

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

**Klinische und histopathologische Charakterisierung
von primär kutanen CD4+ klein- bis
mittelgroßzelligen T-Zell-Lymphoproliferationen**

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

vorgelegt von

Thomas Christian Wüseke

aus Hamburg

Kiel 2021

1. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. Ilske Oschlies, Institut für Pathologie

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Björn Konukiewitz, Institut für Pathologie

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 24.08.2022

gez.:

Vorsitzender der Prüfungskommission

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Definition und Klassifikation der primär kutanen Lymphome.....	1
1.2 Primär kutane CD4+ klein- bis mittelgroßzellige T-Zell-Lymphoproliferation (CD4LPD).....	2
1.3 PD-1.....	4
1.4 Cyclin D1.....	5
1.5 Fragestellungen.....	8
2. Material und Methoden.....	9
2.1 Zusammenstellung des Probenkollektivs.....	9
2.2 Histopathologische Diagnostik und Immunphänotypisierung.....	11
2.2.1 Histopathologische Evaluation.....	11
Bestimmung des Wachsmusters der CD4LPD.....	11
Bestimmung der Klonalität der T-Zellinfiltrate.....	12
2.2.1 Immunphänotypisierung.....	14
Bestimmung der Proliferationsrate.....	14
2.2.2 Immunhistochemische Färbung.....	14
2.2.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	16
Anteil der B- und T-Zellen, sowie der PD-1-positiven lymphatischen Zellen in % des gesamten Infiltrates.....	16
Verteilung der PD-1 Population.....	16
Untersuchung der Plasmazellinfiltration.....	17
Untersuchung auf eine Cyclin D1/PD-1 Koexpression.....	17
Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Frage molekularer Alterationen des <i>Cyclin D1</i> Gens.....	18
2.3 Klinische Datenerhebung.....	19
3. Ergebnisse.....	24
3.1 Zusammenstellung des Probenkollektivs.....	24

3.2 Histopathologische Diagnostik.....	24
3.2.1 Histomorphologische Evaluation	24
Bestimmung des Infiltrationsmusters.....	24
Bestimmung der Klonalität der T-Zellinfiltrate	25
3.2.2 Immunphänotypisierung	26
Bestimmung der Proliferationsrate	26
3.2.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	27
Anteil der B- und T-Zellen sowie der PD-1-positiven lymphatischen Zellen in % des gesamten lymphatischen Infiltrates	27
Verteilung der PD-1 Population	28
Untersuchung der Plasmazellinfiltration	29
Untersuchung auf eine Cyclin D1/PD-1 Koexpression.....	30
Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Frage einer molekularen Alteration des <i>Cyclin D1</i> Gens	33
3.3 Klinische Datenerhebung	33
Lokalisation der Hautmanifestation (Kopf/Halsregion, Rumpf, Extremitäten)	33
Art der Hautmanifestation (Patch, Plaque, Nodus, Tumor)	34
Ausbreitung der Hautmanifestationen (solitär, solitäre Lokalisation mit multiplen Manifestationen, disseminierte Manifestationen)	34
Größe der Hautmanifestationen in cm.....	34
Therapie der Hautmanifestationen (keine Angabe, Exzision, topische Steroide, systemische Therapie).....	34
Andere Erkrankungen der Haut	35
Verlauf der Erkrankung nach Therapie	35
4. Diskussion.....	39
5. Zusammenfassung.....	47
6. Literaturverzeichnis.....	49
Danksagung	55

1. Einleitung

1.1 Definition und Klassifikation der primär kutanen Lymphome

Primär kutane Lymphome werden als Non-Hodgkin-Lymphome definiert, die sich in der Haut präsentieren. Dabei muss die Erkrankung bei Diagnosestellung auf die Haut beschränkt sein und durch ein Staging eine extrakutane Manifestation ausgeschlossen werden. Die primär kutanen Lymphome sind eine heterogene Gruppe aus kutanen T- und B-Zell-Lymphomen. Die kutanen T-Zell-Lymphome machen dabei 75-80% der primär kutanen Lymphome der westlichen Welt aus, während die kutanen B-Zell-Lymphome 20-25% betragen (Willemze et al., 2005). Diese verschiedenen Arten von T- und B-Zell-Lymphomen werden anhand eines charakteristischen klinisch-histopathologischen Erscheinungsbildes, sowie molekularer Veränderungen klassifiziert. Kutane Lymphome präsentieren sich häufig klinisch als auch prognostisch anders als morphologisch ähnliche systemische Lymphome und benötigen oft ein anderes Behandlungsschema.

Aus diesem Grunde werden die primär kutanen Lymphome seit 2005 als eigene Entitäten in der Weltgesundheitsorganisation-EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) klassifiziert. Diese Klassifikation wurde 2005 erstmals publiziert und ein Jahr später in das WHO „Classification of Skin Tumors Blue Book“ (LeBoit et al., 2006), sowie 2008 in die WHO Klassifikation hämatologischer Neoplasien aufgenommen (Steven H. Swerdlow et al., 2008) und 2016 revidiert (S.H. Swerdlow et al., 2017; Steven H. Swerdlow et al., 2016). Die WHO unterscheidet anerkannte von provisorischen Entitäten,

deren Erforschung noch nicht abgeschlossen ist und die insofern auch nur einen vorläufigen Platz innerhalb der WHO-Klassifikation aufweisen. Im August 2018 wurde die überarbeitete WHO-EORTC-Klassifikation inklusive der provisorischen Entitäten in der vierten Ausgabe des WHO „Classification of Skin Tumors Blue Book“ veröffentlicht (Elder et al., 2019). Diese unterscheidet sich lediglich in minimalen Details von der 2016 veröffentlichten Klassifikation.

1.2 Primär kutane CD4+ klein- bis mittelgroßzellige T-Zell-Lymphoproliferation (CD4LPD)

Seit der im Jahr 2008 publizierte WHO-EORTC-Klassifikation gilt die primär kutane CD4+ klein- bis mittelgroßzellige T-Zell-Lymphoproliferation (CD4LPD) als provisorische Entität von kutanen T-Zell-Lymphomen. Definiert wurde diese durch eine klonale Proliferation von klein- bis mittelgroßzelligen CD4-positive T-Zellen. Histopathologisch zeigen diese Läsionen eine dichte bis diffuse noduläre dermale Infiltrationen, die primär aus CD4-positiven, mäßig pleomorphen T-Zellen bestehen. Typischerweise exprimieren diese T-Zellen zusätzlich den follikulären T-Helferzellmarker PD-1 (Rodríguez Pinilla et al., 2009). Ein Epitheliotropismus ist untypisch, selten wird ein geringer Follikulotropismus beobachtet (Willemze et al., 2019). Meist besteht gleichzeitig eine signifikante Begleitinfiltration von reaktiven CD8+-Zellen, B-Zellen und Histozyten. Die Proliferationsrate ist niedrig. Der Blastengehalt soll < 30% liegen (Steven H. Swerdlow et al., 2016). Per Definition der Erkrankung muss ein lokalisierter Hautbefall vorliegen, der sich auf eine

Läsion und/oder mehrere Läsionen in einem Hautareal beschränkt (Steven H. Swerdlow et al., 2016).

Die CD4LPD zeigt mehrere überlappende Eigenschaften mit nodulären Pseudolymphomen der Haut sowohl in dem klinisch blanden Verlauf als auch der histologischen Präsentation (Beltraminelli et al., 2009). Aufgrund des Mangels an histomorphologisch kennzeichnenden Merkmalen ist es oft schwer die beiden Entitäten diagnostisch voneinander zu unterscheiden (Çetinözman, Jansen, & Willemze, 2012). Derzeit gilt als wesentliches Merkmal zur Differenzierung der Nachweis der Klonalität der T-Zellinfiltrate mittels T-Zell-Rezeptor (TCR)-Gen-Rearrangement-Analyse.

Betroffen sind meist Patienten im Alter von ≥ 50 Jahren, jedoch können auch Kinder betroffen sein (Volks et al., 2013). Eine Geschlechterpräferenz herrscht nicht vor. In der Regel präsentieren sich die CD4LPD mit solitären Tumoren oder Plaques, die sich meist im Gesicht, am Hals oder Oberkörper bilden (Salah, 2019).

Die Prognose der Patienten ist gut (Grogg et al., 2008; Salah, 2019). In einigen Fällen führt bereits die Biopsie zum Rückgang der Läsion, anderenfalls erfolgt eine Lokaltherapie mit primär chirurgischer Exzision, topischer Steroidgabe oder in Ausnahmefällen durch Bestrahlung. Ein Teil der Fälle rezidiert allerdings lokal in der Haut (Salah, 2019; Willemze et al., 2019).

In der Literatur finden sich auch Einzelfälle, die sich klinisch mit aggressiverem Verhalten präsentieren und durch eine schnelle Progression, Rezidivneigung und fehlende Tendenz zu spontaner Rückbildung auffallen (Garcia-Herrera et al., 2008). Diese Fälle werden nach den neusten Empfehlungen der WHO nicht mehr als CD4LPD, sondern als kutanes peripheres T-Zell-

Lymphom klassifiziert, da sie sich in der klinischen Präsentation deutlich von der CD4LPD unterscheiden (S.H. Swerdlow et al., 2017).

Es ist unsicher, ob die CD4LPD ein echtes neoplastisches Potential besitzt. Bislang sind keine rekurrenten molekularen Veränderungen bekannt und das klinische Verhalten war in Fallserien meist als sehr blande beschrieben. Während die CD4LPD in der WHO-Klassifikation 2008 noch als primär kutane CD4+ klein- bis mittelgroßzellige T-Zell-Lymphom bezeichnet wurde, erfolgte in der WHO-EORTC-Klassifikation 2016/2018 daher die Umbenennung als Lymphoproliferation.

1.3 PD-1

Der zu den Immunglobulinen gehörende „programmed cell death protein 1“ (PD-1)-Rezeptor ist ein Transmembranprotein und gehört zu der Gruppe der Immuncheckpoint-Inhibitoren (Ishida et al., 1992). Seine Expression wurde sowohl in aktivierten murinen B- und T-Zellen als auch in aktivierten humanen T-Zellen beschrieben (Agata et al., 1996; Vibhakar et al., 1997). Mit PD-L1 und PD-L2 wurden zwei Liganden des PD-1 Proteins identifiziert. Beide werden von dendritischen Zellen und aktivierten Monozyten der parenchymatösen Organe exprimiert. Bindet PD-1 an einen seiner Liganden, werden sowohl die Proliferation von T-Zellen als auch deren Zytokinproduktion gehemmt (Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001).

Immunhistochemisch lässt sich PD-1 in lymphatischem Gewebe nachweisen. Die T-Zellen des Keimzentrums sind meist PD-1-positiv, dagegen sind die außerhalb des Keimzentrums liegenden T-Zellen PD-1 negativ. Hieraus wurde der Schluss gezogen, dass

man die Expression von PD-1 als Marker für die T-Zell Population des Keimzentrums, also als Marker für folliculäre T-Helferzellen (TFH) nutzen kann (Dorfman et al., 2006).

PD-1 konnte als diagnostischer Marker in folliculären T-Helferzellen-Lymphomen, wie dem angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphom (AITL), beschrieben werden, da ein Großteil dieser Neoplasien PD-1 exprimieren (Dorfman et al., 2006). Auch im Mikroenvironment verschiedener B- und T-Non-Hodgkin-Lymphomen ist eine Expression von PD-1, bezogen auf T-Zellen, beschrieben. Durch diese Kenntnis und die Möglichkeit der Checkpointinhibition des PD-1/PD-L1 Pathways wird eine prognostische wie auch therapeutische Relevanz von PD-1 in der Therapie verschiedener NHL vermutet (Gravelle et al., 2017; McClanahan et al., 2016). Eine Expression ist ebenfalls in kutanen T-NHL wie der Mycosis fungoides und Sézary-Syndrom (Çetinözman, Jansen, Vermeer, et al., 2012; Dorfman et al., 2006; Gravelle et al., 2017), sowie in CD4LPD als auch reaktiven Pseudolymphomen dokumentiert (Çetinözman, Jansen, & Willemze, 2012).

1.4 Cyclin D1

Beim Übergang der G1-Phase des Zellzyklus in die S-Phase spielt Cyclin D1 eine tragende Rolle als Mediator des Restriktionspunktes des Zellzyklus und externer Mitogene. Wachstumsfaktoren bewirken eine Hochregulation der Replikationsrate des Cyclin D1 Proteins, welches mit seinen regulatorischen Untereinheiten der Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 Dimere bildet. Diese phosphorylieren das Retinoblastom-Protein, was die Freisetzung von Transkriptionsfaktoren der E2F Familie zur Folge hat. Diese

sorgen wiederum für die Hochregulation der Transkription wichtiger Proteine für den Übergang in die S-Phase (John et al., 2017).

Einige Körperzellen zeigen eine physiologische Expression von Cyclin D1, beispielsweise Epithelien, Endothelien und Makrophagen, in normalen lymphatischen Geweben ist Cyclin D1 aber komplett negativ. Eine Überexpression von Cyclin D1 wird mit der Onkogenese vieler Tumoren, wie dem Mantelzell-Lymphom, nicht kleinzelligem Lungenkrebs, Haarzelleukämie und vielen weiteren in Verbindung gebracht (John et al., 2017).

Dieses vermehrte Aufkommen des Cyclin D1 Proteins in Tumorzellen ist in der Regel Folge einer Amplifikation des *CCND1* Gens. Allerdings wurden auch Fälle beschrieben in denen ein Tumor mit erhöhter Konzentration an Cyclin D1 Protein und RNA vorlag ohne nachweisbare Amplifikation des Gens (John et al., 2017). Beispielsweise im Mantelzelllymphom oder auch in Plasmazellmyelomen wird Cyclin D1 aufgrund der Translokation zwischen Cyclin D1 und einem Immunglobulin-Gen überexprimiert und gilt dort als wesentlicher Motor der Lymphomgenese (S.H. Swerdlow et al., 2017).

Eine Dysregulation der Cyclin D1 und der Cyclin-abhängigen Kinasen kann zur Entstehung von Tumoren beitragen, da sie zu einer von den Checkpoints des Zellzyklus unabhängigen Proliferation führen kann (Song et al., 2016). Zudem hat es auch eine mögliche therapeutische Bedeutung als Ziel gerichteter Ansätze in der Onkologie (Song et al., 2016).

Die aberrante Expression von Cyclin D1 ist bei soliden Tumoren, sowie bei B-Zell-Lymphomen gut dokumentiert. Zu der Expression von Cyclin D1 in peripheren T-Zell-Lymphomen ist die

Datenlage dagegen deutlich geringer ausgeprägt (Song et al., 2016).

Im Jahr 2016 wurde eine retrospektive Studie zur Prävalenz der Expression von Cyclin D1 in peripheren T-Zell-Lymphomen veröffentlicht. In dieser konnte eine Expression von Cyclin D1 in verschiedenen peripheren T-Zell-Lymphomen nachgewiesen werden. Dabei trat eine Cyclin D1 Expression am häufigsten in anaplastisch-großzelligen Lymphomen (ALCL) auf (Song et al., 2016).

Diese beschriebene Expression von Cyclin D1 in peripheren T-Zell-Lymphomen, sowie die Beobachtung, dass einzelne in die Abteilung für Hämatopathologie eingesendete Fälle von CD4LPD ebenfalls eine aberrante Expression von Cyclin D1 zeigten, veranlasste uns dieses Phänomen in der CD4LPD systematisch zu analysieren.

1.5 Fragestellungen

- Was sind die typischen klinischen und histopathologischen Merkmale der primär kutanen CD4+ klein- bis mittelgroßzelligen T-Zell-Lymphoproliferation (CD4LPD) in retrospektiver Analyse einer gut charakterisierten Kohorte?
- Wie ist die genaue zelluläre Zusammensetzung der CD4LPD?
- Exprimieren die PD-1-positiven Tumorzellen aberrant Cyclin D1, ein bislang in wenigen T-Zell-Lymphomen beschriebenes Phänomen?
- Ist die aberrante Expression von Cyclin D1 durch eine molekulare Alteration des *Cyclin D1* Gens verursacht?

2. Material und Methoden

Verwendete Materialien und Software

Konventionell und immunhistochemisch gefärbte Schnittpräparate, sowie in Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Biopsien aus dem Gewebearchiv des Lymphknotenregister Kiel

- Axioskop Mikroskop, Zeiss, Oberkochen
- Fragebogen zu klinischen Patientendaten (s. u.)
- Nexus / Pathologie, NEXUS AG, Villingen-Schwenningen
- Orbis 21, AGFA HealthCare, Mortsel, Belgien
- Excel 2016, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
- Word 2016, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
- BondMax Färbeautomaten von Leica

2.1 Zusammenstellung des Probenkollektivs

Zur Auswahl der infrage kommenden Präparate wurde die Datenbank Nexus / Pathologie der Abteilung Hämatopathologie und Lymphknotenregister des Instituts für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel durchsucht. Im Rahmen dieser Recherche wurden 109 Fälle identifiziert, die im Zeitraum der Jahre 2011 bis 2017, nach den WHO-Kriterien als CD4-positive klein- bis mittelgroßzellige Lymphoproliferationen (CD4LPD) diagnostiziert wurden.

Dieses Fallkollektiv bestand zu großen Teilen aus Hautproben, die in externen, meist dermatologischen Praxen aus dem gesamten Bundesgebiet entnommen und im Rahmen der Referenzdiagnostik eingesendet wurden.

Zusätzlich enthielt diese Gruppe auch zwölf Fälle von Patienten, die in der Dermatologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein behandelt wurden.

Im Lymphknotenregister Kiel wurden histologische und immunhistochemische sowie molekulare Analysen zur Diagnosestellung hergestellt. Die Schnittpräparate und Daten wurden archiviert sowie auch das Paraffinmaterial, soweit dieses nicht von Einsendern wieder zurückgefordert wurde. Ein Kriterium für den Einschluss in die Studie war, dass mindestens eine Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Hauptprobe zur weiterführenden Diagnostik im Lymphknotenregister Kiel gelagert wurde.

Dieses erfüllten 73 der gesammelten Fälle. Anschließend wurden diese Fälle erneut unter dem Mikroskop analysiert, um die Diagnose noch einmal retrospektiv zu bestätigen, sowie eine weitere Evaluation histopathologischer Merkmale durchzuführen. Ein Fall fiel in diesem Review heraus, da eine CD4LPD nicht sicher bestätigt werden konnte. Die übrigen 3 Fälle wurden aufgrund von ungenügendem Material für weitere Untersuchungen aus der Kohorte ausgeschlossen. Für drei dieser 69 Fälle wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten insgesamt zwei Biopsien eingesendet, sodass die Kohorte abschließend aus 69 Proben bei 66 Patienten bestand.

2.2 Histopathologische Diagnostik und Immunphänotypisierung

Es erfolgte eine gemeinsame Auswertung der Präparate am Multiheadmikroskop zusammen mit der spezialisierten Hämato-pathologin Frau PD Dr. med. Ilske Oschlies.

Ein Review der Schnittpräparate erfolgte primär zur retrospektiven Sicherung der Diagnose einer CD4LPD nach gültigen WHO-Kriterien (Steven H. Swerdlow et al., 2016). Aufgrund der retrospektiven und am individuellen Fall orientierten histopathologischen Diagnostik standen pro Fall jeweils unterschiedlich viele Präparate zur Verfügung. Darunter mindestens ein konventionell histopathologisches mit Hämatoxylin und Eosin gefärbtes Präparat und eine immunhistochemische Färbung der Oberflächenantigene CD20, sowie der Zelltypmarker CD3 und PD-1. Weitere erfasste immunhistochemische Marker, die in unterschiedlich großem Anteil der Fälle zur Verfügung standen, waren: Cyclin D1, CD4, CD8 und Färbungen zur Immunglobulin-Leichtkettenexpression (kappa, lambda). Aufgrund der retrospektiven Analyse standen hier unterschiedliche immunhistochemische Färbungen unter Verwendung kommerziell etablierter Antikörper in standardisierten Färbeverfahren zur Verfügung.

2.1.1 Histopathologische Evaluation

Bestimmung des Wachsmusters der CD4LPD:

Das lymphatische Infiltrat wurde hinsichtlich seines Ausbreitungsmusters (knotig versus bandenförmig) in der Haut untersucht (siehe auch Abb. 1 und 2).

- Das bandförmige Muster wurde definiert als ein bandförmiges dichtes, direkt subepitheliales dermal limitiertes Infiltrat.
- Das knotige Muster wurde definiert als eine diffuse und knotige pandermale, bis in die Subkutis reichende Infiltration.
- Bandförmig und knotig/ nicht auswertbar (z.B., wenn nur die Oberfläche sichtbar war).

Bestimmung der Klonalität der T-Zellinfiltrate

In allen Fällen wurde im Rahmen der initialen Diagnostik eine Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gestützte Klonalitätsuntersuchung unter Berücksichtigung der EuroClonality/BIOMED-2-Protokolls an verschiedenen für die *TCRB* (T-Zell-Rezeptor-beta-Gen) und *TCRG* (T-Zell-Rezeptor-gamma-Gen) kodierenden Loci durchgeführt (Langerak et al., 2012).

Die Beurteilung der *TCRB*-Genumlagerungen erfolgte anhand von drei verschiedenem Primern, die DNA-Fragmente unterschiedlicher Nukleotidlänge amplifizieren. Tube A (240-285 nt), Tube B (240-285 nt) und Tube C (170-210 nt). Für die *TCRG* wurden zwei Primer verwendet: Tube Va (145-255 nt) und Tube Vb (80-120 nt).

Daten über die *TCRG*-Rearrangements lagen in 53 Fällen, über die *TCRB*-Rearrangements in 41 Fällen vor.

In der Auswertung der einzelnen Loci wurden ein monoklonales (mono), sowie ein monoklonales vor einem polyklonalen Hintergrund (mono v. poly) Profil der Multiplex-PCR Untersuchung als klonal gewertet. Ein irregulär polyklonales

(irregulär) und ein oligoklonales (oligo) Profil wurden als polyklonal gewertet.

Aus diesen Daten wurde retrospektiv erhoben in wie vielen Fällen ein klonales Rearrangement in einer bzw. beider Reaktionen der TCR-gamma-Kette vorlag. Ebenfalls wurde untersucht in wie vielen dieser Fälle ein Rearrangement in einer der Reaktionen der TCR-beta-Kette vorlag.

Bestimmung der Klonalität der B-Zell-Infiltrate

Für Fälle mit schwieriger Differentialdiagnose zu kutanen B-Zell-Lymphomen erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik eine Differenzierung mittels der Klonalitätsbestimmung des B-Zell-Anteils im Infiltrat. Im Rahmen der initialen Diagnostik wurde eine Multiplex-PCR-gestützte Klonalitätsuntersuchung unter Berücksichtigung des EuroClonality/BIOMED-2-Protokolls an für die *IGH* (Immunglobulin-Schwerketten-Gen) kodierenden Loci durchgeführt (Langerak et al., 2012).

Die Beurteilung der *IGH*-Rearrangements erfolgte anhand von drei verschiedenem Primern, die DNA-Fragmente unterschiedlicher Nukleotidlänge amplifizieren. Tube A (310–360 nt), Tube B (250–295 nt) und Tube C (100–170 nt).

Daten über die *IGH*-Rearrangements lagen in insgesamt 31 Fällen vor. Je nach Fall wurden alle oder nur einzelne Loci analysiert.

In der Auswertung der einzelnen Loci wurden ein monoklonales (mono), sowie ein monoklonales vor einem polyklonalen Hintergrund (mono v. poly) Profil der Multiplex-PCR Untersuchung als klonal gewertet. Ein irregulär polyklonales

(irregulär) und ein oligoklonales (oligo) Profil wurden als polyklonal gewertet.

Aus diesen Daten wurde retrospektiv erhoben in wie vielen Fällen eine klonale B-Zell-Infiltration vorlag.

2.2.1 Immunphänotypisierung

Bestimmung der Proliferationsrate

In 43 Fällen wurde im Rahmen der Initialdiagnostik die Proliferationsrate durch den beurteilenden Pathologen anhand der Ki-67 Färbung am Ganzschnitt geschätzt und dokumentiert. Dabei erfolgte die semiquantitative Analyse in 5% Schritten.

2.2.2 Immunhistochemische Färbung

Zur ergänzenden Untersuchung der Expression einzelner Marker wurden konventionelle immunhistochemische Färbeverfahren durchgeführt.

Hier beschrieben wird explizit die für die Arbeit verwendete immunhistochemische Doppelfärbung für Cyclin D1 (nukleärer Marker) und PD-1 (cytoplasmatischer Marker) an den in Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Proben (FFPE). Es wurden kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper verwendet. Für Cyclin D1 wurde der Klon SP4 von ThermoScientific #RM-9104-S verwendet. Für PD-1 der Klon NAT105 (MRQ-22) von Cell Marque #315M-96, 1:200.

Die Färbungen mit dem Cyclin D1 Antikörper, sowie dem PD-1 Antikörper wurden maschinell mit dem BondMax Autostainer durchgeführt. Zuerst wurde das Paraffin aus dem Gewebe der Präparate entfernt, indem dieses 10 Minuten lang in Xylol

gelagert wurde. Anschließend erfolgte eine Rehydrierung des Gewebes mittels absteigender Alkoholreihen. Um die im Formalinfixierten Gewebe häufig vorkommenden Konformitätsänderungen der Antigene rückgängig zu machen, wurden die Proben bei bestimmten pH-Werten erhitzt (Shi et al., 1991, 1993). Die Präparate wurden jeweils in einem Dampfdrucktopf für 20 Minuten gekocht. Für die Vorbehandlung zur Färbung von PD-1 und Cyclin D1 wurde ein Citrat-basierter Puffer (ER2) verwendet. Danach wurde jeder Schnitt mit 100 µl Antikörperlösung aufgetropft und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung bestand aus einer Verdünnung (Verhältnis 1:200) des Primärantikörpers (PD-1), bzw. 1:20 (Cyclin D1) und 1%iger boviner Serum-Albuminlösung. Markiert wurden die Primärantikörper mit dem ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit. Nach 20-minütiger Inkubation in einer Verstärkerlösung wurden die Gewebeproben mit einer Meerrettich-Peroxidase markiert. Anschließend wurde für die PD-1 Färbung Diaminobenzidin als Chromogen hinzugefügt. Diaminobenzidin bildet bei Kontakt mit Antikörpergebundenen Peroxidase einen braunen Niederschlag. Nach einigen Minuten wurde nach optischer Kontrolle die Farbreaktion abgebrochen. Die Kerngegenfärbung nach Meier erfolgte mit saurem Hämalaun. Zuerst wurden die Gewebepreparate für 5 bis 10 Minuten in der Hämalaun-Lösung gefärbt und anschließend für 20 Minuten in Wasser gebläut und danach mittels absteigender Alkoholreihe dehydriert.

2.2.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Anteil der B- und T-Zellen, sowie der PD-1-positiven lymphatischen Zellen in % des gesamten Infiltrates

Immunhistochemisch wurde der prozentuale Anteil von jeweils B- und T-Zellen, sowie der PD-1-positiven Zellen am Gesamtinfiltrat lymphatischer Zellen in der Hautprobe am Ganzschnitt bestimmt.

Hier erfolgte eine semiquantitative Schätzung am Lichtmikroskop mittels der jeweiligen Oberflächenantigene:

- CD20: B-Zellgehalt
- CD3: T-Zellgehalt
- PD-1: PD-1-positiv lymphatische Zellen

Die Einteilung erfolgte in 5% Schritten.

Verteilung der PD-1 Population

62 der PD-1 gefärbten Fälle wurden lichtmikroskopisch untersucht, um zu ermitteln, wie sich die PD-1-positiven Zellen im lymphatischen Gewebe verteilen. Primär wurde zwischen zwei Verteilungsmustern unterschieden:

- Im gesamten Infiltrat disseminierte/diffuse PD-1 Expression
- Anhäufung von kleinen Gruppen (Clustern) PD-1-positiver Zellen innerhalb des Infiltrates

Untersuchung der Plasmazellinfiltration:

Zur Analyse standen 39 Fälle mit einer spezifischen immunhistochemischen Anfärbung der Plasmazellen über die Leichtketten kappa und lambda im Ganzschnitt. Es wurden drei Infiltrationsmuster semiquantitativ nach Augenmaß unterschieden:

- wenig: einzelne sporadische PZ im lymphatischen Infiltrat
- diffus vermehrt: leicht vermehrte PZ im Infiltrat in diffuser Verteilung
- gruppiert: deutlich vermehrte PZ im Infiltrat, dabei in kleingruppierter Lage

Anschließend wurden in 39 Fällen anhand der Leichtkettenexpression (kappa, lambda) ebenfalls die Klonalität der Plasmazellen beurteilt.

Untersuchung auf eine Cyclin D1/PD-1 Koexpression:

42 Fälle konnten mittels einer immunhistochemischen Doppelfärbung untersucht werden (siehe 2.2.2). In einem ersten Schritt wurde der Anteil der Cyclin D1 und PD-1 koexprimierender Zellen von den PD-1-positiven Zellen innerhalb des Infiltrates semiquantitativ geschätzt. Dabei wurden nur Zellen beachtet, die eine lymphatische Morphologie aufwiesen. Cyclin D1-positive Makrophagen oder Endothelien wurden ignoriert. Da PD-1 als typisches T-Zellmolekül gilt, wurden PD-1-positive Zellen generell als lymphatisch anerkannt. Die Einteilung erfolgte in 5% Schritten. In 22 Fällen, in denen der Anteil Cyclin D1 und PD-1 koexprimierender Zellen auf über 10% der PD-1-positiven Population geschätzt wurden, erfolgte anschließend eine genauere quantitative lichtmikroskopische Analyse. Um die

Anzahl der doppelt positiven lymphatischen Zellen zu quantifizieren, wurden jeweils 200 PD-1-positive lymphatische Zellen ausgezählt und der Anteil der Cyclin D1 und PD-1 koexprimierenden Zellen in % ermittelt.

Zudem wurden 6 kutane Pseudolymphome mit einem hohen T-Zellgehalt für PD-1 und Cyclin D1 gefärbt und verblindet dieser Zählung als Kontrolle zugeführt.

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Frage molekularer Alterationen des *Cyclin D1* Gens.

15 Fälle mit einem großen Anteil (>15%) PD-1-positiver Zellen mit Cyclin D1 Koexpression im Infiltrat wurden mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit der Frage nach einem *Cyclin D1* Bruch oder Amplifikation analysiert. Die Untersuchung erfolgte mit einer break-apart-Sonde *CCND1* (Genort 11q13) der Firma Abbott. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde mit dem Leica Bond Max Färbeautomaten durchgeführt. Zunächst wurden die Proben bei 72°C vom Paraffin befreit. Anschließend wurden die Zellen mit der Proteinkinase K für 10 Minuten bei 37°C angedaut. Mit Hilfe von Fluoreszein-konjugierten Oligonukleotiden wurde das *Cyclin D1/CCND1* nach 120-minütiger Inkubation bei 37°C markiert. Angefärbt wurden die markierten Gene mit dem Bond Polymer Refine Detection Kit, welches Diaminobenzidin als Farbstoff verwendet. Die Auswertung der Untersuchungen mittels der Fluoreszenzmikroskopie wurden von Frau Dr. med. Karoline Koch, Fachärztin für Pathologie, durchgeführt und nach den standardisierten Verfahren ausgewertet. Es wurden hierzu mindestens 30 Interphasekerne fluoreszenzmikroskopisch analysiert und eine Bilddokumentation von mindestens drei Zellen für die Zielsequenz durchgeführt.

2.3 Klinische Datenerhebung

Zur retrospektiven Erhebung der Daten bezüglich der klinischen Manifestation der CD4LPD wurde ein Fragebogen (siehe Abbildungen 1 und 2) erstellt und an die behandelnden Dermatologen, Hausärzte bzw. Onkologen nach telefonischer Rücksprache und unter Berücksichtigung der Bestimmungen des Datenschutzes zugefaxt. Die Erhebung der klinischen Daten, einschließlich des im Folgenden vorgestellten Fragebogens und des Anschreibens an die Ärzte, wurde berufsrechtlich von der Ethikkommission der Universität Kiel beraten (Aktenzeichen D464/17). Zusätzlich konnten bestimmte Daten wie Lokalisation, sowie das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie bzw. Exzision in toto aus der Datenbank der Abteilung für Hämatopathologie und Lymphknotenregister des Instituts für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel entnommen werden.

In dem Fragebogen wurden folgende Parameter erfasst:

- Befallsmuster der Hautinfiltration (*Lokalisation, einzelne Hautläsion, multiple Läsionen in einem Areal, disseminierte Hautbeteiligung*)
- Art der Hauteffloreszenz (*Größe, Patch, Plaque, Nodus, Tumor, mit oder ohne Ulzeration*)
- Vorliegen eines systemischen Lymphoms zum Zeitpunkt der Diagnose
- Vorliegen einer Mycosis fungoides zum Zeitpunkt der Diagnose
- Hinweise auf die Genese der Hautveränderungen (*Medikamente, Insektenstiche, sonstige Trigger*)

- Wurde ein Staging durchgeführt und wenn ja, mit welchem Ergebnis
- Art der erfolgten Therapie (*lokal, systemisch*)
- Vorkommen von weiteren Hautmanifestationen (Rezidiven) im Krankheitsverlauf
- Zustand des Patienten zum Zeitpunkt des letzten Follow-up mit Datum (*Remission, stable disease, Rezidiv/Progress*)
- Kommentar zu anderen bekannten Hauterkrankungen (z.B. *Neurodermitis*)



UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein, Campus KIEL
 Institut für Pathologie, Arnold-Heller-Str. 3, 24105 Kiel
 Leiter Sektion Hämatopathologie: Prof. Dr. med. Wolfram Klapper
 Oberärztin: PD Dr med Ilske Oschlies



UNIVERSITÄTSKLINIKUM
 Schleswig-Holstein

→ **Campus Kiel**
 Institut für Pathologie
 Direktor: Prof. Dr. med. Christoph Röcken
**Sektion Hämatopathologie
 und Lymphknotenregister**
 Leitung: Prof. Dr. Wolfram Klapper
 Oberärztin: PD Dr. Ilske Oschlies
 Tel.: 0431 / 597-3399
 E-Mail: ioschlies@path.uni-kiel.de
 Postanschrift: Postfach 7154, 24171 Kiel
 Tel.: 0431 / 597-3425
 Fax : 0431 / 597-4129
 Internet: www.uni-kiel.de/haematopath-kr
 Datum:

— **Betreff: ...(Patientenname und Geb. Datum)**

Sehr geehrte(r) ...,

bei dem von Ihnen mitbetreuten Patienten/in haben wir anhand einer Hautbiopsie Veränderungen diagnostiziert, die mit der Diagnose eines primär kutanen klein- bis mittelgroßzellige CD4-positive T-Zell Lymphom/lymphoproliferation vereinbar sind. Im Rahmen einer wissenschaftlichen Studie möchten wir die klinische Präsentation und Biologie dieser seltenen Entität besser charakterisieren und würden uns über Ihre Mithilfe dabei sehr freuen. Die hierzu im beiliegenden kurzem Fragebogen erfassten Patientendaten werden in pseudonymisierter Form ausgewertet, die Studie ist durch eine Stellungnahme der Ethikkommission der Universität Kiel gedeckt (Aktenzeichen.....).

Wir sind Ihnen sehr dankbar, wenn Sie sich die Zeit nehmen würden, unsere Fragen auf dem beigefügten Blatt zu beantworten. Zusätzlich (oder alternativ) bitten wir um **Übersendung eines aktuellen Arztbriefes** aus dem wir die Informationen selbst entnehmen können.

Für Ihre Unterstützung möchten wir uns herzlich bedanken.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med Wolfram Klapper

OÄ PD Dr. Ilske Oschlies

Thomas Wüseke (med. Doktorand)

Universitätsklinikum
 Schleswig-Holstein
 Anstalt des
 öffentlichen Rechts

Vorstandsmitglieder:
 Prof. Dr. Jens Scholz
 Pflegedirektorin: Christa Meyer

Bankverbindungen:
 Commerzbank BLZ 230 800 40, Kto-Nr. 0305571100
 Steuernummer: 1929388291
 IBAN: DE 64230800400305571100 BIC: DRES DE FF 230



Fragebogen zu Ihrem Patienten mit CD4-positiver klein-bis mittelgroßzelligem T-Zell-Lymphom/Lymphoproliferation der Haut

zu Hautbiopsie (unser histologischer Befund RNR vom:

... (Patientenname und Geb. Datum)

Wie war das klinische Befallsmuster zum Zeitpunkt der Haut-Diagnose?

- nur eine Hautläsion, -Lokalisation:.....
- multiple Hautläsionen beschränkt auf ein Hautareal, -Lokalisation:.....
- disseminierte Hautbeteiligung

Liegen Details zur Art der Hauteffloreszenz vor?

Max. Größe:..... Patch, Plaque, Nodus, Tumor, andere:.....

Ulzeration: ja nein

War zum Zeitpunkt der Hautbiopsie ein systemisches Lymphom bekannt?

ja (Datum Erstdiagnose des Lymphoms: _____) nein

War zum Zeitpunkt der Hautbiopsie eine Mycosis fungoides bekannt oder bestanden Hautveränderungen, die eine Mycosis fungoides wahrscheinlich machen?

ja nein

Gab es zum Zeitpunkt der Hautbiopsie Hinweise auf die Genese der Hautveränderung z.B. Medikamenten, Insektenstich, andere Trigger?

ja, welche?..... nein

Wurden im Rahmen des weiteren klinischen Stagings andere extrakutane Manifestationen gefunden?

ja,..... nein unbekannt

Erfolgte eine lokale Therapie der Hautmanifestation?

ja (Therapieart: _____) nein

Erfolgte eine systemische Therapie des Lymphoms?

ja nein

Gab es weitere Haut-Manifestationen/Rezidive im Krankheitsverlauf?

lokal anderes Hautareal

_____)
Zustand des Patienten bei **letztem Follow-up** (Datum: _____)

Remission Stable disease Rezidiv/Progress

Kommentar/zusätzliche bekannte Hauterkrankung (z.B. Neurodermitis):

3. Ergebnisse

3.1 Zusammenstellung des Probenkollektivs

Im Zeitraum von 2011 bis 2017 wurden in der Datenbank der Abteilung Hämatopathologie und Lymphknotenregister 109 Fälle einer CD4LPD diagnostiziert und registriert. Von diesen Fällen konnten 36 nicht weiter histologisch untersucht werden, weil keine in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcke vorlagen.

Von den übrigen 69 Präparaten wurden in drei Fällen zwei zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommene Biopsien eingeschendet. Somit bestand das Kollektiv aus 69 Proben von 66 Patienten.

3.2 Histopathologische Diagnostik

Alle eingeschlossenen Fälle erfüllten die diagnostischen Kriterien der WHO-Klassifikation der CD4LPD. Sie zeigten eine dichte dermale, sowie molekular klonale Infiltration von klein- bis mittelgroßen CD4-positiven T-Zellen, meist mit Expression von PD-1 auf.

3.2.1 Histomorphologische Evaluation

Bestimmung des Infiltrationsmusters

In allen Fällen wurde mittels Hämatoxylin und Eosin gefärbter Präparate das vorliegende Infiltrationsmuster histologisch beurteilt.

- 17 Fälle: bandförmige direkt subepitheliale Infiltrate (Beispiel Abb. 1)

- 52 Fälle: diffuse und knotige pandermale bis in die Subkutis reichende Infiltration (Beispiel Abb. 2)

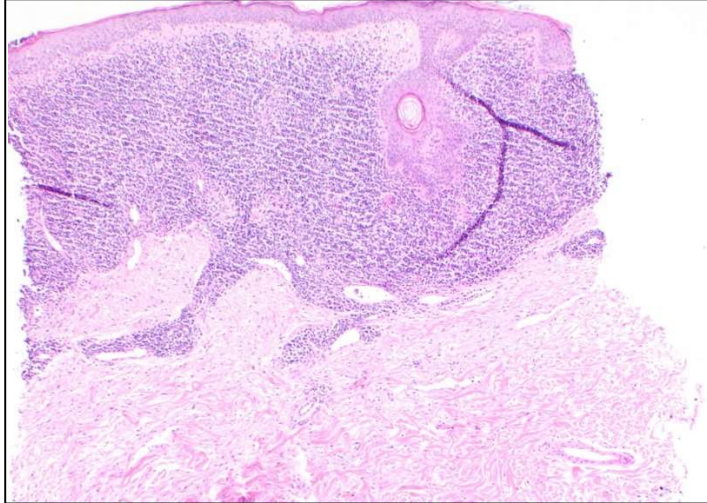


Abbildung 1: Bandförmige Infiltration (H&E) x40

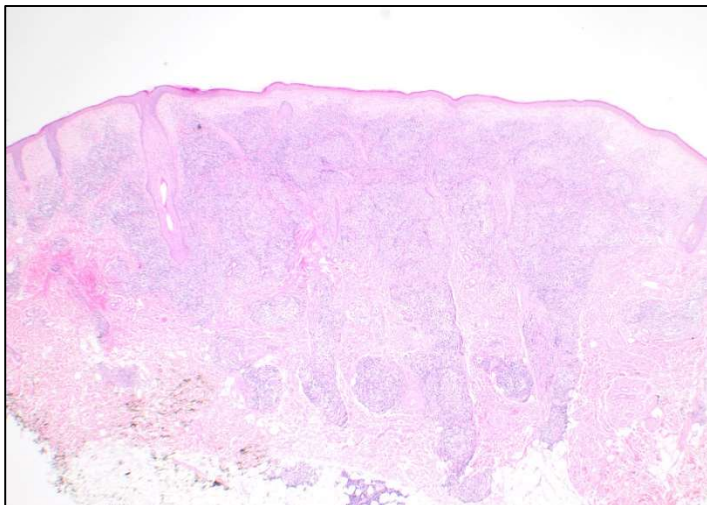


Abbildung 2: Noduläre Infiltration (H&E) x40

Bestimmung der Klonalität der T-Zellinfiltrate

In allen Fällen zu denen Daten über die Klonalität vorlagen (n=67/69) konnte die Monoklonalität der T-Zellen in der Hautinfiltration belegt werden.

Dabei wurden 67 Fälle mit dem TCR-gamma-Primer und 54 Fälle mit TCR-gamma und beta-Primern untersucht.

Für die Fälle, die mit den gamma- und beta-Primern untersucht wurden, zeigte sich ein isoliertes TCR-gamma Rearrangement in einer bzw. zwei PCR-Reaktionen in 4/54 Fällen, ein isoliertes TCR-beta-Rearrangement in 14/54 Fällen und ein kombiniertes TCR-gamma und beta-Rearrangement in 36/54 Fällen.

Bestimmung der B-Zell-Klonalität in Fällen mit hohem B-Zellgehalt

Zur Differentialdiagnose kutaner B-Zelllymphome wurde in 31 Fällen mit besonders hohem B-Zellgehalt eine zusätzliche Analyse der B-Zell-Klonalität mittels *IGH*-PCR durchgeführt. Alle Fälle (n=31/31) waren polyklonal für den *IGH*-Genort.

3.2.2 Immunphänotypisierung

Bestimmung der Proliferationsrate

Über die Proliferationsrate der Infiltrate lagen in 28 Fällen Daten vor. Die mittlere Rate lag bei 24%.

- Ki67 \geq 20% 9 Fälle
- Ki67 \leq 20% 19 Fälle

3.2.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Anteil der B- und T-Zellen sowie der PD-1-positiven lymphatischen Zellen in % des gesamten lymphatischen Infiltrates

Das Verhältnis zwischen T- und B-Zellen wurde in allen dem Review unterzogenen Fällen (n=69) ermittelt. Dabei ergab sich ein durchschnittlicher T-Zellgehalt von 77%. Der B-Zellgehalt lag im Schnitt bei 23%.

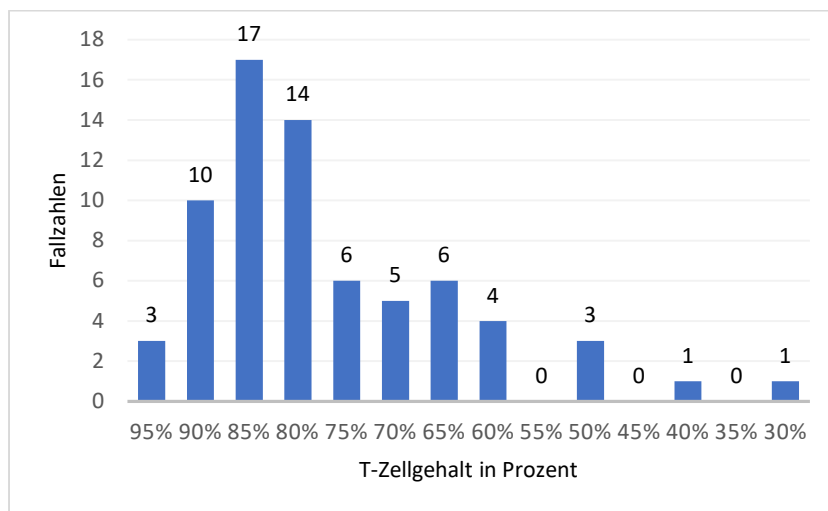


Abbildung 3: Prozentualer Gehalt an T-Zellen in der CD4LPD

Der Anteil an PD-1-positiven Zellen in Prozent konnte in 62 Fällen bestimmt werden. Dabei wurde ein durchschnittlicher Anteil von 24% PD-1-positiven Zellen in der Population der lymphatischen Zellen ermittelt.

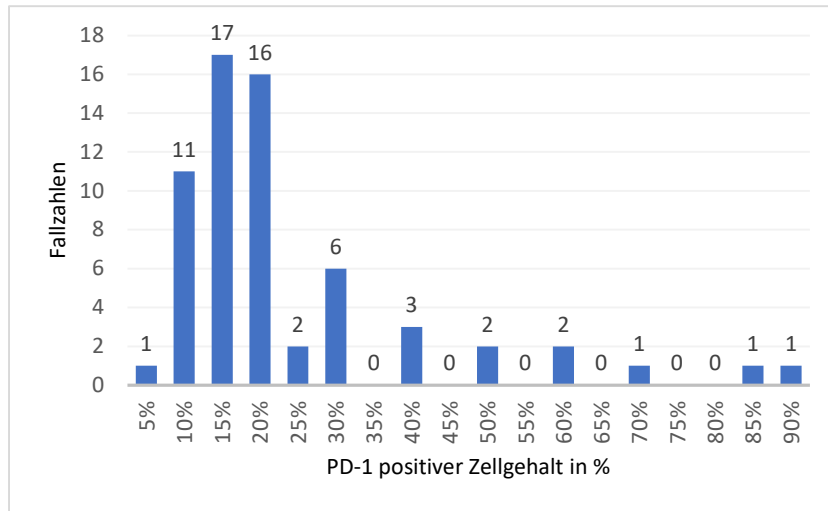


Abbildung 4: Prozentualer Gehalt an PD-1-positiven Zellen im LPD

Verteilung der PD-1 Population

Bei der Untersuchung des Verteilungsmusters der PD-1-positiven Population des lymphatischen Gewebes zeigten 45% der untersuchten Fälle (n=28/62) eine Clusterbildung der PD-1-positiven Zellen (siehe Abb. 3 und 4). Diese Zellen erscheinen etwas größer als normale Lymphozyten und weisen teilweise



Abbildung 5: Clusterbildung (PD-1) x40

eine blastäre Morphologie auf. Alle übrigen Fälle zeigten ein diffuses Muster.

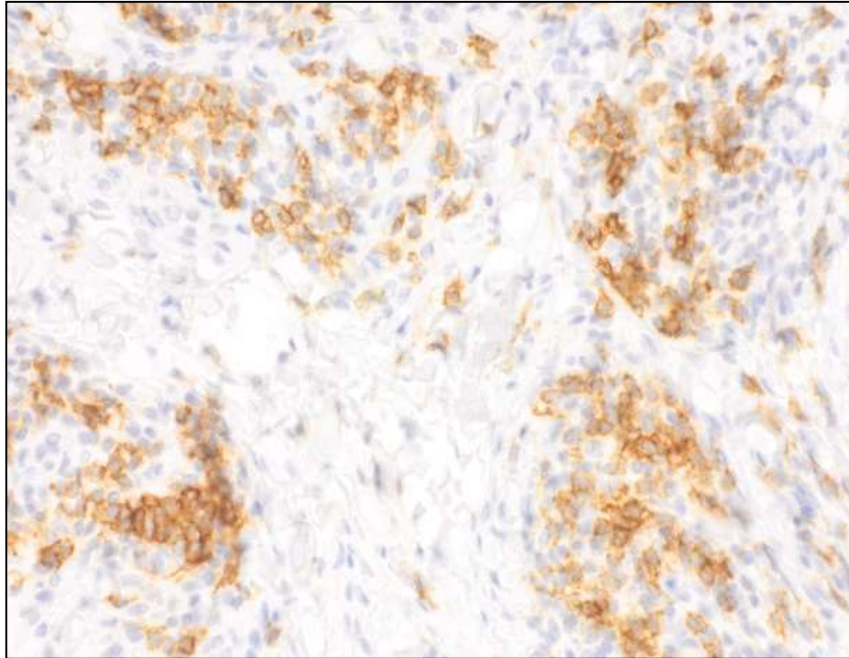


Abbildung 6: Clusterbildung (PD-1) x400

Untersuchung der Plasmazellinfiltration:

Der Plasmazellgehalt konnte in 39 Fällen quantifiziert werden. Dies erfolgte mittels Lichtmikroskop.

- Wenig: 24 Fälle wiesen einzelne sporadische PZ im lymphatischen Infiltrat auf
- Diffus vermehrt: 9 Fälle wiesen leicht vermehrte PZ im Infiltrat in diffuser Verteilung auf
- Gruppiert: 6 Fälle wiesen deutlich vermehrte PZ im Infiltrat auf, dabei in kleingruppierter Lage

In 42 Fällen konnte das Plasmazellinfiltrat in den Proben anhand von immunhistochemischen Färbungen der Leichtketten kappa und lambda auf Monoklonalität untersucht werden. In allen Fällen (n=42/42) zeigte sich eine polyklonale Verteilung.

Untersuchung auf eine Cyclin D1/PD-1 Koexpression:

Von den 62 Fällen, die auf ihren PD-1-positiven Zellgehalt untersucht wurden, wurden 42 zufällig ausgewählt, um diese mittels immunhistochemischer Doppelfärbung auf eine PD-1 und Cyclin D1 Koexpression zu analysieren. Evaluiert wurde der Anteil Cyclin D1 und PD-1-positiver Zellen an der Gesamtzahl PD-1-positiver lymphatischer Zellen im Infiltrat. Zuerst erfolgte eine Schätzung des Anteils von doppelt positiven Zellen in 5% Prozentschritten per Augenmaß am Lichtmikroskop.

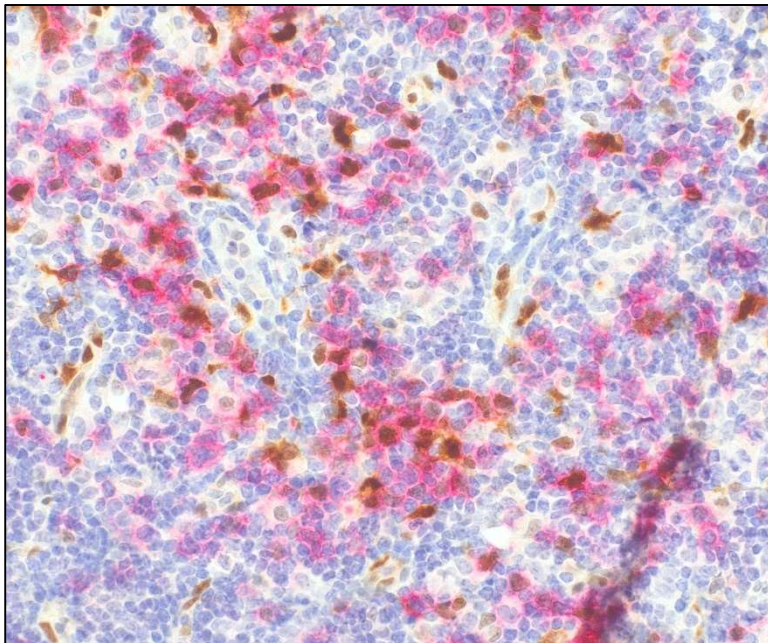


Abbildung 7: Cyclin D1/PD-1 Doppelfärbung (rote Farbe cytoplasmatisch/membranär: PD-1; braune Kernfärbung: Cyclin D1) x400

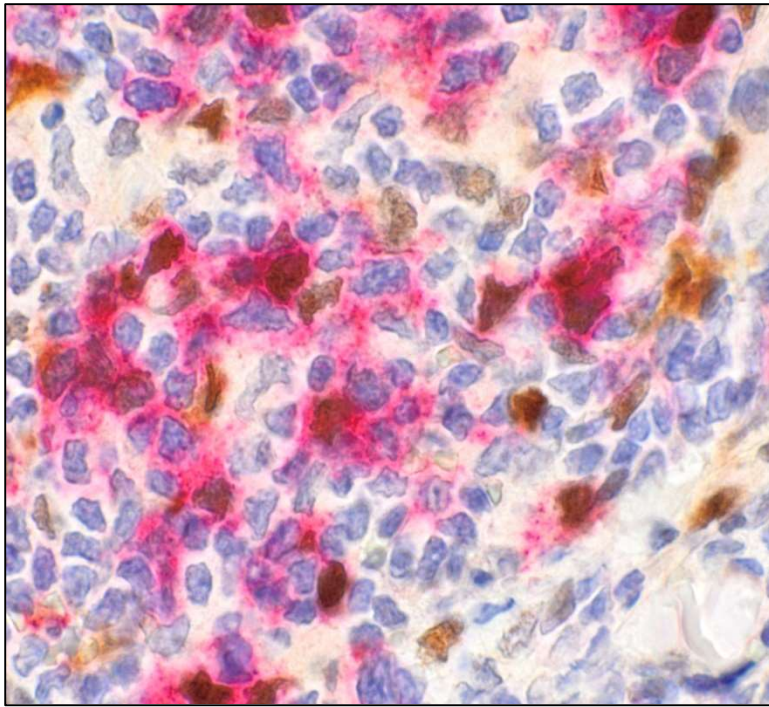


Abbildung 8: Cyclin D1/PD-1 Doppelfärbung (rote Farbe cytoplasmatisch/membranär: PD-1; braune Kernfärbung: Cyclin D1) x1000

In der lichtmikroskopisch geschätzten Analyse ließen sich in 33 von 42 Fällen (79%) >5% Cyclin D1/PD-1 koexprimierende Zellen innerhalb der Population PD-1-positiver lymphatischer Zellen.

In 22 von 42 Fällen (52%) wurden sogar >10% Cyclin D1/PD-1 koexprimierende Zellen gesehen.

In letzterer Kohorte mit 22 Fällen erfolgte dann in einem weiteren Schritt die genauere Quantifizierung per Auszählung (siehe Methodik).

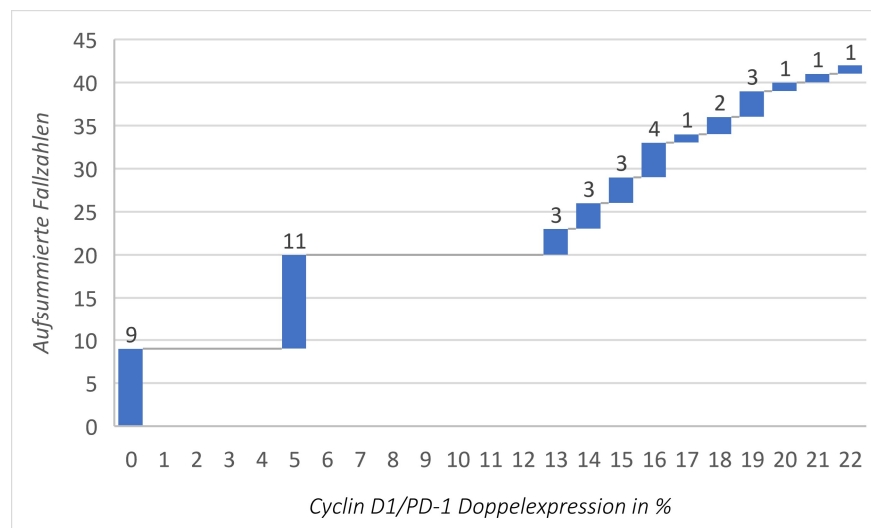


Abbildung 9: Cyclin D1/PD-1 Doppelexpression in % aller PD-1-positiven Zellen. Die Fallnummern sind nach aufsteigender Doppelexpression sortiert. Die Abbildung enthält zudem die Daten der quantitativen Auswertung für die Fälle mit einem Anteil an Cyclin D1/PD-1 doppelt positiven Zellen >10%.

Bei den 22 einzeln ausgezählten Fällen mit einer Expression von über 10% doppelt exprimierenden Zellen lag der durchschnittliche Wert bei 17%.

Zudem wurden 6 Fälle von bestätigten Pseudolymphomen mit hohem T-Zellgehalt als Kontrolle ebenfalls doppelgefärbt und

geblindet analysiert. Bei diesen 6 Kontrollproben ließ sich keine Cyclin D1/PD-1 Koexpression (0% Cyclin D1/PD-1-positive lymphatische Zellen) nachweisen.

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Frage einer molekularen Alteration des *Cyclin D1* Gens

15 ausgewählte Fälle mit einem hohen Anteil ($\geq 15\%$) von Cyclin D1/PD-1 Koexpression wurden mittels FISH auf einen *Cyclin D1* Bruch oder eine Amplifikation analysiert. Hier zeigte sich in allen Fällen eine normale Signalherstellung. In keinem Fall ($n=0/15$) konnte ein Bruch oder eine Amplifikation des *Cyclin D1* Gens nachgewiesen werden.

3.3 Klinische Datenerhebung

Von den 69 eingesandten Fällen gab es 3 Fälle zu denen zwei Proben eingesendet wurden. Insgesamt waren es damit 66 Patienten von denen 32 männlich und 34 weiblich waren. Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung lag bei 59 Jahren (Bereich 23-82 Jahre). Insgesamt wurden klinische Fragebögen zu 23 Fällen ausgefüllt und konnten zur Datenerhebung herangezogen werden.

Lokalisation der Hautmanifestation (Kopf/Halsregion, Rumpf, Extremitäten):

In 23 Fällen war die Lokalisation der Hautmanifestationen bekannt. Davon zeigten 15/23 der Fälle die Hautmanifestation am Kopf, 6/23 Fälle am Rumpf und 2/23 am Arm.

Art der Hautmanifestation (Patch, Plaque, Nodus, Tumor):

Zur Art der Manifestation lagen Daten in 23 Fällen vor. Ein Patch lag in 2/23 Fällen vor. Eine Plaque zeigten 5/23 Fälle. Einen Nodus zeigten 13/23 Fälle. Ein Fall zeigte sowohl einen Patch als auch eine Plaque und einen Nodus. Ein Tumor wurde in 2/23 Fällen angegeben, einer davon zusätzlich mit einer Ulzeration beschrieben.

Ausbreitung der Hautmanifestationen (solitär, solitäre Lokalisation mit multiplen Manifestationen, disseminierte Manifestationen):

In allen 23 Fällen lag eine solitäre Hautläsion vor.

Größe der Hautmanifestationen in cm:

Es lagen Angaben über die Größe der Hautmanifestationen in 22 Fällen vor. Hieraus ergab sich im Durchschnitt eine Größe von 1,68 cm (Spannweite 0,1 cm bis 6 cm).

Therapie der Hautmanifestationen (keine Angabe, Exzision, topische Steroide, systemische Therapie):

Daten über die erfolgte Therapie lagen in 20 Fällen vor.

- Die häufigste Therapieoption war mit 15 Fällen die chirurgische Exzision.
- Eine Therapie mit topischen Steroiden wurde in 3 Fällen angewandt.
- Ein Fall wurde mit systemischer Antibiotikagabe behandelt.
- In einem Fall erfolgte eine Behandlung mit Psoralen plus UV-A und Bexaroten.

Andere Erkrankungen der Haut:

In zwei Fällen wurde als weitere Erkrankung der Haut ein Insektenstich beschrieben. In beiden Fällen, sowohl in räumlicher als auch zeitlicher Assoziation zur Hautmanifestation.

Verlauf der Erkrankung nach Therapie:

Über den Verlauf wurde in 23 Fällen Auskunft gegeben:

- In 16 Fällen wurde entweder ein Rezidiv verneint oder eine Remission beschrieben.
- In 3 Fällen sind die Patienten nach der Therapie nicht mehr vorstellig geworden und wurden somit als „lost to follow-up“ klassifiziert:
 - Bei einem dieser „lost to follow-up“ Fälle wurde in nahem zeitlichem Abstand eine zweite Biopsie derselben Läsion eingesendet, sodass der Fall als Rezidiv gewertet wurde.
 - In einem Fall wurde bei der Kontrolle nach einem Jahr der Zustand der „stable disease“ beschrieben.
- In 3 Fällen wurde ein Rezidiv bzw. eine Progression beschrieben:
 - In einem Fall lag 1 Jahr nach lokaler Steroidtherapie ein Rezidiv vor.
 - Im zweiten Fall lag ein halbes Jahr nach Erstdiagnose ohne Therapie eine Progression vor.
 - Im dritten Fall lag ein Monat nach Exzision ein Rezidiv an derselben Lokalisation vor.

- Zusätzlich zeigten sich in der Datenerhebung aus dem Lymphknotenregister Kiel zwei weitere Fälle, die Rezidive mit klonaler Verwandtschaft zur der Erstmanifestation zeigten. Leider lagen zu diesen Fällen keine klinischen Daten vor.

Zusammenfassend wurde in 5/21 Fällen (24%) ein Rezidiv oder eine Persistenz der Erkrankung im weiteren Verlauf beschrieben. In drei Viertel der Fälle (76%) konnte nach lokaler Therapie, meist mittels einer lokalen Exzision, keine Progression der Erkrankung im Verlauf nachgewiesen werden. Ein Staging wurde in 16 Fällen nicht durchgeführt, in den übrigen Fällen wurde diesbezüglich keine Angabe gemacht.

Klinische Bilder der CD4LPD wurden uns für zwei der untersuchten Fälle zur Verfügung gestellt (PD Dr. med. Ulrike Wehkamp).



Abbildung 10: Klinisches Bild 1

Alter zum Zeitpunkt der Diagnose:	53 Jahre
Geschlecht:	männlich
Hautbefund:	solitäre Läsion
Lokalisation:	rechte Wange/Schläfe



Abbildung 11: Klinisches Bild 2

Alter zum Zeitpunkt der Diagnose:	67 Jahre
Geschlecht:	weiblich
Hautbefund:	solitäre Läsion
Lokalisation:	retroaurikulär rechts

4. Diskussion

Das primär kutane CD4+ klein- bis mittelgroßzellige T-Zell-Lymphom wurde als provisorische Entität 2008 in die WHO-Klassifikation aufgenommen. Die Revision dieser Klassifikation im Jahr 2016 zweifelt das echte neoplastische Potential der Erkrankung an und favorisiert aus diesem Grund die Bezeichnung CD4-positive Lymphoproliferation (CD4LPD), anstelle der Benennung als CD4-positives Lymphom (Willemze et al., 2019).

Die Erkrankung weist viele Gemeinsamkeiten mit reaktiven, entzündlichen Pseudolymphomen auf (Çetinözman, Jansen, & Willemze, 2012). Diagnostisch abgrenzen lässt sie sich durch den Nachweis einer klonalen T-Zell Population. Klinisch verhält sie sich meistens blande mit überwiegend solitären Läsionen an Kopf, Rumpf oder Hals, die in der Regel auf eine lokale Therapie, meist mittels einer Exzision, gut ansprechen (Salah, 2019). Allerdings werden auch Fälle mit einem anderem Verlauf beschrieben, die keine Tendenz zur spontanen Rückbildung zeigen, sowie Rezidive oder eine Progression aufweisen (Volks et al., 2013). Zudem ist auch ein Fall mit einem komplexen klinischen Verlauf beschrieben, in dem sich die CD4LPD in ein großzelliges Lymphom transformierte (Garcia-Herrera et al., 2008).

Die CD4LPD muss differentialdiagnostisch auch von anderen CD4-positiven kutanen Lymphomen abgegrenzt werden. Hierzu ist die klinisch-pathologische Korrelation essenziell. Speziell sollte die CD4LPD auf ein Körperareal beschränkt sein und mit einer oder wenigen lokalisierten Hautläsionen einhergehen (Steven H. Swerdlow et al., 2016).

Da es sich bei dieser Erkrankung um eine seltene Entität handelt, ist es schwierig eine repräsentative Kohorte für eine Untersuchung zusammenzutragen. Hierfür bot sich die Biobank der Abteilung für Hämatopathologie und Lymphknotenregister an, in welcher nicht nur Fälle aus der Universitätsklinik Kiel, sondern auch Zusendungen aus dem gesamten Bundesgebiet als Referenzzentrum für Lymphomdiagnostik vorliegen und über Jahrzehnte archiviert werden. Dies machte eine ausreichende Zusammenstellung von Fällen mit der Diagnose CD4LPD und eine anschließende retrospektive Untersuchung der Histopathologie, sowie der klinischen Präsentation, durch Anschreiben und Befragen der einsendenden Ärzte möglich.

Insofern ist es uns gelungen für diese Entität eine große Kohorte von 69 Fällen der CD4LPD mit verfügbarem Lymphommaterial zusammenzustellen.

Alle hier untersuchten Fälle erfüllten die diagnostischen Kriterien der Erkrankung. Speziell konnte der molekulare Klonalitätsnachweis der Läsion in Zusammenschau mit den typischen histopathologischen Merkmalen in fast allen Fällen erbracht werden. Primär bedeutet dies, dass CD4-positive klein- bis mittelgroßzellige T-Zellen im Hautinfiltrat dominierten und im Schnitt 77% der lymphatischen Zellen in den untersuchten Fällen ausmachten (Spannweite 30-95%). Unsere Untersuchungen belegen aber eindeutig, dass die zelluläre Zusammensetzung sehr heterogen ist. T-Zellen machen meist den höheren Anteil des Infiltrates aus, jedoch sind typischerweise relativ viele B-Zellen involviert, im Schnitt 23% (Spannweite 5-70%). Dies kann zur Fehldiagnose eines B-Zell-Lymphoms führen, besonders in Fällen, bei denen die Anzahl an B-Zellen höher ist als die der T-Zellen. Gerade primär kutane Marginalzonenlymphome kommen in solchen Fällen

differentialdiagnostisch in Betracht (Oschlies et al., 2020). Einige Fälle mit höherem B-Zellgehalt wurden daher sicherheitshalber zusätzlich mit der Fragestellung nach einer klonalen B-Zell-Population analysiert und wiesen alle eine polyklonale Verteilung der Rearrangements auf. Entsprechend ließ sich in keinem der untersuchten Fälle eine Leichtketten-restringierte Plasmazellpopulation nachweisen. Somit kann unsere Kohorte Einzelfallbeobachtungen zu klonaler Expansion von Plasmazellen in der CD4 LPD nicht bestätigen (Magro et al., 2019).

In der Literatur werden verschiedene histologische Infiltrationsmuster in der Haut beschrieben (Salah, 2019). In unserer Kohorte zeigten nur 25% der Fälle das gut erkennbare bandförmig diffuse Infiltrationsmuster, welches wenig polymorph ist und daher leichter als mögliches Lymphom/Lymphoproliferation erkannt wird. Die meisten Fälle, nämlich 75% zeigten das polymorph knotige Muster, welches viel Ähnlichkeit zum Pseudolymphom aufweist und so die histopathologische Diagnostik erschwert.

Obwohl die PD-1 Expression in der Literatur beschrieben ist (Salah, 2019), weist in der Regel nur ein Teil der Zellen im Infiltrat diese Expression auf, im Durchschnitt 24%. Auffällig ist dabei vor allem die besondere Verteilung der PD-1-positiven Zellen in Form von Clustern mittelgroßer bis blastärer Zellen, welche wir als Phänomen in 45% der Fälle objektivieren konnten, aber in keinem der untersuchten Pseudolymphome sahen. Dieses Merkmal kann in der Routinediagnostik ein Hinweis auf die CD4LPD sein und sollte zur Klonalitätsanalyse führen. Dabei geht man davon aus, dass gerade diese Zellgruppe Ursprung des klonalen T-Zell-Rezeptor-Gen-Rearrangements ist.

Als weitere Auffälligkeit der CD4LPD konnten wir die ungewöhnliche Koexpression von Cyclin D1 und PD-1 in

lymphatischen Zellen des Infiltrates nachweisen. Cyclin D1 wird normalerweise nicht in lymphatischen Zellen exprimiert, jedoch ist in der Literatur vereinzelt eine Expression von Cyclin D1 in bestimmten T-NHL beschrieben (Song et al., 2016). Auch ist die aberrante Expression aus mehreren B-Zell-Neoplasien bekannt (S.H. Swerdlow et al., 2017).

Dieses Phänomen konnten wir durch eine Doppelfärbung eindeutig (>10% der PD-1-positiven Zellen) für knapp über die Hälfte der untersuchten Fälle dokumentieren. Eine geringe Koexpression konnte für zusätzliche 26% der Fälle dokumentiert werden, sodass nur etwa ein Viertel der Fälle dieses Phänomen gar nicht aufwies. Zum einen kann diese Besonderheit, ähnlich wie die gruppierten PD-1-Zellen, ein diagnostisches Merkmal der CD4LPD in Abgrenzung zum Pseudolymphom darstellen, zum anderen kann die Expression des Zellzykluspromoters Cyclin D1 in den T-Zellen der CD4LPD als Hinweis auf deren Fehlregulation bzw. ein neoplastisches Potential gewertet werden.

Dabei ist darauf hinzuweisen, dass die Auswertung bezüglich der Cyclin D1 Expression in PD-1-positiven T-Zellen nicht ganz einfach ist, da Cyclin D1-positive Makrophagen oder Endothelien nicht mit evaluiert werden dürfen. Dieses Problem konnten wir mit der Doppelfärbung aber gut lösen, da PD-1 nicht in Makrophagen oder Endothelien exprimiert wird. Somit konnte die Auswertung auf die PD-1-positive Population fokussiert und diese Fehlinterpretation umgangen werden. Denkbar bleibt dennoch, dass auch ein Teil der Cyclin D1-positiven Zellen ohne PD-1 Expression zum neoplastischen T-Zellklon gehört, insofern wären unsere Untersuchungen hier möglicherweise geringer sensitiv.

Insgesamt stellten wir in 52% der untersuchten Fälle eine eindeutige ($\geq 10\%$) Cyclin D1/PD-1 Doppelexpression fest. Dieses

Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass es sich bei diesem Phänomen nicht um Einzelfälle, sondern um ein mögliches Charakteristikum dieser Entität handelt.

In den 6 selektierten T-Zell-reichen und PD-1 exprimierenden Pseudolymphomen, die verblindet der Auszählung zugeführt wurden, zeigte sich in keinem eine Cyclin D1/PD-1 Doppelexpression.

Bislang konnte in durchgeführten Studien außer der Klonalität im TCR-Gen-Rearrangement keine weiteren klonalen Marker wie rekurrente Mutationen oder andere genetische Alterationen beschrieben werden (Steven H. Swerdlow et al., 2016). Hier haben wir uns gefragt, ob die aberrante Proteinexpression von Cyclin D1 durch eine Translokation oder durch eine Genamplifikation verursacht sein könnte. Dazu haben wir im Anschluss an die Doppelfärbungen Untersuchungen des *Cyclin D1/CCND 1* Gens mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung durchgeführt. Dabei zeigten 15 Fälle mit einem Cyclin D1/PD-1 Doppelexpressionsanteil von mehr als 15% weder Amplifikationen noch Brüche im *CCND 1* Gen. Diese Befunde decken sich mit denen anderer Studien, die eine Cyclin D1 Expression in einigen anaplastisch-großzelligen Lymphomen nachgewiesen haben und ebenfalls keine Amplifikation oder Translokation des *CCND 1* Gens nachweisen konnten (Song et al., 2016). Demzufolge könnten hier epigenetische Modifikationen oder Genmutationen, die wir in dieser Studie nicht analysiert haben, für die aberrante Proteinexpression verantwortlich sein.

Die Proliferationsrate in der CD4LPD gemessen am Ki67 wird in der WHO-Klassifikation als niedrig (5- max. 20%) beschrieben (Garcia-Herrera et al., 2008; Steven H. Swerdlow et al., 2016). Dies können wir für 68% der analysierten Fälle in unserem Kollektiv bestätigen. In 32% der Fälle war hingegen eine etwas

höhere Proliferationsrate (bis max. 45%) zu beobachten, die ansonsten alle typischen Kriterien einer CD4LPD aufwiesen. Demnach sollten die in der WHO angegebenen Grenzen nach unseren Analysen etwas weiter gefasst werden. Allerdings lagen nur in 2 der 9 dieser Fälle mit erhöhter Proliferationsrate eindeutige klinische Daten vor, anhand derer die Klassifikation mit isoliertem Hautbefall auch in klinisch-pathologischen Korrelation sicher einer CD4LPD entsprachen.

Insgesamt konnte retrospektiv für 23 Fälle eine klinisch-pathologische Korrelation erfolgen. Alle Fälle wurden klinisch als solitäre Patches oder Knoten, meist im Kopf oder Halsbereich beschrieben. Dies steht im Einklang mit den typischen Präsentationen der CD4LPD nach Literaturdaten (Willemze et al., 2019). In der Literatur wird das klinische Verhalten meist als indolent, mit lokalen solitären Läsionen, die ein gutes Ansprechen auf lokale Therapien zeigen, beschrieben (Grogg et al., 2008; Salah, 2019). Diese Erkenntnisse decken sich ebenfalls mit den Daten der befragten Einsender.

In 20 Fällen mit vorliegender Angabe zur Therapie wurden 90% der Fälle (n=18/20) lokal behandelt. In 80% (n=16/20) der Fälle mit Nachverfolgung (n=16/20) konnte kein Rezidiv beobachtet werden. Bei 15% (n=3/20) wurde ein Lokalrezidiv beschrieben. In einem Fall wurde keine Angabe über den Verlauf gemacht. Ein Übergang in ein aggressiveres/systemisches Lymphom wurde in keinem der Fälle dokumentiert. In einem der drei Fälle mit dokumentiertem Rezidiv und vorliegenden Daten zum zeitlichen Verlauf, wurde dieses als innerhalb des ersten Jahres nach Lokaltherapie auftretend beschrieben. Zudem konnte zu zwei weiteren der 69 untersuchten Fälle ohne ausgefüllten Fragebogen aus den Daten des Lymphknotenregisters ein klonal verwandtes Rezidiv nachgewiesen werden. In einem dieser

beiden Fällen trat das Rezidiv an gleicher, bei dem anderen Fall an einer anderen Lokalisation auf. Bei dem Fall mit dem Rezidiv an gleicher Lokalisation bestand ein zeitlicher Abstand von 2 Jahren zwischen Therapie und Rezidiv.

Der Grund für die große Anzahl primärer Exzisionen bzw. Biopsien der Hautmanifestationen lässt sich durch die Größe der Hautveränderungen erklären. Diese waren in unserer Befragung im Durchschnitt 1,68 cm groß, wiesen aber auch Größen von bis zu 6 cm auf, sodass sowohl die Patienten als auch die behandelnden Kollegen eine histologische Abklärung einer malignen Genese der klinisch „besorgniserregenden“ Hautmanifestation anstrebten.

Grundsätzlich kann man sagen, dass sich die klinische Präsentation der meisten von uns untersuchten CD4LPD Fälle mit denen in der Literatur beschriebenen, häufig indolenten Verläufen, sowie gelegentlichen Lokalrezidiven, übereinstimmen. In keinem der Fälle musste aufgrund der klinisch-pathologischen Korrelation die histopathologisch gestellte Diagnose revidiert werden. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass das histopathologische Bild der CD4LPD für sich alleinstehend offenbar recht charakteristisch ist. Insbesondere gilt dies für die Fälle mit „Buntzelligkeit“ bei Durchmischung von T- und B-Zellen und nur wenigen Blasten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Großteil unserer Kohorte von CD4LPD Fällen eine klinische, sowie histopathologische Präsentation aufweist, die mit der aus anderen beschriebenen Kohorten übereinstimmt und die Einordnung der Entität als indolente Lymphoproliferation unterstützt. Dafür sprechen der meist gemischtzellige und polymorphe Aufbau und das klinische Verhalten der Läsion.

Dennoch zeigt die Entität rekurrente Merkmale, die eine gesonderte Klassifikation in Abgrenzung zu Pseudolymphomen der Haut rechtfertigt. Die Läsionen sind oft klinisch besorgniserregend und werden aufgrund ihrer Größe und Persistenz biopsiert oder reseziert. Zudem ist konsistent molekular eine T-Zell-Klonalität nachweisbar. Histopathologisch sehen wir besondere Charakteristika wie clusternde PD-1-positive T-Zellen mit gesteigerter Proliferation und aberranter Expression von Cyclin D1. Gerade letzteres Phänomen ist in dieser Promotionsarbeit erstmalig als biologisches Merkmal der CD4LPD beschrieben und weist klar auf eine Deregulation oder sogar neoplastisches Potential der T-Zellen in der Läsion hin.

Aufgabe zukünftiger Arbeiten wird es sein, noch klarer zu erforschen, welcher Mechanismus hinter der Cyclin D1 Deregulation steht und ob andere Mutationen als Driver der Lymphoproliferation in Frage kommen. Hierzu sind aufgrund des wohl insgesamt niedrigen Gehaltes an Tumorzellen der Läsion sehr sensitive Methoden gegebenenfalls in Kombination mit Mikrodissektion der Zielzellen erforderlich. Derartige Arbeiten werden im Institut für Pathologie, Sektion Hämatopathologie, an der wertvollen im Rahmen dieser Promotionsarbeit etablierten Kohorte weitergeführt werden.

5. Zusammenfassung

In dieser Promotionsarbeit erfolgte eine umfassende klinische und histopathologische Charakterisierung einer in der Sektion für Hämatopathologie am Institut für Pathologie gesammelten Kohorte von 69 Fällen der seltenen primär kutanen CD4+ klein- bis mittelgroßzelligen T-Zell-Lymphoproliferationen (CD4LPD). Da die Entität derzeit nach der WHO-Klassifikation als provisorisch gilt, sind weitere klinische und biologische Daten zur weiteren Charakterisierung erforderlich, vor allem da das neoplastische Potential noch unklar ist.

In retrospektiver Analyse wurde die Diagnose als CD4LPD nach den derzeitigen WHO-Kriterien bestätigt. Anschließend erfolgte eine detaillierte Analyse zur zellulären Zusammensetzung des lymphatischen Infiltrates und ergänzende Analysen zur Frage einer aberranten Cyclin D1 Expression der vermeintlich neoplastischen PD-1 exprimierenden T-Zellpopulation des Infiltrates. Retrospektiv wurden über Fragebögen die klinischen Daten erhoben.

Die Proben stammten von 67 Patienten (n=32m, n=35w) mit einem Altersmedian von 60 Jahren (23-82 Jahre). In 23 Fällen konnten retrospektiv klinische Daten ermittelt werden. Alle Fälle zeigten eine solitäre Läsion in Form einer Plaque oder eines kleinen Knotens (0,6-6cm). Für 18/24 Fällen wurde eine lokale Therapie (z.B. Exzision, Kortikoide) angegeben. In keinem Fall erfolgte eine Bestrahlung oder Chemotherapie. Der B-Zellgehalt lag im Durchschnitt bei 23%, der T-Zellgehalt bei 77%. Konsistent zeigte sich eine klonale T-Zell-Rezeptorgenumlagerung.

Der Gehalt PD-1-positiver Zellen im Infiltrat lag im Durchschnitt bei 24%, mit einer nachweisbaren Clusterbildung in 45% der

Fälle. In 22/42 Fällen mit Cyclin D1 Färbung fanden sich >10% aberrant Cyclin D1-positive lymphatische Zellen. Die Doppelfärbung bestätigte die Koexpression von Cyclin D1 und PD-1 im Infiltrat. Dabei lag der gemittelte Anteil an Cyclin D1 und PD-1 exprimierenden PD-1-positiven Zellen bei 17%. Es fanden sich aber weder Amplifikationen noch Brüche des *Cyclin D1* Gens als Ursache der Cyclin D1 Expression. In 6 Pseudolymphomen mit vielen enthaltenen PD-1-positiven Zellen konnte keine Koexpression von Cyclin D1/PD-1 nachgewiesen werden. Ebenfalls zeigte sich keine nachweisbare Clusterung.

Zusammenfassend kann die CD4LPD in unserer Analyse als histopathologisch gemischtzellige Lymphoproliferation mit Dominanz von CD4-positiven und variabel PD-1 exprimierenden T-Zellen mit nachweisbarer T-Zell-Klonalität beschrieben werden.

Als besonderes Merkmal der Entität wird in der vorliegenden Arbeit das Phänomen der Clusterung PD-1 exprimierender T-Zellen erstmalig objektiviert, sowie die aberrante Expression von Cyclin D1 als neu beschriebenes Merkmal aufgezeigt. Dies sind Charakteristika, die eine Abgrenzung zu den sich histopathologisch ähnlich präsentierenden Pseudolymphomen ermöglichen können, und zudem biologische Hinweise auf eine Zellzyklusderegulation der T-Zellen in der CD4LPD liefern. Im Einklang mit den Daten aus der Literatur, präsentierte sich die CD4LPD in der Analyse klinisch als indolent, mit überwiegend solitären Läsionen ohne Disseminationstendenz. Meist erfolgte die Behandlung mit anschließender Kontrolle mittels lokaler Therapie, jedoch kam es zu gelegentlichen Rezidiven. Die im Rahmen dieser Dissertation zusammengestellte wertvolle Kohorte ist Ausgangspunkt weiterer zukünftiger Untersuchungen zur Pathogenese der CD4LPD.

6. Literaturverzeichnis

- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., & Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International Immunology*, 8(5). <https://doi.org/10.1093/intimm/8.5.765>
- Beltraminelli, H., Leinweber, B., Kerl, H., & Cerroni, L. (2009). Primary cutaneous CD4+ small-/medium-sized pleomorphic T-cell lymphoma: a cutaneous nodular proliferation of pleomorphic T lymphocytes of undetermined significance? A study of 136 cases. *The American Journal of Dermatopathology*, 31(4), 317–322. <https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e31819f19bb>
- Çetinözman, F., Jansen, P. M., Vermeer, M. H., & Willemze, R. (2012). Differential expression of Programmed Death-1 (PD-1) in Sézary syndrome and mycosis fungoides. *Archives of Dermatology*, 148(12). <https://doi.org/10.1001/archdermatol.2012.2089>
- Çetinözman, F., Jansen, P. M., & Willemze, R. (2012). Expression of programmed death-1 in primary cutaneous CD4-positive small/medium-sized pleomorphic t-cell lymphoma, cutaneous pseudo-T-cell lymphoma, and other types of cutaneous T-cell lymphoma. *American Journal of Surgical Pathology*, 36(1). <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318230df87>
- 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. *American Journal of Surgical Pathology*, 30(7). <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000209855.28282.ce>

- Elder, D. E., Massi, D., Scolyer, R. A., Willemze, R., & International Agency for Research on Cancer. (2019). WHO classification of skin tumours. In *American Journal Dermatopathology* (Vol. 41).
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R., & Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *Journal of Experimental Medicine*, 192(7).
<https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027>
- Garcia-Herrera, A., Colomo, L., Camós, M., Carreras, J., Balague, O., Martinez, A., López-Guillermo, A., Estrach, T., & Campo, E. (2008). Primary cutaneous small/medium CD4+ T-cell lymphomas: A heterogeneous group of tumors with different clinicopathologic features and outcome. *Journal of Clinical Oncology*, 26(20). <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.1307>
- Gravelle, P., Burroni, B., Péricart, S., Rossi, C., Bezombes, C., Tosolini, M., Damotte, D., Brousset, P., Fournié, J. J., & Laurent, C. (2017). Mechanisms of PD-1/PD-L1 expression and prognostic relevance in non-Hodgkin lymphoma: A summary of immunohistochemical studies. In *Oncotarget* (Vol. 8, Issue 27).
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16680>
- Grogg, K. L., Jung, S., Erickson, L. A., McClure, R. F., & Dogan, A. (2008). Primary cutaneous CD4-positive small/medium-sized pleomorphic T-cell lymphoma: A clonal T-cell lymphoproliferative disorder with indolent behavior. *Modern Pathology*, 21(6). <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.40>
- 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 Journal*, 11(11). <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x>
- John, R. R., Malathi, N., Ravindran, C., & Anandan, S. (2017). Mini review: Multifaceted role played by cyclin D1 in tumor behavior. In *Indian Journal of Dental Research* (Vol. 28, Issue 2). https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_697_16
- Langerak, A. W., Groenen, P. J. T. A., Brüggemann, M., Beldjord, K., Bellan, C., Bonello, L., Boone, E., Carter, G. I., Catherwood, M., Davi, F., Delfau-Larue, M. H., Diss, T., Evans, P. A. S., Gameiro, P., Garcia Sanz, R., Gonzalez, D., Grand, D., Håkansson, Å., Hummel, M., ... Van Dongen, J. J. M. (2012). EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. In *Leukemia* (Vol. 26, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/leu.2012.246>
- 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., ... Freeman, G. J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*, 2(3). <https://doi.org/10.1038/85330>
- LeBoit, P. E., Burg, G., Weedon, D., & Sarasin, A. (2006). The World Health Organization classification of skin tumours. In *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* (Vol. 18, Issue 6).
- Magro, C. M., Ruan, J., Grossman, M., & Hedayat, A. A. (2019). Monoclonal plasma cell infiltrates in the setting of cutaneous follicular helper T cell lymphoproliferative disorders. *Annals of Diagnostic Pathology*, 40.

<https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2019.04.013>

McClanahan, F., Sharp, T. G., & Gribben, J. G. (2016). Catching up with solid tumor oncology: What is the evidence for a prognostic role of programmed cell death-ligand 1/programmed cell death-1 expression in b-cell lymphomas? In *Haematologica* (Vol. 101, Issue 10).

<https://doi.org/10.3324/haematol.2016.145904>

Oschlies, I., King, R. L., Dotlic, S., Montes-Moreno, S., Ponzoni, M., Traverse-Glehen, A., Calaminici, M., Ferry, J. A., Ott, G., & Goodlad, J. R. (2020). The clinico-pathological spectrum of primary cutaneous lymphoma other than mycosis fungoides/Sezary syndrome. In *Virchows Archiv* (Vol. 476, Issue 5). <https://doi.org/10.1007/s00428-019-02713-7>

Rodríguez Pinilla, S. M., Roncador, G., Rodríguez-Peralto, J. L., Mollejo, M., García, J. F., Montes-Moreno, S., Camacho, F. I., Ortiz, P., Limeres-González, M. A., Torres, A., Campo, E., Navarro-Conde, P., & Piris, M. A. (2009). Primary cutaneous CD4+ small/medium-sized pleomorphic T-cell lymphoma expresses follicular T-cell markers. *American Journal of Surgical Pathology*, 33(1).

<https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31818e52fe>

Salah, E. (2019). Primär kutane CD4+ klein- bis mittelgroßzellige pleomorphe T-Zell-Lymphoproliferation: Wo stehen wir? Eine systematische Übersicht. In *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology* (Vol. 17, Issue 2).

https://doi.org/10.1111/ddg.13691_g

Shi, S. R., Chaiwun, B., Young, L., Cote, R. J., & Taylor, C. R. (1993). Antigen retrieval technique utilizing citrate buffer or urea solution for immunohistochemical demonstration of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections. *Journal of*

Histochemistry and Cytochemistry, 41(11).

<https://doi.org/10.1177/41.11.7691930>

Shi, S. R., Key, M. E., & Kalra, K. L. (1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 39(6). <https://doi.org/10.1177/39.6.1709656>

Song, J. Y., Song, L., Herrera, A. F., Venkataraman, G., Murata-Collins, J. L., Bedell, V. H., Chen, Y. Y., Kim, Y. S., Tadros, R., Nathwani, B. N., Weisenburger, D. D., & Feldman, A. L. (2016). Cyclin D1 expression in peripheral T-cell lymphomas. *Modern Pathology*, 29(11). <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.136>

Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J., & Vardiman, J. . (2017). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France. *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, 4th*.

Swerdlow, Steven H., Campo, E., Haris, N. L., Jafee, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J., & Vardiman, J. W. (2008). World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue IARC. In *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue IARC* (Vol. 4).

Swerdlow, Steven H., Campo, E., Pileri, S. A., Lee Harris, N., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G. A., Zelenetz, A. D., & Jaffe, E. S. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. In *Blood* (Vol. 127, Issue 20). <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>

- Vibhakkar, R., Juan, G., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., & Finger, L. R. (1997). Activation-induced expression of human programmed death-1 gene in T- lymphocytes. *Experimental Cell Research*, 232(1). <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3493>
- Volks, N., Oschlies, I., Cario, G., Weichenthal, M., & Fölster-Holst, R. (2013). Primary cutaneous CD4+ small to medium-size pleomorphic T-cell lymphoma in a 12-year-old girl. *Pediatric Dermatology*, 30(5), 595–599. <https://doi.org/10.1111/pde.12168>
- Willemze, R., Cerroni, L., Kempf, W., Berti, E., Facchetti, F., Swerdlow, S. H., & Jaffe, E. S. (2019). The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood*, 133(16), 1703–1714. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-881268>
- Willemze, R., Jaffe, E. S., Burg, G., Cerroni, L., Berti, E., Swerdlow, S. H., Ralfkiaer, E., Chimenti, S., Diaz-Perez, J. L., Duncan, L. M., Grange, F., Harris, N. L., Kempf, W., Kerl, H., Kurrer, M., Knobler, R., Pimpinelli, N., Sander, C., Santucci, M., ... Meijer, C. J. L. M. (2005). WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. In *Blood* (Vol. 105, Issue 10). <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3502>

Danksagung

Mein größter Dank gilt PD Dr. med. Ilske Oschlies. Danke für die hervorragende Betreuung dieser Doktorarbeit! Dass Du mir allzeit mit Rat und Tat zur Seite standest hat diese überhaupt möglich gemacht.

Danke ebenfalls für die Unterstützung in der Vorbereitung und Präsentation meines Vortrages bei der 103. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie in Frankfurt. Danke für die klare Struktur und Anweisungen die Du mir im Laufe dieser Doktorarbeit immer gegeben hast.

Herzlichen Dank an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister. Insbesondere bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Wolfram Klapper für seine allzeitige konstruktive Unterstützung.

Susanne Pietz und Susanne Griep danke ich für Ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Aufnahme in das Team. Mein Dank gilt auch Dr. med. Ulrike Wehkamp aus der Hautklinik.

Ich bedanke mich auch herzlichst bei den vielen Ärztinnen und Ärzten, die mir die Datenerhebung durch das Beantworten der Fragebögen überhaupt ermöglichten.

Zuletzt möchte ich meiner Frau Margaret Wüseke dafür danken, dass sie mir nicht nur in meinem Studium, sondern auch bei der Erstellung dieser Dissertation den Rücken freigehalten hat, damit ich mich vollkommen der Arbeit widmen konnte.