das follikuläre Lymphom nach der Ann-Arbor Klassifikation eingeteilt werden. Entsprechend der Krankheitsausbreitung wird die Neoplasie in vier Stadien unterteilt. Bei den Stadien 1 und 2 ist die Neoplasie auf eine Seite des Zwerchfells begrenzt, bei den Stadien 3 und 4 hat sich die Neoplasie auf beide Seiten des Zwerchfells ausgebreitet und gilt als fortgeschrittene Erkrankung. Der internationale Prognoseindex für follikuläre Lymphome (FLIPI) bieten eine klinische Einteilung, um eine Aussage über den Krankheitsverlauf des follikulären Lymphoms zu treffen. Er beinhaltet die Ann-Arbor-Klassifikation, das Alter des Patienten, die Anzahl der betroffenen Lymphknoten, den Lactat Dehydrogenase Spiegel (LDH) und die Hämoglobin Konzentration. Mithilfe dieser klinischen Daten wird der Patient in eines der drei Risikoprofile eingeteilt (Buske et al., 2006; Solal-Céliney et al., 2004). Follikuläre Lymphome sind vorwiegend im Lymphknoten lokalisiert, befallen aber auch extranodale Standorte. Daten der deutschen Studiengruppe für niedrig-graduierte Lymphome konnte zeigen, dass 67% der follikulären Lymphome das Knochenmark, 36% die Milz und 3% den Waldeyer Rachenring infiltrieren. Auch extralymphatische Gewebe wie der Gastrointestinaltrakt (7%), die Leber (7%), die Lunge (5%) und die Haut können befallen sein (Klapper and Wacker, 2007). Es gibt eine Reihe von Therapieoptionen wie die Chemotherapie, die Immunchemotherapie und die myeloablativen Therapie mit

darauffolgender Stammzelltransplantation. Die Einführung der Behandlung mit dem monoklonalen Anti-CD-20 Antikörper hat zu einer Besserung des klinischen Verlaufs bezüglich des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens geführt (Hiddemann et al., 2005). Das folliculäre Lymphom gehört zu den Tumoren der Keimzentrum-B-Zellen bestehend aus Centrozyten und Centroblasten. Anhand des Gehaltes an Centroblasten wird das folliculäre Lymphom histologisch in drei Grade eingeteilt; dazu werden Hämatoxilin-Eosin-gefärbte Präparate pro mikroskopisches Gesichtsfeld in 400-facher Vergrößerung untersucht: Eins bis fünf Centroblasten Grad 1, 6-15 Centroblasten Grad 2 und Grad 3 mit mehr als 15 Centroblasten pro Gesichtsfeld. Grad 3 wird weiter unterteilt in einen Grad 3A. Neben Centroblasten sind bei Grad 3A noch Centrozyten anwesend. Bei Grad 3B kommen ausschließlich Centroblasten vor. Im Hinblick auf den Immunphänotyp und die genetischen Eigenschaften zeigen folliculäre Lymphome mit dem Grad 1/2 und Grad 3A auf der einen Seite und auf der anderen Seite folliculäre Lymphome mit dem Grad 3B und das diffus großzellige B-Zell-Lymphom eine enge Assoziation (Horn et al., 2011; Koch et al., 2016; Ott et al., 2002). Während man ursprünglich davon ausging, dass höhere Grade eines folliculären Lymphoms mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert sind (Swerdlow SH et al., 2008), konnten jüngere Arbeiten zeigen, dass Grad 3A und 3B eines folliculären Lymphoms einen günstigeren Krankheitsverlauf aufweisen (Maeshima et al., 2013; Wahlin et al., 2014), insbesondere unter Immunchemotherapie (Ganti et al., 2006; Wahlin et al., 2012). Die charakteristische genetische Veränderung des folliculären Lymphoms ist die Translokation t(14;18)(q32,q21) (Fukuhara et al., 1979; Yunis et al., 1982). Sie vollzieht sich bereits bei der Entstehung der B-Zellen im Knochenmark (Küppers and Dalla-Favera, 2001). Durch die Translokation t(14;18) (q32,q21) gelangt das anti-apoptotisch wirkende BCL2-Gen in die sterische Nähe zu dem in B-Zellen stark exprimierten Immunglobulinschwerkettengen. Durch die Translokation t(14;18)(q32,q21) kommt es zu einer Überexpression des BCL2-Gens (Küppers and Dalla-Favera, 2001). Die Translokation t(14;18)(q32,q21) alleine führt nicht obligat zur Entstehung eines folliculären Lymphoms; die Anzahl an B-Zellen im Blutsystem, welche die Translokation tragen, nimmt im Alter zu, ohne dass die Patienten zwangsläufig ein Lymphom entwickeln (Roulland et al., 2005; Schüler et al., 2005). Selbst Patienten, deren t(14;18)(q32,q21)-positive B-Zellen in das Keimzentrum eintreten, bleiben oft gesund (Roulland et al., 2006). Während in frühen Stadien nur bei 50% der

follikulären Lymphome die Translokation t(14;18) vorliegt, lässt sich in fortgeschrittenen Stadien die Translokation bei 85% der follikulären Lymphome nachweisen. Die Abwesenheit der Translokation in frühen Stadien lässt alternative molekulare Mechanismen in der Pathogenese des follikulären Lymphoms vermuten (Leich et al., 2016). Zu weiteren Mechanismen, die das physiologische Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose beeinträchtigen, gehören eine verminderte Beseitigung des BCL2-Gens durch BAX, eine fehlerhafte FAS vermittelte Apoptose oder fehlerhafte anti-apoptotisch wirkende Proteine (Akyurek et al., 2006; Schwaenen et al., 2009). In der Tumorgenese sind darüber hinaus eine verminderte Expression des CRSP3 Gens, welches als Metastasensuppressor fungiert und das MAP3K7 Gen beteiligt, welches in den Signalweg der NF-kappaB-Aktivierung involviert ist (Schwaenen et al., 2009). Es wird angenommen, dass follikuläre Lymphome aus Zellen des Keimzentrums entstehen (Swerdlow SH et al., 2008). Diese Annahme stützt sich auf die Beobachtung, dass bei reaktiven Keimzentren und malignen Follikeln Ähnlichkeiten bezüglich des histologischen Wachstumsmusters, der Zytologie und des Immunphänotyps gibt. Das follikuläre Lymphom scheint auch das Mikroenvironment des physiologischen Keimzentrums zu imitieren. So zeigen sich im Mikroenvironment des follikulären Lymphom die gleichen nicht-neoplastischen Zellen wie im reaktiven Keimzentrum (Klapper, 2011). Zu den nicht-neoplastischen Zellen gehören follikuläre T-Helfer-Zellen (Carreras et al., 2009; Wahlin et al., 2010) regulatorische T-Zellen (Carreras et al., 2009), zytotoxische T-Zellen (Wahlin et al., 2007), Mastzellen (Taskinen et al., 2008), follikuläre dendritische Zellen (Jong et al., 2009), Makrophagen (Farinha et al., 2005) und Blutgefäße (Farinha et al., 2010c). Dieses sogenannte Mikroenvironment ist in seiner Zusammensetzung heterogen mit der Prognose assoziiert. Diese mittels Genexpression und Immunhistochemie erhobenen Ergebnisse werden kontrovers diskutiert. Die Arbeitsgruppe hat in vorausgegangenen Arbeiten darstellen können, dass die Zusammensetzung des Mikroenvironments mit dem Krankheitsstadium zum Zeitpunkt der Diagnose korreliert. Anhand ihrer Ausbreitung im Körper werden follikuläre Lymphome in Ann-Arbor-Stadien unterteilt. In frühen Stadien, also lokalisierten follikulären Lymphomen ähnelt das Mikroenvironment einem physiologischen Keimzentrum d.h. es zeigt sich ein hoher Gehalt an follikulären T-Helfer-Zellen und ein niedrigerer Gehalt an regulatorischen T-Zellen im Vergleich zu späten Stadien (Koch et al., 2012). Bei dem follikulären Lymphom als einer langsam

wachsenden, klinisch oft lange inapparanten Neoplasie, könnte dies mit der Dauer der Krankheitsausbreitung und Evolution gleichzusetzen sein. Aus dieser Beobachtung ist die Hypothese abgeleitet worden, dass das Mikroenvironment des follikulären Lymphoms, ähnlich wie die Lymphomzellen selbst, einer Evolution über die Zeit unterliegen (Loeffler et al., 2015; Okosun et al., 2014). Zur Darstellung des Mikroenvironments follikulärer Lymphome haben sich folgende Marker als günstig erwiesen: Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) als Marker für regulatorische T-Zellen, Programmed Death-1 (PD-1) um follikuläre T-Helfer-Zellen zu detektieren, Cluster of Differentiation 68 (CD-68) als Marker für Makrophagen und Cluster of Differentiation 21 (CD-21) um follikuläre dendritische Zellen zu erfassen.

1.2 FoxP3

FoxP3 ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und codiert für den Forkhead-winged-helix-Transkriptionsfaktorregulator (Brunkow et al., 2001). Der Transkriptionsfaktor FoxP3 stellt einen spezifischen immunhistochemischen Marker für T-regulatorische Zellen dar (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003).

Untersuchungen konnten zeigen, dass die Expression von FoxP3 sich in erster Linie auf die CD25⁺CD4⁺-T-regulatorischen- Zellen im Thymus und in der Peripherie beschränkt. Die FoxP3-Expression in CD25⁺CD4⁺-T-Zellen korreliert mit der regulatorischen Funktion der Zellen (R.Walker et al., 2003). Eine Transduktion von FoxP3 führt in naiven T-Zellen zu einer herabgesetzten Ansprechbarkeit auf eine T-Zell-Rezeptor (TCR)- Stimulation, einer Inhibierung der Zytokinproduktion und einer Hochregulierung von Zelloberflächenmolekülen, die in CD25⁺CD4⁺-T-regulatorischen Zellen eine regulatorische Funktion übernehmen (Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 1998). Diese Untersuchungen unterstützen die Hypothese über die Wichtigkeit des FoxP3-Gens in regulatorischen Funktionen der CD25⁺CD4⁺-T-regulatorischen-Zellen (Hori et al., 2003). Bei Mutationen im FoxP3-Gen entwickeln sich bei Patienten und im Scurfy Mausstamm zahlreiche Autoimmunerkrankungen, wie das sog. „immune dysregulation, polyendocrinopathy enteropathy and x-linked heritage Syndrome“ (IPEX) oder das „X-linked autoimmunity-allergic dysregulation-Syndrome“ (XLAAD) (Bennett et al., 2001; Brunkow et al., 2001; Chatila et al., 2000; Wildin et al., 2001). Ein Charakteristikum vieler solider Tumore und hämatologischer

Neoplasien ist ein erhöhter Gehalt an regulatorischen T-Zellen (Beyer and Schultze, 2006). Bereits 1980 wurde beschrieben, dass T-Zellen in Mäusen verantwortlich sind für die Unterdrückung der immunologischen Anti-Tumorantwort (Berendt and North, 1980) sowie die Unterdrückung der autologen zytotoxischen antitumoralen Immunantwort (Chakraborty et al., 1990). Die Rolle von FoxP3 in follikulären Lymphomen wurde von einigen Arbeitsgruppen untersucht. Es zeigte sich, dass ein hoher Gehalt bzw. bestimmte Infiltrationsmuster von FoxP3-positiven Zellen einen günstigen Einfluss auf den klinischen Verlauf der Krankheit aufwiesen. (Carreras et al., 2006; Farinha et al., 2010a; Glas et al., 2007; Lee et al., 2006a; Tzankov et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit ist Fox-P3 der Biomarker für regulatorische T-Zellen.

1.3 PD-1

Programmed-death-1 (PD-1) ist ein Mitglied der immunglobulinen Superfamilie (Ishida et al., 1992). Im Mausmodell ist die Expression der PD-1 mRNA auf den Thymus beschränkt und nimmt durch einen induzierten T-Zelltod (Injektion von monoklonalen CD-3 Antikörpern anti-CD3 mAb) zu. Man geht also davon aus, dass die Aktivierung des PD-1 Gens in den Ablauf des programmierten Zelltods involviert ist (Ishida et al., 1992). Die PD-1 Expression ist aber nicht obligat für den Apoptose-Signalweg (Agata et al., 1996). Die Expression des homologen humanen hPD-1 korreliert hingegen vielmehr mit der Aktivierung und funktionellen Differenzierung von T-Zellen (Vibhakar et al., 1997). Eine Aktivierung von T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen induziert die Expression von PD-1 (Folkl and Bienzle, 2010). PD-1 wird von Immunzellen einschließlich B- und T-Zellen exprimiert, aber auch von Zellen, die nicht dem Immunsystem zugehörig sind (Folkl and Bienzle, 2010). Über seine Liganden PD-L1 und PD-L2 ist das PD-1-Protein an inhibitorischen Signalwegen beteiligt (Nishimura and Honjo, 2001). Bei der physiologischen adaptiven Immunantwort auf exogene Antigene werden PD-1 und PD-L1 auf aktivierten T-Zellen hochreguliert (Keir et al., 2008). Die Bindung von PD-L1 oder PD-L2 an den PD-1 Rezeptor führt in T-Zellen zur Hemmung der Proliferation und Zytokinproduktion (Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001). So wird die Induktion der Anergie, Toleranz und der programmierte Zelltod erleichtert,

indem das Ausmaß und die Dauer der Immunantwort begrenzt wird (Keir et al., 2008). Eine Reihe von Neoplasien exprimieren PD-L1. Darauf basierend haben Ishida et al. die Hypothese aufgestellt, dass PD-L1 die Tumorzellen bei dem Entkommen vor dem Immunsystem unterstützt (M. Ishida, et al., 2002). PD-1 ist in die Regulierung von Autoimmunerkrankungen involviert. So entwickeln PD-1 defiziente Mäuse Lupus ähnliche Autoimmunerkrankungen oder autoimmune Kardiomyopathien (Nishimura et al., 2001, 1999). Basierend auf ihrer Funktion sind monoklonale PD-1-Antikörper vielversprechende Therapeutika in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen, AIDS, Transplantationsabstoßung (Okazaki and Honjo, 2007), hämatologischen Neoplasien (Berger et al., 2008) und Bronchialkarzinomen. Anti-PD-L1 Antikörper spielen eine relevante Rolle in der Therapie vieler solider Tumore zum Beispiel dem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC). Die Inhibition des Liganden PD-L1 führt zu einer Tumorregression und stabilisiert die Krankheit langanhaltend (Brahmer et al., 2012). PD-1 ist ein Marker für T-Zellen des Keimzentrums (follikuläre T-Helfer Zellen) in reaktiven und neoplastischen lymphatischen Gewebe (Roncador et al., 2007). Dorfman et al. konnten die Expression PD-1 positiver Zellen im angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphom nachweisen, dabei exprimierten Tumor assoziierte follikuläre dendritische Zellen dieser Tumorentität PD-L1, den Liganden von PD-1 (Dorfman et al., 2006). Während das klassische und das Lymphozyten-prädominante Hodgkin-Lymphom sich nicht immunoreaktiv für PD-1 zeigten, exprimierten die Rosetten des Lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphom, welche die neoplastischen Zellen umgeben, PD-1 (Dorfman et al., 2006). In follikulären Lymphomen sind PD-1 positive Zellen Teil des sogenannten Mikroenvironment. Während in der Arbeit von Carreras et al. der Gehalt an PD-1 positiven Zellen mit einer guten Prognose assoziiert ist (Carreras et al., 2009), zeigte sich bei Richendollar et al. eine Assoziation mit einer schlechten Prognose (Richendollar et al., 2011). Smeltzer et al. konnte zeigen, dass das Verteilungsmuster PD-1-positiver Zellen Einfluss auf die Prognose hat. Ein diffuses Verteilungsmuster war mit einer schlechten Prognose assoziiert (Smeltzer et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit ist PD-1 der Biomarker für follikuläre T- Helfer-Zellen.

1.4 CD-68

CD-68 ist ein transmembranes Glykoprotein vom Typ 1 (Holness and Simmons, 1993). CD-68 zeigt strukturelle Ähnlichkeiten mit den Lysosomal-assoziierten Membranproteinen (LAMP's) und gehört zu der LAMP-Familie der Glykoproteinen (Holness et al., 1993). Das humane CD-68 Gen ist auf dem Chromosom 17p13 lokalisiert (Holness and Simmons, 1993). Das Intron 1 dient als spezifischer Makrophagen Transkriptions-Enhancer (Greaves et al., 1998). Über die Funktion von CD-68 ist wenig bekannt, aber sein Vorkommen in Endosomen suggeriert eine Rolle im Peptidtransport oder in der Antigenentwicklung (Barois et al., 2002). CD-68 ist bekannt als spezifischer myeloischer Oberflächenmarker und wird hauptsächlich von Makrophagen exprimiert (Betjes et al., 1991). Die CD-68 Expression zusammen mit weiteren Makrophagen spezifischen Genen werden in Progenitorzellen durch Wachstumsfaktoren wie M-CSF und GM-CSF während der Differenzierung zwischen der lymphoiden und myeloischen Zellreihe induziert (Greaves and Gordon, 2002; Kondo, 2010). Im geringen Ausmaß wird CD-68 in CD-19 positiven B-Lymphozyten und CD-4 positiven T-Lymphozyten exprimiert. Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen weisen eine CD-68 Expression in ihren Granulozyten auf (Amanzada et al., 2013) auf. Auch Zellen, die nicht dem hämatopoetischen System zugehörig sind, einschließlich Fibroblasten, Endothelzellen (Gottfried et al., 2008) und Muskelzellen in Aterienwänden (Andreeva et al., 1997), exprimieren im geringen Ausmaß CD-68. Myeloische und nicht-myeloische Zellen verwenden verschiedene Promoter. Dies erklärt die Unterschiede im CD-68-Expressionslevel (Chistiakov et al., 2016). CD-68 identifiziert Makrophagen und wird häufig in Neoplasien als diagnostischer und prognostischer immunhistochemischer Marker verwendet (Chistiakov et al., 2016). Makrophagen haben das Potenzial für eine pro- sowie antitumorale Aktivität. Das Mikroenvironment des Tumors vermittelt den Wechsel des Phänotyps der Makrophagen von einem proinflammatorischen und antitumoralen wirkenden Typ 1 (M1) hin zu einem antiinflammatorischen Tumor fördernden Typ 2 (M2) (Mantovani et al., 2006). M1 polarisierte Makrophagen wirken proinflammatorisch und spielen eine Rolle in der Phagozytose, der Antigenentwicklung, der Antigenpräsentation und induzieren die Differenzierung von TH1 T-Zellen (Mantovani et al., 2002; Mills et al., 2000). CD-68 positive Zellen, sogenannte Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs), die

Charakteristika des Makrophagen Typ 2 Phänotypus aufweisen, wirken antiinflammatorisch. Sie sezernieren Moleküle, welche die Akkumulation von antitumoral wirkenden Zellen, z.B. zytotoxische CD-8⁺-T-Zellen, im Tumor verhindern und rekrutieren weitere antiinflammatorisch wirkende Zellen z.B. regulatorische T-Zellen (Coffelt et al., 2009; Dunn et al., 2004; Savage et al., 2008). Zudem erleichtern TAMs die hämatogene und lymphogene Metastasierung von Tumoren (Dunn et al., 2004; Goswami et al., 2005; Wyckoff et al., 2004). Auch fördern TAMs die Angiogenese und Lymphangiogenese, indem sie proangiogenetische Faktoren, z.B. VEGF in hypoxischen Geweben und pro-lymphangiogenetische Faktoren hochregulieren (Coffelt et al., 2009; Goerdt et al., 1999; Schoppmann et al., 2002; Solinas et al., 2009). Die Rolle von Makrophagen im Mikroenvironment des follikulären Lymphoms wird kontrovers diskutiert. Eine Zusammensetzung mit prädominant Makrophagen wurde sowohl mit einer guten (Dave et al., 2004) als auch mit einer schlechten Prognose (Blaker et al., 2016) assoziiert. Die Auswirkungen der Makrophagen auf den Verlauf der Erkrankung hängt von der Art der Behandlung ab (Kridel et al., 2015). Im klassischen Hodgkin-Lymphom (cHL) bewies sich CD-163 als ein spezifischer Makrophagen Marker (Klein et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit ist CD-68 der Biomarker für Makrophagen.

1.5 CD-21

Follikuläre dendritische Zellen (FDC) exprimieren drei Typen von C3-Rezeptoren: Komplement-Rezeptor 1 (CR1), 2 (CR2) und 3 (CR3) (Reynes et al., 1985). CR1 und CR2 gehören zu der sogenannten RCA-Familie (regulators of complement activation (RCA) gene cluster), die aus Komplementfaktoren bindenden und regulatorisch wirkenden Proteinen besteht (Hourcade et al., 1989). Die zwei Rezeptoren dieser Familie CR1 und CR2 werden von kollinearen, aber sich nicht überlappenden Genen auf Chromosom 1q32 kodiert (Bora et al., 1989; Rey-Campos et al., 1988). CR1 wurden auf humanen Erythrozyten, neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten, Monozyten, B-Lymphozyten, einer Subpopulation von T-Lymphozyten, glomerulären Podozyten und auf follikulären dendritischen Zellen in Gefrierschnitten von Lymphfollikeln und Tonsillen nachgewiesen (Gerdes et al., 1983; Hogg et al., 1984; van der Valk et al., 1984). CR-2 wird synonym als Komplement-3d-(C3d)-

Rezeptor, Ebstein-Barr-Virus(EBV)-Rezeptor (Cooper et al., 1988) oder Cluster of differentiation 21 (CD-21) bezeichnet. Der CR-2 ist ein Oberflächenmembranglykoprotein, welches auf normalen B-Lymphozyten, follikulär dendritischen Zellen und Epithelzellen exprimiert wird. CR2 interagiert vorzugsweise mit C3dg, das abschließende Fragment der dritten Komplement-Aktivierungskaskade (Cooper et al., 1990). CR2 verknüpft die angeborene Immunantwort auf Pathogene und körperfremde Antigene mit der adaptiven Immunantwort, indem es C3d bindet. C3d führt in B-Zellen zur verstärkten Immunantwort auf Antigene (Hannan, 2016). Hauptsächlich wird CR2 aber auf follikulär dendritischen Zellen exprimiert (Reynes et al., 1985). Darüberhinaus spielt CR2 eine Rolle in der Pathogenese der Ebstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion. EBV bindet an CR2 auf B-Lymphozyten und vermittelt die Internalisierung des Virus mit anschließender Infektion der Zelle (Carel et al., 1990). Im follikulären Lymphom gehören follikuläre dendritische Zellen zum sogenannten Mikroenvironment. Die Rolle follikulär dendritischer Zellen wurde in verschiedenen Studien analysiert. Ausgebildete Netzwerke CD-21-positiver follikulärer dendritischer Zellen zeigten sich als ein negativer prognostischer Marker in Bezug auf Gesamtüberleben, progressionsfreies Überleben und ein höheres Transformationsrisiko (Blaker et al., 2016). In der Arbeit von Smeltzer et al. konnte gezeigt werden, dass das Verteilungsmuster der follikulär dendritischen Zellen ebenfalls mit der Prognose assoziiert ist. Follikuläre Lymphome, deren follikuläre dendritische Zellen vorwiegend intrafollikulär lokalisiert sind, transformierten früher in ein diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, indem FDC das Überleben von malignen B-Lymphozyten fördert (Smeltzer et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit ist CD-21 der Biomarker für follikuläre dendritische Zellen.

1.6 Fragestellung und Ziele

Follikuläre Lymphome stellen in den westlichen Ländern das zweithäufigste Lymphom dar. Das follikuläre Lymphom imitiert das Keimzentrum sowie dessen Mikroenvironment. Die Arbeitsgruppe hat in vorausgegangenen Arbeiten darstellen können, dass die Zusammensetzung des Mikroenvironments mit dem Krankheitsstadium zum Zeitpunkt der Diagnose korreliert. In frühen Stadien ähnelt das Mikroenvironment einem physiologischen Keimzentrum im Vergleich zu späten Stadien (Koch et al., 2012). In dieser Arbeit wurde das Mikroenvironment des follikulären Lymphoms im Krankheitsverlauf, d.h. zur Primärdiagnose und zum Zeitpunkt des Rezidivs im Hinblick auf folgende Fragestellungen untersucht.

1. Verändert sich das Mikroenvironment des follikulären Lymphoms zwischen Primärdiagnose und Rezidiv?
2. Wie verändert sich die Zusammensetzung des Mikroenvironments? Welche Zelltypen zeigen einen Anstieg, welche Zelltypen eine Absenkung des Zellgehaltes zwischen Primärdiagnose und Rezidiv?
3. Welche Bedeutung haben die Veränderungen der Zusammensetzung des Mikroenvironments? Lässt sich aus den Veränderungen eine Hypothese ableiten, welche die mit jedem Rezidiv zunehmende Therapierefraktärität der Lymphome erklären könnte?

2. Material und Methoden

2.1 Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden in der Datenbank der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister Kiel manuell identifiziert. Die Kohorte umschloss Fälle aus den Städten Bremen, Flensburg, Kiel, Lübeck, Neumünster, Oldenburg, Osterkappeln und Wuppertal. Zudem wurden Fälle aus dem Verbundsprojekt der deutschen Krebshilfe (MMML) in die Kohorte miteingeschlossen und alle Einsendungen des Lymphknotenregisters Kiel von 1990 bis 2014. Die Datenbank wurde auf sequentielle Biopsien, d.h. Gewebeproben bei Primärdiagnose und zum Zeitpunkt des Rezidivs untersucht. In die Kohorte wurden Gewebeproben von Patienten mit folliculären Lymphom Grad 1, Grad 2 und Grad 3A eingeschlossen. Patienten mit Grad 3B bei Primärdiagnose oder bei einem Rezidiv wurden von der Kohorte ausgeschlossen. Analysen konnten zeigen, dass folliculäre Lymphome Grad 3B und diffus großzellige B-Zell-Lymphome im Hinblick auf den Immunophänotyp und die genetischen Eigenschaften eine enge Assoziation zeigen (Horn et al., 2011; Koch et al., 2016; Ott et al., 2002). Anhand ihrer histologischen Nummer wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcke sowie die Schnittpräparate im Archiv der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister manuell herausgesucht. Die Gewebeblöcke wurden daraufhin auf genügend Material für die Anfertigung weiterer Schnitte untersucht. Die bereits angefertigten Schnittpräparate wurden mikroskopisch untersucht. Zum einen wurden die Diagnose sowie der histologische Grad zum anderen die Qualität der Schnitte überprüft. Dabei wurde sowohl auf die Qualität der Fixierung und der immunhistochemischen Färbungen als auch auf mögliche Areale mit diffusem Wachstum und die Abgrenzbarkeit der einzelnen Follikel geachtet. Die Marker FoxP3, PD-1, CD-21 und CD-68 wurden an den Lymphomproben untersucht. Sieben der Proben konnten aufgrund von wiederholt schlechtem immunhistochemischen Färbeergebnis für die Marker FoxP3, PD-1 und CD-68 nicht ausgewertet werden. Es handelte sich jeweils um die gleichen Proben. Die endgültige Fallzahl der Kohorte, die analysiert werden konnte, umschloss die Gewebeproben von 46 Patienten. Die endgültige Anzahl der Gewebeproben betrug 97. Von allen 46 Patienten standen folgende klinische Daten zur Verfügung: Diagnosedatum der Primärdiagnose und des Rezidivs, Geschlecht und Alter des Patienten und die Lokalisation des Lymphoms. Bei 12 von 46 Patienten lagen

Informationen über das Therapieschema vor. Von 45 Patienten bei Primärdiagnose und von 44 Patienten bei Rezidiv war die Graduierung dokumentiert. Das Ann-Arbor-Stadium konnte bei 9 Primärfällen und bei 4 Rezidivfällen ermittelt werden. Alle Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit den Empfehlungen der Ethikkommission zur Verwendung von Gewebeproben aus dem Archiv des Lymphknotenregisters (AZ447/10) durchgeführt. Alle patientenbezogenen Daten wurden in pseudonymisierter Form nur innerhalb des gesicherten Datennetzes der Universität Kiel gespeichert. Die Publikation der Ergebnisse erfolgte in vollständig anonymisierter Form.

2.2 Immunhistochemische Färbung

Zu der Untersuchung der Expression von FoxP3, PD-1, CD-68 und CD-21 wurden konventionelle immunhistochemische Färbungen an in Paraffin eingebetteten Gewebeproben durchgeführt. Eine Zusammenfassung der verwendeten Antikörper, Chemikalien, Lösungen und Geräte findet sich in den Tabellen 1, 2, 3 und 4. Von den in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden zunächst ca. 2µm dicke Schnitte angefertigt, diese wurden auf einen beschichteten Objektträger gebracht und über Nacht bei 37-42 °C im Brutschrank getrocknet. Die immunhistochemischen Färbungen für FoxP3, PD-1 und CD-68 wurden manuell durchgeführt. Die Färbung für CD-21 wurde komplett automatisiert durchgeführt.

2.2.1 Manuelle immunhistochemische Färbung für FoxP3, CD-68, PD-1

Die Schnittpräparate wurden in Xylol für mindestens 20 min. deparaffinisiert. Anschließend wurden die Präparate in drei aufeinanderfolgenden Behältern mit Xylol gewaschen und in einer absteigenden Alkoholreihe (3x 100%, 2x 96%, 1x 70%) rehydriert.

Mithilfe eines 10 minutigen Aufenthaltes in einer Methanol H₂O₂- Lösung wurde die endogene Peroxidase, die zu einer nachteiligen Hintergrundfärbung führen würde, geblockt.

Manche Epitope sind formalinsensitiv und zeigen unter Formalinfixierung Änderungen in ihrer dreidimensionalen Struktur. Diese Konformationsänderung kommt durch intramolekulare und intermolekulare Quervernetzungen sog. Cross-

Links zustande. Folglich kann es zu einem Verlust der Immunreaktivität kommen.

Man spricht hier von einer „Maskierung“ des Antigenes bzw. des Epitops (Key, 2006).

Zur Antigendemaskierung wurden die Präparate in einem Citratpuffer pH 6 unter Druck im Dampfkochtopf für drei Minuten gekocht. Auf diese Weise kann die Formalin induzierte Konformationsänderung rückgängig gemacht werden (Shi et al. 1991). Der pH des Citrapuffers wurde vor jeder Färbung überprüft.

Nach dem Kochvorgang wurden die Schnitte erst zügig mit Leitungswasser gespült, um eine Austrocknung zu vermeiden und dann in Tris-Waschpuffer gestellt. Hier kühlten die Präparate auf Raumtemperatur ab.

Die Primärantikörper wurden im Verhältnis 1:200 (FoxP3), 1:100 (CD-68) und 1:50 (PD-1) mit „AntibodyDiluent verdünnt“.

Auf jedes Schnittpräparat wurden mindestens 100µl Antikörperlösung aufgetragen und bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer für eine Stunde inkubiert. Der Antikörper wurde mithilfe des Tris-Puffers entfernt.

Anschließend wurden für die immunhistochemische Färbung von FoxP3 und CD-68 drei bis vier Tropfen des Sekundärantikörpers auf die Präparate aufgebracht und für 30 Minuten feucht inkubiert, gefolgt von einer Waschung im Tris-Puffer. Für die immunhistochemische Färbung der PD-1 Expression wurde für 20 Minuten 100-200µl einer Verstärkerlösung (PostBlockReagent) inkubiert. Hierdurch findet eine Signalverstärkung statt, indem mehr Signalmoleküle am Ort des Antigens binden (Boenisch, 2006). Wieder fand eine Waschung im Tris-Puffer statt, bevor 100-200µl des zweiten Sekundärantikörpers (HRP-Polymer (Mouse/Rabbit)) aufgetropft wurden.

Nach 30 min. wurden die Präparate im Tris-Waschpuffer gespült. Als Chromogen wurde Diaminobenzidin (DAB) für alle Färbungen verwendet. Dieser wurde angesetzt aus 1000µl Chromogenpuffer zusammen mit 1-2 Tropfen Chromogen. Beim Auftröpfen von 100µl DAB entwickelte sich ein braunes Endprodukt.

Nach ausgiebiger Spülung der Präparate mit Leitungswasser erfolgte eine dreiminütige Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer.

Die Schnittpräparate wurden dann mit Leitungswasser gespült und anschließend für mindestens 10 Minuten in Leitungswasser stehen gelassen. Der pH des Leitungswassers lässt die Kerne „bläuen“.

Abschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (1x 70%, 2x 96%, 3x 100%) und maschinell gedeckelt.

2.2.2 Automatisierte immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung für CD-21 lief automatisiert auf dem Leica Bond Automaten. Der Ablauf der automatisierten Färbung ist ab dem Schritt der Endparaffinisierung der Schnitte bis zum Schritt der Kernfärbung nach Hämalaun nach Mayer vergleichbar mit der manuellen Färbung. Die Präparate werden für die CD-21 Färbung mit ER1 (pH 6) vorbehandelt. Die Primärantikörper werden im Verhältnis 1:25 verdünnt.

Primärantikörper	Hersteller
Mouse-anti-human-FoxP3	abcam ab20034 (Cambridge, England)
Mouse-anti-human-CD68	Dako M0876 (Hamburg)
Mouse-anti-human-CD-21	NovoCastra-Leica NCL-CD21-2G9 (Wetzlar)
Mouse-anti-human-PD-1	abcam ab52587 (Cambridge, England)
Sekundärantikörper	Hersteller
Universale Immuno-peroxidase Polymer Anti-Mouse and Anti-Rabbit (readytouse)	Medac: Histofine Simple Stain MAX PO (Multi) Bestellnr.: 414154F (Wedel)
PostBlockReagent (readytouse)	Zytomed: ZyoChem Plus Bestellnr. POLHRP-100 (Berlin)
HRP-Polymer (Mouse/Rabbit) (readytouse)	Zytomed: ZyoChem Plus Bestellnr. POLHRP-100 (Berlin)

Tabelle 1: Antikörper und Hersteller

Chemikalien	Hersteller
Aluminiumkaliumsulfat	Merck Nr. 1.01047 (Darmstadt)
Antibody-Diluent	Medac: B1-31C (Wedel)
Aqua destillata	DeltaSelect Nr. 23705-12A (München)
Chloralhydrat	Merck Nr. 1.02425 (Darmstadt)
Citronensäure-Monohydrat	Merck Nr. 1.00244 (Darmstadt)
Diaminobenzidin	Dako Nr. K3468 (Hamburg)
Ethanol	Merck Nr. 1.00983 (Darmstadt)
Hämalaun nach Mayer (1:4 (Dest.))	Merck Nr. 1.15938 (Darmstadt)
Methanol	Merck Nr. 1.06009 (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck Nr. 106400 (Darmstadt)
Natronlauge (NaOH) 2N	Merck Nr. 1.09136 (Darmstadt)
Pertex® Eindeckelmedium	Medite Nr. Per 30000 (Burgdorf)
Trisma-Base	Sigma Nr. T1503 (Darmstadt)

Tris-HCl	Sigma Nr. T3253 (Darmstadt)
Tween 20	Merck Nr. 8.22184 (Darmstadt)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ , 30%)	Merck Nr. 1.07210 (Darmstadt)
Xylol	Merck Nr. 1.08681 (Darmstadt)

Tabelle 2: Chemikalien und Hersteller

Lösung	Herstellung
1%iges Wasserstoffperoxid	200 ml Methanol, 6ml H ₂ O ₂ 30%
Tris-Waschpuffer + 0,05 % Tween	9,0 g Tris-Base (Sigma), 68,5 g Tris-HCL (Sigma), 87,8 g NaCl (Merck) auf 10 l aquadest. und 5 ml Tween 20 (Merck) titrieren
Citratpuffer 10 mM: pH 6	10,5 g Citronensäure-Monohydrat (Merck) mit ca. 65 ml NaOH (2N) (Merck) einstellen und auf 5 l aquadest. titrieren
Hämalaun	1 g Hämatoxylin, 1 l aquadest., 0,2 g Natriumjodat, 50 g Aluminiumkaliumsulfat, 50 g Chloralhydrat, über Nacht stehen lassen, 1g Citrat

Tabelle 3: Lösungen und Puffer

Geräte	Hersteller
Axioskop Mikroskop	Zeiss (Oberkochen)
Dampfdrucktopf	Tefal (Offenbach)
Deckgläschchen	Menzel- Gläser (Braunschweig)
Objekträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen Leica (Nussloch)
Pipetten und –spitzen	Eppendorf (Hamburg)
Promounter RCM2000 CoverslippingMachine	Medite (Burgdorf)
Rasterokkular	Zeiss (Oberkochen)

Tabelle 4: Geräte und Hersteller

2.3 Manuelle Auswertung der konventionellen immunhistochemischen Färbungen

Die Analyse erfolgte quantitativ über Morphometrie mittels Zählokkular. Zunächst wurden morphologisch gut auswertbare Areale identifiziert. Dazu wurden die immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparate bei 100facher Vergrößerung auf Areale untersucht, die eine intensive Färbung aufwiesen und ausreichend fixiert waren.

Für die Auswertung der FoxP3 und der PD-1 Expression wurden in 400facher Vergrößerung für jedes Präparat positive Zellen unter 100 Zellen in jeweils drei

follikulären und drei interfollikulären Arealen ausgezählt. Die CD68-Färbung wurde nur innerhalb der Follikel ausgewertet, da die einzelnen Zellen in den interfollikulären Arealen schwer voneinander abgrenzbar waren. Dabei wurden alle Zellelemente unabhängig davon, ob der Zellkern im Schnitt enthalten war, als positiv ausgewertet. Aus den drei Einzelwerten der follikulären beziehungsweise interfollikulären Areale wurde jeweils ein Mittelwert gebildet. Dieser wurde für die nachfolgende statistische Analyse verwendet.

Die Auswertung der CD-21 Färbung erfolgte semiquantitativ. Die Fälle wurden in vier Gruppen von 0-3 unterteilt. In der Gruppe 0 fanden sich keine Netzwerke CD-21 positiver Zellen. In den Gruppen 1 und 2 zeigten sich reduzierte Netzwerke CD-21 positiver Zellen. In der Gruppe 1 nahmen diese weniger als 50% und in der Gruppe 2 mehr als 50% der Follikel ein. Der Gruppe 3 zugehörige Fälle zeigten vollständig erhaltene Netzwerke CD-21 positiver Zellen.

2.4 Statistische Analyse

Der Vergleich der Anteile PD-1 positiver Zellen und FoxP3 positiver Zellen in den neoplastischen Follikeln und im interfollikulären Raum, sowie der Anteil CD-68 positiver Zellen in den neoplastischen Follikeln zum Zeitpunkt der Primärdiagnose und zum Zeitpunkt des Rezidivs wurde mithilfe von GraphPadPrism berechnet. Es wurden t-Tests angewendet. Die Analyse der CD-21 positiven Zellen erfolgte rein deskriptiv.

Software	Hersteller
GraphPadPrism	Graph Pad Software, Sandiego, Kalifornien, USA

Tabelle 5: Software und Hersteller

3. Ergebnisse

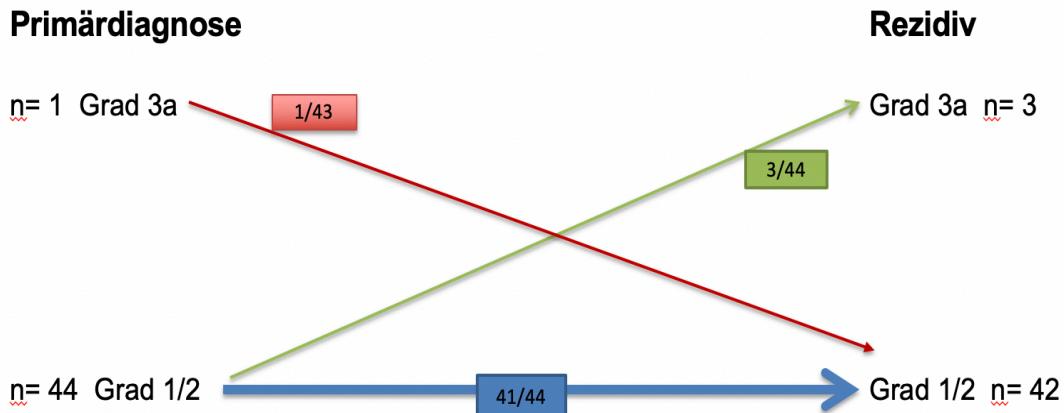
3.1 Patientenkollektiv

In der Datenbank der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister wurden die Gewebeproben manuell identifiziert. Die analysierten Gewebeproben stammen von 46 Patienten. Davon zeigten 41 Patienten ein Rezidiv und fünf Patienten zwei Rezidive. Die Zeitabstände zwischen Primärdiagnose und Rezidiv variierten enorm. Sie lagen zwischen 4 Monaten und 11 Jahren. Im Mittel lagen sie bei 3 Jahren. Bei Patienten mit mehreren Rezidiven lag der Abstand zwischen den Rezidiven im Mittel bei drei Jahren. Von der endgültigen Fallzahl von 46 Patienten war von 12 Patienten bei der Primärdiagnose und von 8 Patienten zum Zeitpunkt des Rezidivs das Therapieschema bekannt. Bei Primärdiagnose wurden drei, in den Rezidivfällen fünf Patienten ohne Therapie überwacht (sogenanntes „watch-and-wait“). Die Therapieschemata sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Therapie	Anzahl Proben Primärdiagnose	Anzahl Proben Rezidiv	Anzahl Proben mehrere Rezidive
R-Bendamustin	keine	1	1
R-CHOP	2	1	1
CHOP	2	keine	keine
andere	5	1	keine
unbekannt	34	38	keine

Tabelle 6: Therapieschema

Die Veränderung der Graduierung im Krankheitsverlauf ist in der Graphik 1 dargestellt. Bei Primärdiagnose und zum Zeitpunkt des Rezidivs blieb jeweils ein Fall ungraduiert.



Graphik 1: Graduierung im Krankheitsverlauf: Einteilung in Grad 1/2 und 3a. Pfeilfarbe = Veränderung der Graduierung im Krankheitsverlauf, Rot = Abnahme des Grades, Grün = Zunahme des Grades, Blau = keine Veränderung des Grades im Krankheitsverlauf; Pfeildicke = symbolisiert Anzahl der Fälle

Die Verteilung der Ann-Arbor-Stadien ist in Tabelle 10 aufgeführt. Bei drei Fällen lagen Informationen über das Ann-Arbor-Stadium zum Zeitpunkt der Primärdiagnose und des Rezidivs vor. Davon zeigten zwei Fälle im Krankheitsverlauf ein unverändertes Ann-Arbor-Stadium. Der Fall wies sowohl bei der Primärdiagnose als auch zum Zeitpunkt des Rezidivs ein Ann-Arbor-Stadium III auf, der andere Fall ein Stadium IV. Ein Fall zeigte eine Evolution des Ann-Arbor-Stadiums von einem Stadium II bei der Primärdiagnose in ein Stadium III zum Zeitpunkt des Rezidivs. Die Manifestationsorte des folliculären Lymphoms im Krankheitsverlauf sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Das mediane Alter bei Primärdiagnose betrug 57 Jahre bei einer Range von 54 Jahren. Der jüngste Patient war 27 Jahre alt und der älteste 73 Jahre alt zum Zeitpunkt der Primärdiagnose. Das Geschlechterverhältnis der Kohorte war nahezu ausgeglichen.

Ann-Arbor-Stadium	Anzahl Proben Primärdiagnose	Anzahl Proben Rezidiv
I	keine	keine
II	4	keine
III	3	2
IV	2	2
unbekannt	37	42

Tabelle 8: Ann-Arbor-Stadium

Manifestationsort	Anzahl Proben Primärdiagnose	Anzahl Proben Rezidiv
Lymphknoten	43	42
Extranodal (Bronchialschleimhaut, Mamma, Parotis, Retroperitoneum)	3	4

Tabelle 9: Manifestationsort Follikuläre Lymphom

3.2 Verteilung FoxP3 und PD-1 positiver Zellen im malignen lymphatischen Gewebe

Die Verteilung von follikulären T-Helfer-Zellen (PD-1) und regulatorischen T-Zellen (FoxP3) wurde für 53 Patienten bei Primärdiagnose und zum Zeitpunkt des Rezidivs untersucht. Insgesamt umschloss die Kohorte 111 Gewebeproben. Sieben jeweils gleiche Fälle konnten aufgrund von wiederholt schlechten immunhistochemischen Färbeergebnissen für beide Marker nicht bewertet werden. Die immunhistochemische Analyse fand letztendlich an insgesamt 46 Fällen statt; das entsprach 97 Gewebeproben. Es zeigte sich ein Unterschied im Anteil der positiven Zellen zwischen dem follikulären und interfollikulären Raum. PD-1 positive Zellen fanden sich hauptsächlich in den neoplastischen Follikeln sowohl bei der Primärdiagnose als auch zum Zeitpunkt des Rezidivs im Durchschnitt 19 (Standardabweichung 9) PD-1 positive Zellen zu Primärdiagnose und 17 (Standardabweichung 9) im Rezidivfall im follikulären Raum. Im interfollikulären Raum zeigten sich durchschnittlich 4 (Standardabweichung 3) PD-1 positive Zellen zu Primärdiagnose und 5 (Standardabweichung 4) zum Zeitpunkt des Rezidivs. Dieser Unterschied war sowohl in den Primär- als auch in den Rezidivfällen statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$). Ein inverser, jedoch weniger deutlicher Trend zeigt sich bei FoxP3 positiven Zellen. Der Anteil FoxP3 positiver Zellen zeigte sich im interfollikulären Areal im Vergleich zu dem Anteil innerhalb der Follikel leicht erhöht: durchschnittlich 8 (Standardabweichung 4) positive Zellen in den Follikeln gegenüber 9 (Standardabweichung 5) FoxP3 positive Zellen interfollikulär.

Der Unterschied zwischen FoxP3 positiven Zellen im follikulären Raum im Vergleich zum interfollikulären Raum zum Zeitpunkt der Primärdiagnose war nicht statistisch signifikant ($p= 0,1856$).

In den Rezidivfällen zeichnete sich der Unterschied FoxP3 positiver Zellen zwischen follikulärem und interfollikulärem Raum deutlicher ab. Im Durchschnitt waren 7 (Standardabweichung 5) FoxP3 positive Zellen in den neoplastischen Follikeln gegenüber 10 (Standardabweichung 5) im interfollikulären Raum nachweisbar. In den Rezidivproben ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen FoxP3 positiven Zellen in den neoplastischen Follikeln im Vergleich zu FoxP3 positiven Zellen im interfollikulären Raum ($p= 0,001$).

3.3 Dynamik FoxP3 und PD-1 positiver Zellen zwischen Primärdiagnose und Rezidiv

Die Zusammensetzung des Zellgehaltes FoxP3 und PD-1 positiver Zellen zwischen Primärdiagnose und Rezidiv wies eine Dynamik auf; diese Dynamik folgte jedoch keiner klaren Regel. Die Veränderungen waren enorm heterogen und einige Fälle zeigten erhebliche Unterschiede. Dabei waren sowohl enorme Anstiege als auch erhebliche Absenkungen des Zellgehaltes zwischen Primärdiagnose und Rezidiv zu vermerken.

Abbildung 1 zeigt exemplarisch sowohl einen Fall, in dem der Zellgehalt FoxP3 positiver Zellen in den neoplastischen Follikeln zwischen Primärdiagnose und Rezidiv deutlich zunahm, als auch einen Fall mit Abnahme des Zellgehaltes im Krankheitsverlauf. Es zeigten sich aber auch Fälle, in denen kaum eine Veränderung des Zellgehaltes FoxP3 positiver Zellen zwischen Primärdiagnose und Rezidiv nachzuweisen war. Im Durchschnitt fanden sich 8 (Standardabweichung 5) FoxP3 positive Zellen bei der Primärdiagnose und 7 (Standardabweichung 5) zum Zeitpunkt des Rezidivs in den neoplastischen Follikeln. Es zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung FoxP3 positiver Zellen in den neoplastischen Follikeln im Krankheitsverlauf ($p= 0,2205$). Diese heterogene Dynamik des Zellgehaltes FoxP3 positiver Zellen zwischen Primärdiagnose und Rezidiv zeigte sich auch in den interfollikulären Arealen. Im Durchschnitt fanden sich im interfollikulären Raum bei der Erstdiagnose 9 (Standardabweichung 5) und bei der Zweitdiagnose 10

(Standardabweichung 5) FoxP3 positive Zellen. Eine statistisch signifikante Veränderung FoxP3 positiver Zellen im interfollikulären Raum im Krankheitsverlauf ergab sich nicht ($p= 0,2388$).

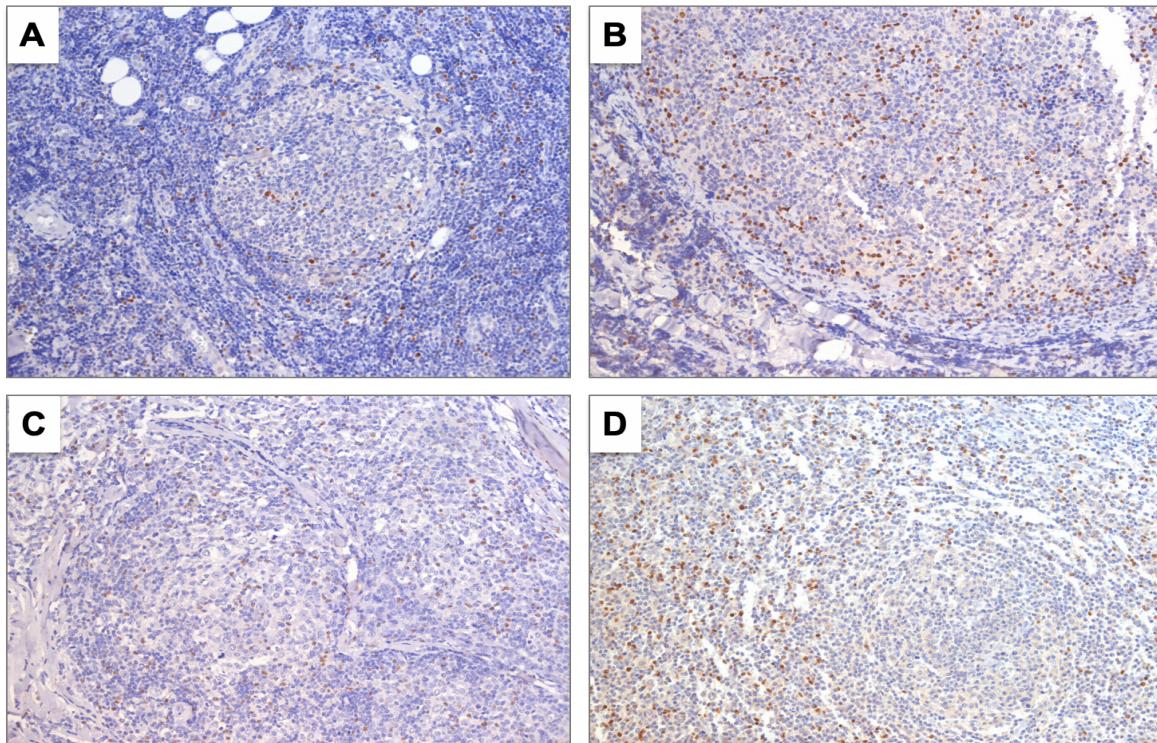


Abb. 1: Dynamik FoxP3 positiver Zellen in folliculären Lymphomen. Anstieg des Zellgehaltes FoxP3 positiver Zellen in den neoplastischen Follikeln zwischen Erstdiagnose (A) und Rezidiv (B); Absenkung des Zellgehaltes FoxP3 positiver Zellen in den neoplastischen Follikeln zwischen Erstdiagnose (C) und Rezidiv (D) ($p= 0,2205$) Vergrößerung 200-fach.

Der Zellgehalt PD-1 positiver Zellen zeigte ähnlich stark heterogene Veränderungen zwischen Primärdiagnose und Rezidiv. Abbildung 2 zeigt exemplarisch sowohl einen Fall, bei dem der Zellgehalt PD-1 positiver Zellen zunahm, als einen Fall, bei dem der Zellgehalt abnahm. Abbildung 3 zeigt die prozentuale Verteilung PD-1 positiver Zellen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose und zum Zeitpunkt des Rezidivs zum einen für den folliculären Raum, zum anderen für den interfollikulären Raum.

Durchschnittlich wurden folliculär 19 (Standardabweichung 9) im Primärfall und 17 PD-1 positive Zellen im Rezidivfall nachgewiesen. Im interfollikulären Raum waren im Durchschnitt bei der Primärdiagnose 4 (Standardabweichung 3) und zum Zeitpunkt des Rezidivs 5 (Standardabweichung 4) PD-1 positive Zellen nachweisbar.

Der Zellgehalt PD-1 positiver Zellen im interfollikulären Raum wies eine statistisch signifikante Zunahme zwischen Primärdiagnose und Rezidiv auf ($p= 0,0426$) (Abb.

3). Die Veränderungen PD-1 positiver Zellen in den neoplastischen Follikeln im Krankheitsverlauf wies keine statistische Signifikanz auf ($p= 0,2613$) (Abb. 2 und 3).

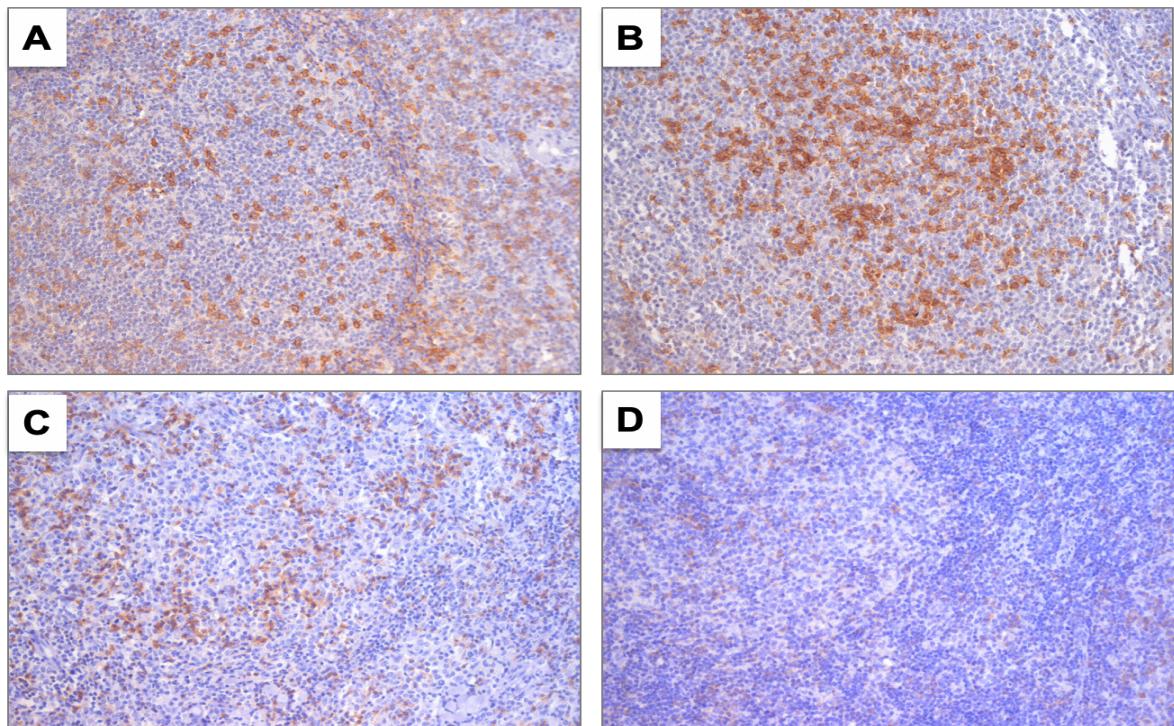


Abb. 2: Dynamik PD-1 positiver Zellen in folliculären Lymphomen. Anstieg des Zellgehaltes PD-1 positiver Zellen in den neoplastischen Follikeln zwischen Erstdiagnose (A) und Rezidiv (B); Absenkung des Zellgehaltes PD-1 positiver Zellen in den neoplastischen Follikeln zwischen Erstdiagnose (C) und Rezidiv (D). ($p=0,2613$), gepaarter T-Test, Vergrößerung 200-fach.

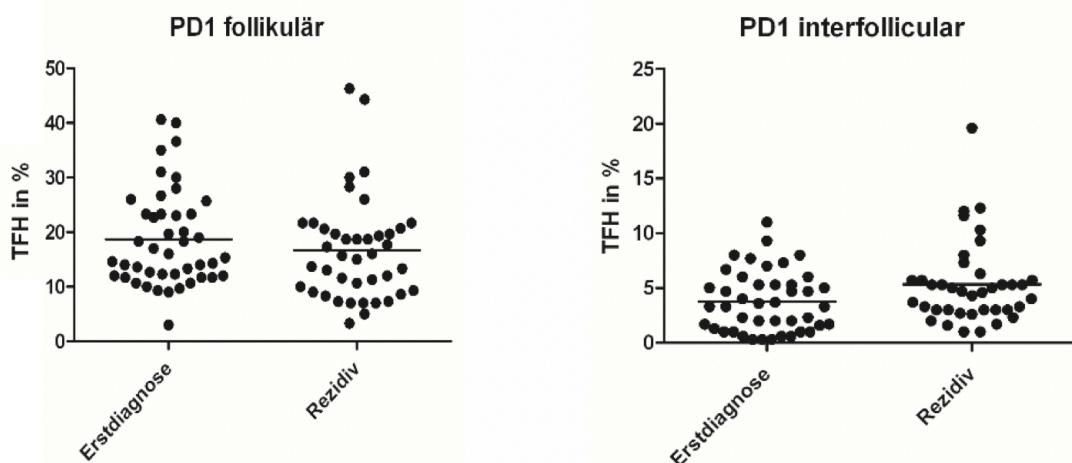


Abb. 3: Anteil PD-1 positiver Zellen in Prozent zur Erstdiagnose und Rezidiv. In den neoplastischen Follikeln zeigt sich kein signifikanter Unterschied PD-1 positiver Zellen zwischen Erstdiagnose und Rezidiv ($p= 0,2613$) (A), im interfollikulären Raum zeigt sich ein signifikanter Anstieg PD-1 positiver Zellen zwischen Erstdiagnose und

Rezidiv ($p= 0,0426$) (B). Dargestellt sind Scatter Plots. Jeder Punkt stellt einen Fall dar, die Querbalken zeigen die Mittelwerte. x-Achse= Primär und Rezidiv, y-Achse= PD-1 positive Zellen in %.

3.4 Dynamik CD-68 positiver Zellen zwischen Primärdiagnose und Rezidiv

Die Verteilung von Makrophagen (CD-68) wurde bei Primärdiagnose und zum Zeitpunkt des Rezidivs an 53 folliculären Lymphomen untersucht. Morphometrisch wurden auf 400-facher Vergrößerung für jedes Präparat positive Zellen unter 100 Zellen in jeweils drei Follikeln ausgezählt. Die immunhistochemische Analyse fand letztendlich an 46 Fällen statt, da sieben Fälle aufgrund von schlechten Färbergebnissen nicht ausgewertet werden konnten. Der Makrophagenzellgehalt zeigte eine Dynamik im Krankheitsverlauf. Es zeigten sich sowohl Fälle, in denen der Makrophagenzellgehalt zwischen Primärdiagnose und Rezidiv abnahm, als auch Fälle, in denen er zunahm. In der Gesamtanalyse des Zellgehaltes wurden signifikante Ergebnisse vermerkt. Im Vergleich zwischen Proben der Erstdiagnose und des Rezidivs zeigte sich eine geringe, aber statistisch signifikante Veränderung des folliculären Makrophagenzellgehaltes. Der Zellgehalt CD-68 positiver Zellen war in Rezidivproben höher ($p= 0,0492$) (Abb. 4 und Abb. 5).

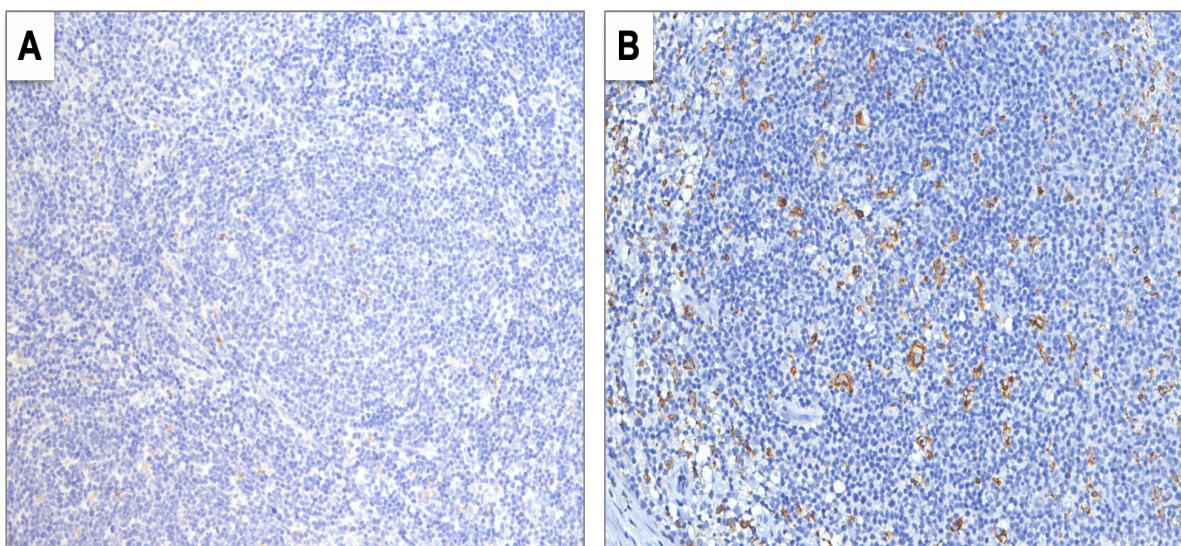


Abb. 4: Dynamik CD-68 positiver Zellen in folliculären Lymphomen. CD-68 positive Makrophagen innerhalb eines malignen Follikels bei Erstdiagnose (A) und Rezidiv (B) ($P= 0,0492$).

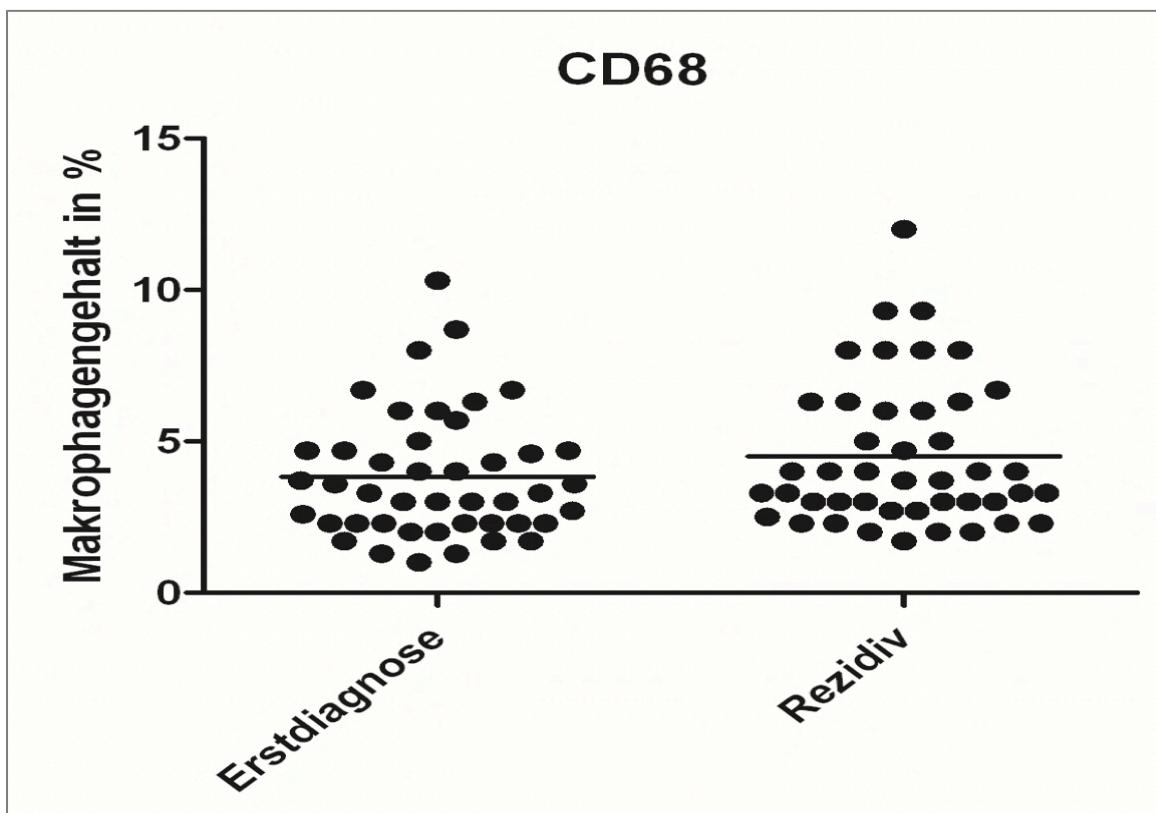


Abb. 5: Anteil CD-68 positiver Zellen in Prozent zur Erstdiagnose und Rezidiv.

In den neoplastischen Follikeln zeigt sich ein signifikanter Anstieg CD-68 positiver Zellen zwischen Erstdiagnose und Rezidiv ($p= 0,0492$), gepaarter T-Test.
 Dargestellt sind Scatter Plots. Jeder Punkt stellt einen Fall dar, die Querbalken zeigen die Mittelwerte. x-Achse= Primär und Rezidiv, y-Achse= CD-68 positive Zellen in %

3.5 Verteilung und Dynamik CD-21 positiver follikulär dendritischer Zellen zwischen Primärdiagnose und Rezidiv

Die Verteilung von CD-21 positiven follikulär dendritischen Zellen wurde zum Zeitpunkt der Primärdiagnose und des Rezidivs an 53 folliculären Lymphomen untersucht.

17 der Primärfälle und 19 der Rezidivfälle waren aufgrund eines schlechten immunhistochemischen Färbeergebnisses nicht auswertbar, sodass insgesamt 36 Primärfälle und 34 Rezidivfälle ausgewertet werden konnten. Dazu wurde auf 400-facher Vergrößerung jeder Fall einer der vier Gruppen (0-3) zugeordnet. Die einzelnen Gruppen unterschieden sich anhand der Netzwerkbildung der CD-21 positiven follikulär dendritischen Zellen. In der Gruppe 0 fanden sich keine Netzwerke CD-21 positiver Zellen. In den Gruppen 1 und 2 waren reduzierte Netzwerke CD-21

positiver Zellen nachweisbar (Gruppe 1 < 50% und Gruppe 2 > 50% der Follikel einnehmend). In der Gruppe 3 waren Fälle mit vollständig erhaltenen Netzwerken CD-21 positiver Zellen.

Bei den Primärfällen waren 17 Fälle der Gruppe 1 zugehörig, 9 Fälle der Gruppe 2 und 10 Fälle der Gruppe 3 zugehörig. Bei den Rezidivfällen wiesen 17 Patienten eine Zugehörigkeit zu Gruppe 1, 9 Patienten zu Gruppe 2 und 8 Patienten zu Gruppe 3 auf. Die endgültige Zahl der auswertbaren Pärchen lag bei 26 Fällen. Davon waren 11 der Primärfälle der Gruppe 1 zugehörig, 7 der Primärfälle der Gruppe 2 und 8 der Primärfälle der Gruppe 3 zugehörig. Von den Rezidivfällen waren 12 der Patienten in Gruppe 1. In den Gruppen 2 und 3 waren jeweils 7 Patienten.

Es zeigte sich eine Dynamik in der Ausbildung der Netzwerke CD-21 positiver follikulär dendritischer Zellen zwischen Primärdiagnose und Rezidiv. Die Veränderungen im Krankheitsverlauf erwiesen sich als heterogen. Die Ergebnisse wurden deskriptiv gehalten. Es zeigten sich sowohl Fälle, in denen die Netzwerkbildung CD-21 positiver Zellen im Krankheitsverlauf zunahm, als auch Fälle, in denen die Netzwerkbildung abnahm. Auch fanden sich Fälle, in denen die Netzwerkbildung im Krankheitsverlauf keine Veränderungen aufwiesen. Bei 6 von 26 auswertbaren Pärchen zeigte sich eine Zunahme der Netzwerkbildung zwischen Primärdiagnose und Rezidiv (Abb. 6). Dabei waren 5 der Patienten zum Zeitpunkt der Primärdiagnose der Gruppe 1 zugeordnet (Abb. 6). Zum Zeitpunkt des Rezidivs wurden davon 4 Patienten der Gruppe 2 geordnet (Abb. 6). Die Netzwerke CD-21 positiver follikulär dendritischer Zellen nahm also mehr als 50% des Follikels ein. Ein Fall zeigte zum Zeitpunkt des Rezidivs vollständig erhaltene Netzwerke CD-21 positiver Zellen und konnte somit der Gruppe 3 zugeordnet werden (Abb. 6). Ein Patient ließ sich zur Primärdiagnose der Gruppe 2 zuordnen und zum Zeitpunkt des Rezidivs der Gruppe 3 zuordnen (Abb. 6). Bei 8 der 26 auswertbaren Fälle zeigte sich eine Reduktion der Netzwerkbildung CD-21 positiver Zellen (Abb. 6). Von 3 Patienten, die zur Primärdiagnose vollständig erhaltene Netzwerke CD-21 positiver Zellen aufwiesen und somit der Gruppe 3 zugeordnet werden konnten, zeigten sich zum Zeitpunkt des Rezidivs reduzierte Netzwerke; dabei wurden 2 Patienten der Gruppe 2 und ein Patient der Gruppe 1 zugeordnet (Abb. 6). Von 5 Patienten, bei denen zur Primärdiagnose mehr als 50% des Follikels mit Netzwerken CD-21 positiver Zellen ausgefüllt waren, also einer Gruppe 2 zugehörig waren, zeigte sich im Krankheitsverlauf eine Abnahme der Netzwerke. Diese konnten zum Zeitpunkt

des Rezidivs der Gruppe 1 zugeordnet werden (Abb. 6). Bei 12 Pärchen zeigte sich im Krankheitsverlauf keine Veränderung in der Netzwerkausbildung CD-21 positiver Zellen. 6 der 26 auswertbaren Pärchen verblieben in Gruppe 1, ein Pärchen verblieb in Gruppe 2 und 5 Pärchen verblieben in Gruppe 3 (Abb. 6).

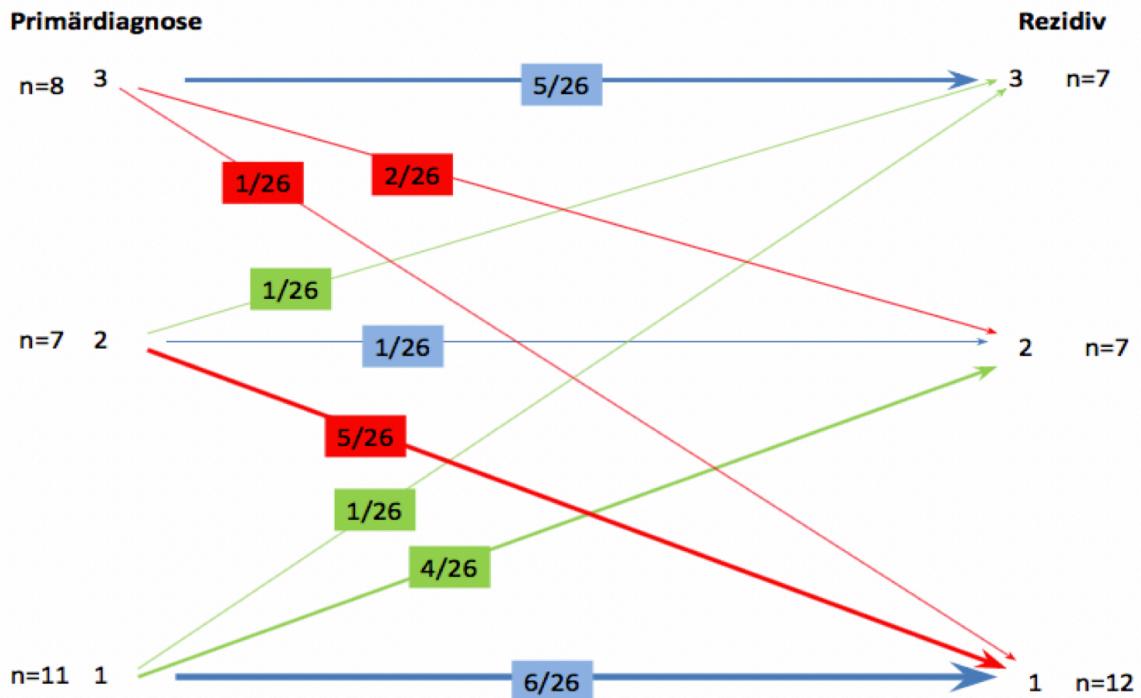


Abb. 6: Verteilung und Dynamik der Netzwerkbildung CD-21 positiv dendritischer Zellen im Krankheitsverlauf: Anhand des Ausmaßes der Netzwerkbildung CD-21 positiv dendritischer Zellen in Follikeln, Einteilung in die Gruppen 1-3. Pfeilfarbe= Veränderung der Netzwerkebildung im Krankheitsverlauf, Rot=Abnahme der Netzwerke, Grün=Zunahme der Netzwerke, Blau=keine Veränderung der Netzwerke; Pfeildicke=symbolisiert Anzahl der Fälle

Die Fälle der Gruppen 1 und 2, d.h. Fälle, die reduzierte Netzwerke CD-21 positiver Zellen aufwiesen, verblieben zum Großteil innerhalb dieser Gruppen. Es zeigte sich also kaum eine Veränderung der Netzwerkausbildung CD-21 positiver Zellen zwischen Primärdiagnose und Rezidiv (Abb. 7). 5 der 26 auswertbaren Pärchen verblieben in der Gruppe 3. Sie zeigten damit vollständig ausgebildete Netzwerke CD-21 positiver Zellen sowohl zum Zeitpunkt der Erstdiagnose als auch zum Zeitpunkt des Rezidivs. Lediglich 5 Pärchen zeigten eine Veränderung im Krankheitsverlauf. Davon wiesen 2 Patienten eine Zunahme und 3 Patienten eine Abnahme der Netzwerke CD-21 positiver Zellen zwischen Primärdiagnose und Rezidiv auf.

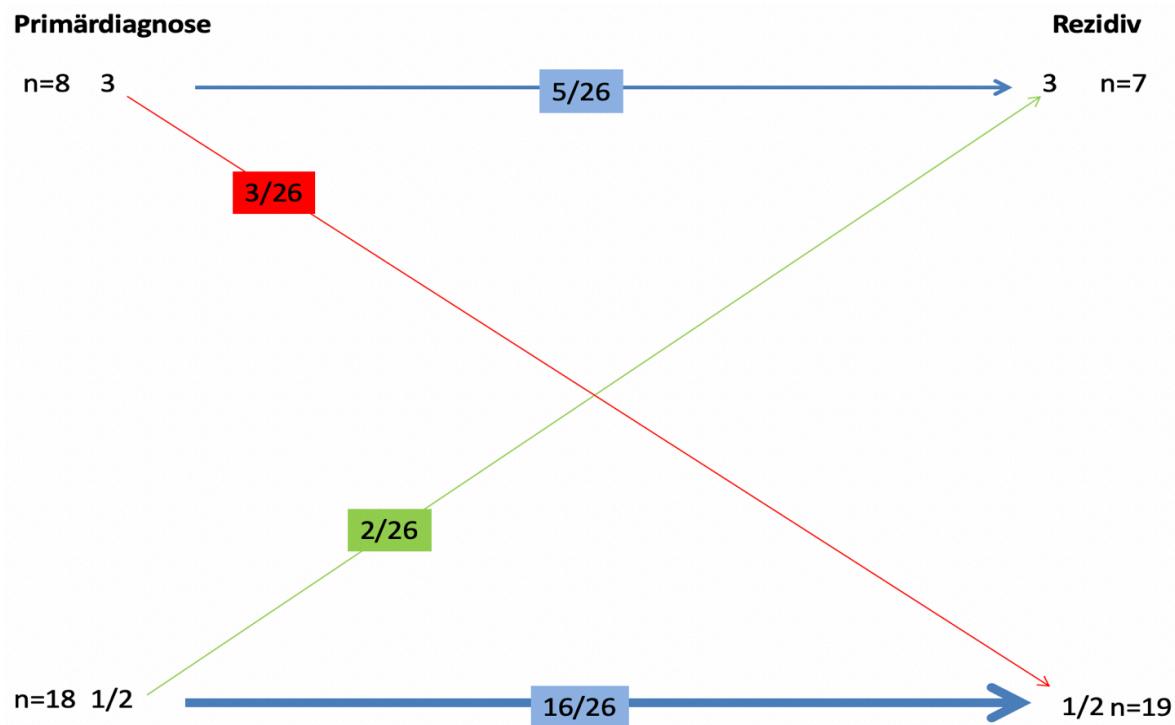


Abb. 7: Verteilung und Dynamik der Netzwerkbildung CD-21 positiv dendritischer Zellen im Krankheitsverlauf: Anhand des Ausmaßes der Netzwerkbildung CD-21 positiv dendritischer Zellen in Follikeln, Einteilung in die Gruppen 1/2 und 3. Pfeilfarbe= Veränderung der Netzwerkebildung im Krankheitsverlauf, Rot=Abnahme der Netzwerke, Grün=Zunahme der Netzwerke, Blau=keine Veränderung der Netzwerke; Pfeildicke=symbolisiert Anzahl der Fälle

4. Diskussion

Follikuläre Lymphome gehören zu den zweithäufigsten Non-Hodgkin-Lymphomen in der Welt und repräsentieren 20% aller Non-Hodgkin-Lymphome (Swerdlow SH et al., 2008). Das nicht-neoplastische Begleitinfiltrat des follikulären Lymphoms, das sogenannte Mikroenvironment, spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Lymphoms und das klinische Verhalten follikulärer Lymphome wird nicht nur von den Tumorzellen selbst, sondern auch von dem nicht-neoplastischen Begleitinfiltrat bestimmt (Dave et al., 2004; de Jong, 2005; Glas et al., 2007). Die Arbeitsgruppe konnte in vorausgegangenen Arbeiten darstellen, dass die Zusammensetzung des Mikroenvironments mit dem Krankheitsstadium nach Ann-Arbor zum Zeitpunkt der Diagnose korreliert. In frühen Stadien und somit lokalisierten follikulären Lymphomen ähnelt das Mikroenvironment einem physiologischen Keimzentrum, d.h. es zeigt sich ein hoher Gehalt an follikulären T-Helfer-Zellen und ein niedriger Gehalt an regulatorischen T-Zellen im Vergleich zu späten Stadien (Koch et al., 2012). Da sich die Ann-Arbor Klassifikation nach der Ausbreitung der Neoplasie im Körper richtet, könnte das Stadium dieser langsam fortschreitenden Erkrankung die Zeit des Lymphomwachstums und somit die Dauer des Krankheitsverlaufs reflektieren. Eine Evolution des Mikroenvironments im Krankheitsverlauf wäre denkbar. Diese Annahme berücksichtigend wäre von einer Veränderung des Mikroenvironments von einem dem physiologischen reaktiven Begleitinfiltrat ähnlichen mit prädominant follikulären T-Helfer-Zellen hin zu einem Begleitinfiltrat mit prädominant regulatorischen T-Zellen im Krankheitsverlauf auszugehen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Zusammensetzung des Mikroenvironments zum Zeitpunkt der Primärdiagnose und zum Zeitpunkt des Rezidivs analysiert. Optimal wäre dabei ein Vergleich von Fällen, die zwischen Primärdiagnose und Rezidiv nicht therapiert wurden (sogenanntes watch&wait). Solche Fälle standen nicht zur Verfügung. Möglicherweise liegt dies daran, dass keine zweite Biopsie vor der Therapieeinleitung entnommen oder diese nicht an ein Referenzzentrum wie Kiel verschickt wird. Um zu klären, ob und wie sich die Zusammensetzung des Mikroenvironments des follikulären Lymphoms im Krankheitsverlauf verändert und welche Bedeutung die Veränderungen auf den Krankheitsverlauf haben, wurde in dieser Studie die Datenbank der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister manuell auf sequentielle Biopsien untersucht und mittels immunhistochemischen Färbungen die Zellen des nicht

neoplastischen Begleit infiltrates für die Primärdiagnose und das Rezidiv quantifiziert. Zu den von uns untersuchten nicht-neoplastischen Zellen gehörten PD-1 positive T-Helferzellen, FoxP3 positive T-regulatorische Zellen, CD-21 positive folliculäre dendritische Zellen und CD-68 positive Makrophagen. Mehrere Studien untersuchten bereits die Rolle der einzelnen Zellen des nicht-neoplastischen Begleit infiltrates. Die mittels Genexpression und Immunhistochemie erhobenen Ergebnisse werden kontrovers diskutiert. Studien zeigten, dass ein hoher Gehalt an FoxP3 und PD-1 positiven T-Zellen mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert waren (Carreras et al., 2009, 2006; Tzankov et al., 2008). In anderen Studien zeigte sich eine inverse Korrelation (Blaker et al., 2016; Richendollar et al., 2011). Wiederrum in anderen Studien konnte keine Korrelation zwischen dem Gesamtüberleben und dem Gehalt an FoxP3 positiven Zellen (Koch et al., 2012; Richendollar et al., 2011; Sweetenham et al., 2010) und PD-1 positiven Zellen (Koch et al., 2012) nachgewiesen werden. In einigen Arbeiten zeigte sich viel mehr das Infiltrationsmuster der nicht-neoplastischen Zellen als prognostisch relevanter als die Quantität der einzelnen Zellpopulationen (Farinha et al., 2010b; Koch et al., 2012; Lee et al., 2006b; Smeltzer et al., 2014; Wahlin et al., 2010). Eine wesentliche Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen ist, dass die Studien größtenteils in einzelnen Instituten durchgeführt wurden und die Fälle somit über einen langen Zeitraum gesammelt werden mussten. Zudem ist das folliculäre Lymphom eine langsam wachsende Neoplasie. Die Patienten erhielten also verschiedene Therapieschemata über den langen Zeitraum der Erkrankung. Dabei hat die Therapie Einfluss auf die nicht-neoplastischen Zellen des Mikroenvironments (Jong et al., 2009). Eine weitere Erklärung wären Unterschiede in der Vorgehensweise der Auswertung der Ergebnisse oder verschiedene Auswahlkriterien für das Patientenkollektiv zwischen den einzelnen Studien (de Jong and Fest, 2011) oder die Verwendung von verschiedenen Arten von Proben wie zum Beispiel TMAs oder Ganzschnitte.

In unserer Studie konnte eine Dynamik in der Zusammensetzung des Zellgehaltes FoxP3 positiver Zellen und PD-1 positiver Zellen zwischen Primärdiagnose und Rezidiv nachgewiesen werden. Die Veränderungen erwiesen sich als heterogen. Ein statistisch signifikanter Trend - sei es ein Abfall oder ein Anstieg einer Zellreihe der T-Zellsubpopulationen im Krankheitsverlauf - konnte nicht festgestellt werden. Eine Ausnahme stellte der Zellgehalt PD-1 positiver Zellen im interfollikulären Raum dar,

welcher im Krankheitsverlauf statistisch signifikant zunahm ($p= 0,0426$) (Abb. 3). In der Arbeit von Koch et al. konnte belegt werden, dass sich das nicht-neoplastische Begleit infiltrat in verschiedenen Ann-Arbor-Stadien und FLIPI-Risikogruppen unterscheidet. In frühen Stadien zeigte sich ein dem physiologischen reaktiven Begleit infiltrat ähnliches Mikroenvironment mit einem hohen Gehalt an T-Helfer Zellen und ein niedriger Gehalt an regulatorischen T-Zellen im Vergleich zu späten Stadien (Koch et al., 2012). Wenn man das Rezidiv des folliculären Lymphoms als ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium versteht, konnten in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse der Arbeit von Koch et al. nicht belegt werden. Der keimzentrumsspezifische Aufbau des Mikroenvironment geht im Krankheitsverlauf nicht verloren. Ein Grund hierfür könnte die mangelnde Vergleichbarkeit der Kohorten der beiden Arbeiten bezogen auf die Ann-Arbor-Stadien sein. In der Arbeit von Koch et al. lagen vom größten Teil der Patienten Informationen über das Ann-Arbor-Stadium vor und das Verhältnis von Patienten mit lokalisierten Stadien ($n=125$) zu Patienten mit fortgeschrittenen Stadien ($n=139$) war nahezu ausgeglichen (Koch et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit war der Zugang zu den klinischen Daten der Patienten limitiert. Von insgesamt 46 Fällen lag von 9 Fällen bei der Primärdiagnose und bei 4 Rezidivfällen das Ann-Arbor-Stadium vor. Dabei war von 3 Fällen das Ann-Arbor-Stadium im Krankheitsverlauf bekannt. Davon zeigten 2 Fälle keine Veränderung im Ann-Arbor-Stadium und ein Fall eine Evolution von einem Stadium II in ein Stadium III im Krankheitsverlauf. Eine adäquate Aussage, ob das im Krankheitsverlauf auftretende Rezidiv des folliculären Lymphoms gleichzeitig mit einem höheren Stadium nach Ann-Arbor korreliert, ließ sich nur schwer treffen. Die Hypothese einer Evolution des Mikroenvironments im Krankheitsverlauf kann weder belegt noch ausgeschlossen werden. Des Weiteren basierten die Ergebnisse der Arbeit von Koch et al. auf dem Vergleich von Primärfällen verschiedener Patienten in unterschiedlichen Stadien und nicht auf der Untersuchung sequentieller Biopsien desselben Patienten im Krankheitsverlauf wie in der vorliegenden Arbeit. Alle Patienten der Kohorte dieser Studie wurden zwischen der Primärdiagnose und dem Rezidiv therapiert. Die Therapie hat Einfluss auf die Zellen des Mikroenvironments (Jong et al., 2009). Es ist auch in Betracht zu ziehen, dass es sich bei den Rezidivfällen, um eigene Krankheitsidentitäten handeln könnte und der Rezidivfall nicht die Zeit des Lymphomwachstums und somit die Dauer des Krankheitsverlaufes darstellt.

CD-21 positive follikulär dendritische Zellen sind ein weiterer Bestandteil des nicht-neoplastischen Begleitinfiltates follikulärer Lymphome.

In der Studie von Blaker et al. waren ausgebildete Netzwerke CD-21- positiver follikulärer dendritischer Zellen ein negativer prognostischer Marker in Bezug auf Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben und waren außerdem mit einem höheren Transformationsrisiko assoziiert (Blaker et al., 2016). In der Studie von Smeltzer et al. zeigte sich das Verteilungsmuster CD14-positive follikuläre dendritische Zellen als prognostisch relevant (Smeltzer et al., 2014).

Follikulär dendritische Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese follikulärer Lymphome zum einen durch einen indirekten Einfluss auf die verschiedenen Zelllinien des follikulären Lymphoms, zum anderen durch eine direkte Unterstützung der malignen B-Zellen (Amé-Thomas and Tarte, 2014).

Follikulär dendritische Zellen unterbinden die Apoptose von transformierten malignen B-Zellen (Goval et al., 2008; Park and Choi, 2005; Smeltzer et al., 2014).

In unserer Studie wurden die CD-21 positiven follikulär dendritischen Zellen anhand ihrer Netzwerkbildung innerhalb des Follikels in drei Gruppen unterteilt. Versteht man das Rezidiv des follikulären Lymphoms als ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium und berücksichtigt man den protumoralen Einfluss der follikulär dendritischen Zellen (Amé-Thomas and Tarte, 2014; Blaker et al., 2016; Goval et al., 2008; Park and Choi, 2005; Smeltzer et al., 2014), wäre davon auszugehen, dass die Netzwerkbildung der CD-21 positiven Zellen im Krankheitsverlauf zunimmt. In der vorliegenden Arbeit konnten keine homogenen Veränderungen der Netzwerkbildung verzeichnet werden. Ein großer Teil der Pärchen verblieb im Krankheitsverlauf in seiner Gruppe. Da alle Fälle zwischen Primärdiagnose und Rezidiv therapiert wurden, ist davon auszugehen, dass die Therapie Einfluss auf die follikulär dendritischen Zellen hat. Möglicherweise handelt es sich bei dem Rezidiv auch um eine neue Krankheitsidentität.

In mehreren Studien wurde der Einfluss des Makrophagenzellgehaltes bzw. das Verteilungsmuster von Makrophagen auf die Pathogenese follikulärer Lymphome analysiert. Auch hier wiesen die Ergebnisse Diskrepanzen auf.

Während die Genexpressionsanalyse von Dave et al. bei einem Signaturmuster mit prädominant Makrophagen eine Assoziation mit einer guten Prognose zeigte (Dave et al., 2004), lies sich in den meisten anderen Studien eine negative Assoziation zwischen Makrophagenzellgehalt bzw. dem Verteilungsmuster von CD-68 positiven

Makrophagen und der Prognose oder dem Transformationsrisiko (Blaker et al., 2016; Farinha et al., 2005; Wahlin et al., 2010) verzeichnen. In unserer Studie wies der Zellgehalt CD-68 positiver Makrophagen eine Dynamik auf. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg des Makrophagenzellgehaltes im Rezidiv im Vergleich zur Primärdiagnose ($p= 0,0492$). Wird das Rezidiv des folliculären Lymphoms als ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium verstanden, stimmen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die einen ansteigenden Zellgehalt CD-68 positiver Makrophagen im Rezidiv zeigte, mit den Ergebnissen der oben genannten Studien überein, in denen ein erhöhter Makrophagengehalt mit einer schlechten Prognose oder einem höheren Transformationsrisiko korrelierte (Blaker et al., 2016; Farinha et al., 2005; Wahlin et al., 2010). In jüngsten Studien konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von Makrophagen auf die Tumorgenese von der Therapie abhängig ist. Ein hoher Gehalt an CD-68 positiver Makrophagen ist assoziiert mit einer schlechten Prognose unter einer konventionellen Chemotherapie. Diese negative Wirkung ist aufgehoben oder sogar invers unter einer Immunchemotherapie (Canioni et al., 2008; Taskinen et al., 2007). In der Analyse von Jong et al. zeigte sich, dass dichte interfollikuläre Infiltrate CD-68 positiver Makrophagen mit längerem progressionsfreiem Überleben korrelieren unter einer Therapie nach dem CVP-Protokoll (Cyclophosphamid, Vincristin, Prednisolon) als unter einer Therapie mit dem Zytostatikum Fludarabin (Jong et al., 2009). Die Therapie nach dem CVP-Protokoll richtet sich gegen die Tumorzellen, hingegen richten sich das Zytostatikum Fludarabine gegen Tumorzellen und das Mikroenvironment (de Jong, 2005; Herreros et al., 2007). Zusammenfassend zeigten die oben genannten Ergebnisse, dass das Mikroenvironment zum einen die Resonanz des folliculären Lymphoms auf die Therapie moduliert zum anderen hat die Therapie Einfluss auf das Mikroenvironment. Auch konnte gezeigt werden, dass Tumor-assoziierte Makrophagen die Effektivität von Rituximab modulieren. Es scheint eine positive Interaktion zwischen Tumor-assoziierten Makrophagen und der Ansprechbarkeit von Rituximab zu geben (Taskinen et al., 2007). Makrophagen binden therapeutische Antikörper und funktionieren als Effektoren in der Tumorbekämpfung (Minard-Colin et al., 2008; Pallasch et al., 2014). Vermittelt durch Makrophagen zeigt Rituximab eine Antikörper-abhängige zelluläre Phagozytose (antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP)) (Manches et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg des Makrophagenzellgehaltes in den Rezidivfällen

im Vergleich zu den Primärfällen. Die meisten folliculären Lymphome zeigen im Krankheitsverlauf eine kürzere Zeitspanne bis zur Remission und eine abnehmende Therapiesensibilität (Johnson et al., 1995; Project, 1997). Versteht man das Rezidiv des folliculären Lymphoms als ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium, stellt sich die Frage, warum trotz erhöhtem Makrophagenzellgehalt in den Rezidiven die Therapiesensibilität des folliculären Lymphoms im Krankheitsverlauf abnimmt. Eine mögliche Erklärung wären die verschiedenen Makrophagensubpopulationen. Das Mikroenvironment des Tumors vermittelt den Wechsel des Phänotypus der Makrophagen von einem proinflammatorisch antitumoralen wirkenden Typ 1 (M1) hin zu einem antiinflammatorisch tumorfördernden Typ 2 (M2) (Mantovani et al., 2006). M2 polarisierte Makrophagen spielen eine Rolle in der Tumorprogression. Ein Zusammenspiel aus intrinsischen Effekten der neoplastischen B-Zellen und dem Einfluss des Mikroenvironments sind wahrscheinlich Ursache für die zunehmende Therapierefrakterität der Tumore im Krankheitsverlauf. Die jüngsten Studien konnten verdeutlichen, dass die Therapeutika und das nicht neoplastische Begleit infiltrat des folliculären Lymphoms untereinander interagieren und sich gegenseitig beeinflussen. Ferner konnte gezeigt werden, dass die neoplastischen B-Zellen selbst vom Mikroenvironment beeinflusst werden (Amin et al., 2015; Pandey et al., 2017; Pangault et al., 2010). Die Anordnung der neoplastischen B-Zellen und der Zellen des nicht-neoplastischen Begleit infiltrats scheint dabei nicht spontan zu sein. So konnte die Studie von Schnottalle et al. belegen, dass die Zellen des nicht-neoplastischen Begleit infiltrates Nester bilden. Innerhalb dieser Zellnester finden Interaktionen statt. Diese Zellinteraktionen stellen wiederum mögliche Therapieansätze dar (Schnottalle et al., 2018).

Ein besseres Verständnis über den Einfluss der Therapeutika auf die verschiedenen Zellen des nicht-neoplastischen Begleit infiltrates und eine Subtypisierung der Zellen des nicht-neoplastischen Begleit infiltrates könnte nützlich sein, um die Zellnischen zu identifizieren, die maligne B-Zellen vor zytotoxischen Therapien schützen. Dadurch könnten Strategien entwickelt werden, die tumorfördernden Zellnischen zu schwächen und einen Nutzen aus den Zellnischen zu ziehen, die antitumoral wirken.

5. Zusammenfassung

Das folliculäre Lymphom gehört zu den indolenten Lymphomen und stellt in den westlichen Ländern die zweithäufigste Untergruppe der B-Zell-Lymphomen dar (Swerdlow SH et al., 2008). Das reaktive Keimzentrum wird nicht nur in seiner Morphologie, Zytologie und in seinem Immunphänotyp vom folliculären Lymphom nachgeahmt, sondern auch das Mikroenvironment des physiologischen Keimzentrums wird vom folliculären Lymphom imitiert. Das Mikroenvironment des folliculären Lymphoms setzt sich aus den gleichen nicht-neoplastischen Zellen zusammen wie das Mikroenvironment des reaktiven Keimzentrums (Klapper, 2011). Das nicht-neoplastische Begleitfiltrat nimmt dabei eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Lymphoms ein. In vorausgegangenen Arbeiten zeigte die Arbeitsgruppe, dass die Zusammensetzung des nicht-neoplastischen Begleitfiltrates mit dem Krankheitsstadium nach Ann-Arbor zum Zeitpunkt der Diagnose korreliert. In frühen Stadien, also lokalisierten folliculären Lymphomen, ähnelt das Mikroenvironment einem physiologischen Keimzentrum, d.h. es zeigt sich ein hoher Gehalt an folliculären T-Helfer-Zellen und ein niedriger Gehalt an regulatorischen T-Zellen im Vergleich zu späten Stadien (Koch et al., 2012). Eine Evolution des Mikroenvironments im Krankheitsverlauf wäre denkbar. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Zusammensetzung der nicht-neoplastischen Zellen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose und zum Zeitpunkt des Rezidivs verglichen. Zu den untersuchten nicht-neoplastischen Zellen gehörten PD-1 positive T-Helferzellen, FoxP3 positive T-regulatorische Zellen, CD-21 positive folliculäre dendritische Zellen und CD-68 positive Makrophagen. In der vorliegenden Studie zeigte sich für jede Zellsubpopulation eine Dynamik in der Zusammensetzung des Zellgehaltes zwischen Primärdiagnose und Rezidiv. Homogene Veränderungen der T-Zellsubpopulation zwischen Primärdiagnose und Rezidiv konnte nicht gezeigt werden. Eine Ausnahme zeigte sich bei dem Zellgehalt PD-1 positiver Zellen im interfollikulären Raum. Dieser nahm im Krankheitsverlauf statistisch signifikant zu. Die Ergebnisse der vorausgegangenen Arbeit von Koch et al., in der gezeigt werden konnte, dass sich die T-Zellsubpopulationen in verschiedenen Stadien unterscheiden, konnte in dieser Arbeit, wenn man das Rezidiv des folliculären Lymphoms als ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium versteht, nicht reproduziert werden. Der Zellgehalt CD-68 positiver Makrophagen zeigte einen statistisch signifikanten Anstieg im Krankheitsverlauf. Makrophagen

spielen eine heterogene Rolle in der Tumorgenese follikulärer Lymphome, die auch von der Therapie abhängt (Amé-Thomas and Tarte, 2014). Zusätzlich üben unterschiedliche Makrophagensubpopulationen verschiedene Funktionen aus. Die Untersuchung des Makrophagenzellgehaltes im Krankheitsverlauf im Zusammenhang mit der Therapie und auch der Subtypisierung von Makrophagen bei Erstdiagnose und Rezidiv könnte weitere Informationen über die Biologie des Krankheitsverlaufes bieten.

6. Literaturverzeichnis

- Agata, Y.**, Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubat, T., Yagita, H., Honjo, T., 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.* 8, 765–772.
<https://doi.org/10.1093/intimm/8.5.765>
- Akyurek, N.**, Ren, Y., Rassidakis, G.Z., Schlette, E.J., Medeiros, L.J., 2006. Expression of inhibitor of apoptosis proteins in B-cell non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas. *Cancer* 107, 1844–1851.
<https://doi.org/10.1002/cncr.22219>
- Amanzada, A.**, Malik, I.A., Blaschke, M., Khan, S., Rahman, H., Ramadori, G., Moriconi, F., 2013. Identification of CD68+ neutrophil granulocytes in in vitro model of acute inflammation and inflammatory bowel disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 6, 561–570.
- Amé-Thomas, P.**, Tarte, K., 2014. The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: role of microenvironment heterogeneity and plasticity. *Semin. Cancer Biol.* 24, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2013.08.001>
- Amin, R.**, Mourcin, F., Uhel, F., Pangault, C., Ruminy, P., Dupré, L., Guirriec, M., Marchand, T., Fest, T., Lamy, T., Tarte, K., 2015. DC-SIGN-expressing macrophages trigger activation of mannosylated IgM B-cell receptor in follicular lymphoma. *Blood* 126, 1911–1920. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-640912>
- Andreeva, E.R.**, Pugach, I.M., Orekhov, A.N., 1997. Subendothelial smooth muscle cells of human aorta express macrophage antigen in situ and in vitro. *Atherosclerosis* 135, 19–27. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(97\)00136-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(97)00136-6)
- Barois, N.**, de Saint-Vis, B., Lebecque, S., Geuze, H.J., Kleijmeer, M.J., 2002. MHC class II compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation. *Traffic Cph. Den.* 3, 894–905.
- Bennett, C.L.**, Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., Ochs, H.D., 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27, 20–21.
<https://doi.org/10.1038/83713>
- Berendt, M.J.**, North, R.J., 1980. T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. *J. Exp. Med.* 151, 69–80. <https://doi.org/10.1084/jem.151.1.69>
- Berger, R.**, Rotem-Yehudar, R., Slama, G., Landes, S., Kneller, A., Leiba, M., Koren-Michowitz, M., Shimon, A., Nagler, A., 2008. Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of CT-011, a Humanized Antibody Interacting with PD-1, in Patients with Advanced Hematologic Malignancies. *Clin. Cancer Res.* 14, 3044–3051. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4079>

Betjes, M.G.H., Haks, M.C., Tuk, C.W., Beelen, R.H.J., 1991. Monoclonal Antibody EBM11 (Anti-CD68) Discriminates between Dendritic Cells and Macrophages after Short-Term Culture. *Immunobiology* 183, 79–87.
[https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(11\)80187-7](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(11)80187-7)

Beyer, M., Schultze, J.L., 2006. Regulatory T cells in cancer. *Blood* 108, 804–811.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-002774>

Blaker, Y.N., Spetalen, S., Brodtkorb, M., Lingjaerde, O.C., Beiske, K., Østenstad, B., Sander, B., Wahlin, B.E., Melen, C.M., Myklebust, J.H., Holte, H., Delabie, J., Smeland, E.B., 2016. The tumour microenvironment influences survival and time to transformation in follicular lymphoma in the rituximab era. *Br. J. Haematol.* 175, 102–114. <https://doi.org/10.1111/bjh.14201>

Boenisch, T., 2006. Handbuch Immunchemische Färbemethoden, in: Immunchemische Färbemethoden. Dako, p. S. 34-42.

Bora, N.S., Lublin, D.M., Kumar, B.V., Hockett, R.D., Holers, V.M., Atkinson, J.P., 1989. Structural gene for human membrane cofactor protein (MCP) of complement maps to within 100 kb of the 3' end of the C3b/C4b receptor gene. *J. Exp. Med.* 169, 597–602.

Brahmer, J.R., Tykodi, S.S., Chow, L.Q.M., Hwu, W.-J., Topalian, S.L., Hwu, P., Drake, C.G., Camacho, L.H., Kauh, J., Odunsi, K., Pitot, H.C., Hamid, O., Bhatia, S., Martins, R., Eaton, K., Chen, S., Salay, T.M., Alaparthi, S., Grosso, J.F., Korman, A.J., Parker, S.M., Agrawal, S., Goldberg, S.M., Pardoll, D.M., Gupta, A., Wigginton, J.M., 2012. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N. Engl. J. Med.* 366, 2455–2465. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200694>

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paeper, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., Ramsdell, F., 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27, 68–73.
<https://doi.org/10.1038/83784>

Buske, C., Hoster, E., Dreyling, M., Hasford, J., Unterhalt, M., Hiddemann, W., 2006. The Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) separates high-risk from intermediate- or low-risk patients with advanced-stage follicular lymphoma treated front-line with rituximab and the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) with respect to treatment outcome. *Blood* 108, 1504–1508.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-013367>

Campbell, B.A., Voss, N., Woods, R., Gascoyne, R.D., Morris, J., Pickles, T., Connors, J.M., Savage, K.J., 2010. Long-term outcomes for patients with limited stage follicular lymphoma: involved regional radiotherapy versus involved node radiotherapy. *Cancer* 116, 3797–3806.
<https://doi.org/10.1002/cncr.25117>

- Canioni, D.**, Salles, G., Mounier, N., Brousse, N., Keuppens, M., Morschhauser, F., Lamy, T., Sonet, A., Rousselet, M.-C., Foussard, C., Xerri, L., 2008. High Numbers of Tumor-Associated Macrophages Have an Adverse Prognostic Value That Can Be Circumvented by Rituximab in Patients With Follicular Lymphoma Enrolled Onto the GELA-GOELAMS FL-2000 Trial. *J. Clin. Oncol.* 26, 440–446. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.8298>
- Carel, J.C.**, Myones, B.L., Frazier, B., Holers, V.M., 1990. Structural requirements for C3d,g/Epstein-Barr virus receptor (CR2/CD21) ligand binding, internalization, and viral infection. *J. Biol. Chem.* 265, 12293–12299.
- Carreras, J.**, Lopez-Guillermo, A., Fox, B.C., Colomo, L., Martinez, A., Roncador, G., Montserrat, E., Campo, E., Banham, A.H., 2006. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* 108, 2957–2964. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-018218>
- Carreras, J.**, Lopez-Guillermo, A., Roncador, G., Villamor, N., Colomo, L., Martinez, A., Hamoudi, R., Howat, W.J., Montserrat, E., Campo, E., 2009. High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 1470–1476. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.0513>
- Chakraborty, N.G.**, Twardzik, D.R., Sivanandham, M., Ergin, M.T., Hellstrom, K.E., Mukherji, B., 1990. Autologous melanoma-induced activation of regulatory T cells that suppress cytotoxic response. *J. Immunol.* 145, 2359–2364.
- Chatila, T.A.**, Blaeser, F., Ho, N., Lederman, H.M., Voulgaropoulos, C., Helms, C., Bowcock, A.M., 2000. *JM2*, encoding a fork head–related protein, is mutated in X-linked autoimmunity–allergic disregulation syndrome. *J. Clin. Invest.* 106, R75–R81. <https://doi.org/10.1172/JCI11679>
- Chistiakov, D.A.**, Killingsworth, M.C., Myasoedova, V.A., Orehkov, A.N., Bobryshev, Y.V., 2016. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab. Invest.* <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.116>
- Coffelt, S.B.**, Hughes, R., Lewis, C.E., 2009. Tumor-associated macrophages: Effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer*, Bone marrow-derived cells in tumor growth and metastasis 1796, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.02.004>
- Cooper, N.R.**, Bradt, B.M., Rhim, J.S., Nemerow, G.R., 1990. CR2 complement receptor. *J. Invest. Dermatol.* 94, 112S–117S.
- Cooper, N.R.**, Moore, M.D., Nemerow, G.R., 1988. Immunobiology of CR2, the B lymphocyte receptor for Epstein-Barr virus and the C3d complement fragment. *Annu. Rev. Immunol.* 6, 85–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.06.040188.000505>

Dave, S.S., Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Gascoyne, R.D., Chan, W.C., Fisher, R.I., Braziel, R.M., Rimsza, L.M., Grogan, T.M., Miller, T.P., LeBlanc, M., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Lynch, J.C., Vose, J., Armitage, J.O., Smeland, E.B., Kvaloy, S., Holte, H., Delabie, J., Connors, J.M., Lansdorp, P.M., Ouyang, Q., Lister, T.A., Davies, A.J., Norton, A.J., Muller-Hermelink, H.K., Ott, G., Campo, E., Montserrat, E., Wilson, W.H., Jaffe, E.S., Simon, R., Yang, L., Powell, J., Zhao, H., Goldschmidt, N., Chiorazzi, M., Staudt, L.M., 2004. Prediction of Survival in Follicular Lymphoma Based on Molecular Features of Tumor-Infiltrating Immune Cells. *N. Engl. J. Med.* 351, 2159–2169. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa041869>

de Jong, D., 2005. Molecular Pathogenesis of Follicular Lymphoma: A Cross Talk of Genetic and Immunologic Factors. *J. Clin. Oncol.* 23, 6358–6363. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.26.856>

de Jong, D., Fest, T., 2011. The microenvironment in follicular lymphoma. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 24, 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2011.02.007>

Dorfman, D.M., Brown, J.A., Shahsafaei, A., Freeman, G.J., 2006. Programmed Death-1 (PD-1) is a Marker of Germinal Center-associated T Cells and Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 30, 802–810. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000209855.28282.ce>

Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2004. The immunobiology of cancer immuno-surveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>

Farinha, P., Al-Tourah, A., Gill, K., Klasa, R., Connors, J.M., Gascoyne, R.D., 2010a. The architectural pattern of FOXP3-positive T cells in follicular lymphoma is an independent predictor of survival and histologic transformation. *Blood* 115, 289–295. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235598>

Farinha, P., Al-Tourah, A., Gill, K., Klasa, R., Connors, J.M., Gascoyne, R.D., 2010b. The architectural pattern of FOXP3-positive T cells in follicular lymphoma is an independent predictor of survival and histologic transformation. *Blood* 115, 289–295. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235598>

Farinha, P., Kyle, A.H., Minchinton, A.I., Connors, J.M., Karsan, A., Gascoyne, R.D., 2010c. Vascularization predicts overall survival and risk of transformation in follicular lymphoma. *Haematologica* 95, 2157–2160. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.021766>

Farinha, P., Masoudi, H., Skinnider, B.F., Shumansky, K., Spinelli, J.J., Gill, K., Klasa, R., Voss, N., Connors, J.M., Gascoyne, R.D., 2005. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood* 106, 2169–2174. 2,52

Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J.B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F.J., Stanley, E.R., Segall, J.E., Condeelis, J.S., 2005. Macrophages Promote the Invasion

of Breast Carcinoma Cells via a Colony-Stimulating Factor-1/Epidermal Growth Factor Paracrine Loop. *Cancer Res.* 65, 5278–5283.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1853>

Gottfried, E., Kunz-Schughart, L.A., Weber, A., Rehli, M., Peuker, A., Müller, A., Kastenberger, M., Brockhoff, G., Andreesen, R., Kreutz, M., 2008. Expression of CD68 in Non-Myeloid Cell Types. *Scand. J. Immunol.* 67, 453–463.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2008.02091.x>

Goval, J.-J., Thielen, C., Bourguignon, C., Greimers, R., Dejardin, E., Choi, Y.S., Boniver, J., Leval, L. de, 2008. The prevention of spontaneous apoptosis of follicular lymphoma B cells by a follicular dendritic cell line: involvement of caspase-3, caspase-8 and c-FLIP. *Haematologica* 93, 1169–1177.
<https://doi.org/10.3324/haematol.12127>

Greaves, D.R., Gordon, S., 2002. Macrophage-Specific Gene Expression: Current Paradigms and Future Challenges. *Int. J. Hematol.* 76, 6.
<https://doi.org/10.1007/BF02982713>

Greaves, D.R., Quinn, C.M., Seldin, M.F., Gordon, S., 1998. Functional Comparison of the Murine Macrosialin and Human CD68 Promoters in Macrophage and Nonmacrophage Cell Lines. *Genomics* 54, 165–168.
<https://doi.org/10.1006/geno.1998.5546>

Hannan, J.P., 2016. The Structure-Function Relationships of Complement Receptor Type 2 (CR2; CD21). *Curr. Protein Pept. Sci.* 17, 463–487.

Herreros, B., Sanchez-Aguilera, A., Piris, M.A., 2007. Lymphoma microenvironment: culprit or innocent? *Leukemia* 22, 49–58.
<https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404970>

Hiddemann, W., Kneba, M., Dreyling, M., Schmitz, N., Lengfelder, E., Schmits, R., Reiser, M., Metzner, B., Harder, H., Hegewisch-Becker, S., Fischer, T., Kropff, M., Reis, H.-E., Freund, M., Wörmann, B., Fuchs, R., Planker, M., Schimke, J., Eimermacher, H., Trümper, L., Aldaoud, A., Parwaresch, R., Unterhalt, M., 2005. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 106, 3725–3732. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0016>

Hogg, N., Ross, G.D., Jones, D.B., Slusarenko, M., Walport, M.J., Lachmann, P.J., 1984. Identification of an anti-monocyte monoclonal antibody that is specific for membrane complement receptor type one (CR1). *Eur. J. Immunol.* 14, 236–243. <https://doi.org/10.1002/eji.1830140307>

Holness, C.L., Silva, R.P. da, Fawcett, J., Gordon, S., Simmons, D.L., 1993. Macrosialin, a mouse macrophage-restricted glycoprotein, is a member of the lamp/lgp family. *J. Biol. Chem.* 268, 9661–9666.

- Holness, C.L.**, Simmons, D.L., 1993. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 81, 1607–1613.
- Hori, S.**, Nomura, T., Sakaguchi, S., 2003. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061.
<https://doi.org/10.1126/science.1079490>
- Horn, H.**, Schmelter, C., Leich, E., Salaverria, I., Katzenberger, T., Ott, M.M., Kalla, J., Romero, M., Siebert, R., Rosenwald, A., Ott, G., 2011. Follicular lymphoma grade 3B is a distinct neoplasm according to cytogenetic and immunohistochemical profiles. *Haematologica* 96, 1327–1334.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2011.042531>
- Horning, S.J.**, Rosenberg, S.A., 1984. The Natural History of Initially Untreated Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 311, Keir, M.E.1471–1475. <https://doi.org/10.1056/NEJM198412063112303>
- Hourcade, D.**, Holers, V.M., Atkinson, J.P., 1989. The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. *Adv. Immunol.* 45, 381–416.
- Ishida, Y.**, Agata, Y., Shibahara, K., Honjo, T., 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 11, 3887–3895.
- Johnson, P.W.**, Rohatiner, A.Z., Whelan, J.S., Price, C.G., Love, S., Lim, J., Matthews, J., Norton, A.J., Amess, J.A., Lister, T.A., 1995. Patterns of survival in patients with recurrent follicular lymphoma: a 20-year study from a single center. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 13, 140–147.
<https://doi.org/10.1200/jco.1995.13.1.140>
- Jong, D. de**, Koster, A., Hagenbeek, A., Raemaekers, J., Veldhuizen, D., Heisterkamp, S., Boer, J.P. de, Glabbeke, M. van, 2009. Impact of the tumor microenvironment on prognosis in follicular lymphoma is dependent on specific treatment protocols. *Haematologica* 94, 70–77.
<https://doi.org/10.3324/haematol.13574>
- Butte, M.J.**, Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 2008. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 677–704.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331>
- Key, M.**, 2006. Handbuch Immunchemische Färbemethoden, in: Immunchemische Färbemethoden. Dako, p. S. 30-35.
- Khattri, R.**, Cox, T., Yasayko, S.-A., Ramsdell, F., 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* 4, 337–342.
<https://doi.org/10.1038/ni909>
- Klapper, W.**, 2011. Pathobiology and diagnosis of follicular lymphoma. *Semin. Diagn. Pathol., Seminars on Lymphomas, Part I* 28, 146–160.
<https://doi.org/10.1053/j.semfp.2011.02.006>

- Klapper, W.**, Wacker, H.H., 2007. [Follicular and mantle cell lymphoma. Extranodal involvement of primarily nodal indolent B-cell lymphomas]. Pathol. 28, 21–28. <https://doi.org/10.1007/s00292-006-0878-2>
- Klein, J.L.**, Nguyen, T.T., Bien-Willner, G.A., Chen, L., Foyil, K.V., Bartlett, N.L., Duncavage, E.J., Hassan, A., Frater, J.L., Kreisel, F., 2014. CD163 Immunohistochemistry Is Superior to CD68 in Predicting Outcome in Classical Hodgkin Lymphoma. Am. J. Clin. Pathol. 141, 381–387. <https://doi.org/10.1309/AJCP61TLMXLSLJYS>
- Koch, K.**, Hoster, E., Unterhalt, M., Ott, G., Rosenwald, A., Hansmann, M.L., Engelhard, M., Hiddemann, W., Klapper, W., 2012. The composition of the microenvironment in follicular lymphoma is associated with the stage of the disease. Hum. Pathol. 43, 2274–2281. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.03.025>
- Koch, K.**, Hoster, E., Ziepert, M., Unterhalt, M., Ott, G., Rosenwald, A., Hansmann, M.L., Bernd, W., Stein, H., Pöschel, V., Dreyling, M., Trümper, L., Löffler, M., Schmitz, N., Hiddemann, W., Pfreundschuh, M., Klapper, W., 2016. Clinical, pathological and genetic features of follicular lymphoma grade 3A: a joint analysis of the German low-grade and high-grade lymphoma study groups GLSG and DSHNHL. Ann. Oncol. 27, 1323–1329. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw185>
- Kondo, M.**, 2010. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. Immunol. Rev. 238, 37–46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00963.x>
- Kridel, R.**, Xerri, L., Gelas-Dore, B., Tan, K., Feugier, P., Vawda, A., Canioni, D., Farinha, P., Boussetta, S., Moccia, A.A., Brice, P., Chavez, E.A., Kyle, A.H., Scott, D.W., Sanders, A.D., Fabiani, B., Slack, G.W., Minchinton, A.I., Haioun, C., Connors, J.M., Sehn, L.H., Steidl, C., Gascoyne, R.D., Salles, G., 2015. The Prognostic Impact of CD163-Positive Macrophages in Follicular Lymphoma: A Study from the BC Cancer Agency and the Lymphoma Study Association. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 21, 3428–3435. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3253>
- Küppers, R.**, Dalla-Favera, R., 2001. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. Publ. Online 10 Sept. 2001 Doi101038sjonc1204640 20. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204640>
- Latchman, Y.**, Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., Greenfield, E.A., Bourque, K., Boussiotis, V.A., Carter, L.L., Carreno, B.M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. Nat. Immunol. 2, 261–268. <https://doi.org/10.1038/85330>
- Lee, A.M.**, Clear, A.J., Calaminici, M., Davies, A.J., Jordan, S., MacDougall, F., Matthews, J., Norton, A.J., Gribben, J.G., Lister, T.A., Goff, L.K., 2006a. Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3-positive cells in

diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 5052–5059.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.4642>

Lee, A.M., Clear, A.J., Calaminici, M., Davies, A.J., Jordan, S., MacDougall, F., Matthews, J., Norton, A.J., Gribben, J.G., Lister, T.A., Goff, L.K., 2006b. Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3-positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 5052–5059.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.4642>

Leich, E., Hoster, E., Wartenberg, M., Unterhalt, M., Siebert, R., Koch, K., Klapper, W., Engelhard, M., Puppe, B., Horn, H., Staiger, A.M., Stuhlmann-Laeisz, C., Bernd, H.W., Feller, A.C., Hummel, M., Lenze, D., Stein, H., Hartmann, S., Hansmann, M.L., Möller, P., Hiddemann, W., Dreyling, M., Ott, G., Rosenwald, A., 2016. Similar clinical features in follicular lymphomas with and without breaks in the BCL2 locus | Leukemia [WWW Document]. URL <https://www.nature.com/articles/leu2015330> (accessed 5.16.19).

Loeffler, M., Kreuz, M., Haake, A., Hasenclever, D., Trautmann, H., Arnold, C., Winter, K., Koch, K., Klapper, W., Scholtysik, R., Rosolowski, M., Hoffmann, S., Ammerpohl, O., Szczepanowski, M., Herrmann, D., Küppers, R., Pott, C., Siebert, R., 2015. Genomic and epigenomic co-evolution in follicular lymphomas. *Leukemia* 29, 456–463. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.209>

M, I., Y, I., Y, T., T, O., Gj, F., N, M., T, H., 2002. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol. Lett.* 84, 57–62.
[https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(02\)00142-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(02)00142-6)

Maeshima, A.M., Taniguchi, H., Nomoto, J., Miyamoto, K., Fukuwara, S., Munakata, W., Maruyama, D., Kim, S.-W., Watanabe, T., Kobayashi, Y., Tobinai, K., Tsuda, H., 2013. Prognostic implications of histologic grade and intensity of Bcl-2 expression in follicular lymphomas undergoing rituximab-containing therapy. *Hum. Pathol.* 44, 2529–2535.
<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.06.013>

Manches, O., Lui, G., Chaperot, L., Gressin, R., Molens, J.-P., Jacob, M.-C., Sotto, J.-J., Leroux, D., Bensa, J.-C., Plumas, J., 2003. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101, 949–954.
<https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0469>

Mantovani, A., Schioppa, T., Porta, C., Allavena, P., Sica, A., 2006. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 315–322. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-9001-7>

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A., 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23, 549–555.
[https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02302-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02302-5)

- Mills, C.D.**, Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., Hill, A.M., 2000. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J. Immunol.* 164, 6166–6173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>
- Minard-Colin, V.**, Xiu, Y., Poe, J.C., Horikawa, M., Magro, C.M., Hamaguchi, Y., Haas, K.M., Tedder, T.F., 2008. Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage Fc γ RI, Fc γ RIII, and Fc γ RIV. *Blood* 112, 1205–1213. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-135160>
- Montoto, S.**, Davies, A.J., Matthews, J., Calaminici, M., Norton, A.J., Amess, J., Vinnicombe, S., Waters, R., Rohatiner, A.Z.S., Lister, T.A., 2007. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 2426–2433. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.3260>
- Nishimura, H.**, Honjo, T., 2001. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol.* 22, 265–268. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)01888-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)01888-9)
- Nishimura, H.**, Nose, M., Hiai, H., Minato, N., Honjo, T., 1999. Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. *Immunity* 11, 141–151. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80089-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80089-8)
- Nishimura, H.**, Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N., Honjo, T., 2001. Autoimmune Dilated Cardiomyopathy in PD-1 Receptor-Deficient Mice. *Science* 291, 319–322. <https://doi.org/10.1126/science.291.5502.319>
- Okazaki, T.**, Honjo, T., 2007. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int. Immunol.* 19, 813–824. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm057>
- Okosun, J.**, Bödör, C., Wang, J., Araf, S., Yang, C.-Y., Pan, C., Boller, S., Cittaro, D., Bozek, M., Iqbal, S., Matthews, J., Wrench, D., Marzec, J., Tawana, K., Popov, N., O'Riain, C., O'Shea, D., Carlotti, E., Davies, A., Lawrie, C.H., Matolcsy, A., Calaminici, M., Norton, A., Byers, R.J., Mein, C., Stupka, E., Lister, T.A., Lenz, G., Montoto, S., Gribben, J.G., Fan, Y., Grosschedl, R., Chelala, C., Fitzgibbon, J., 2014. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat. Genet.* 46, 176–181. <https://doi.org/10.1038/ng.2856>
- Ott, G., Katzenberger, T.**, Lohr, A., Kindelberger, S., Rüdiger, T., Wilhelm, M., Kalla, J., Rosenwald, A., Müller, J.G., Ott, M.M., Müller-Hermelink, H.K., 2002. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood* 99, 3806–3812. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3806>
- Pallasch, C.P.**, Leskov, I., Braun, C.J., Vorholt, D., Drake, A., Soto-Feliciano, Y.M., Bent, E.H., Schwamb, J., Iliopoulos, B., Kutsch, N., van Rooijen, N., Frenzel,

L.P., Wendtner, C.M., Heukamp, L., Kreuzer, K.A., Hallek, M., Chen, J., Hemann, M.T., 2014. Sensitizing Protective Tumor Microenvironments to Antibody-Mediated Therapy. *Cell* 156, 590–602.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.041>

Pandey, S., Mourcin, F., Marchand, T., Nayar, S., Guirriec, M., Pangault, C., Monvoisin, C., Amé-Thomas, P., Guilloton, F., Dulong, J., Coles, M., Fest, T., Mottok, A., Barone, F., Tarte, K., 2017. IL-4/CXCL12 loop is a key regulator of lymphoid stroma function in follicular lymphoma. *Blood* 129, 2507–2518.
<https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-737239>

Pangault, C., Amé-Thomas, P., Ruminy, P., Rossille, D., Caron, G., Baia, M., De Vos, J., Roussel, M., Monvoisin, C., Lamy, T., Tilly, H., Gaulard, P., Tarte, K., Fest, T., 2010. Follicular lymphoma cell niche: identification of a preeminent IL-4-dependent T(FH)-B cell axis. *Leukemia* 24, 2080–2089.
<https://doi.org/10.1038/leu.2010.223>

Park, C.-S., Choi, Y.S., 2005. How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology* 114, 2–10.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.02075.x>

Project, T.N.-H.L.C., 1997. A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* 89, 3909–3918.

Pugh, T.J., Ballonoff, A., Newman, F., Rabinovitch, R., 2010. Improved survival in patients with early stage low-grade follicular lymphoma treated with radiation. *Cancer* 116, 3843–3851. <https://doi.org/10.1002/cncr.25149>

Rey-Campos, J., Rubinstein, P., Rodriguez de Cordoba, S., 1988. A physical map of the human regulator of complement activation gene cluster linking the complement genes CR1, CR2, DAF, and C4BP. *J. Exp. Med.* 167, 664–669.

Reynes, M., Aubert, J.P., Cohen, J.H., Audouin, J., Tricottet, V., Diebold, J., Kazatchkine, M.D., 1985. Human follicular dendritic cells express CR1, CR2, and CR3 complement receptor antigens. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 135, 2687–2694.

Richendollar, B.G., Pohlman, B., Elson, P., Hsi, E.D., 2011. Follicular programmed death 1-positive lymphocytes in the tumor microenvironment are an independent prognostic factor in follicular lymphoma. *Hum. Pathol.* 42, 552–557. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.08.015>

Roncador, G., Verdes-Montenegro, J.-F.G., Tedoldi, S., Paterson, J.C., Klapper, W., Ballabio, E., Maestre, L., Pileri, S., Hansmann, M.-L., Piris, M.A., Mason, D.Y., Marafioti, T., 2007. Expression of two markers of germinal center T cells (SAP and PD-1) in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Haematologica* 92, 1059–1066. <https://doi.org/10.3324/haematol.10864>

Roulland, S., Lebailly, P., Lecluse, Y., Heutte, N., Nadel, B., Gauduchon, P., 2005. Long-term clonal persistence and evolution of t(14;18)-bearing B cells in

healthy individuals. *Leukemia* 20, 158–162.
<https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404035>

Roulland, S., Navarro, J.-M., Grenot, P., Milili, M., Agopian, J., Montpellier, B., Gauduchon, P., Lebailly, P., Schiff, C., Nadel, B., 2006. Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J. Exp. Med.* 203, 2425–2431.
<https://doi.org/10.1084/jem.20061292>

R. Walker, M., Kasprowicz, D.J., Gersuk, V.H., Bènard, A., Van Landeghen, M., Buckner, J.H., Ziegler, S.F., 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25+ T cells. *J. Clin. Invest.* 112, 1437–1443. <https://doi.org/10.1172/JCI200319441>

Savage, N.D.L., Boer, T. de, Walburg, K.V., Joosten, S.A., Meijgaarden, K. van, Geluk, A., Ottenhoff, T.H.M., 2008. Human Anti-Inflammatory Macrophages Induce Foxp3+GITR+CD25+ Regulatory T Cells, Which Suppress via Membrane-Bound TGF β -1. *J. Immunol.* 181, 2220–2226.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.2220>

Schnotalle, P., Koch, K., Au-Yeung, R.K.H., Reinke, S., Winter, K., Loeffler, M., Braumann, U.-D., Klapper, W., 2018. T-Cell Clustering in Neoplastic Follicles of Follicular Lymphoma. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* 11, 135–140. <https://doi.org/10.1007/s12307-018-0217-1>

Schoppmann, S.F., Birner, P., Stöckl, J., Kalt, R., Ullrich, R., Caucig, C., Kriehuber, E., Nagy, K., Alitalo, K., Kerjaschki, D., 2002. Tumor-Associated Macrophages Express Lymphatic Endothelial Growth Factors and Are Related to Peritumoral Lymphangiogenesis. *Am. J. Pathol.* 161, 947–956.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64255-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64255-1)

Schüler, F., Dölken, L., Hirt, C., Kiefer, T., Berg, T., Fusch, G., Weitmann, K., Hoffmann, W., Fusch, C., Janz, S., Rabkin, C.S., Dölken, G., n.d. Prevalence and frequency of circulating t(14;18)-MBR translocation carrying cells in healthy individuals. *Int. J. Cancer* 124, 958–963.

Schwaenen, C., Viardot, A., Berger, H., Barth, T.F.E., Bentink, S., Döhner, H., Enz, M., Feller, A.C., Hansmann, M.-L., Hummel, M., Kestler, H.A., Klapper, W., Kreuz, M., Lenze, D., Loeffler, M., Möller, P., Müller-Hermelink, H.-K., Ott, G., Rosolowski, M., Rosenwald, A., Ruf, S., Siebert, R., Spang, R., Stein, H., Truemper, L., Lichten, P., Bentz, M., Wessendorf, S., Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche Krebshilfe, 2009. Microarray-based genomic profiling reveals novel genomic aberrations in follicular lymphoma which associate with patient survival and gene expression status. *Genes. Chromosomes Cancer* 48, 39–54.
<https://doi.org/10.1002/gcc.20617>

Smeltzer, J.P., Jones, J.M., Ziesmer, S.C., Grote, D.M., Xiu, B., Ristow, K.M., Yang, Z.Z., Nowakowski, G.S., Feldman, A.L., Cerhan, J.R., Novak, A.J., Ansell, S.M., 2014. Pattern of CD14+ Follicular Dendritic Cells and PD1+ T Cells

Independently Predicts Time to Transformation in Follicular Lymphoma. Clin. Cancer Res. 20, 2862–2872. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2367>

Solal-Célyny, P., Roy, P., Colombat, P., White, J., Armitage, J.O., Arranz-Saez, R., Au, W.Y., Bellei, M., Brice, P., Caballero, D., Coiffier, B., Conde-Garcia, E., Doyen, C., Federico, M., Fisher, R.I., Garcia-Conde, J.F., Guglielmi, C., Hagenbeek, A., Haioun, C., LeBlanc, M., Lister, A.T., Lopez-Guillermo, A., McLaughlin, P., Milpied, N., Morel, P., Mounier, N., Proctor, S.J., Rohatiner, A., Smith, P., Soubeyran, P., Tilly, H., Vitolo, U., Zinzani, P.-L., Zucca, E., Montserrat, E., 2004. Follicular Lymphoma International Prognostic Index. Blood 104, 1258–1265. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4434>

Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., Allavena, P., 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. J. Leukoc. Biol. 86, 1065–1073. <https://doi.org/10.1189/jlb.0609385>

Sweetenham, J.W., Goldman, B., LeBlanc, M.L., Cook, J.R., Tubbs, R.R., Press, O.W., Maloney, D.G., Fisher, R.I., Rimsza, L.M., Braziel, R.M., Hsi, E.D., 2010. Prognostic value of regulatory T cells, lymphoma-associated macrophages, and MUM-1 expression in follicular lymphoma treated before and after the introduction of monoclonal antibody therapy: a Southwest Oncology Group Study. Ann. Oncol. 21, 1196–1202. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp460>

Swerdlow SH et al., 2008. WHO Classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues.

Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., Sakaguchi, S., 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. Int. Immunol. 10, 1969–1980. <https://doi.org/10.1093/intimm/10.12.1969>

Taskinen, M., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Leppä, S., 2008. Prognostic influence of tumor-infiltrating mast cells in patients with follicular lymphoma treated with rituximab and CHOP. Blood 111, 4664–4667. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-125823>

Taskinen, M., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Nyman, H., Eerola, L.-M., Leppä, S., 2007. A high tumor-associated macrophage content predicts favorable outcome in follicular lymphoma patients treated with rituximab and cyclophosphamide-doxorubicin-vincristine-prednisone. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 13, 5784–5789. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0778>

Thornton, A.M., Shevach, E.M., 1998. CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. J. Exp. Med. 188, 287–296.

Tzankov, A., Meier, C., Hirschmann, P., Went, P., Pileri, S.A., Dirnhofer, S., 2008. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with

improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 93, 193–200. <https://doi.org/10.3324/haematol.11702>

van der Valk, P., van der Loo, E.M., Jansen, J., Daha, M.R., Meijer, C.J., 1984. Analysis of lymphoid and dendritic cells in human lymph node, tonsil and spleen. A study using monoclonal and heterologous antibodies. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 45, 169–185.

Vibhakar, R., Juan, G., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., Finger, L.R., 1997. Activation-Induced Expression of Human Programmed Death-1 Gene in T-Lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 232, 25–28. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3493>

Wahlin, B.E., Aggarwal, M., Montes-Moreno, S., Gonzalez, L.F., Roncador, G., Sanchez-Verde, L., Christensson, B., Sander, B., Kimby, E., 2010. A Unifying Microenvironment Model in Follicular Lymphoma: Outcome Is Predicted by Programmed Death-1–Positive, Regulatory, Cytotoxic, and Helper T Cells and Macrophages. *Clin. Cancer Res.* 16, 637–650. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2487>

Wahlin, B.E., Sander, B., Christensson, B., Kimby, E., 2007. CD8+ T-Cell Content in Diagnostic Lymph Nodes Measured by Flow Cytometry Is a Predictor of Survival in Follicular Lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 13, 388–397. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1734>

Wahlin, B.E., Sundström, C., Sander, B., Christensson, B., Jeppsson-Ahlberg, Å., Hjalmarsson, E., Holte, H., Østenstad, B., Brown, P.D., Smeland, E.B., Kimby, E., 2014. Higher World Health Organization grades of follicular lymphoma correlate with better outcome in two Nordic Lymphoma Group trials of rituximab without chemotherapy. *Leuk. Lymphoma* 55, 288–295. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.802778>

Wahlin, B.E., Yri, O.E., Kimby, E., Holte, H., Delabie, J., Smeland, E.B., Sundström, C., Christensson, B., Sander, B., 2012. Clinical significance of the WHO grades of follicular lymphoma in a population-based cohort of 505 patients with long follow-up times. *Br. J. Haematol.* 156, 225–233. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08942.x>

Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., Bricarelli, F.D., Byrne, G., McEuen, M., Proll, S., Appleby, M., Brunkow, M.E., 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* 27, 18–20. <https://doi.org/10.1038/83707>

Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E.Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E.R., Graf, T., Pollard, J.W., Segall, J., Condeelis, J., 2004. A Paracrine Loop between Tumor Cells and Macrophages Is Required for Tumor Cell Migration in Mammary Tumors. *Cancer Res.* 64, 7022–7029. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1449>

Yunis, J.J., Oken, M.M., Kaplan, M.E., Ensrud, K.M., Howe, R.R., Theologides, A.,
1982. Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-
Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 307, 1231–1236.
<https://doi.org/10.1056/NEJM19821113072002>

Danksagung

Prof. Dr. Wolfram Klapper danke ich für die sehr gute Betreuung während der Arbeit. Sein außerordentliches Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten haben mir geholfen die Arbeit voranzubringen und ein über die Doktorarbeit hinausreichendes Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten zu entwickeln.

Dr. Karoline Koch danke ich für die guten Ratschläge und konstruktiven Verbesserungsvorschläge. Während der gesamten Arbeit hat sie mich zuverlässig unterstützt.

Für die sehr gute Einführung in immunhistochemische Techniken, die Unterstützung bei der Anfertigung und Auswertung der Färbungen und die freundliche Aufnahme im Labor möchte ich mich bei Charlotte Botz-Von Drathen und Dana Germer bedanken.

Meinen Eltern, Ursula Pfahl und Gottfried Böhling danke ich von Herzen für ihre hervorragende Unterstützung, ihre Zuverlässigkeit und Beständigkeit.