

Aus dem Institut für Pathologie

(Direktor: Prof. Dr. Röcken)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Digitale Pathologie und T-Zell-Rezeptor-
Repertoire in sequentiellen Biopsien des klassischen
Hodgkin Lymphoms**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Franziska Jochims

aus Eutin

Kiel **2021**

1. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. Wolfram Klapper
2. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. Anne Letsch
Tag der mündlichen Prüfung:	10.03.2023
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	02.11.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Entdeckung des Hodgkin Lymphoms	1
1.2 Thematische Einführung, Epidemiologie und Klinik des Hodgkin Lymphoms	1
1.3 Prognose und Rezidiv des Hodgkin Lymphoms	4
1.4 Die Hodgkin-Reed-Sternberg Zelle und ihr Tumormikromilieu	6
Die Hodgkin-Reed-Sternberg Zelle.....	6
Das Tumormikromilieu	7
Prognostische Bedeutung unterschiedlicher Zelltypen des TME	9
2 Zielsetzung und Fragestellung	13
3 Material und Methoden	14
3.1 Materialien.....	14
Software.....	15
3.2 Auswahl des Patientenkollektivs.....	16
3.3 Immunhistochemische Färbung	18
3.4 Scannen der Gewebeschnitte.....	21
3.5 Digitale Bildanalyse mit Definiens TissueStudio.....	21
Allgemeine Einstellungen.....	21
Erster Schritt: Auswahl des zu analysierenden Gewebes.....	22
Zweiter Schritt: Kern-, Zell- und IHC pos. Flächen-Erkennung	23
3.6 Überprüfen der Qualität	28
3.7 Statistische Auswertung.....	28

3.8 Weitere Analysen	30
4 Ergebnisse	31
4.1 Beschreibung der untersuchten Kohorte	31
Patient*innen.....	31
Gewebe und histopathologische Diagnosen	33
Ganzschnittuntersuchung mithilfe von Definiens TissueStudio 64	35
Auswahl der Berechnungsart.....	35
4.2 Anteile der untersuchten Zellpopulationen	36
4.3 Dynamik der Anteile vom primären Lymphom zu seinem Rezidiv	36
4.4 Kollagenanteil und Berechnung der Zellularität	39
4.5 Subpopulationen der T-Zellen	40
4.6 T-Zell Rezeptor Untersuchungen	42
5 Diskussion.....	47
6 Zusammenfassung	60
7 Literaturverzeichnis	62
8 Publikationen der Ergebnisse	71
9 Danksagung	72
10 Eidesstattliche Erklärung.....	73

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiel einer Zell-Berechnung mithilfe von Definiens TissueStudio 64	25
Abbildung 2: Beispiel einer Flächen-Berechnung mithilfe von Definiens TissueStudio 64	26
Abbildung 3: Beispiel einer Kern-Berechnung mithilfe von Definiens TissueStudio 64	27
Abbildung 4: Kreisdiagramme der histologischen Verteilung der cHLs in dieser Kohorte	34
Abbildung 5: Die durchschnittliche zelluläre Zusammensetzung des Tumormikromilieus im primären und rezidierten Lymphom	36
Abbildung 6: Die Dynamiken der Anteile von der Primär- zur Rezidivbiopsie der CD3, CD20, CD30 und CD68 Färbungen	38
Abbildung 7: Kollagenanteil im Vergleich vom Primär- zum Rezidivbiopsat	39
Abbildung 9: Kreisdiagramm der Zusammensetzung CD3 pos. T-Zell Subpopulationen im primären Lymphom und dem respektiven Rezidiv	41
Abbildung 8: Die Dynamiken in den Anteilen der T-Zell-Subpopulationen vom Primären- zum Rezidivbiopsat	41
Abbildung 10: Vierfeldertafeln zur Beschreibung der Veränderungen der TZR Klone in Abhängigkeit von der Dynamik der CD3 pos. Zellen	43
Abbildung 11: Korrelationen der Anzahl der Rearrangements unabhängig von der Primär- oder Rezidivbiopsie mit dem Anteil der T-Zellen, der Pielou's Evenness und dem Jahr der Biopsieentnahme.	44
Abbildung 12: Veränderungen der Pielou's Evenness in Abhängigkeit von der T-Zellanteil Zu- oder abnahme im Rezidiv.....	45
Abbildung 13: Logarithmische Darstellung der Veränderung der Anteile der gemeinsamen Klone (innerhalb der 10 häufigsten) von Rezidiv zu Primärtumor.....	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung des Hodgkin Lymphoms nach der Ann-Arbor Klassifikation und den Risikofaktoren in Stadien als Kriterien zur Therapieentscheidung	3
Tabelle 2: Internationaler prognostischer Score (Hasenclever and Diehl, 1998)	5
Tabelle 3: Liste durchgeführter Untersuchungen je Patient*in dieser Arbeit ergänzt durch vorangegangene Analysen durch Schnitter et al. (Schnitter et al., 2019)	17
Tabelle 4: Informationen zu den für die IHC-Färbungen verwendeten Antikörpern	21
Tabelle 5: Liste der wichtigsten Informationen, die nach der Analyse durch Definiens TissueStudio 64 je nach Berechnungsart herausgegebenen wurden	28
Tabelle 6: Demographie des in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektivs	32
Tabelle 7: Statistische Auswertung der Unterschiede in den verschiedenen Anteilen des Tumormikromilieus zwischen der Primär- und der Rezidivbiopsie	37
Tabelle 8: Statistische Auswertung der CD3 pos. Subpopulationen anhand eines gepaarten t-Tests als Anteile des gesamten TME	40
Tabelle 9: Statistische Auswertung der CD3 pos. Subpopulationen anhand eines gepaarten t-Tests als Anteile der CD3 pos. T-Zellen	40
Tabelle 10: Statistische Auswertung der Veränderung der T-Zell-Rezeptorklonalität anhand eines gepaarten t-Test	42

Abkürzungsverzeichnis

CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Bezeichn. von Antigenen auf Zelloberflächen)
cHL	<i>classical Hodgkin Lymphoma</i> = klassisches Hodgkin Lymphom
CTL	<i>cytotoxic T-lymphocyte</i> = Zytotoxische T-Zelle (CD8 pos.)
EBV	Epstein-Barr Virus
FoxP3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRS-Zelle	Hodgkin-Reed-Sternberg Zelle
IHC	Immunhistochemisch
IL	Interleukin
IPS	Internationaler prognostischer Score
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> = Haupthistokompatibilitätskomplex
neg.	negativ
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NOS	<i>Not otherwise specified</i>
Prim.	primäres Lymphom
pos.	positiv
Rez.	Rezidiv
Th-Zelle	T-Helferzelle (Th1, Th2)
TME	<i>Tumormicroenvironment</i> = Tumormikromilieu
TMA	<i>tissue microarray</i> = kleine Gewebeausschnitte
Treg	regulatorische T-Zelle
WSI	<i>whole-slide-image analysis</i> = Ganzschnittanalyse

1 Einleitung

1.1 Entdeckung des Hodgkin Lymphoms

Schon im Jahre 1832 beschrieb der britische Arzt und pathologische Anatom Thomas Hodgkin in „On some morbid appearances of the Absorbent Glands and Spleen“ eine Erkrankung, die sowohl die Lymphknoten als auch in den meisten Fällen die Milz betraf. Er ist der Namensgeber des heute bekannten Hodgkin Lymphoms. In seiner Veröffentlichung geht er auf die Zusammensetzung der vergrößerten Lymphknoten ein. Hierbei beschreibt er eine homogene Textur, die eher auf eine Vergrößerung der Drüse selbst, als eine neue wuchernde Struktur in ihr, zurückzuführen ist. Diese vergrößerte Masse sei nicht in der Lage, die physiologische Funktion der Lymphknoten aufrecht zu erhalten. Des Weiteren beschreibt er eine unorganisierte Masse aus Entzündungszellen, die ihren Ursprung nicht in der Entzündung der bestehenden Ulzerationen habe, sondern viel mehr durch die Nähe zu Blutgefäßen entstanden sei (Hodgkin, 1832). Dieses schon vor fast 200 Jahren beschriebene Entzündungsinfiltrat stellt auch heute noch einen wichtigen Ansatz in der Forschung dar. Am Ende des 18. und Beginn des 19. Jahrhunderts beschrieben der österreichische Pathologe Carl Sternberg und die amerikanische Kinderärztin Dorothy Reed Mendenhall unabhängig voneinander Riesenzellen mit ein, zwei oder mehreren Zellkernen, die sich in den vergrößerten Lymphknoten von Patient*innen mit der Hodgkin'schen Krankheit fanden (Sternberg, 1898, Reed, 1902).

1.2 Thematische Einführung, Epidemiologie und Klinik des Hodgkin Lymphoms

Heute weiß man, dass das Hodgkin Lymphom (HL) eine maligne Erkrankung des lymphatischen Gewebes ist. Lymphome sind klonale Tumoren, die entweder aus undifferenzierten oder differenzierten Immunzellen der lymphatischen Reihe, also den B-, T- oder Natürlichen Killer (NK)-Zellen, entstehen (Swerdlow et al., 2008). Die klonalen malignen Zellen des klassischen Hodgkin Lymphoms sind die sogenannten Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen (HRS-Zellen). Sie bilden nur etwa 1% des Tumorgewebes. Die restlichen Zellen spiegeln das Tumormikromilieu (= *Tumormicroenvironment*, TME) wider (Kuppers, 2009).

Das Hodgkin Lymphom ist mit einem Anteil von 0,5% der onkologischen Neuerkrankungen im Jahr eine eher seltene Erkrankung. Bei jungen Menschen im Alter zwischen 15 und 29

Jahren liegt der Anteil mit 10% höher. Laut des Berichts „Krebs in Deutschland für 2015/16“ erkrankten im Jahr 2016 1430 männliche und 1060 weibliche Patient*innen (m:w 1,4:1) (Robert-Koch-Institut, 2019). Dabei zeigt sich ein erster höherer Altersgipfel von Neuerkrankungen zwischen dem 15. und dem 35. Lebensjahr. Wie für viele Krebserkrankungen steigt das Risiko ein Hodgkin Lymphom zu bekommen bei über 65-jährigen wieder an (Robert-Koch-Institut, 2019). Es bleibt zu beachten, dass je nach Ethnie Unterschiede in der Altersverteilung bestehen (Evens et al., 2012). In den letzten Jahren zeigte sich insgesamt ein leichter Anstieg der Inzidenz (Robert-Koch-Institut, 2019). Die absolute 5-Jahres Überlebensrate bei der Erkrankung an einem Hodgkin Lymphom liegt bei Männern in Deutschland bei 82% und bei Frauen bei 81% (Robert-Koch-Institut, 2019). Kinder hingegen haben 5-Jahres Überlebensraten von bis zu 95%, was zum Teil daran liegt, dass junge Patient*innen Hochdosistherapien besser vertragen als ältere (Kahn et al., 2019).

Das Hodgkin Lymphom ist der Überbegriff zweier unterschiedlicher Entitäten, die sich durch ihre klinische, histologische und genetische Erscheinung voneinander abgrenzen: das klassische Hodgkin Lymphom (cHL, 95% der Hodgkin Lymphome) und das nodulär lymphozytenprädominante Hodgkin Lymphom (5%).

Die World Health Organisation (WHO) teilt das cHL in vier unterschiedliche Subtypen ein. Diese Einteilung erfolgt histologisch weniger anhand der HRS-Zellmorphologie, sondern mehr anhand der Zellzusammensetzung des TME. 65% der Fälle werden als nodulär sklerosierender Typ klassifiziert, da histologisch große HRS-Zellen und Fibrose zu erkennen sind. Dieser Subtyp stellt den größten Anteil dar. Weitere 20% werden wegen ihres diffusen oder nodulären Wachstums ohne Sklerose als Mischtyp bezeichnet. 4% sind vom lymphozytenreichen und 1% vom lymphozytenarmen Typ. Sie sind durch viele bzw. wenige B-Lymphozyten gekennzeichnet. Der Rest wird als „nicht anders spezifiziert“ (= *no otherwise specified*; NOS) zusammengefasst (Liu et al., 2014, AWMF et al., 2019, Swerdlow et al., 2008, German-Hodgkin-Study-Group, 2020). Vergleiche für die Verteilung der histologischen Typen nach der German Hodgkin Study Group (GHSg) die Abbildung 4.

Bis heute stellt die klinische Präsentation den wichtigsten Anhaltspunkt für die Therapieentscheidung dar. Das lymphatische Gewebe hat keine klare Abgrenzung zu anderen Geweben und ist somit in allen Stadien eine Systemerkrankung. Um die Erkrankung in Stadien einzuteilen, nutzt man die Ann-Arbor Klassifikation, die die Ausbreitung mithilfe

von Lymphknotenregionen oberhalb und unterhalb des Zwerchfells sowie auf extralymphatisches Gewebe beschreibt (Carbone et al., 1971).

In der Tabelle 1 wird die Klassifikation nach klinischen Gesichtspunkten angeführt.

Tabelle 1: Einteilung des Hodgkin Lymphoms nach der Ann-Arbor Klassifikation und den Risikofaktoren in Stadien als Kriterien zur Therapieentscheidung

Ann-Arbor-Stadium	Betroffenes Gewebe +/- Risikofaktoren		A oder B Suffix
	Frühes Stadium	Intermediäres Stadium	
I	Befall einer LKR oder ein lokalisierter extralymphatischer Befall	<i>Mit Risikofaktoren:</i> +/- >3 befallene LKR +/- hohe BSG +/- großer Mediastinaltumor +/- extranodaler Befall	A: keine B-Symptome
II	Befall von 2-3 LKR auf einer Zwerchfellseite Oder Ein lokalisierter extranodaler Befall und einer LKR auf einer Zwerchfellseite	<i>Mit Risikofaktoren:</i> +/- >3 befallene LKR +/- hohe BSG	B: B-Symptome - Unerklärtes Fieber >38°C - Nachtschweiß - unerklärter Gewichtsverlust von >10% des Körpergewichts innerhalb von 6 Monaten
	Fortgeschrittenes Stadium		
		<i>Mit Risikofaktoren</i> +/- großer Mediastinaltumor +/- extranodaler Befall	
III	Befall von 2 oder mehr LKR auf beiden Seiten des Zwerchfells <i>+/- Risikofaktoren</i>		
IV	Nicht lokalisierte, d.h. disseminierter Befall extralymphatischen Gewebes mit oder ohne Befall des lymphatischen Systems <i>+/- Risikofaktoren</i>		

+/- = mit/ohne, BSG = Blutsenkungsgeschwindigkeit, LKR = Lymphknotenregion;
hohe BSG = >50 mm/h oder >30 mm/h bei B Symptomen, großer Mediastinaltumor = > 1/3 Brustkorbdurchmesser

Nach der klinischen Stadieneinteilung in ein frühes, intermediäres und fortgeschrittenes Stadium wird die Therapie entschieden. Erwachsene werden nach dem ABVD (Adriamycin + Bleomycin + Vinblastin + Dacarbazin) oder BEACOPP (= Bleomycin + Etoposid + Adriamycin + Cyclophosphamid + Vincristin + Procarbazin + Prednison) Chemotherapieschema in Kombination mit einer Strahlentherapie behandelt (AWMF et al., 2019). Da bei Kindern unter 18 Jahren die Spätfolgen der Therapie eine große Rolle spielen, gab es in den letzten Dekaden unterschiedliche Chemotherapieschemata, die durch Studien überprüft wurden (Claviez, 2018). Wegen der Gonadotoxizität gibt es weitere Unterschiede in den Schemata zwischen Jungen und Mädchen. Die Radiotherapie soll wegen ihrer Langzeitwirkung insgesamt so eingeschränkt wie möglich genutzt werden. Ob nur noch Resttumore, die nach Chemotherapie mittels Positronenemissionstomographie (PET) nachgewiesen werden, eine Radiotherapie erhalten sollen und somit die Langzeitnebenwirkungen vermindert werden können, wird in aktuellen Studien erforscht (Mauz-Korholz et al., 2010).

1.3 Prognose und Rezidiv des Hodgkin Lymphoms

Nach der stadienadaptierten Therapie, bestehend aus einer Chemo- mit einer gefolgten In-Field Radiotherapie, gehen ungefähr 80% und in frühen Stadien bis zu 90% in Remission, das heißt Blutuntersuchungen und Bildgebung zeigen keinen aktiven bzw. sichtbaren Tumor mehr (LaCasce, 2019). Nur wenige Patient*innen versterben, wovon viele nicht ihrer Krebserkrankung, sondern der Therapie oder den Therapiefolgen erliegen, wie z.B. Zweitmalignomen oder therapiebedingten kardiovaskulären Erkrankungen (de Vries et al., 2018). Bei wenigen Patient*innen ist der Tumor therapierefraktär, das heißt er spricht nicht auf die Therapie an und ist weiterhin progredient. Bei diesen Patient*innen muss das Therapieregime umgestellt werden.

Man kann die Rezidive in Frührezidive, die nach mehr als 3 Monaten und weniger als 12 Monate nach Therapie, oder Spätrezidive, die mehr als 12 Monate nach Therapie auftreten, unterscheiden. Dabei haben Frührezidive eine schlechtere Prognose als die späten (Brockelmann et al., 2017). Patient*innen mit einem Rezidiv und geringen Begleiterkrankungen werden mit einer Hochdosischemotherapie und einer autologen Stammzelltransplantation behandelt (Rancea et al., 2013). Durch diese Therapie können 50% der Patient*innen geheilt werden (Steidl et al., 2010). Den restlichen werden heutzutage z.B. Therapien mit Antikörpern gegen CD30 (=Cluster of differentiation, Brentuximab vedotin),

gegen den PD-1 Rezeptor bzw. den PD-1 Liganden (Pembrolizumab, Nivolumab) oder andere in Studien laufende Therapiekonzepte, wie die CAR-T-Zell Therapie, angeboten. (Ramos et al., 2017, AWMF et al., 2019)

Patient*innen mit risikoarmen Typen des cHL leiden beim Überleben der Erkrankung häufig unter der Langzeittoxizität der Therapie. Um die Übertherapie von Patient*innen mit risikoarmen und Untertherapie derer mit risikoreichen Typen zu verhindern, wurden prognostische und prädiktive Biomarker gesucht. Das Geschlecht und das Alter der Patient*innen zeigten sich für die Prognose ebenso relevant wie das klinische Staging. Männliche Patienten haben eine höhere Wahrscheinlichkeit, an einem Hodgkin Lymphom zu versterben. Ältere Patient*innen reagieren auf onkologische Erkrankungen immunologisch schlechter als jüngere, haben zudem häufig die prognostisch ungünstigeren histologischen Subtypen und vertragen die Polychemotherapie schlechter (Mina et al., 2019, Koppers et al., 2012, Cirillo und Borchmann, 2020).

Tabelle 2: Internationaler prognostischer Score (Hasenclever and Diehl, 1998)

Anzahl der Risikofaktoren	% der Patient*innen	% 5J-PFS	%5J-OS	Risikofaktoren - Serum Albumin < 40 g/L - Hämoglobin < 10.5 g/dL - Männliches Geschlecht - Ann-Arbor Stadium IV - Alter ≥ 45 Jahre - Weiße Zellen ≥ 15 x10 ⁹ /L - Lymphozyten < 0.6 x10 ⁹ /
0	7	84	89	
1	22	77	90	
2	29	67	81	
3	23	60	78	
4	12	51	61	
>5	7	42	56	

5J = 5 Jahre, PFS = *Progression free survival*, OS = *Overall survival*

Die aufgezählten prognostischen Faktoren und weitere Laborparameter, die zusammen einen signifikanten Unterschied in der Prognose zeigten, wurden durch Hasenclever et al. in einem Internationalen prognostischen Score (IPS) zusammengefasst (Hasenclever und Diehl, 1998). Der IPS und seine Bestandteile werden in der Tabelle 2 gezeigt.

In einer späteren Studie wurden der IPS und seine Aussagekraft infrage gestellt. Moccia et al. fand eine bestehende Gültigkeit des IPS in fortgeschrittenen Stadien, jedoch scheint die

prognostische Aussage durch die heutigen erfolgreichen Therapieschemata eingeschränkter nutzbar zu sein (Moccia et al., 2012).

Bis heute korrelieren die Ergebnisse des PET Scan am besten mit der Prognose (Cirillo und Borchmann, 2020). Die Untersuchung der histologischen Subtypen zeigte unter der modernen aktuellen Therapie keine besonderen Unterschiede in der Prognose zwischen den vier Subtypen (Steidl et al., 2011). Da die prognostische Aussage der klinischen Erscheinung Mängel zeigte, wird in der gegenwärtigen Forschung nun auch das TME untersucht. Um die prognostische Bedeutung von histologischen Merkmalen zu verstehen, müssen die Tumorzelle und ihr umliegendes Tumormikromilieu näher betrachtet werden.

1.4 Die Hodgkin-Reed-Sternberg Zelle und ihr Tumormikromilieu

Die Hodgkin-Reed-Sternberg Zelle

Die klonalen Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen bilden nur einen Anteil von ungefähr 0,1-10% am erkrankten vergrößerten Lymphknoten (Swerdlow et al., 2008). Den Rest der Masse bilden reaktive Entzündungszellen, die mit den Tumorzellen interagieren. Morphologisch unterscheidet man die mononukleären Hodgkin-Zellen von den mehrkernigen Reed-Sternberg Zellen, die beide einen Durchmesser von mehr als 50µm haben können. Die mehrkernige Reed-Sternberg Zelle entsteht entweder durch nukleäre Teilung ohne zelluläre Teilung, durch Fusion oder einer Kombination aus beidem (Newcom et al., 1988). Häufig ist ein klarer Nukleolus im Zellkern zu erkennen.

Da diese Zellen nur einen geringen Anteil am Tumor stellen, nicht sehr robust sind und auf Überlebenssignale aus dem TME angewiesen sind, ist die Isolierung einer Zelllinie und somit die Informationsgewinnung sehr schwierig (Kaplan und Gartner, 1977, Drexler et al., 2018). Die Ursprungszelle der HRS-Zelle war lange unbekannt, da diese Marker unterschiedlicher Zelllinien, wie zum Beispiel den T-Zell Rezeptor stabilisierenden Komplex CD3 der T-Zellen, Granzym B der zytotoxischen Zellen, aber auch typische Oberflächenantigene von B-Zellen, dendritischen Zellen, Natürlichen Killer Zellen (NK-Zelle), myeloiden Zellen oder Granulozyten (Schmitz et al., 2009) exprimiert. Durch die Entdeckung von klonalen somatischen Genmutationen in den leichten und schweren Immunglobulinregionen geht man davon aus, dass >95% der Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen von B-Lymphozyten und nur ca. 5% von T-Lymphozyten stammen (Kuppers und Hansmann, 2005, Seitz et al., 2000, Muschen et al., 2000). Diese Mutationen werden im gesunden Organismus vor allem in

aktiven Keimzentrum-B-Zellen gefunden. Normalerweise gehen die mutierten Keimzentrum-B-Zellen in Apoptose, doch erste Transformationen in der Vorläufertumorzelle helfen die physiologischen Barrieren zu umgehen (Kanzler et al., 1996). Den HRS-Zellen ist in der Transformation das membranständige Immunglobulin, welches dem B-Zell-Rezeptor entspricht, verloren gegangen. Dafür tragen sie nun alle den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 8, CD30. Dieser wird durch das TME stimuliert und aktiviert den intrazellulären NFκB Weg konstitutiv, der wiederum die Transkription von Genen und das Wachstum fördert (Weniger und Kuppers, 2016, Swerdlow et al., 2008). Die konstitutive Aktivierung des NFκB Wegs ist eine pathognomische Veränderung des cHL und wird durch viele unterschiedliche Mutationen und Interaktionen mit dem TME ermöglicht (Liu et al., 2014). Die Ätiologie der Erkrankung ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird jedoch eine Assoziation mit infektiösen Erregern wie dem Epstein-Barr Virus vermutet. In der westlichen Welt sind 40%, in Kenia hingegen 100% der HRS-Zellen mit dem Virus infiziert (Weinreb et al., 1996, Kapatai und Murray, 2007). Es wird angenommen, dass die Integration der Virus-DNA in die der Wirtszelle ein frühes Event darstellt, welches zu einer Immortalisierung der Zelle führt (Kuppers et al., 2012). Der Anteil der Tumorzellen im Gewebe scheint dabei nicht mit der Prognose assoziiert (Steidl et al., 2011).

Das Tumormikromilieu

Das physiologische Immunsystem des Körpers besteht aus zwei antagonistisch arbeitenden Systemen: dem pro- und antiinflammatorischen System. Zum proinflammatorischen System zählen T- und B-Lymphozyten mit ihren Antikörpern, Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, NK-Zellen aber auch Endothelzellen oder Fibroblasten sowie von diesen Zellen sezernierte Zytokine. Sie sind in der Lage, mithilfe von Oberflächenrezeptoren und durch gemeinsame Aktivierung untereinander, körperfremde, infizierte oder genetisch veränderte Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Damit der Körper durch die vom Immunsystem losgetretene, sich selbst befeuernde Kaskade keinen Schaden nimmt, gibt es ein antiinflammatorisches System, welches die Entzündungsreaktion dämmt. Damit werden zum Beispiel antiinflammatorisch agierende regulatorische T-Zellen (Treg) und Th2-Zellen assoziiert, die die Entzündungsreaktion über Sekretion verschiedener Zytokine dämmen. Zu diesen gehören zum Beispiel Interleukin (IL)4, IL10 oder TGFβ. Dieser Vorgang ist

physiologisch und sehr wichtig für die Homöostase im Körper (Mosmann et al., 1986, Yang et al., 2010, Wolf et al., 2015).

Für die HRS-Zellen sind die umliegenden Entzündungszellen, mit denen eine rege Interaktion besteht, überlebenswichtig. Die fragilen HRS-Zellen sammeln in ihrer Umgebung Zellen, die sie unterstützen. Im erkrankten Lymphknoten werden T- und B-Zellen, Neutrophile Granulozyten, Eosinophile Granulozyten, Makrophagen, NK-Zellen und dendritische Zellen, aber auch Fibroblasten gefunden (Kuppers et al., 2012). Sie alle zusammen bilden das Tumormikromilieu. Abzugrenzen ist das Tumormikromilieu vom Tumormakromilieu, welches die Auswirkungen der Tumorerkrankung auf einzelne Organe oder den gesamten Körper, wie zum Beispiel die Tumorkachexie, beschreibt (Al-Zoughbi et al., 2014).

Entscheidend bei der Betrachtung der unterschiedlichen Immunzellen des TME ist, ob diese pro- oder antiinflammatorisch bzw. pro- oder antitumoral wirken.

Die HRS-Zelle ist in der Lage sich durch Sezernierung von bestimmten Zytokinen ein eigenes Entzündungsmilieu aufzubauen, welches ihr Überleben durch Stimulierung oder Abschirmung von antitumoralen Entzündungszellen ermöglicht. Manche sezernierten Zytokine nutzt sie auch zur Übermittlung autokriner Überlebenssignale (Liu et al., 2014).

Die CD4 positiven (pos.) Treg und Th2-Zellen stellen die Hauptakteure des TME des cHL dar. Sie werden durch die HRS-Zelle zum Beispiel mithilfe von CCL17/TARC angelockt. TARC ist ein Zytokin, welches sehr spezifisch für das cHL ist, mit dem Therapieansprechen korreliert und deshalb als ein Biomarker diskutiert wird. Ein schnelles Therapieansprechen kann durch eine kurzfristige Dynamik von TARC erkannt werden, jedoch ist dieses auch bei entzündlichen Erkrankungen wie Asthma erhöht (Sauer et al., 2013, Cirillo und Borchmann, 2020). Die angelockten Treg und Th2-Zellen interagieren zum Beispiel mit ihrem CD40-Liganden mit dem CD40-Rezeptor auf der Oberfläche von HRS-Zellen und stoßen damit eine Proliferation über den NFκB Weg an. Außerdem werden diese beiden Subpopulationen häufig mit dem immunsuppressiven Teil der Immunabwehr in Verbindung gebracht. Mithilfe von IL10 oder TGFβ hemmen sie zum Beispiel die antitumoralen, zytotoxischen T-Zellen (= *cytotoxic T-lymphocyte*, CTL) und NK-Zellen (Steidl et al., 2011). Die angelockten Zellen versammelt die HRS-Zelle direkt um sich. Man nennt diese Versammlung von T-Zellen um die HRS-Zelle „*rosetting*“. Sie stellen nicht nur eine chemische Unterstützung dar, sondern schirmen die

Tumorzellen auch mechanisch vor den Angriffen des antitumoralen Immunsystems ab (Cirillo et al., 2019). Die HRS-Zelle kann auch auf die Reprogrammierung von Th1-Zellen zu antiinflammatorischen Th2- und Treg-Zellen wirken. Dafür produziert sie Zytokine und verhindert eine Entwicklung von nativen T-Zellen zu Th1-Zellen (Liu et al., 2014).

Zu den vor allem antitumoral agierenden Zellen gehören die Th1-Zellen und die CTL. Sie erkennen Tumorzellen normalerweise mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TZR) und dem Ko-Rezeptor CD8 oder CD4 und eliminieren sie. Diese Erkennung mithilfe von CD8 bzw. CD4 wird über den auf der Zelloberfläche präsentierten *major histocompatibility complex 1* (MHC1) und 2 (MHC2), über den die genetisch veränderte Tumorzelle ihre produzierten Proteine präsentiert, vermittelt. Um der Immunantwort zu entgehen, nutzt die Tumorzelle nicht nur die Th2-Zellen und Treg, sondern besitzt zum Teil auch Mutationen in den Genen, welche für das MHC1- bzw. MHC2-Protein kodieren, sodass diese auf Zelloberfläche unterexprimiert sind und nicht mehr von den CD4 bzw. CD8 pos. T-Zellen erkannt werden können (Aoki und Steidl, 2018, Liu und Shipp, 2017, Diepstra et al., 2007). Die NK-Zellen wiederum erkennen normalerweise veränderte Zellen mit zu wenigen MHC1-Molekülen, da sie sich nicht wie normale Körperzellen verhalten und töten sie ab. Die HRS-Zelle kann die NK-Zelle mit immunsuppressiven Zytokinen, wie zum Beispiel TGF β , inhibieren (Aldinucci et al., 2016, Kuppers et al., 2012).

Die HRS-Zelle hat neben der Sezernierung von Zytokinen und der verminderten Expression von MHC-Molekülen weitere Mechanismen, um sich vor einer effektiven Immunabwehr zu schützen. So exprimiert sie zum Beispiel einen membranständigen *Programmed-cell-death-protein-ligand 1* (PD-L1). Dieser fördert die Expression des entsprechenden Rezeptors *Programmed-cell-death protein* (PD-1) auf antitumoralen T-Zellen. Die Aktivierung des Rezeptors auf der T-Zelle führt intrazellulär zu ihrer Hemmung (Aoki und Steidl, 2018, Liu und Shipp, 2017).

Prognostische Bedeutung unterschiedlicher Zelltypen des TME

Das Tumormikromilieu und seine Bedeutung sind in den letzten Jahren mehr und mehr in den Fokus der Forschung gerückt. Dabei wurden Zytokine oder Zelltypen gesucht, die mit der Prognose korrelieren und die Therapieentscheidung beeinflussen könnten (Cirillo und Borchmann, 2020). Da Zelllinien die Interaktionen im TME nicht ausreichend abbilden

können und es bis heute keine Mausmodelle gibt, werden die Untersuchungen dazu meist am primärem Tumorgewebe vorgenommen. Viele Arbeitsgruppen arbeiten mit Genexpressionsanalysen oder manuellen bzw. automatischen Auszählungen von immunhistochemisch (IHC) gefärbten kleinen Gewebeausschnitten (= *tissue microarray*, TMA) und korrelieren die Ergebnisse mit klinischen Endpunkten (Steidl et al., 2010, Chetaille et al., 2009, Devilard et al., 2002).

Einen Vorteil, den die Genexpressionsanalysen gegenüber der histologischen Auszählung von TMA bietet, ist, dass sie die RNA- oder Proteinexpression eines gesamten Schnittes eines malignen Lymphknotens und somit einen größeren Anteil des TME untersuchen, während die histologische Untersuchung von TMA sich meist auf die direkte Umgebung einer Tumorzelle beschränkt. Dafür kann die Anzahl der Zellen einer Population mit der Untersuchung von TMA besser festgestellt werden. Die Einschränkung der Genexpressionsanalysen liegt darin, dass sie die Quantität einer RNA bzw. eines Proteins nachweisen, jedoch diese nicht mit der Quantität der Herkunftszellen korrelieren müssen. Mithilfe von Ganzschnittanalysen (= *whole-slide-image analysis*, WSI) sollen in dieser Arbeit die Vorteile der beiden Untersuchungsmethoden kombiniert werden. Die Auszählung der Zellpopulationen des TME wird mithilfe einer computerbasierten Analyse an einem gesamten Lymphknotenschnitt durchgeführt und repräsentiert somit annäherungsweise den gesamten Lymphknoten eines cHL.

In den Studien zu prognostischen Markern wurden in ihren Stadien und Therapieschemata heterogene Gruppen untersucht. Die meisten davon wurden in einer in den Stadien heterogenen Gruppe mit ABVD therapiert oder in einer Kohorte eines Stadiums mit unterschiedlichen Therapieschemata untersucht. Dabei wurde bis heute kein prognostischer Marker für Patient*innen mit fortgeschrittenem Stadium unter der BEACOPP Therapie beschrieben.

Nur wenige haben sich bis jetzt mit den Veränderungen des TME im Vergleich von primärem Lymphom zum Rezidiv beschäftigt. Chan et al. haben über RNA Expressionsanalysen einen Score aus 30 Genen entwickelt, welche eine prognostische Bedeutung nach einer autologen Stammzelltransplantation aufwiesen. Hierbei wurde festgestellt, dass eine geringe Korrelation der Gene des ursprünglichen Tumormilieus mit seinem Rezidiv eine schlechtere

Prognose hatte. Keine prognostische Bedeutung hatten dabei die Zeit bis zum ersten Rezidiv, das Staging oder das Alter >45 Jahren. Zudem fanden sie eine inverse Korrelation zwischen dem Anteil an Makrophagen und B-Zellen (Chan et al., 2017).

Bei den B-Zellen im TME des cHL ist unklar, ob es sich entweder um physiologische Relikte der Follikel handelt, die B-Zellen durch die Tumorzelle angelockt wurden oder ob sie antitumoral arbeiten. Was jedoch gezeigt werden konnte ist, dass ein hoher Anteil von B-Zellen prognostisch günstig ist (Jachimowicz et al., 2020, Greaves et al., 2013, Panico et al., 2015).

Im Tumormikromilieu werden auch viele andere Zellen des Immunsystems gefunden, wie tumorassoziierte Makrophagen, Eosinophile Granulozyten, NK-Zellen oder B-Zellen, die mit der Tumorzelle interagieren. Einige Studien haben postuliert, dass ein hoher Anteil von Makrophagen sowie von Eosinophilen mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind (Steidl et al., 2010, Scott und Steidl, 2014, Gotti et al., 2017, Casulo et al., 2013, Guo et al., 2016, von Wasielewski et al., 2000). Andere Gruppen konnten die Ergebnisse nicht reproduzieren oder fanden das Gegenteil (Hude et al., 2018, Sanchez-Espiridion et al., 2012, Azambuja et al., 2012).

Interessanterweise zeigten Studien zu der prognostischen Bedeutung von Granzym B pos. CTL und FoxP3 pos. Treg teilweise eine kontraintuitiv bessere Prognose bei einem höheren Anteil von Treg und einem niedrigen Anteil von CTL (Chetaille et al., 2009, Devilard et al., 2002, Alvaro-Naranjo et al., 2005, ten Berge et al., 2001, Asano et al., 2006, Greaves et al., 2013, Kelley et al., 2007).

T-Zellen spielen eine wichtige Rolle im Gedächtnis des Immunsystems. Nach einem erkannten Angriff auf die Homöostase des Körpers bilden sich spezifische T-Zellen. Diese haben einen TZR, welcher sehr spezifisch ein Antigen des Angreifers erkennt, um bei einem erneuten Angriff eine schnelle Proliferation dieser Gedächtniszellen auszulösen. Diese Reaktion auf einen bekannten Angreifer zeigt sich in der Klonalität einer TZR spezifischen T-Zell Population und wird als adaptive Immunreaktion bezeichnet.

Seit einigen Jahren werden die Klone der T-Zellen dahingegen untersucht, ob der Körper bei einem Rezidiv sein adaptives Immunsystem, also ein gelerntes Programm, nutzt. Ob dieses adaptive Immunsystem einen Vorteil für die Tumorzelle oder für den Körper darstellt ist der Fokus der Analysen. In Arbeiten zur Klonalität der T-Zellen im TME von Patient*innen mit einem Mammakarzinom oder einem DLBCL (=diffuse large b-cell lymphoma) wurde eine

erhöhte Klonalität des TZR in der Tumorbiopsie im Gegensatz zum gesunden Gewebe gefunden, was für ein adaptives Immunsystem spricht (Beausang et al., 2017, Keane et al., 2017). Ein dominanter Klon wurde im DLBCL dabei jedoch mit einem schlechteren Überleben assoziiert (Keane et al., 2017).

Um die Hemmung der T-Zellen durch den PD-L1 der HRS-Zellen zu unterdrücken, werden in der Rezidivtherapie oder in Studien Antikörper gegen PD-1 bzw. PD-L1 genutzt. Die Antikörper heben die Hemmung durch die HRS-Zellen auf und aktivieren die T-Zellen somit wieder gegen die Tumorzellen. Diese sogenannten Checkpointinhibitoren werden bereits erfolgreich in der Therapie von rezidivierten oder refraktären Hodgkin Lymphomen, wie auch in anderen Tumorentitäten oder z.B. im Rahmen der NIVAHL Studie schon im primären fortgeschrittenen Stadium, genutzt (Reinke et al., 2020, Hollander et al., 2017). Die Wirkung dieser Medikamente unterstreicht die Wichtigkeit des antitumoralen Immunsystems.

Erkenntnisse über die Veränderungen des Mikromilieus im Rezidiv können dabei helfen, die Interaktion zwischen malignen Zellen und dem körpereigenen Abwehrsystem besser zu verstehen. Dafür soll in dieser Arbeit mithilfe der neuen Möglichkeit von digitalen Ganzschnittanalysen die Entwicklung der Anteile der unterschiedlichen Zellpopulationen am TME betrachtet werden. Wenn sich in den Zellpopulationen eine Dynamik zeigt, könnte dies mit der Prognose und dem Therapieansprechen assoziiert sein. Die Interaktion des TME mit den Tumorzellen kann einen wichtigen Schlüssel in der Identifikation von neuen Parametern für eine personalisierte Therapieentscheidung oder Prognosefeststellung darstellen. Neue Erkenntnisse aus den Untersuchungen des TME des cHL können dann auf andere maligne Erkrankungen angewandt werden.

2 Zielsetzung und Fragestellung

In dieser Arbeit sollen die Veränderungen im Tumormikromilieu im Lymphknotenganzschnitt untersucht werden. Hierbei wird eine digitale Ganzschnittanalyse genutzt, um mithilfe eines Computerprogramms mehr über die Zusammensetzung des gesamten Lymphknotens zu erfahren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, neue Biomarker im TME zu detektieren, die zu einer personalisierten und risikoadaptierten Therapieentscheidung beitragen.

Außerdem sollen Interaktionen zwischen HRS-Zellen mit ihrem TME besser verstanden werden, um diese therapeutisch nutzen zu können.

- Gibt es Veränderungen im Tumormikromilieu des klassischen Hodgkin Lymphoms im Rezidiv als Hinweis auf eine veränderte Biologie der Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen nach Chemotherapie?
- Gibt es Hinweise auf eine T-Zell-Immunantwort in Form von expandierten T-Zellklonen?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

- Antikörper:
 - CD3
(Dako, Glostrup, Dänemark)
 - CD8
(Dako, Glostrup, Dänemark)
 - CD20
(Dako, Glostrup, Dänemark)
 - CD30
(Institut für Pathologie, UKSH, Campus Kiel, Deutschland)
 - CD68
(NovoCastra, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)
 - FoxP3
(abcam, Cambridge, Großbritannien)
 - HRP Polymer
(Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)
 - PostBlock Reagent
(Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)
 - BondTM Polymer Refine Detection
(Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)
- Immunhistochemische Färbung
 - 3,3'-Diaminobenzidin
(=DAB, Dako, Glostrup, Dänemark)
 - Alkohol (100%, 96%, 70%)
 - Citratpuffer pH6
 - destilliertes Wasser
 - Epitopendemaskierungslösung 1 und 2
(Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)
 - 4% Formalin
 - Hämalaun nach Mayer
(Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland)
 - Methanol H₂O₂

(Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland)

- Tris-Waschpuffer, Waschpuffer
- Paraffin, Xylol
- Hämatoxylin-Eosin Färbung
 - Hämatoxylin = Mayers Hämaunlösung
(Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland)
 - Eosin
- Geräte und Materialien
 - Dampfkochtopf
 - BOND-MAX Färbeautomat
(Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)
 - Objektträger, beschichtet
(Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)
 - Pertex Eindeckmedium
(Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)
 - Schlittenmikrotom 210R
(Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)
 - Rotationsmikrotom Thermo Fisher Scientific HM 325
(Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)
 - Hamamatsu Nanozoomer RS 2.0
(Hamamatsu Photonics, Ammersee Deutschland)

Software

- Definiens TissueStudio 64
(Definiens AG, München, Deutschland)
- Excel
(Microsoft Corporation, Redmond, USA)
- GraphPad Prism 8
(GraphPad Software, San Diego, USA)
- NDP.view
(Hamamatsu Photonics, Ammersee, Deutschland)
- immuno-Seq™
(Adaptive Biotechnologies, Seattle, USA)

3.2 Auswahl des Patientenkollektivs

Insgesamt wurden 38 paarige Gewebeproben, jeweils bestehend aus primärem Tumor und Rezidiv, aus dem Zeitraum zwischen 1992 und 2017 in diese Arbeit eingeschlossen.

Davon wurden 32 Paare bereits in einer vorausgegangenen Arbeit (Schnitter et al., 2019) auf ihre Unterschiede im RNA Gehalt untersucht. 17 Patient*innen mit einem rezidierten Hodgkin Lymphom mit vorhandenem Gewebe wurden damals aus der Datenbank der Sektion Hämatopathologie und des Lymphknotenregisters des Instituts für Pathologie des Uniklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel identifiziert. Dazu wurden weitere Gewebelöcke und bereits gefärbte Schnitte durch das Institut für Pathologie des Uniklinikums Schleswig-Holstein (UKSH) Campus Lübeck (n=7) zur Verfügung gestellt. Vom Institut für Pathologie und Neuropathologie der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen (n=2) und dem Dr. Senckenberg Institut für Pathologie des Universitätskrankenhauses der Goethe-Universität in Frankfurt am Main (n=6) liegen für die Arbeit Schnitte vor, die für CD3 gefärbt worden sind.

Das Kollektiv, welches von A. Schnitter (Doktorandin, Prof. Dr. Klapper, Pathologisches Institut des UKSH Campus Kiel, Hämatopathologie) zusammengestellt wurde, wurde in dieser Arbeit durch sechs Patient*innen (n=6) und deren Gewebelöcke aus der Abteilung für klinische Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses in Stuttgart ergänzt. Alle Gewebebiopsien entstammten Resektaten, die zur Diagnosesicherung entnommen wurden und in denen anhand der WHO Kriterien ein klassisches Hodgkin Lymphom gefunden wurde (Swerdlow et al., 2008).

Einschlusskriterien waren ein rezidiertes klassisches Hodgkin Lymphom, die Existenz von Biopsien aus dem primären Tumor und dem Rezidiv und genügend Material, um die Proben sequenziell schneiden und färben zu können. Da aus den pathologischen Instituten in Frankfurt und Tübingen lediglich für CD3 gefärbte Schnitte vorlagen, wurde für die Färbung von CD3 mit einer Grundgesamtheit von 38 Patient*innen gerechnet. Die restlichen Färbungen bezogen sich auf eine Grundgesamtheit von 30 Patient*innen (Vergleiche Tabelle 3).

Die Resektate stellten zum größten Teil (n=65 von 76) Lymphknoten dar. Sieben Gewebeproben stammten aus extranodalem Gewebe: Lunge (n=3), Milz (n=2), Pleura (n=1) und paravertebralem Gewebe (n=1). Zwei Resektate waren unbekannter Lokalisation. Insgesamt gab es vier Stenzen, von denen zwei aus Lymphknoten und zwei aus der Lunge

entnommen wurden (Vergleiche Tabelle 3). Nach ihrer Erstdiagnose erhielten alle Patient*innen eine alters- und stadiengerechte klassische Kombination aus Chemo- und In-Field Radiotherapie. Alle Daten zu Geschlecht, Geburtsdatum, Diagnose, Zeitpunkt der Erstdiagnose und der Rezidivdiagnose wurden anonymisiert zur Verfügung gestellt. Die bereits immunhistochemisch gefärbten Schnitte, die zur Verfügung standen, wurden auf ihre Qualität geprüft. Artefaktreiche Schnitte wurden ersetzt. Dafür wurde ein sequenzieller Schnitt hergestellt und durch die Routinefärbung des Pathologischen Instituts, UKSH, Campus Kiel gefärbt. Fehlende Schnitte wurden entweder durch manuelle (FoxP3) oder automatische Färbung nachgeholt, sodass von alle gepaarten Patientenproben sechs Färbungen für CD3, CD20, CD30, CD68, CD8 und FoxP3 vorhanden waren. Dies gelang bis auf die acht Patient*innen aus den pathologischen Instituten in Frankfurt und Tübingen, bei denen die Gewebelöcke nicht zur Verfügung standen. Zur weiteren Übersicht dient die Tabelle 3, die alle Färbungen und durchgeführten Untersuchungen darstellt.

Tabelle 3: Liste durchgeführter Untersuchungen je Patient*in dieser Arbeit ergänzt durch vorangegangene Analysen durch Schnitter et al. (Schnitter et al., 2019)

Pat	Sta-dt	Lokalis.		Färbung + Definiens TissueStudio 64 Auswertung												TZR		Schnitter Kohorte				
				CD3		CD20		CD30		CD68		CD8		FoxP3		Sirius-Red		TZR		IHC		Gen-expr.
		P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	
1	Kiel			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+		
2	Kiel			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Kiel			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Kiel			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Kiel			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Kiel			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Kiel			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	Kiel			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<	<	+	+	+	+
9	Kiel			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+		
10	Kiel			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+		
11	Kiel		Ve	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+
12	Kiel			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	Kiel			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<	<	+	+	+	+
14	Kiel			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	Kiel			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<	<	+	+	+	+
16	Kiel			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

17	Kiel			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	Lüb	Lu	Mi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+		
19	Lüb			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
20	Lüb			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+		
21	Lüb	Un	Un	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+		
22	Lüb			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+		
23	Lüb			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
24	Lüb			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
25	Tüb			+	+															+	+	
26	Tüb	Mi		+	+															+	+	
27	Fra			+	+															+	+	
28	Fra			+	+															+	+	
29	Fra			+	+															+	+	
30	Fra			+	+															+	+	
31	Fra			+	+															+	+	
32	Fra			+	+															+	+	
33	Stu		SN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
34	Stu	SM	SPI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
35	Stu			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+			
36	Stu			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
37	Stu			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
38	Stu	SLu	Lu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+							

+= durchgeführte Analyse; <= nicht ausreichende T-Zell Klone; Fra= Frankfurt; Genexpr.= Genexpression; IHC= Immunhistochemische Untersuchung; Lokalis.= Lokalisation; Lu= Lunge; Lüb= Lübeck; Mi= Milz; P= Primäres Lymphom; Pat= Patient*in; R= Rezidiv; SLu= Stanze Lunge; SM= Stanze Mediastinum; SN= Stanze LK; SPI= Stanze Pleura; Stu= Stuttgart; TZR= T-Zell Rezeptoruntersuchung; Tüb= Tübingen; Un= Unbekannte Lokalisation; Ve= Paravertebrales Gewebe;

Die durchgeführten Untersuchungen erfolgten in Übereinstimmung mit den Empfehlungen, die durch die Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zur wissenschaftlichen Nutzung von Gewebeproben aus dem Lymphknotenregister vorgegeben wurden (Ethikvotum: D447/10). Die patientenbezogenen Daten wurden pseudonymisiert und lediglich innerhalb des gesicherten Datennetzes der Universität Kiel gespeichert. Des Weiteren wurden auch in den Publikationen alle Patientendaten anonymisiert dargestellt.

3.3 Immunhistochemische Färbung

Die mit Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden mit dem Schlitten- (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) bzw. dem Rotationsmikrotom (Thermo Fisher

Scientific, Schwerte, Deutschland) in 2-3 µm dicke Schnitte geschnitten. Danach wurden sie bei 37-42°C über Nacht im Wärmeschrank (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) getrocknet und dann immunhistochemisch gefärbt.

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung besteht darin, dass ein Protein der Zielzelle durch einen Detektionsbaum mit farbiger Reaktion markiert und im Mikroskop sichtbar gemacht wird. An den primären Antikörper bindet ein das Signal verstärkenden Antikörper. Dieser wird wiederum von einem mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörper detektiert. Die Meerrettichperoxidase verwandelt 3,3'-Diaminobenzidin zu einem braunen Produkt, welches die Zielzelle anfärbt und durch das Mikroskop sichtbar macht.

Hierbei konnte das vollautomatische Verfahren durch das BOND-MAX-System (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) von einer manuellen Färbung unterschieden werden. Die Färbung mit den Antikörpern gegen CD3 (T-Zellen), CD8 (Zytotoxische T-Zellen), CD20 (B-Zellen), CD30 (HRS-Zellen) und CD68 (Makrophagen) wurden vom Gerät übernommen, wohingegen die Schnitte, bei denen FoxP3 (Treg) detektiert werden sollte, manuell bearbeitet und gefärbt wurden.

Für die Färbungen für CD3, CD8, CD20, CD30 und CD68 wurden alle folgenden Schritte vom BOND-MAX-System (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) übernommen.

Der Automat begann mit Entfernung des Paraffins durch Xylol mit einer absteigenden Alkoholreihe sowie der Blockierung der endogenen Peroxidase. Danach wurden die Antigene mithilfe der Bond™ Epitopendemaskierungslösung 1 (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) bzw. 2 (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) und Hitze demaskiert. Es folgte die automatische Färbung mit den verdünnten primären Antikörpern gegen die zu detektierenden Epitope. Zum Schluss wurde das Signal durch ein polymeres Detektionssystem sichtbar gemacht (Bond™ Polymer Refine Detection, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) und das Gewebe mit der Kern-Hämalaun-Färbung nach Mayer gegengefärbt.

Anschließend wurde die Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe und das Eindeckeln mit Pertex (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) manuell durchgeführt.

Die manuelle immunhistochemische Färbung wurde nach den Standards des Pathologischen Instituts, UKSH, Campus Kiel für paraffineingebettetes Gewebe durchgeführt. Zunächst

wurden die auf beschichtete Objektträger (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) gezogenen Schnitte 20 Minuten in Xylol eingelegt. Danach wurden sie mit einer absteigenden Alkoholreihe 3x 100%, 2x 96%, 1x 70% rehydriert. Die gewebespezifische endogene Peroxidase wurde durch 10-minütiges Einlegen in Methanol H₂O₂ (200ml Methanol mit 6-8ml H₂O₂) (Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland) denaturiert. Um die Antigene zu demaskieren, wurde der Schnitt 3 Minuten in einem Citratpuffer bei pH6 im Dampfkochtopf gekocht, dann mit Wasser gespült und in Tris-Waschpuffer gestellt. Danach wurden 100µl des mit Antikörper-Diluent verdünnten primären Antikörpers auf das Gewebe getropft und wirkten eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur ein. Die genutzten Antikörper und ihre Herkunft werden in Tabelle 4 aufgelistet. Nach Beendigung der Einwirkzeit wurde der Schnitt mit Tris-Waschpuffer, 3-maligem Spülen mit Leitungswasser und Waschpuffer gesäubert - diese Säuberung folgte jeweils auch auf die nächsten beiden Schritte. Nun wurden 100-200µl des PostBlock Reagents (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland), welche an den primären Antikörper binden, aufgetropft und wirkte 20 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur ein. Danach wurde das Ganze, wie im letzten Schritt beschrieben, gesäubert. Als Nächstes wurden 100-200µl des HRP-Polymers (HRP = engl. Meerrettichperoxidase) (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland), einem Antikörper, welcher mit einer Peroxidase gekoppelt ist, auf den Schnitt getropft. Dieser musste weitere 30 Minuten einwirken und der Schnitt dann gesäubert werden.

Im nächsten Schritt wurden 100µl 3,3'-Diaminobenzidin (Dako, Glostrup, Dänemark) auf den Schnitt gegeben, bis dieser sich durch die Oxidation mithilfe der Meerrettichperoxidase bei einer Einwirkzeit von 5-7 Minuten braun färbte. Nachdem das restliche DAB mit Wasser abgespült worden war, wurden die Zellkerne des schon immunhistochemisch gefärbten Gewebes mit Hämalun nach Mayer (Verdünnung 1:4) blau gefärbt.

Diese letzte Färbung wurde mit Wasser abgespült und dann zehn Minuten in Wasser stehen gelassen. Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe 1x 70%, 2x 96% und 3x 100% wurde der Schnitt wieder entwässert, dann viermal mit Xylol behandelt und mit Pertex (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) eingedeckelt.

Einen Überblick über die verwendeten Antikörper Klone, ihre Herkunftspezies, die Vorbehandlungen und weitere Angaben zur immunhistochemischen Färbung gibt die Tabelle 4.

Tabelle 4: Informationen zu den für die IHC-Färbungen verwendeten Antikörpern

Anti-körper	Firma	Bestellnr.	Tier	Klon	Vorbehandl.	Verdünnung	Detektions-system
CD3	Neomarkers	RM-9107-S	Kaninchen	SP7	ER1	1:100	Automat
CD8	Dako	M7103	Maus	C8/144B	ER1	1:200	Automat
CD20	Dako	M0755	Maus	L26	ER1	1:400	Automat
CD30	Eigener	0	Maus	BerH2	ER1	1:5	Automat
CD68	NovoCastra	NCL-L-CD68	Maus	514H12	ER2	1:100	Automat
FoxP3	Abcam	ab99963	Kaninchen	SP97	pH5	1:25	Zytomed

Bestellnr.= Bestellnummer; ER1=pH6 (Citratpuffer); ER2=pH8 (EDTA Puffer); Vorbehandl.= Vorbehandlung

3.4 Scannen der Gewebeschnitte

Die für CD3, CD8, CD20, CD30, CD68 und FoxP3 gefärbten Schnitte wurden für die computerassistierte Analyse hochauflösend eingescannt. Dafür wurde der Hamamatsu Nanozoomer RS 2.0 (Hamamatsu Photonics, Ammersee, Deutschland) genutzt, welcher das Gewebe in einer 40-fachen Auflösung gescannt und als .ndpi Datei gespeichert hat. Diese hochauflösende Datei konnte durch das Programm NDP.view von Hamamatsu geöffnet, in großer Vergrößerung betrachtet und so artefaktreiche Schnitte aussortiert werden.

3.5 Digitale Bildanalyse mit Definiens TissueStudio

Allgemeine Einstellungen

Mithilfe des Programms Definiens TissueStudio 64 (Definiens AG, München, Deutschland) wurden die Ganzschnitte digital analysiert.

Die durch den Hamamatsu Nanozoomer RS 2.0 erhobenen Metainformationen, wie die 40-fache Vergrößerung, was einer Darstellung in 0.2270354 µm/Pixel entspricht, wurden übernommen.

In den allgemeinen Einstellungen (*General Settings*) wurde die immunhistochemische Farbe eingestellt (*Stain Combination*). In den überwiegenden Fällen war dies *IHC Brown chromogen*, welches die braune DAB Färbung detektieren sollte. 12 alte CD20 Schnitte und 11 CD30 Schnitte waren rot gefärbt (n=23) (*IHC Red chromogen*).

Nun wurde die Struktur angegeben, die durch die Antikörperfärbung markiert wurde (*IHC Marker*). CD3, CD20 und CD30 wurden als Membran-, CD8, FoxP3 als Nuklear- und CD68 als eine Zytoplasma-Färbung eingestellt.

Nach den allgemeinen Einstellungen für das Gewebe wurde im ersten Schritt das zu analysierende Gewebe festgelegt und im zweiten Schritt die Detektion der immunhistochemisch markierten Struktur definiert. Danach konnte das Programm auf der Basis der manuellen Bearbeitung eine Analyse des gesamten Schnitts durchführen.

Erster Schritt: Auswahl des zu analysierenden Gewebes

Der erste Schritt bestand darin, geeignete Gewebebereiche für die Analyse auszuwählen. Dabei wurde das gefärbte Gewebe von dem restlich gescannten Objektträger durch das Programm erkannt. Zu kleine Gewebeinseln (häufig gewählte Mindestgröße: 2000-mal $1000\mu\text{m}^2$) wurden erkannt und von der Analyse ausgeschlossen. Unter *Composer: Initialization*, *Composer: Action* und *Composer: Training* wurde der gesamte Schnitt in kleinere Flächen mit einer gemeinsamen Eigenschaft, wie z.B. der Färbeintensität oder der Zellularität eingeteilt. Diese Flächen wurden dann in zwei Kategorien (*Region of interest, ROI*) eingeteilt. ROI 1 war orange markiert und stellte das Gewebe dar, welches analysiert werden sollten. Alle Flächen, die von der Analyse ausgeschlossen werden sollten, wurden mithilfe von ROI 2 blau markiert. Ausgeschlossen wurden Artefakte, Nekrosen, nicht dem Lymphknoten zuzuordnendes Gewebe, Fettzellen, TMA Stanzlöcher, große Gefäße und unter-/überfärbte Areale. Das Gewebe war nun in eine orange und eine blaue Fläche eingeteilt. Über die aufgestellte Bedingung, dass einzelne ROI Inseln nicht kleiner als meist 50000 sein sollten, wurden die zu kleinen Flächen neu kategorisiert und fusionierten mit der umgebenden ROI (*Composer: Reclassify Region*).

Zum Schluss wurden die durch die vorangegangenen Einstellungen erlangten ROI manuell korrigiert. Dabei wurden alle Bereiche mit dem Cursor umfahren, die durch das Programm noch nicht richtig kategorisiert wurden (*ROI Correction*).

Zweiter Schritt: Kern-, Zell- und IHC pos. Flächen-Erkennung

Im zweiten Schritt wurden Kerne, Zellen oder Flächen detektiert, die positiv oder negativ für die immunhistochemische Färbung waren. Dieser Schritt ist für die verschiedenen Berechnungen, je nach gefärbter Zielstruktur, unterschiedlich. Die Zellberechnung wird für die CD3- und CD20-Färbung angewandt (Vergleiche Abbildung 1), die Flächenberechnung für die CD30- und CD68-Färbung (Vergleiche Abbildung 2) und die Kernberechnung für die CD8-, FoxP3 und CD3-Färbung (Vergleiche Abbildung 3).

Für alle Berechnungen wurden zunächst aus dem Schnitt bis zu zwölf repräsentative Stichproben (*Initialize Cellular Analysis*) herausgesucht, welche durch das Auge des Betrachters als unterschiedliche Färbeintensitäten, Zellkompositionen und Zellularitäten erkannt wurden. Über *Nucleus Detection* wurde die Erkennung von Zellkernen eingestellt. Wurde bei den allgemeinen Einstellungen eine Nucleus Färbung (CD8, FoxP3) festgelegt, so unterschied das Programm nun zwischen IHC-positiven und -negativen Nuclei. Wenn jedoch eine Membran- oder Zytoplasmafärbung (Zell-/Flächenberechnung) ausgewählt wurde, detektierte das Programm in diesem Schritt nur alle mit Hämatoxylin gefärbten Zellkerne. Der Grenzwert für Hämatoxylin wurde auf Werte zwischen 0,01 und 0,1 (Skala: 0-1,2) gesetzt. Für die Zell- und Flächen-Berechnung wurde der Grenzwert für die Erkennung der immunhistochemischen Färbung auf 0,1 (Skala: 0-3) festgelegt. Da die Kern-Berechnung nur zwischen IHC pos. und neg. Nuclei unterscheidet, wurde hier der finale Grenzwert manuell auf Werte zwischen 0,17 und 0,45 (Skala: 0-3) eingestellt.

Um sehr eng aneinander liegende Zellkerne voneinander abzugrenzen, wurde die Kerngröße (*Typical Nucleus Size (μm^2)*) festgelegt. Zur besseren Vergleichbarkeit mit vorangegangenen Arbeiten (Jachimowicz et al., 2020) wurde die durchschnittliche Kerngröße von $20\mu\text{m}^2$ übernommen ($20\mu\text{m}^2$ entspricht einem Durchmesser von $5\mu\text{m}$). Sowohl für die CD8 und FoxP3 Färbungen als auch die Neuberechnungen von CD3 und CD20 wurde einheitlich der Wert $30\mu\text{m}^2$ angenommen ($d=6,1\mu\text{m}$).

Nun wurden die erkannten Zellkerne, die kleiner als $7\mu\text{m}^2$ waren, von den positiv und negativ detektierten Zellen ausgeschlossen (*Nucleus Morphology and Filter*).

Damit waren die Einstellungen für eine Kern-Berechnung abgeschlossen. Für die Zell- und Flächen-Berechnung wurden weitere unterschiedliche Einstellungen festgelegt.

Für die Flächen-Berechnung wurden keine Zellen detektiert, sondern lediglich die immunhistochemisch positiv gefärbte Fläche. Dafür wurden Grenzwerte zwischen 0,11 und 0,6 für CD30 und zwischen 0,12 und 0,3 für CD68 (Skala: 0-2) für die Abgrenzung von IHC pos. gefärbten Arealen zu IHC neg. Arealen eingestellt (*Marker Area Detection*). Um nur intakte und ganze Makrophagen und HRS-Zellen zu zählen, wurden Flächen, die kleiner als $60\mu\text{m}^2$ für HRS-Zellen und $30\mu\text{m}^2$ für Makrophagen sind, von der Berechnung ausgeschlossen (*Minimum Area*).

Die Membranfärbungen CD3 und CD20 wurden als Zell-Berechnung analysiert. Das Programm war in der Lage, aus den detektierten Zellkernen und Membranen eine Zelle zu rekonstruieren (*Membranes and Cells*). Der Grenzwert für die IHC Färbung (*IHC Threshold*) wurde auf 0 (Skala: 0-0,4) gesetzt, sodass alle braun gefärbten Strukturen erkannt wurden. In unseren Einstellungen wurde die Membrandicke als 1pxl (Skala: 0-5pxl) breit definiert (*Membrane Thickness*). Nun wurden die detektierten Zellen nach ihrer Intensität (*Cell Classification, IHC Marker Intensity*) in positive und negative Zellen eingeteilt. Dafür wurden die gleichen Grenzwerte für *thresh none/low*, *thresh low/medium*, *thresh medium/high* eingestellt. Die IHC-Intensität sollte in der ganzen Zelle betrachtet werden (*Measurement in: Cell*).

Nachdem die manuellen Einstellungen vervollständigt waren, wurde die Art der Ausgabe der analysierten Bilder festgelegt (*Default Export*). Zur Kontrolle der auf den ganzen Schnitt angewandten Einstellungen sollten nach der Analyse die Originalscreenshots und die respektiven *Overlays* ausgegeben werden. Im *Overlay* wurden die ROI-Auswahl und die durch die Analyse detektierten Kerne/Zellen/Flächen auf die Originalscreenshots projiziert. Diese Screenshots waren quadratische Ausschnitte des gesamten analysierten Gewebes und wurden im .jpg Format gespeichert. Das Programm wendete am Schluss alle vorgenommenen Einstellungen auf den ganzen Schnitt an (*Run*).

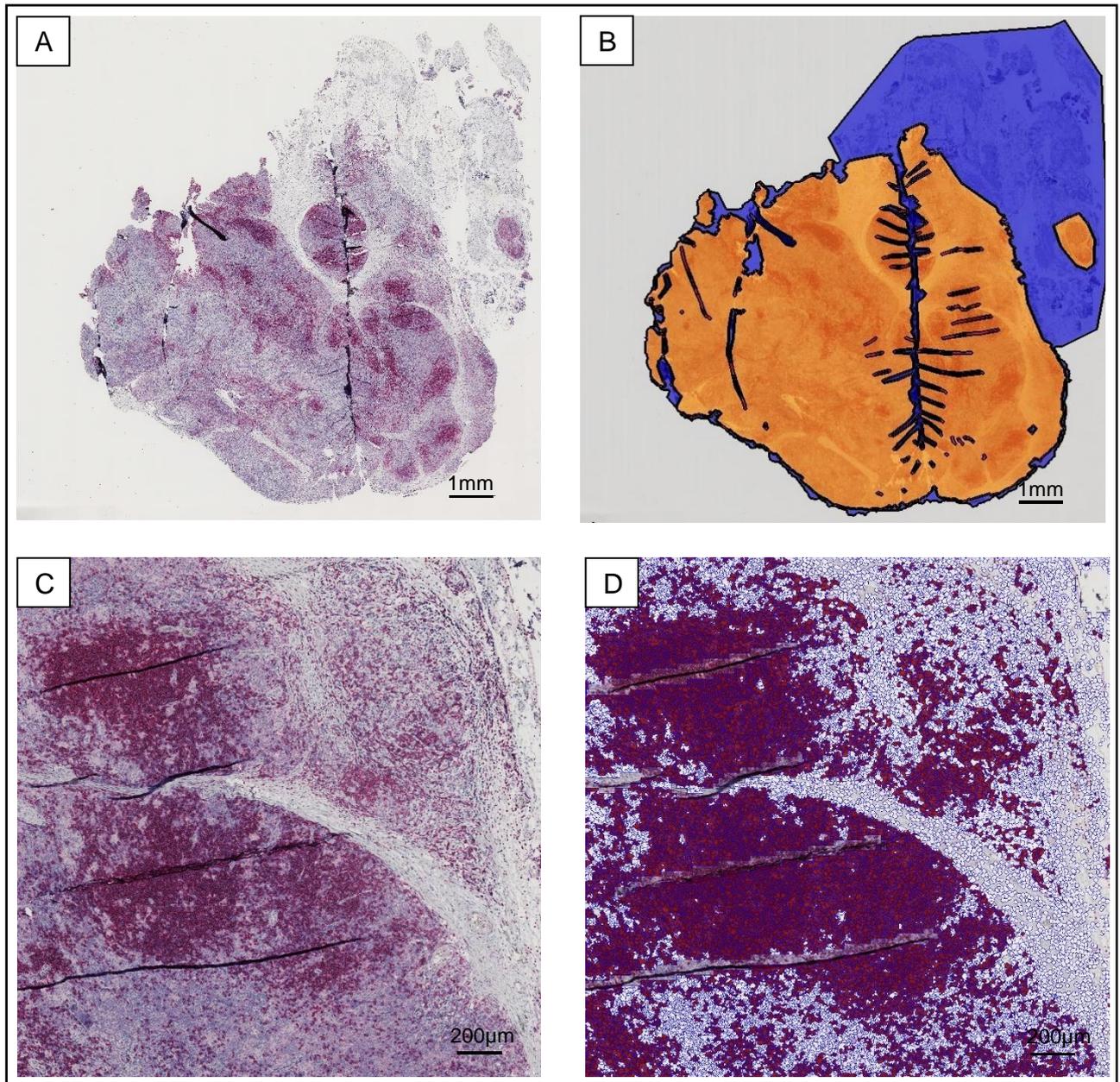


Abbildung 1: Beispiel einer Zell-Berechnung mithilfe von Definiens TissueStudio 64

Patient 15, Primärbiopsie rote Färbung mit CD20 (B-Zellen), Ergebnis der digitalen Ganzschnittanalyse:
40,04% der Zellen sind IHC positiv.

Maßstab A,B=1mm; C,D=200µm

A: gesamter Schnitt, B: ausgewählte ROI (orange), C: Ausschnitt für Einstellung,

D: positive (rot) und negative Zellen (weiß)

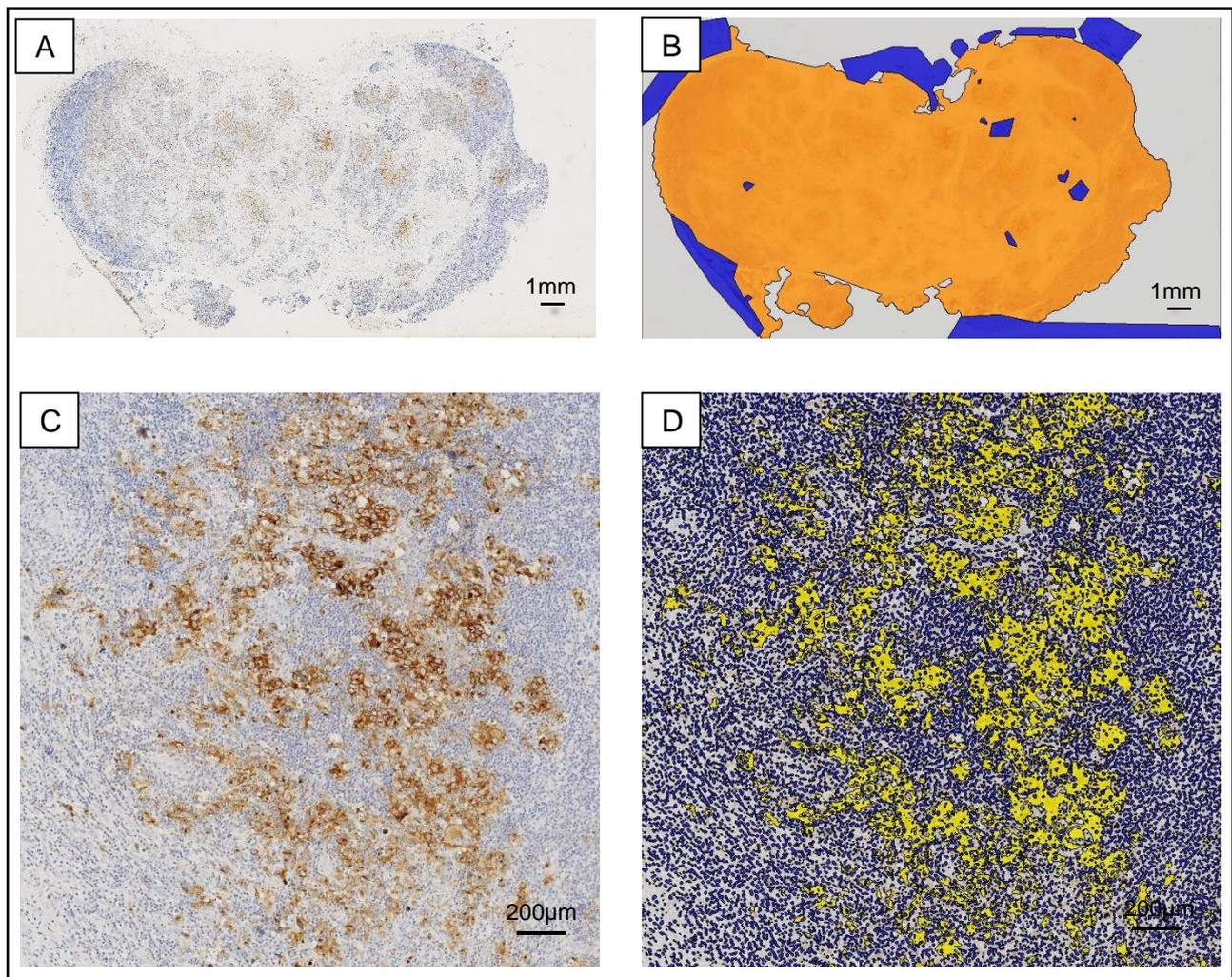


Abbildung 2: Beispiel einer Flächen-Berechnung mithilfe von Definiens TissueStudio 64

Patient 12, Rezidivbiopsie, braune Färbung mit CD30 (HRS-Zellen), Ergebnis der digitalen Ganzschnittanalyse: 1,17% der Fläche ist IHC positiv.

Maßstab A,B=1mm; C,D=200µm

A: gesamter Schnitt, B: ausgewählte ROI (orange), C: Ausschnitt für Einstellung,

D: positive (gelb) und negative Fläche mit Kernen (blau)

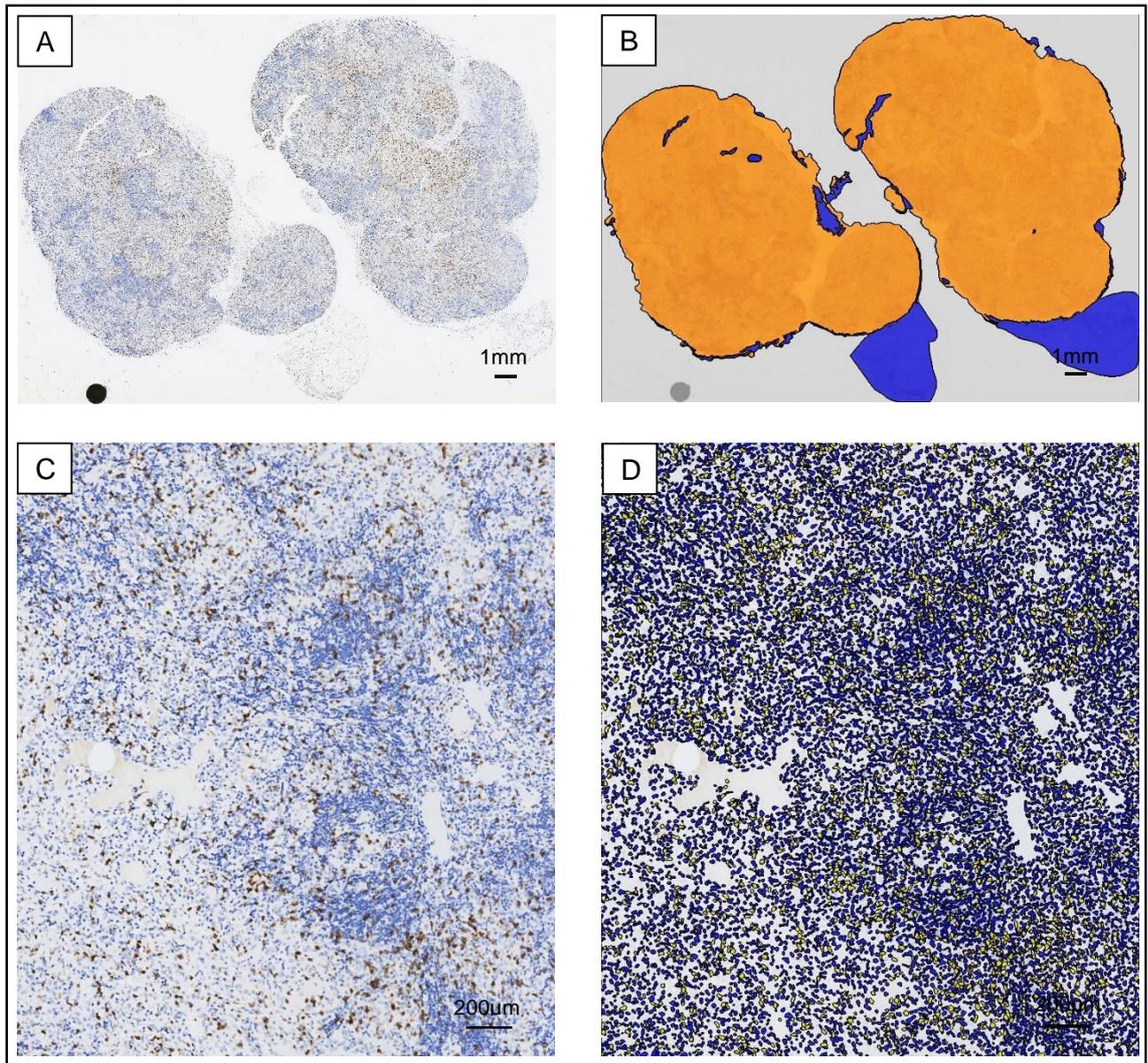


Abbildung 3: Beispiel einer Kern-Berechnung mithilfe von Definiens TissueStudio 64

Patient 23, Rezidivbiopsie, braune Färbung mit CD8 (T-Zell-Subpopulation), Ergebnis der digitalen Ganzschnittanalyse: 23,25% der Kerne sind IHC positiv.

Maßstab A,B=1mm; C,D=200µm

A: gesamter Schnitt, B: ausgewählte ROI (orange), C: Ausschnitt für Einstellung,

D: positive (gelb) und negative Zellen (blau)

3.6 Überprüfen der Qualität

Um die Qualität der Berechnung zu überprüfen, wurden stichprobenartig die originalen Screenshots mit ihren *Overlays* verglichen. Bildanalysen, bei denen der angewandte Overlay in mehreren Stichproben nicht zum Original passte, wurden wiederholt.

Die Berechnungen für CD3 wurden nicht nur mit der Zell-Berechnung vorgenommen, sondern auch mit der Kern-Berechnung. Außerdem wurde die Zell-Berechnung der CD20 gefärbten Schnitte mit anderen Einstellungen, die eine Fibrose besser ausschlossen, wiederholt.

3.7 Statistische Auswertung

Die Analyse des Ganzschnittes ergab eine Datei mit den einzelnen Screenshots als .jpg-Dateien, der Exceltabelle mit den Ergebnissen und Exceltabellen mit den Einstellungen. In der folgenden Tabelle 5 wurden die erhobenen Informationen zusammengefügt.

Tabelle 5: Liste der wichtigsten Informationen, die nach der Analyse durch Definiens TissueStudio 64 je nach Berechnungsart herausgegebenen wurden

	Kern-Berechnung	Zell-Berechnung	Flächen-Berechnung
	CD8, FoxP3, (CD3)	CD3, CD20	CD30, CD68
All Nucleus	X	X	X
All Cells		X	
Positive Index	X		
Nucleus Negative	X		
Nucleus Positive	X		
Cells with Cytoplasm		X	
Cells with Nucleus		X	
Cell Negative		X	
Cell High		X	
Cell Negative (%)		X	
Cell High (%)		X	
Marker Area (%)			X
Marker Area (μm^2)			X
No Stain Area (μm^2)			X
Marker Areas			X

Das Programm berechnete in der Zell-Berechnung den Anteil der IHC pos. Zellen an allen Zellen (CD3, CD20), in der Kern-Berechnung den Anteil IHC pos. Nuklei an allen Nuklei (CD8, FoxP3, CD3) und in der Flächen-Berechnung die IHC pos. gefärbte Fläche an der gesamten analysierten Fläche (CD30, CD68).

Um die Ergebnisse vergleichbarer zu machen, wurde die IHC pos. erkannte Fläche der HRS-Zellen und Makrophagen in eine Zellzahl konvertiert. Um die Größe der Zellen herauszufinden, wurden Makrophagen in *High-power fields* (HPF, kleine Gewebeausschnitte) manuell ausgezählt und diese HPF dann mithilfe des Programms Definiens TissueStudio 64 analysiert. Die durchschnittlich berechnete Fläche eines Makrophagen war $127,3\mu\text{m}^2$ und $167,7\mu\text{m}^2$ für eine HRS-Zelle, was bei Annahme einer kreisrunden Zelle einem Durchmesser von $12,7\mu\text{m}$ bzw. $14,6\mu\text{m}$ entspricht (Jachimowicz et al., 2020).

Nun wurden die Anzahlen der Makrophagen und HRS-Zellen berechnet, indem man die IHC pos. Area (μm^2) durch die Größe der Zellen, das heißt $167,6\mu\text{m}^2$ oder $127,3\mu\text{m}^2$ teilte. Diese Anzahl wurde dann auf die Anzahl der gesamten detektierten Kerne bezogen.

Während die Zell-Berechnung auf die gesamte Zellzahl (*All Cells*) bezogen wurden, wurden in den Flächen-Berechnungen nur Kerne gezählt. Die Zell- und Kernzahlen wichen in den Zell-Berechnungen voneinander ab, da die Software auch Zellen erkannte, die keinen im Schnitt detektierbaren Kern hatten. Die Kernzahl hatte einen Anteil zwischen 55-98% an der detektierten Gesamtzellzahl.

In den Flächen und Kern-Berechnungen wurden Zellen anhand ihrer Färbung besser detektiert, sodass festgelegt wurde, dass die Grundgesamtheit für CD30, CD68, CD8, FoxP3 und die neue Berechnung von CD3 die detektierten Zellkerne darstellten und für CD3 und CD20 die gesamten detektierten Zellen.

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, USA) genutzt. Die Dynamik zwischen den Anteilen der Zellpopulationen in der primären Biopsie und dem Rezidiv wurde anhand eines gepaarten t-Tests berechnet. Um eine Beziehung zwischen zwei Variablen zu bestimmen, wurde mithilfe des Pearson-Test ein Korrelationswert r festgestellt. Kleinere Stichproben wurden mithilfe einer Vierfeldertafel analysiert. Um einen statistisch signifikanten Unterschied zu erkennen, wurde ein p-Wert kleiner als 0,05 angestrebt. Die p-Werte wurden auf vier Kommastellen gerundet dargestellt.

3.8 Weitere Analysen

Die in der Arbeit untersuchte Dynamik der Zellpopulationen wurde durch weitere Analysen ergänzt. Dazu wurde DNA aus FFPE (Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes) Gewebe von 19 Paaren (n=19) zu Adaptive Biotechnologies (Seattle, USA) geschickt. Diese Firma bietet kommerziell die Analyse des T-Zell-Rezeptor (TZR) Repertoire mithilfe der immuno-Seq™ Methode an. Dabei wurde die sehr variable rekombinante Region V (D) J von der TZR Beta Kette mithilfe von Sequenzierung von ca. 87 Basen betrachtet. Durch ihre Variabilität ist sie spezifisch für einen T-Zell Klon (Keane et al., 2017). Damit die Ergebnisse der TZR Klone nicht von kleinen T-Zell Populationen beeinflusst wurden, wurden Proben mit weniger als 1000 produktiven Rearrangements ausgeschlossen (n=3), sodass insgesamt eine Analyse von 16 gepaarten Patientenproben vorgenommen wurde. In den Primär- und Rezidivbiopsien wurden die Rearrangements, die Produktive Klonalität sowie der Anteil der 10 häufigsten Klone und die Pielou's Evenness analysiert.

Um unsere Ergebnisse zu ergänzen, wurden von allen Patientenpärchen, von denen Gewebeblöcke vorhanden waren (n=30), Schnitte angefertigt und mit Sirius Red gefärbt, welches eine Färbemethode für das Kollagen darstellt. Zwei der primären Biopsien konnten nicht gefärbt werden, sodass 28 Patientenpärchen mithilfe von Definiens TissueStudio 64 auf ihren Kollagengehalt untersucht werden konnten.

Außerdem wurden in einer vorangegangenen Arbeit von Schnitter et al. von 32 Pärchen der Kohorte IHC Färbung hergestellt und mithilfe von *High-power fields* untersucht. Ergänzend dazu wurden an 14 der Kieler Pärchen Genexpressionsanalysen vorgenommen (Schnitter et al., 2019). Die Zusammenfassung der gesamten Untersuchung der Pärchenkohorte wird in Tabelle 3 abgebildet.

4 Ergebnisse

4.1 Beschreibung der untersuchten Kohorte

Patient*innen

Die Kohorte aus 38 Patient*innen war selektiert und betrachtete Patient*innen mit einem aggressiven klassischen Hodgkin Lymphom (Al-Zoughbi et al.), welches bei den Patient*innen rezidierte. Von den Patient*innen waren 9 weiblich (23,7%) und 29 männlich (76,3%). Dies entsprach einer Geschlechterverteilung männlich zu weiblich von 3,2:1. Das Alter bei Erstdiagnose der Erkrankung war in unserer Kohorte zweigipflig verteilt, mit einem vermehrten Erkrankungsalter bei Erstdiagnose zwischen 20 bis 29 Jahren und einem weiteren Anstieg bei Patient*innen, die älter als 55 Jahren waren. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 34,8 Jahre mit einer Standardabweichung von 19,14 Jahren. Die weiblichen Erkrankten waren bei ihrer Erstdiagnose mit 32,7 Jahren ein wenig jünger als die männlichen Erkrankten mit 35,5 Jahren. 18,4% (n=7) Patient*innen waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose jünger als 18 Jahre und 44,7% (n=17) waren junge Erwachsene zwischen 19 und 35 Jahren.

Die Dauer zwischen der Erstdiagnose und dem Rezidiv zeigte eine große Varianz. Im Durchschnitt war sie 1131,6 Tage, was circa 3 Jahren entspricht. Die Standardabweichung betrug 877,0 Tagen also circa 2,4 Jahre. Die neun weiblichen Patientinnen unserer Kohorte hatten mit einem Intervall von 671 Tagen (2 Jahren) eine kürzere Zeit bis zu ihrem Rezidiv als die 29 männlichen mit 1274,6 Tagen (3,5 Jahren). Dieser Unterschied war mit einem p-Wert von 0,0676 nicht ganz signifikant.

Insgesamt hatten fünf von 38 Patient*innen ein Frührezidiv (13,2%). So werden Rezidive benannt, welche zwischen 3 Monaten und bis zu einem Jahr nach Therapie auftreten. Dies betraf zwei der neun Frauen (22%) und drei der 29 Männer (10,3%). Die restlichen 86,8% der Patient*innen erlitten ein Spätrezidiv, welches mehr als 12 Monate nach Therapie eintrat. Da nur von wenigen Patient*innen Informationen über die Therapie vorliegen, muss man davon ausgehen, dass die untersuchten Fälle nach deutschen Leitlinien behandelt wurden. So wurden sie, da sie vor der Zeit der Immuncheckpointinhibitoren erkrankten, vermutlich mit einer alters- und stadiengerechten Therapie aus Chemo- und In-Field Radiotherapie behandelt.

Die Angaben beziehen sich auf die gesamte Kohorte (n=38), wobei für acht der Patient*innen nicht für alle Untersuchungen das Gewebe vorlag (restliche Untersuchungen n=30). Unter den acht Patient*innen waren eine weibliche Patientin und sieben männliche Patienten. Der Altersdurchschnitt lag bei diesen Patient*innen (n=8) mit 42,9 Jahren höher als der der gesamten Kohorte, jedoch befanden sich unter ihnen drei von den sieben Untersuchten unter 18-jährigen. Der Rest (n=5) der Patient*innen war älter als 35 Jahre. Bei diesen acht war die Zeit zwischen primärem Lymphom und Rezidiv mit 942,3 Tagen im Durchschnitt geringer (vgl. n=38=1131,6 Tage). Die klinischen Charakteristika jedes einzelnen Patient*innen werden in der Tabelle 6 zusammengetragen. Es lagen keine Informationen zu vorherigen Krebserkrankungen, der genauen Therapieform, des klinischen Stagings, des EBV Status oder der Überlebenszeit vor.

Tabelle 6: Demographie des in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektivs

Patient*in	Stadt	Eingangsjahr		Geschlecht	Alter bei ED	Zeit zw. P+R	Gewebe		Histologie	
		Prim.	Rez.				[J]	[T]	Primär	Rezidiv
1	Kiel	2003	2010	m	20	2504	LK zerv.	LK	mixed	mixed
2	Kiel	2006	2010	w	74	1344	LK	LK zerv.	mixed	mixed
3	Kiel	2002	2007	m	33	1644	LK abd.	LK	mixed	mixed
4	Kiel	2006	2007	m	22	356	LK	LK zerv.	nod. skl.	nod. skl.
5	Kiel	2004	2005	m	16	365	LK zerv.	med.	mixed	NOS
6	Kiel	2004	2005	m	28	503	LK zerv.	LK	nod. skl.	nod. skl.
7	Kiel	2004	2006	w	64	495	LK zerv.	LK	nod. skl.	nod. skl.
8	Kiel	2003	2006	m	28	1144	LK zerv.	LK pelv.	mixed	NOS
9	Kiel	2001	2003	w	27	602	LK	LK pulm.	nod. skl.	nod. skl.
10	Kiel	2003	2004	m	21	459	LK zerv.	LK abd.	nod. skl.	nod. skl.
11	Kiel	1994	2000	m	26	2284	LK	paravert.	mixed	NOS
12	Kiel	1995	1999	m	41	1637	LK zerv.	LK ax	nod. skl.	nod. skl.
13	Kiel	1998	2000	m	12	884	LK zerv.	LK ax.	mixed	NOS
14	Kiel	2006	2014	m	28	2993	LK ax.	LK abd.	NOS	nod. skl.
15	Kiel	2002	2009	m	20	2598	LK zerv.	LK abd.	nod. skl.	Lym. reich
16	Kiel	2007	2009	w	16	643	LK zerv.	LK ax.	nod. skl.	nod. skl.
17	Kiel	1992	1998	m	37	2037	LK	lymp Gew	mixed	Mixed
18	Lüb	2002	2006	m	40	1550	Lunge	Milz	nod. skl.	nod. skl.
19	Lüb	2000	2008	m	56	3045	LK zerv.	LK abd.	nod. skl.	Mixed
20	Lüb	2000	2006	m	36	1982	LK zerv.	LK zerv.	mixed	Mixed

21	Lüb	2004	2005	m	68	482	-	-	nod. skl.	nod. skl.
22	Lüb	2002	2004	m	21	445	LK zerv.	LK zerv.	nod. skl.	nod. skl.
23	Lüb	1997	2000	m	24	1057	LK zerv.	LK zerv.	mixed	Mixed
24	Lüb	2007	2009	m	27	915	LK	LK zerv.	nod. skl.	nod. skl.
25	Tüb	2011	2012	w	15	424	LK	LK	nod. skl.	nod. skl.
26	Tüb	2010	2012	m	46	597	Milz	LK	NOS	nod. skl.
27	Fra	2006	2008	m	56	597	LK zerv.	LK ax.	nod. skl.	Lym. arm
28	Fra	2006	2015	m	72	3198	LK zerv.	LK pelv.	mixed	Mixed
29	Fra	2012	2013	m	59	546	LK zerv.	LK zerv.	mixed	Mixed
30	Fra	2011	2014	m	12	1278	LK zerv.	LK	mixed	Mixed
31	Fra	2012	2013	m	15	534	LK zerv.	LK	nod. skl.	nod. skl.
32	Fra	2014	2015	m	68	364	LK ax.	LK zerv.	NOS	nod. skl.
33	Stu	2014	2014	m	27	316	LK med.	St. LK abd.	nod. skl.	NOS
34	Stu	2007	2011	w	23	1161	St. LK med	St. Pleu. par	NOS	Lym. arm
35	Stu	2016	2017	w	29	294	LK zerv.	LK zerv.	nod. skl.	nod. skl.
36	Stu	2015	2017	m	71	648	LK zerv.	LK zerv.	mixed	Mixed
37	Stu	2013	2014	w	30	239	LK zerv.	LK	nod. skl.	nod. skl.
38	Stu	2014	2017	w	16	837	St. pulm.	Lunge	NOS	NOS

Die Patient*innen aus Frankfurt und Tübingen wurden nur auf den CD3 Anteil untersucht.
abd.= abdominell; ax.= axillär; ED= Erstdiagnose; Fra= Frankfurt; Gew.= Gewebe; J= Jahre; LK= Lymphknoten; Lüb= Lübeck; lym./lymp.= Lymphozyten/lymphatisch; m= männlich; med.= mediastinal; *mixed* = Mischtyp; nod. skl.= nodulär sklerosierter Typ; NOS= nicht anders spezifiziert; paravert.= paravertebral; par.= parietal; pelv.= pelvin; Pleu.= Pleura; P/Prim.= Primäres Lymphom; pulm.= pulmonal; R/Rez.= Rezidiv; St.= Stanze; Stu= Stuttgart; T= Tage; Tüb= Tübingen, w= weiblich; zerv.= zervikal

Gewebe und histopathologische Diagnosen

Die Gewebeproben stammten zum größten Teil (n=67) aus Lymphknotengewebe. Nur sieben Proben wurden aus extranodalem Gewebe entnommen. Vier stammten aus pulmonalem Gewebe, zwei aus der Milz und eins war paravertebraler Herkunft. Bei dem Patienten 21 sind die Lokalisationen der Gewebsentnahme unbekannt. Die meisten Gewebe stellten ganze Lymphknoten oder operative Resektate von Lunge, Milz oder paravertebralem Gewebe dar. Drei der ausgewerteten Gewebe waren Stanzbiopsate.

Die Verteilung der histologischen Subtypen in der vorliegenden Arbeit kann aus Abbildung 4 entnommen werden.

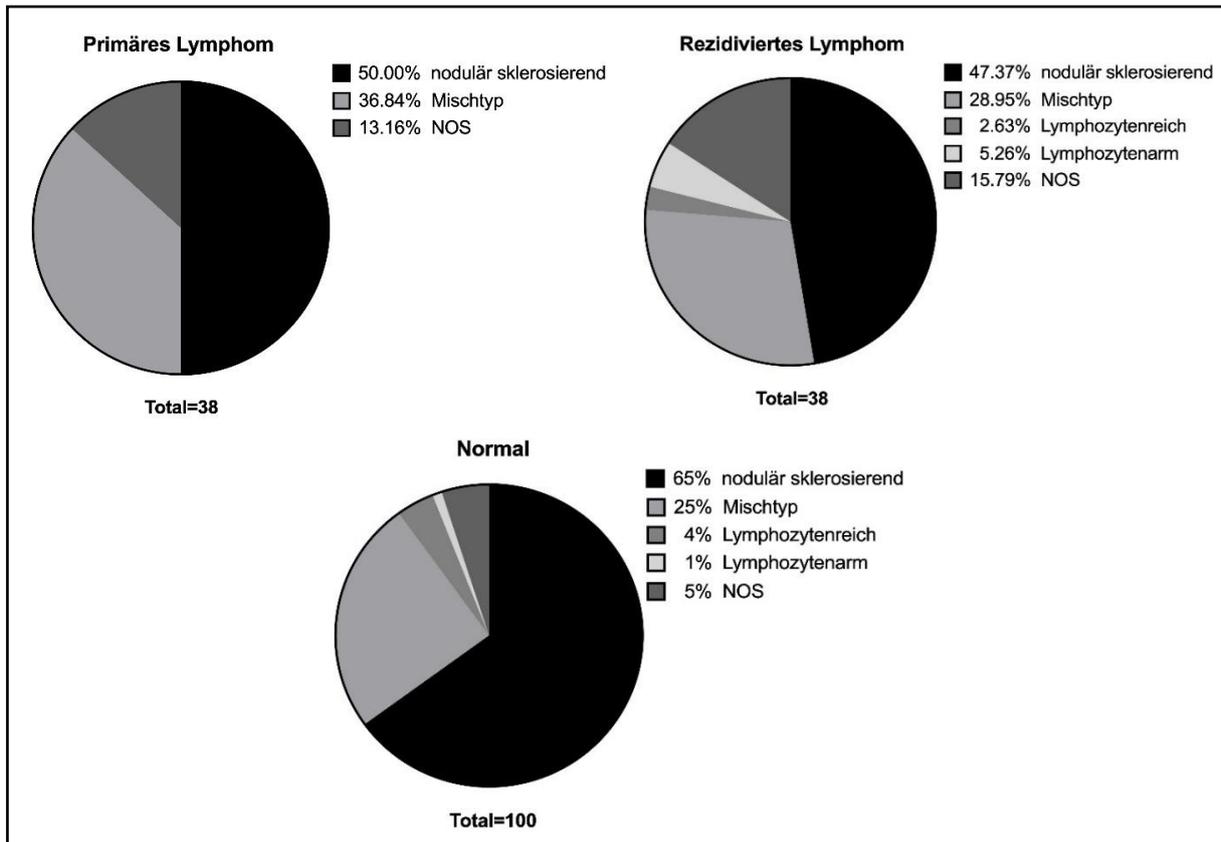


Abbildung 4: Kreisdiagramme der histologischen Verteilung der cHLs in dieser Kohorte

Zum Vergleich die durch die German Hodgkin Study Group (GHSg) ermittelte Verteilung (GHSg Verteilung= normal) (German-Hodgkin-Study-Group, 2020)

Bei der Betrachtung der histologischen Verteilung im Vergleich mit der durch die German Hodgkin Study Group ermittelten normalen Verteilung von Alter, Geschlecht und histologischen Typen muss berücksichtigt werden, dass es sich bei den 38 Patientenfällen um eine Selektion aggressiver Hodgkin Lymphome handelte, da alle Patient*innen Rezidive aufwiesen. Zwischen den beiden Geschlechtern und in der Altersverteilung wurden keine Unterschiede in der Verteilung der histologischen Typen gefunden. Im Rezidiv unterschieden sich 12 Fälle (31,6%; n=38) im histologischen Typ von ihrem primären Lymphom. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die untersuchenden Patholog*innen, die die histologische Diagnose des Rezidivs gestellt haben, nicht für die primären Diagnosen verblindet waren. Die acht Patient*innen, die nur auf CD3 pos. T-Zellen untersucht wurden und für Untersuchungen mit anderen Färbungen aus der gesamten Kohorte (n=38) herausgenommen wurden, hatten die gleiche histologische Verteilung wie die Gesamtkohorte.

Die Zeit zwischen dem primären Lymphom und seinem Rezidiv schien in unserer Kohorte von seinem histologischen Typ abzuhängen. Ist die primäre Diagnose ein nodulär sklerosierender Typ, so kommt es bei unseren untersuchten Patient*innen mit durchschnittlichen 849,16 Tagen (SD=820,28 Tage) zwischen Erstdiagnose und Rezidiv zu einem früheren Rezidiv als beim Mischtyp mit 1493,93 Tagen (SD=793,98 Tage) (t-Test, $p=0.0301$). Die cHL vom NOS Typ rezidivieren zu jeder Zeit.

Ganzschnittuntersuchung mithilfe von Definiens TissueStudio 64

Durch die Ganzschnittanalyse wurden im Schnitt $156,55 \text{ mm}^2$ (SD=100,66 mm^2) eines Lymphknotens bzw. einer Stanze (n=4) analysiert (ohne Stenzen n=4 MW=165,5 mm^2 ; SD=97,18 mm^2). In diesem Bereich wurden durchschnittlich 1,45 Millionen (SD=1,1 Millionen) Zellkerne erkannt, anhand derer die Kern-, Zell- oder Flächenberechnung vorgenommen wurde.

Bei den Schnitten für CD3, CD20, CD30, CD68, CD8, FoxP3 und SiriusRed handelt es sich um Folgeschnitte. Die Anzahl der gezählten Zellkerne pro Schnitt zeigt in der Korrelation nach Pearson Werte zwischen $r=0,771$ (CD8/CD20 Rezidiv) und $r=0,961$ (CD3/CD68 primäres Lymphom). Dabei muss berücksichtigt werden, dass durch Färbe- oder Gewebeartefakte unterschiedlich viele Bereiche des Gewebes von der Berechnung ausgeschlossen werden mussten.

Auswahl der Berechnungsart

Die Schnitte mit der Färbung für CD3 wurden zunächst mit der Zell-Berechnung und dann mit der Kern-Berechnung, welche unterschiedlich die immunhistochemisch gefärbten Strukturen detektieren, bearbeitet. Trotz der unterschiedlichen Berechnungsmethoden korrelieren die einzelnen Ergebnisse mit $r=0,912$ und die Differenzen von Rezidiv zum primären Lymphom mit $r=0,936$. Die Zell-Berechnungen für die CD20 gefärbten Schnitte wurden mit anderen Einstellungen wiederholt. Dabei zeigen die einzelnen Ergebnisse mit $r=0,953$ und die Differenz zwischen Rezidiv und primärem Lymphom der beiden Berechnungen mit $r=0,970$ eine hohe Korrelation. Dies lässt auf eine Unabhängigkeit der digitalen Analyse von der manuellen Einstellung schließen.

4.2 Anteile der untersuchten Zellpopulationen

Aus den Ergebnissen, die mithilfe von Definiens TissueStudio 64 generiert wurden, wurden Kreisdiagramme erstellt. Diese zeigten die unterschiedlichen Anteile von T-Zellen (CD3), B-Zellen (CD20), HRS-Zellen (CD30), Makrophagen (CD68) und restlichen Zellen, die nicht durch unsere Färbungen erfasst worden sind. Dabei wurden die Anteile der B-Zellen aus der Zellkernberechnung, die der T-Zellen durch die Zellberechnung und die der von der Flächenberechnung in eine Zellkernberechnung umgewandelten Anteile der HRS-Zellen und Makrophagen verwendet. Die Werte der Flächenberechnung (ursprüngliche Berechnung mittels Definiens TissueStudio 64) korrelierten stark mit den Werten, die durch Division der detektierten Fläche durch eine durchschnittliche HRS-Zelle ($r=0,901$ primäres Lymphom, $r=0,969$ Rezidiv) oder Makrophage ($r=0,949$ primäres Lymphom, $r=0,966$ Rezidiv) ermittelt und dessen Anteil an den gesamten Zellkernen bestimmt wurde. Wenn aus allen 4 Analysen die berechneten Anteile (in %) summiert werden, decken diese durchschnittlich 84,51% (SD=24,57%) des primären und 80,86% (SD=30,90%) des rezidierten Lymphoms ab. 11 von 60 Proben (18,3%) hatten eine Summe von über 100% mit Werten bis 148,2%. Die niedrigste Summe war 29,6%.

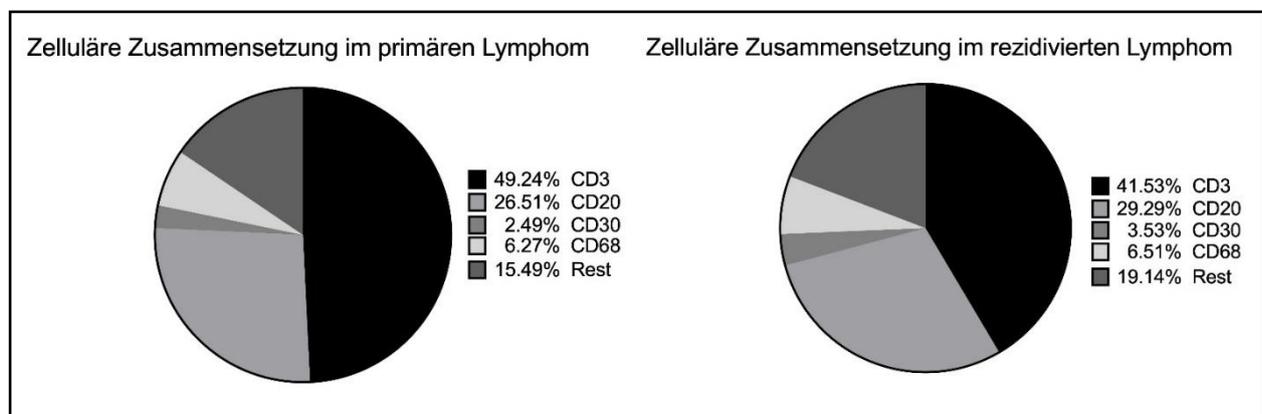


Abbildung 5: Die durchschnittliche zelluläre Zusammensetzung des Tumormikromilieus im primären und rezidierten Lymphom

4.3 Dynamik der Anteile vom primären Lymphom zu seinem Rezidiv

Mithilfe eines gepaarten t-Tests, der die Unterschiede zwischen abhängigen Proben untersucht, wurde die Dynamik der Anteile der CD3 pos. T-Zellen, der CD20 pos. B-Zellen, der CD30 pos. HRS-Zellen und der CD68 pos. Makrophagen zwischen primärem Lymphom und Rezidiv auf ihre Signifikanz geprüft. Dabei stellten sich keine signifikanten

Veränderungen im Anteil der B-Zellen, der Tumorzellen und der Makrophagen heraus. Die Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte können aus der Tabelle 7 entnommen werden. Die CD3 pos. T-Zellpopulation zeigte eine signifikante Abnahme im Rezidiv mit durchschnittlich 49,25% in der primären und 41,52% in der rezidierten Biopsie. Der p-Wert lag bei 0,0054% und die Standardabweichung bei 11,28% bzw. 14,35%. Auf der folgenden Seite werden in Abbildung 6 die Zu- und Abnahmen von B- und T-Zellen sowie HRS-Zellen und Makrophagen in vier Graphiken dargestellt.

Tabelle 7: Statistische Auswertung der Unterschiede in den verschiedenen Anteilen des Tumormikromilieus zwischen der Primär- und der Rezidivbiopsie

Färbung	Zellpopulation	N	Mittelwert (%)		Standardabweichung (%)		p-Wert
			Prim.	Rez.	Prim.	Rez.	
CD3	T-Zelle	38	49,25	41,52	11,28	14,35	0,0054
CD20	B-Zelle	30	26,51	29,29	16,81	18,90	0,5335
CD30	Tumorzelle (HRS)	30	2,49	3,53	3,64	6,28	0,1838
CD68	Makrophage	30	6,27	6,51	6,80	6,89	0,8606

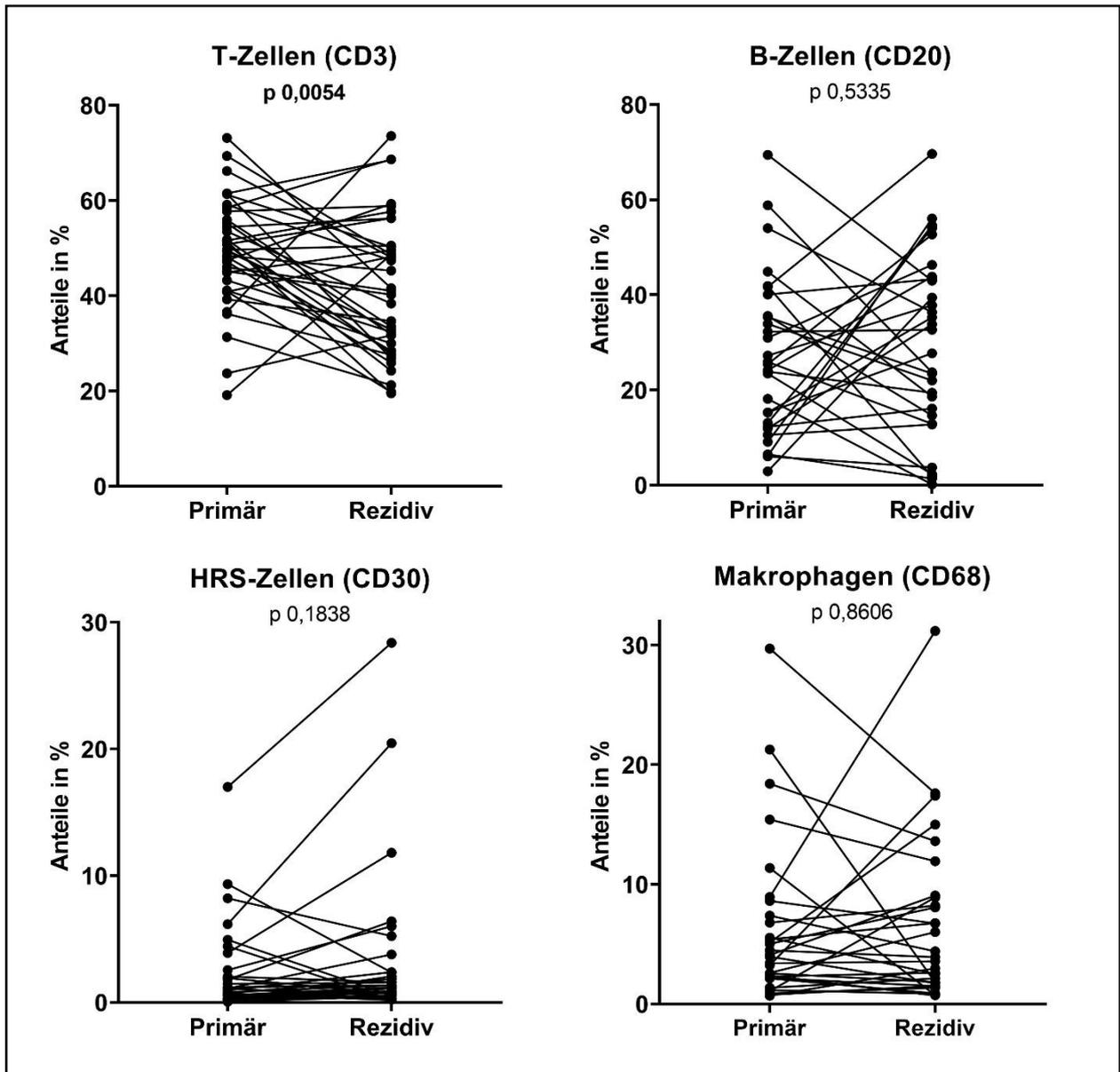


Abbildung 6: Die Dynamiken der Anteile von der Primär- zur Rezidivbiopsie der CD3, CD20, CD30 und CD68 Färbungen

Die Punkte bzw. Punktverbindungen stellen ein Patientenpärchen dar. Dabei werden in den unterschiedlichen Abbildungen die Veränderungen der unterschiedlichen Anteile von Zellpopulationen im Tumormikromilieu betrachtet.

4.4 Kollagenanteil und Berechnung der Zellularität

Durchschnittlich wurden im primären Lymphom 15,49% und im Rezidiv 19,14% der Zellen im untersuchten Gewebe nicht durch die ausgewählten Färbungen detektiert. Um herauszufinden, ob es sich bei diesen nicht detektierten Zellen um Fibroblasten, andere Gewebszellen oder Kollagen handelt, wurden 28 Proben auf SiriusRed gefärbt und berechnet. Dabei zeigte sich, dass im primären durchschnittlich 19,71% und im rezidierten Biopsat 18,88% der Fläche IHC pos. darstellten.

Außerdem wurde untersucht, ob es einen Unterschied in der Zellularität, also den detektierten Zellkernen/mm² zwischen primärem Lymphom und Rezidiv gibt. Dafür wurden zunächst die Zellularitäten in den unterschiedlichen Färbungen miteinander korreliert. Es zeigte sich Werte zwischen $r=0,321$ (CD20/CD3 Rezidiv) und $r=0,910$ (CD3/CD8 Primäres Lymphom).

Insgesamt zeigten der Anteil des Kollagens (SiriusRed Färbung, p -Wert=0,7710) (siehe Abbildung 7) und die Zellularität (p -Wert=0,2858) zwischen primärem Lymphom und Rezidiv keine signifikanten Veränderungen.

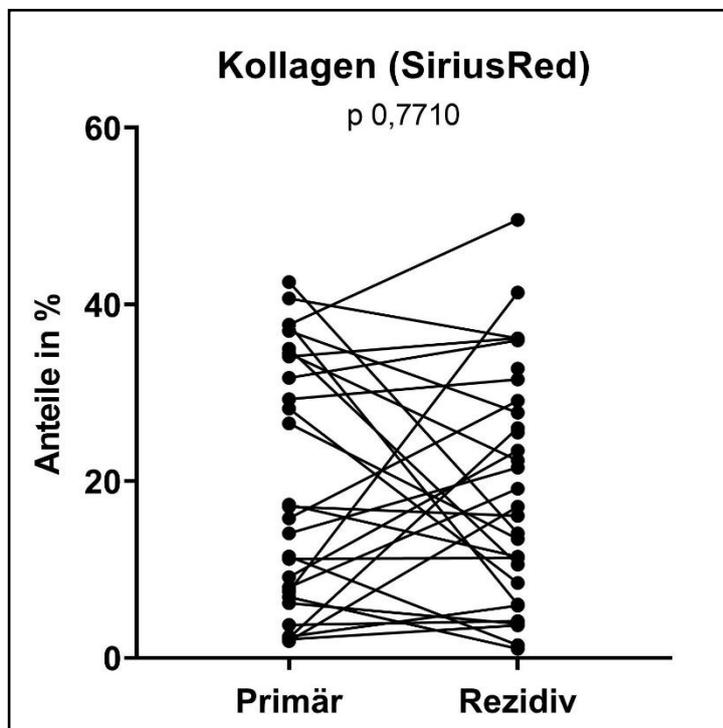


Abbildung 7: Kollagenanteil im Vergleich vom Primär- zum Rezidivbiopsat

Die Punktverbindung beschreibt die Veränderung des Anteils des Kollagens vom Primärtumor zu seinem Rezidiv eines Patienten*in.

4.5 Subpopulationen der T-Zellen

Um die Subpopulation der T-Zellen näher zu untersuchen, wurden 30 Patientenfälle mit immunhistochemischen Färbungen für CD8, welches ein membranständiges Protein auf zytotoxischen Zellen ist und für den zytoplasmatisch gelegenen Transkriptionsfaktor FoxP3, der in regulatorischen Zellen zu finden ist, gefärbt. Insgesamt repräsentieren die untersuchten Populationen circa die Hälfte der CD3 pos. Zellen, also aller T-Zellen (Prim.=56,01%; Rez.=58,62%). In einem gepaarten t-Test wurden die Veränderung der Anteile analysiert. Für die CD8 pos. Subpopulation wurde mit einem p-Wert von 0,1864 keine Veränderung festgestellt. Auch die FoxP3 pos. Zellpopulation zeigte keine signifikante Dynamik zum Rezidiv (p-Wert=0,4044). Die signifikante abnehmende CD3 pos. Subpopulation konnte durch diese Färbungen nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 8: Statistische Auswertung der CD3 pos. Subpopulationen anhand eines gepaarten t-Tests als Anteile des gesamten TME

Färbung	Zellpopulation	n	Mittelwert (%)		Standardabweichung(%)		p-Wert
			Prim.	Rez.	Prim.	Rez.	
CD3 pos.	T-Zelle	38	49,25	41,52	11,28	14,35	0,0054
CD8 pos.	Zytotoxische T-Zelle	30	22,47	19,49	13,25	11,24	0,1864
FoxP3 pos.	Regulatorische T-Zelle	30	3,6	4,42	2,77	4,78	0,4044

Tabelle 9: Statistische Auswertung der CD3 pos. Subpopulationen anhand eines gepaarten t-Tests als Anteile der CD3 pos. T-Zellen

T-Zell Subpopulationen (als Anteil der CD3 pos. Fraktion)	n	Mittelwert (%)		Standardabweichung (%)		p-Wert
		Prim.	Rez.	Prim.	Rez.	
CD8 pos.	30	48,30	48,10	25,75	24,23	0,9660
FoxP3 pos.	30	7,72	10,52	5,49	8,70	0,1266
Rest (CD8 neg. FoxP3 neg.)	30	43,98	41,38	26,92	25,08	0,5929

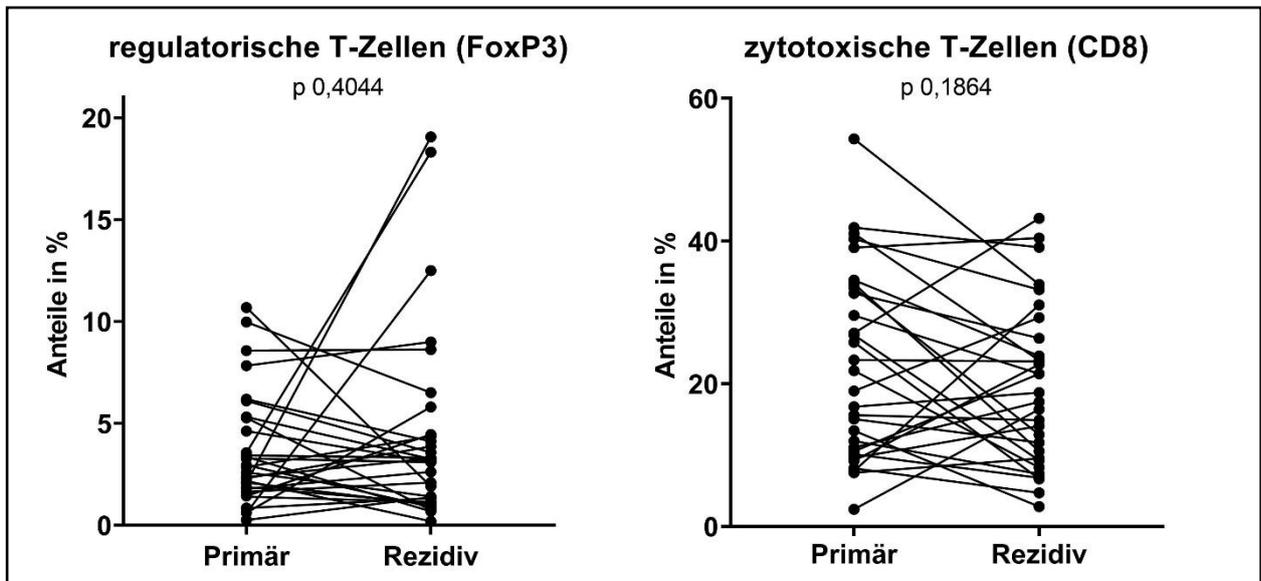


Abbildung 8: Die Dynamiken in den Anteilen der T-Zell-Subpopulationen vom Primären- zum Rezidivbiopsat

Die Punkte bzw. Punktverbindungen stellen ein Patientenpärchen dar. Dabei werden in den unterschiedlichen Abbildungen die Veränderungen der unterschiedlichen Anteile von Zellpopulationen im Tumormikromilieu betrachtet

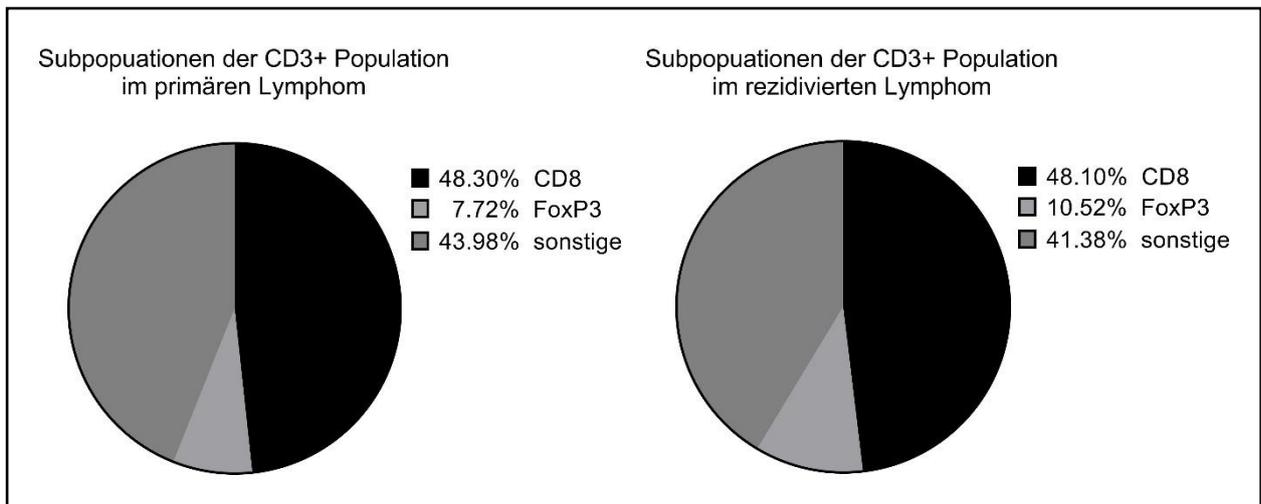


Abbildung 9: Kreisdiagramm der Zusammensetzung CD3 pos. T-Zell Subpopulationen im primären Lymphom und dem respektiven Rezidiv

In der Literatur wurden FoxP3 pos. T-Zellen mit CD8 pos. T-Zellen oder B-Zellen korreliert. Diese Ratio wies prognostische Bedeutung auf (Greaves et al., 2013, Devilard et al., 2002). In unserer Studie zeigte die Ratio FoxP3/CD68 Mittelwerte von 1,55 im primären und 1,82 im rezidierten Biopsat. Diese Veränderung war statistisch nicht signifikant (p-Wert=0,7115). Auch die Zunahme der Ratio CD8/FoxP3 von 11,38 auf 13,41 zeigte keine Signifikanz (p-Wert=0,1807).

4.6 T-Zell Rezeptor Untersuchungen

Um die T-Zellen besser zu charakterisieren, wurde von 19 Paaren ausreichend DNA aus dem FFPE-Gewebe isoliert und die T-Zell Rezeptoren (TZR) durch immuno-Seq™ von Adaptive biotechnologies charakterisiert. Aufgrund unzureichender DNA-Qualität waren in den DNA Proben von 3 Patient*innen zu wenig T-Zell Klone, das heißt weniger als 1000 produktive Rearrangements, sodass diese aus der weiteren Analyse ausgeschlossen worden sind. Aus den restlichen 16 Patientenfällen wurden 4 unterschiedliche Parameter erhoben: die Anzahl der Rearrangements, die Produktive Klonalität, der Anteil der 10 häufigsten Klone der TZR und die Pielou's Evenness (Äquität) (Kirsch et al., 2015). In gepaarten t-Tests wurden signifikante Veränderungen in der Produktiven Klonalität und der Pielou's Evenness der TZR gefunden. Die Produktive Klonalität ist dabei ein Index, der durch $1 - \text{Pielou's Evenness}$ definiert ist. Da die Pielou's Evenness von der Produktiven Klonalität abhängig ist, wurde nur sie zur Beschreibung der Verteilung der TZR weiter genutzt. In den 16 untersuchten Fällen nahm die Pielou's Evenness (0=völlig ungleiche Verteilung; 1=totale Gleichverteilung) zum Rezidiv signifikant ($p\text{-Wert}=0,0025$) ab. Dabei lagen die Mittelwerte bei 0,970 im primären Lymphom und 0,956 im Rezidiv. Das heißt, dass die TZR im Rezidiv weniger gleich verteilt waren. Die Anzahl der detektierten Rearrangements zeigte eine Tendenz zur Abnahme ($p\text{-Wert}=0,1224$). Der Anteil der 10 häufigsten Klone nahm mit Mittelwerten von 4,44% auf 5,66% mit einem $p\text{-Wert}$ von 0,0962 tendenziell zu.

Eine Zusammenfassung der Analyse und auch den Standardabweichungen wurden in der Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Statistische Auswertung der Veränderung der T-Zell-Rezeptorklonalität anhand eines gepaarten t-Test

TZR Untersuchung	n	Mittelwert		Standard-abweichung		p-Wert
		Prim.	Rez.	Prim.	Rez.	
Rearrangements	16	23306	15598	30708,9	17120,27	0,1224
10 häufigsten Klone	16	4,32	5,52	3,86	4,30	0,0962
Pielou's Evenness	16	0,967	0,949	0,033	0,039	0,0025

	Rearrangement Abnahme	Rearrangement Zunahme		Anteil 10 häufigste Klone Abnahme	Anteil 10 häufigste Klone Zunahme
CD3 Abnahme	7 (70%)	3 (30%)	CD3 Abnahme	8 (80%)	2 (20%)
CD3 Zunahme	3 (50%)	3 (50%)	CD3 Zunahme	3 (50%)	3 (50%)
	Pielou's Evenness Abnahme	Pielou's Evenness Zunahme			
CD3 Abnahme	8 (80%)	2 (20%)			
CD3 Zunahme	5 (83,3%)	1 (16,7%)			

Abbildung 10: Vierfeldertafeln zur Beschreibung der Veränderungen der TZR Klone in Abhängigkeit von der Dynamik der CD3 pos. Zellen

Da die untersuchte Grundgesamtheit klein war, wurde der Zusammenhang zwischen der Abnahme der CD3 pos. T-Zellen und Veränderungen in den T-Zell Rezeptoren in Vierfeldertafeln untersucht (Abbildung 10). Dabei zeigte sich die Tendenz, dass bei der Abnahme von CD3 pos. T-Zellen auch die Anzahl der Rearrangements abnahm (CD3 Abnahme: 7 von 10 Abnahme des Rearrangements) und der Anteil der 10 häufigsten Klone zunahm (CD3 Abnahme: 8 von 10 Zunahme des Anteils der 10 häufigsten Klone). Die Pielou's Evenness schien unabhängig von der Veränderung der CD3 pos. T-Zellen zu sein und nahm in 13 von allen 16 Patienten zu.

Um die Aussagen der TZR Analysen zu validieren und zu überprüfen, ob die Anzahl der Rearrangements ein Maß für den T-Zellanteil darstellt, wurden Korrelationen der unterschiedlichen Messwerte unabhängig von der Primär- oder Rezidivbiopsie vorgenommen. Dabei zeigte die Anzahl der Rearrangements keine Korrelation mit den T-Zell Anteilen ($r=0,104$), jedoch eine mittelstarke Korrelation mit der Pielou's Evenness ($r=-0,369$). Interessanterweise korrelierte das Jahr der Biopsientnahme mit der Anzahl der detektierten Rearrangements ($r=0,555$) (Abbildung 11).

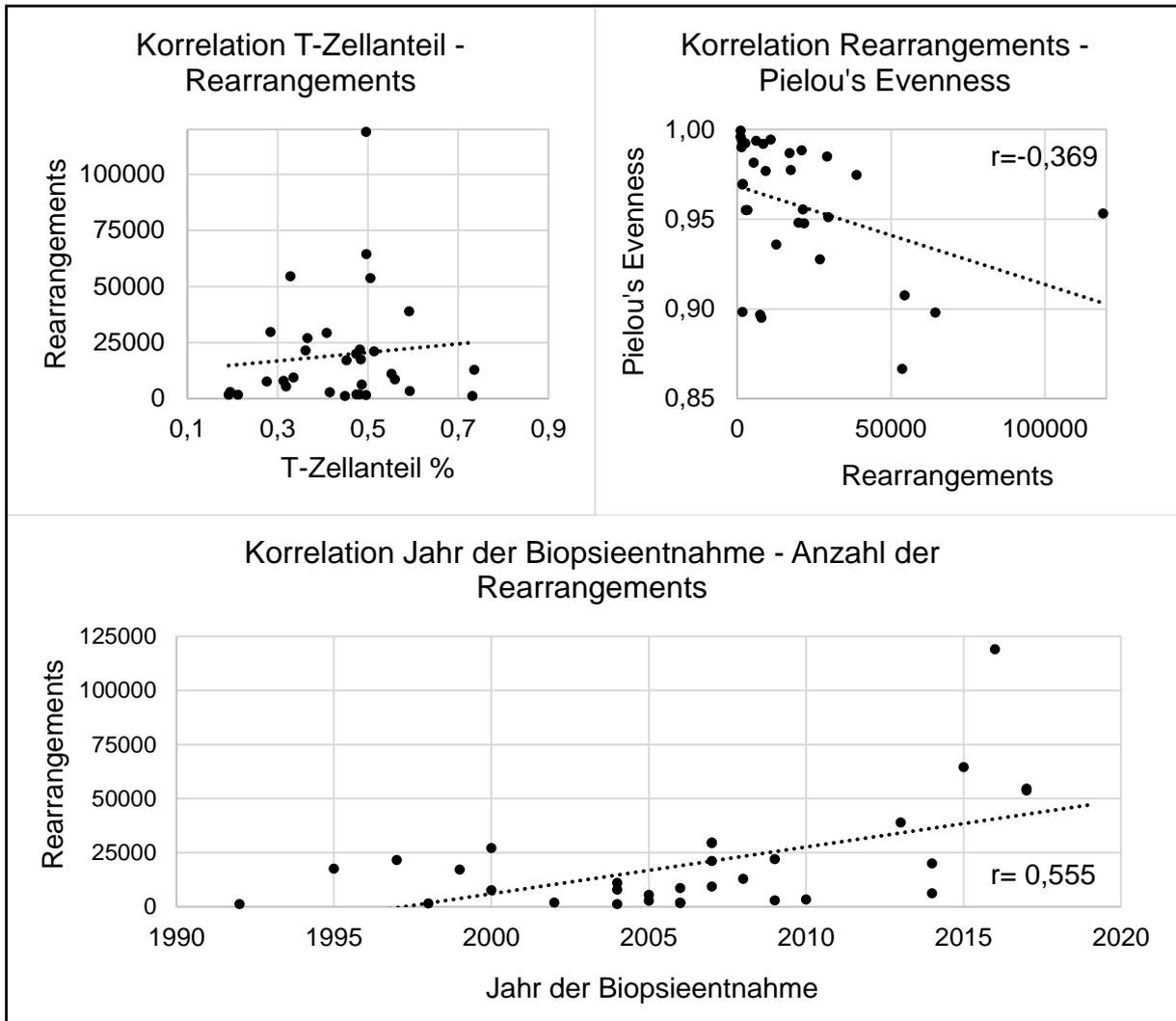


Abbildung 11: Korrelationen der Anzahl der Rearrangements unabhängig von der Primär- oder Rezidivbiopsie mit dem Anteil der T-Zellen, der Pielou's Evenness und dem Jahr der Biopsieentnahme.

Untersuchung zur Validität der Methodik

Die Abbildung 12 zeigt die Veränderungen der Diversität der TZR, also der Pielou's Evenness, in Abhängigkeit von der Zu- oder Abnahme der T-Zellen im Rezidiv. Die Korrelation der beiden Ratios aus Rezidiv/Primärem Tumor ergeben einen Zusammenhang von $r = 0,388$, was auf eine gleichzeitige Abnahme der Diversität bei Abnahme des T-Zellanteils hindeutet.

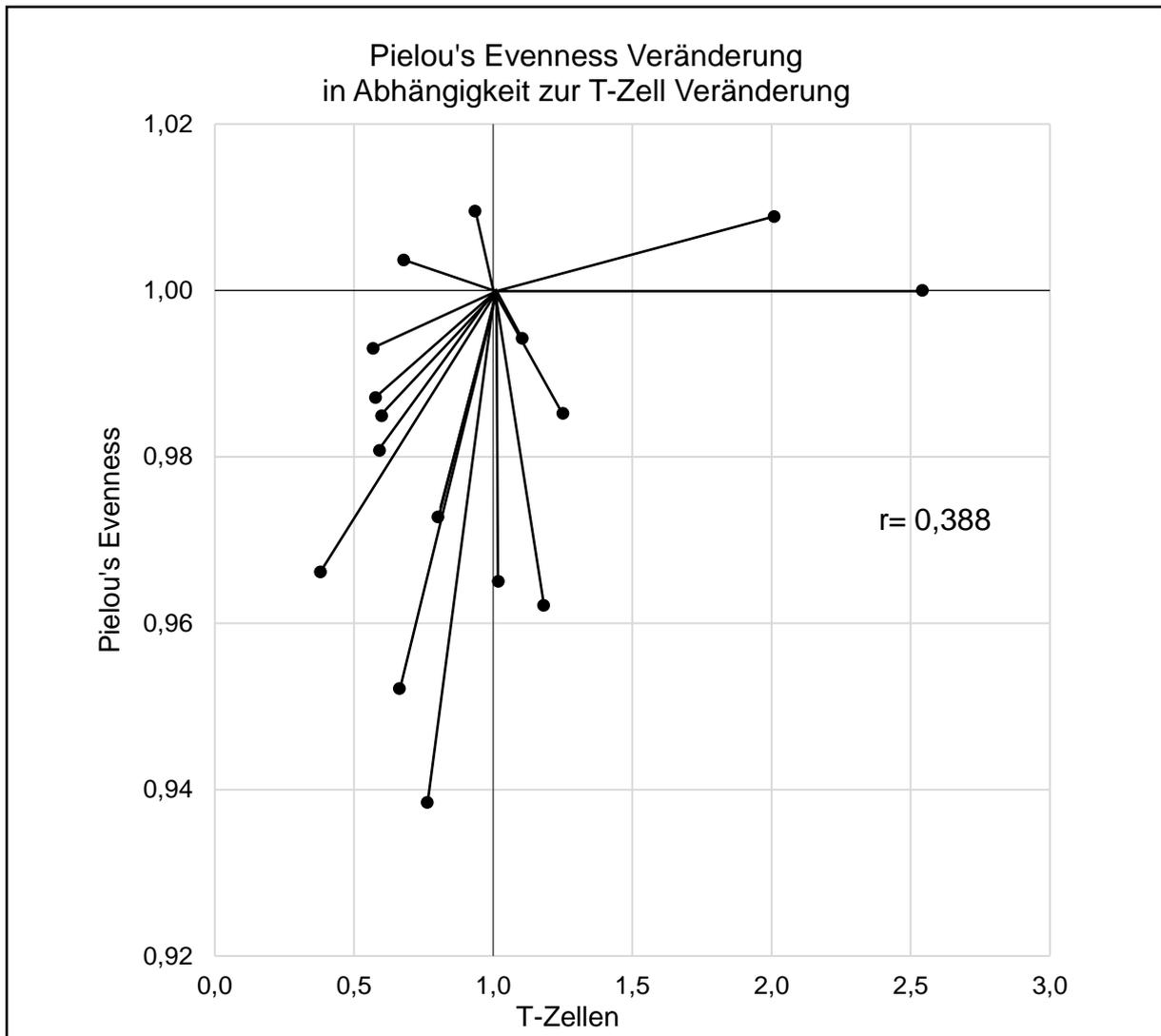


Abbildung 12: Veränderungen der Pielou's Evenness in Abhängigkeit von der T-Zellanteil Zu- oder abnahme im Rezidiv.

Veränderung als Ratio von Rezidiv/Primärtumor dargestellt

Um zu zeigen, dass die T-Zellen tumorspezifisch sind, wurden die 10 häufigsten Klone der Primäربيopsie darauf untersucht, wie sie sich im Rezidiv verhalten. Dabei wurde festgestellt, dass in 5 der 16 Proben die 10 häufigsten Klone des Primärtumors und des Rezidivs keinen gemeinsamen Klon zeigten. Die restlichen 11 Proben hatten mindestens 1 und maximal 6 Klone, die auch im Rezidiv unter den 10 häufigsten Klonen zu finden waren (Abbildung 13). Dabei nahm der Anteil der 10 häufigsten TZR Klone tendenziell ab. Die 10 häufigsten Klone stellten jedoch insgesamt einen geringen Anteil an allen analysierten TZR (Abbildung 14).

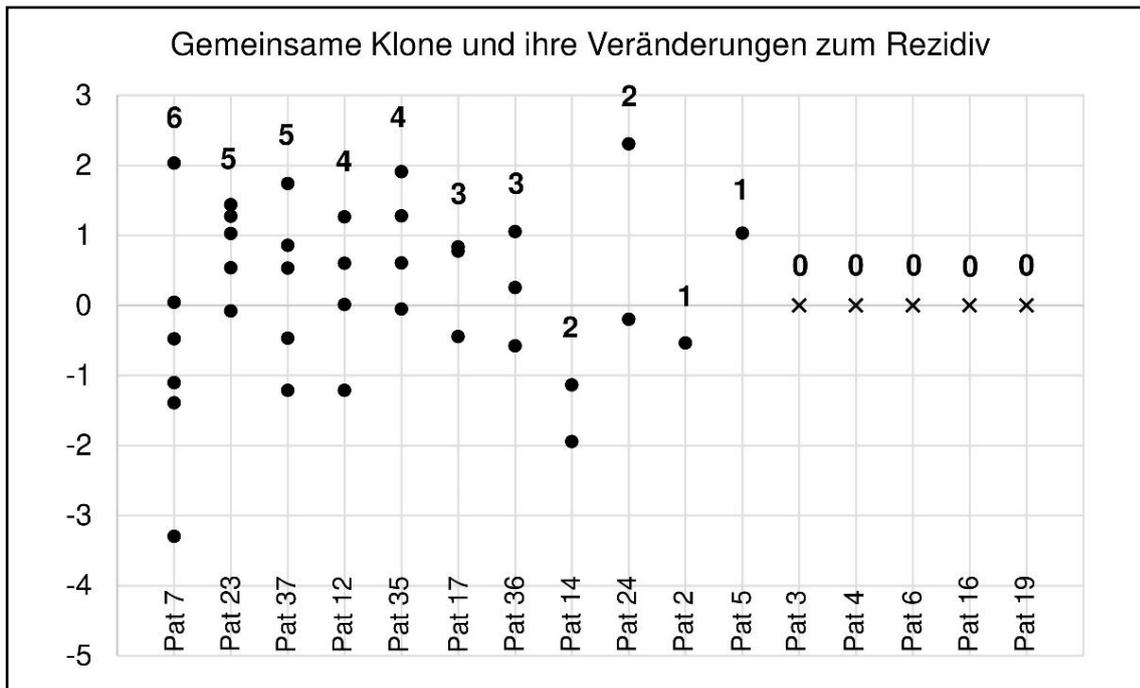


Abbildung 13: Logarithmische Darstellung der Veränderung der Anteile der gemeinsamen Klone (innerhalb der 10 häufigsten) von Rezidiv zu Primärtumor

Die Zahl beschreibt die Anzahl der gemeinsamen Klone. Die Punkte beschreiben die logarithmische Veränderung des Klonanteils zum Rezidiv.

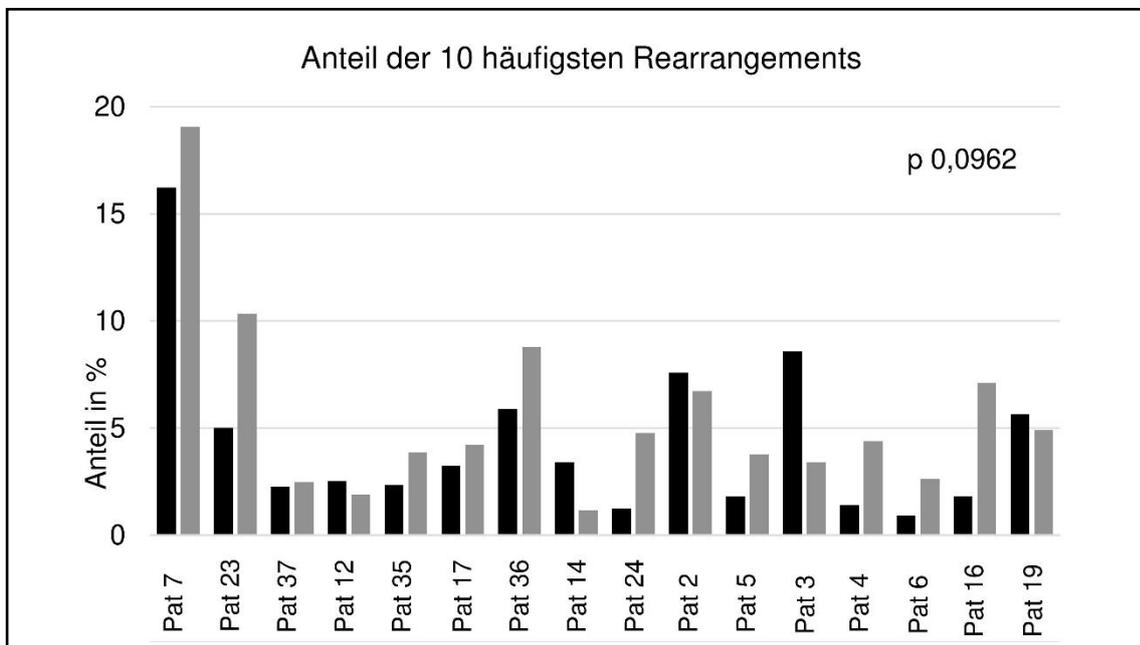


Abbildung 14: Anteile der 10 häufigsten Klone an allen detektierten Rearrangements einer Lymphknotenprobe

Zunahme des Anteils in allen Proben getestet mit einem gepaarten t-Test mit einem p-Wert= 0,0962. Geordnet sind die Patienten nach der Anzahl ihrer gemeinsamen Klone im Rezidiv (siehe Abbildung 13)

5 Diskussion

Kurze Einordnung dieser Arbeit

Das klassische Hodgkin Lymphom ist durch das überwiegende Tumormikromilieu gekennzeichnet. Die Tumorzelle ist dabei abhängig von Überlebenssignalen und Interaktionen mit den reaktiven Immunzellen, Fibroblasten und der extrazellulären Matrix. Das Mikromilieu dirigiert die HRS-Zelle durch Zytokine oder membranständige Liganden, die die antitumoralen Zellen direkt hemmen, oder durch Induktion bestimmter Phänotypen, z.B. der Th2-Zelle. Diese durch die Tumorzelle begonnene Aufgabe übernehmen die stimulierten Immunzellen und schützen sie vor Angriffen des antitumoralen Systems (Aldinucci et al., 2016). Auch wenn das Hodgkin Lymphom eine Heilungschance von über 80% hat, spielen durch das junge Alter der Erkrankten auch die Langzeitfolgen der Therapie eine Rolle (de Vries et al., 2018). Um die Therapie personalisiert und risikostratifiziert zu adaptieren, müssen prognostische Biomarker gefunden werden. Dabei spielen nicht nur Veränderungen der Tumorzelle, sondern auch Veränderungen im TME eine Rolle. Aggressive Entitäten und damit verbundene Veränderungen im TME sollen durch Routinediagnostik detektierbar werden, um Patient*innen danach risikoadaptiert zu therapieren und ein Rezidiv zu verhindern. In der Literatur werden verschiedene Verhältnisse unterschiedlicher Komponenten des TME oder hohe Anteile einer bestimmten Zell-Population mit einer schlechten Prognose korreliert. Doch diese Zusammenhänge werden kontrovers diskutiert, da die Studien aufgrund verschiedener Kohortenzusammensetzungen und unterschiedlicher Methoden das TME zu analysieren Aussagen widerlegen oder nicht reproduzieren können (Cirillo et al., 2019).

Digitale Ganzschnittanalysen untersuchen 1,45 Millionen Zellen pro Schnitt

Die in dieser Studie genutzten Ganzschnittanalysen sind ein neuer Ansatz bei der Identifizierung von histologischen Biomarkern, die auch in der Routine genutzt werden können. Um die Komposition des gesamten TME im Lymphknoten zu erfassen, wurden nach heutigem Kenntnisstand bis jetzt nur Genexpressionsanalysen genutzt (Sanchez-Aguilera et al., 2006, Chetaille et al., 2009, Devilard et al., 2002, Scott et al., 2013, Steidl et al., 2010).

Die Kohorte aus 38 (für CD3 Färbung) bzw. 30 Patient*innen bestand aus aggressiven Typen des klassischen Hodgkin Lymphoms, die rezidierten und war somit selektiert. Sie repräsentierte mit den histologischen Typen, der Altersverteilung, dem zweigipfligen Auftreten und der Geschlechterverteilung die Population der in Deutschland an einem Hodgkin Lymphom Erkrankten (Robert-Koch-Institut, 2019). Durch das bereits seltene Auftreten eines klassischen Hodgkin Lymphoms und das gute Therapieansprechen sind Rezidive nicht häufig. Die Anzahl von 38 Patient*innen stellt dabei eine gute repräsentative Kohorte dar.

Die Auswahl des mithilfe von Definiens TissueStudio 64 zu analysierenden Gewebes wurde durch den Anwender getroffen. Bei den manuellen Parametern zur Zellkerndetektion, wie die Größe eines durchschnittlichen Zellkerns und der Grenzwerte für die Hämalaun Färbung nach Mayer sowie die IHC Färbung, wurde sich zur internen Vergleichbarkeit an Arbeiten orientiert, die zuvor im Pathologischen Institut, UKSH, Campus Kiel, Sektion Hämatopathologie durchgeführt wurden (Jachimowicz et al., 2020). Bei der Zell-, Zellkern- oder Flächenberechnung wurde ein Wert gewählt, der eine gute Diskriminierung von zu detektierenden hellen IHC Färbungen und nicht zu detektierenden dunklen HE Färbungen bzw. Hintergrundfärbung ermöglichte. Der Fehler, der durch eine manuelle Auswahl des zu analysierenden Gewebes und die manuelle Einstellung eines IHC Grenzwertes entstehen, sind gering, da alle Untersuchungen von einer einzigen, verblindeten Untersucherin durchgeführt wurden und somit in ihrer Aussage vergleichbar sind. Die moderne Software und die Analyse von durchschnittlich 1,45 Millionen Zellen minimieren den Fehler zusätzlich. Zudem spricht die gute Korrelation der wiederholten CD3 und CD20 Färbungen für eine geringe Abhängigkeit des Programms vom Untersucher*in.

T-Zellen stellen den größten Anteil im TME des rezidierten cHL

Die Literatur beschreibt, dass der größte Anteil am TME im klassischen Hodgkin Lymphom die T- und B-Zellpopulation darstellt. Der Anteil der CD3 pos. T-Zellen lag in unserer Untersuchung bei knapp der Hälfte und bestätigt somit die Ergebnisse der Literatur (Cader et al., 2018, Steidl et al., 2011).

Die mit dem B-Zell Marker CD20 angefärbten B-Zellen waren mit einem Drittel der Zellen die zweitgrößte Population. Ihre Aufgabe im Tumormikromilieu ist noch unklar. Es wird

hinterfragt, ob die B-Zellen, als größte Fraktion in einem physiologischen Lymphknoten, die Relikte dieser im erkrankten Gewebe darstellen oder, wie die anderen Zellen des TME, durch die Tumorzelle angelockt werden (Steidl et al., 2011). Ob eine große Population das Zeichen einer milderen Hodgkin Erkrankung ist, die die physiologische Struktur eines Lymphknotens nicht so stark verdrängt hat, ist nicht verstanden. Insgesamt scheinen ein hoher Anteil von B-Zellen im Lymphknoten und erhaltene B-Zell-reiche Follikel prognostisch günstig zu sein (Panico et al., 2015, Greaves et al., 2013, Jachimowicz et al., 2020). In einer vorangegangenen Untersuchung der Anteile von B-Zellen bei fortgeschrittenen klassischen Hodgkin Lymphomen mithilfe von WSI zeigte sich ein prognostischer Grenzwert bei einem Anteil von 21%. Patient*innen mit einem größeren Anteil als 21% B-Zellen zeigten dabei eine bessere Prognose (Jachimowicz et al., 2020). Die vorliegende Kohorte liegt mit einem durchschnittlichen Wert von 26,51% im primären und 29,29% im rezidierten Biopsat über dem in der Studie festgelegten Grenzwert, das heißt im Bereich der risikoärmeren Patient*innen. Dieses Ergebnis könnte durch die Patientenzahl (n=30) und durch die teilweise alte rote IHC Färbung, die den Hintergrund mitanfärbt, erklärt werden. Der Anteil der Hodgkin-Reed-Sternberg liegt bei ungefähr 3% und deckt sich mit der Studienlage, die einen sehr geringen Tumorzellgehalt im erkrankten Gewebe festgestellt hat. Die Anteile der HRS-Zellen haben in Studien bis heute keine prognostische Bedeutung gezeigt und zeigten auch in dieser Arbeit keine Dynamik (Steidl et al., 2011).

Der Anteil der Makrophagen zeigt keine Veränderung

Für die Detektion von Makrophagen wurde wie in der Routine das zytoplasmatische Glykoprotein CD68, welches sich in der Membran der Lysosomen der monozytären Reihe befindet, als Antigen für die immunhistochemische Färbung genutzt.

Die ermittelte CD68 pos. Fläche wurde wie die CD30 pos. Fläche in eine Zellzahl umgewandelt und auf die detektierten Zellkerne bezogen. Der Anteil der Makrophagen lag in der angepassten Einheit bei 6,27% und 6,51% (vor der Anpassung als Flächenanteil Prim.=7,69% Rez.=8,47%). In der Studie von Steidl et al. zu tumorassoziierten CD68 pos. Makrophagen wurden in kleinen TMA nach dem Makrophagenanteil drei Risikogruppen gewählt, wobei viele Makrophagen mit einem kürzeren progressionsfreien und insgesamt Überleben korrelierten: 0-5%, 5-25% und >25% (Steidl et al., 2010). In der vorliegenden

Studie lag der Makrophagenanteil im primären wie auch im rezidierten Stadium bei 17 Patient*innen zwischen 0-5%, bei 12 zwischen 5-25%, bei einem/r Patient*in über 25%. Dass in dieser Kohorte über die Hälfte der Patient*innen einen Makrophagenanteil unter 5% hatten, kann durch die unterschiedlichen analysierten Gewebe erklärt werden. Durch TMA werden die Bereiche um Tumorzellen herum analysiert, während die WSI den ganzen Lymphknoten und auch sklerosierte Bereiche betrachtet. Liegen die Makrophagen eher tumorzellnah, verringert sich der Anteil bei der Betrachtung der gesamten Lymphknotenfläche im Gegensatz zu TMA. Makrophagen werden in der Forschung auch häufig mit dem membranständigen Marker CD163 angefärbt. Dieses Antigen ist ein Teil des Scavenger-Rezeptor Komplexes, welcher Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexe binden kann. Klein et al. zeigte, dass der Anteil der CD163 pos. im Gegensatz zu CD68 pos. Makrophagen prognostisch relevanter sei (Klein et al., 2014). CD163 wird dabei eher in Verbindung mit M2-Makrophagen gebracht, welche immunsuppressiv, angiogenetisch und tumorzellaktivierend wirken (Aldinucci et al., 2016). Bei anderen Studien, die die Aussage durch Steidl et al. reproduzierten, fiel auf, dass die meisten Arbeitsgruppen mit IHC gefärbten TMA arbeiteten und CD163, als M2 Makrophagenmarker, besser mit der Prognose korrelierte (Gotti et al., 2017, Klein et al., 2014, Guo et al., 2016, Panico et al., 2015, Scott und Steidl, 2014, Touati et al., 2015). In manchen anderen Arbeiten zeigte diese Aussage keine statistische Signifikanz (Azambuja et al., 2012, Sanchez-Espiridion et al., 2012). Diese gegensätzlichen Aussagen könnten durch die unterschiedlich genutzten Methoden entstanden sein. Die meisten Arbeiten wurden dabei mit Schätzung des Anteils durch mehrere Patholog*innen anhand von *High-power fields*, also kleinen Gewebeausschnitten vorgenommen. Dabei gab es zudem Unterschiede in den genutzten Zielstrukturen und Klonen der genutzten Antikörper. Eine Übersicht der unterschiedlichen Arbeiten bietet die Metaanalyse von Guo et al. (Guo et al., 2016).

In Anbetracht der Arbeiten, die in kleinen Gewebeanalysen einen hohen Anteil von Makrophagen mit einer schlechten Prognose assoziieren konnten, lässt sich mit unseren Ergebnissen vermuten, dass die Anzahl der Makrophagen in der Nähe der HRS-Zelle eine prognostische Rolle spielt.

T-Zellen nehmen zum Rezidiv ab

Mithilfe eines gepaarten t-Tests, welcher einen Unterschied zwischen abhängigen Proben untersucht, wurde die Dynamik der Anteile der T-Zellen, B-Zellen, HRS-Zellen und Makrophagen vom primären Lymphom zum Rezidiv ermittelt. Dabei sollte eine Dynamik, das heißt ein Pathomechanismus, eruiert werden, der die Entstehung eines Rezidivs begünstigen könnte. Zu dieser Fragestellung gibt es nach heutigem Kenntnisstand keine Literatur, mit der man die Ergebnisse vergleichen könnte.

In der statistischen Analyse zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Anteil der B-Zellen. Dieses Ergebnis passt zu der Diskussion, ob B-Zellen in das TME rekrutiert werden oder ein Relikt des physiologischen Lymphknotens darstellen (Cirillo et al., 2019, Steidl et al., 2011). Es unterstützt eher die These, dass B-Zellen in der Rezidiventstehung keine wesentliche Rolle spielen und der prognostisch günstige hohe Anteil an B-Zellen eher zu einem physiologisch erhaltenen Lymphknoten passt.

Passend zur Literatur, die im Anteil der Tumorzellen keinen prognostischen Biomarker sieht, konnte in den konsekutiven Proben kein signifikanter Unterschied von HRS-Zellen gezeigt werden (Steidl et al., 2011). Auch die Zahl der Makrophagen zeigte keine signifikante Veränderung (Prim.=6,27% Rez.=6,51% p-Wert=0,8606) und bestätigt das Ergebnis der Genexpressionsanalyse an einem Teil (n=14) der hier untersuchten konsekutiven Schnitte, die ebenfalls keine Dynamik in der makrophagenspezifischen RNA im Rezidiv im Vergleich zum primären Lymphom fand (Schnitter et al., 2019).

Die CD3 pos. T-Zellpopulationen hingegen nahmen zu ihrem Rezidiv signifikant ab. Mit einem durchschnittlichen Anteil von 49,25% im primären und 41,52% im Rezidivbiopsat wurde eine Signifikanz von 0,0054 erreicht.

Die Studien zur prognostischen Bedeutung von T-Zellen differenzieren diese je nach ihrer Funktion weiter in Subpopulationen. Die T-Zellen wurden in dieser Arbeit auch in ihren Subpopulationen untersucht und werden in dieser Diskussion noch beleuchtet.

Keine der untersuchten Populationen bildet den zunehmenden Teil ab

Interessanterweise gibt es in den in dieser Arbeit analysierten Zellpopulationen keine, die sich gegensätzlich zu der CD3 pos. T-Zellpopulationsabnahme verhält. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine für diese Arbeit nicht gefärbte Struktur im Rezidiv zunimmt. Dafür

infrage kommen noch andere Zellarten, die im TME des cHL zu finden sind und eine Rolle in der Pathogenese spielen könnten. Hierzu gehören die Eosinophilen, die Mastzellen, die NK-Zellen und das umliegende Kollagen. Die Bedeutung der Eosinophilen wurde kontrovers diskutiert. Manche Studien fanden ein besseres Überleben bei einem hohen Anteil (Hude et al., 2018), andere zeigten ein besseres Überleben bei einem niedrigen Anteil von Eosinophilen (von Wasielewski et al., 2000, Enblad et al., 1993). Insgesamt wurden die Eosinophilen in letzter Zeit in der Forschung wenig beachtet. Auffällig ist, dass eine Erkrankung mit einem cHL zu einer erhöhten Eosinophilenzahl im peripheren Blut führt. Diese korreliert jedoch nicht mit der Anzahl im erkrankten Gewebe (von Wasielewski et al., 2000). Außerdem scheint die Zahl der Eosinophilen und Mastzellen im cHL eher mit Asthma assoziiert zu sein (Glimelius et al., 2011).

Eine hohe Anzahl von c-kit pos. Mastzellen zeigte sich in der Arbeit von Deau et al. als prognostisch ungünstig (Deau et al., 2013). Diese Aussage konnte durch eine andere Arbeitsgruppe nur für den Mischtyp bestätigt werden (Andersen et al., 2016). Auch die NK-Zellen spielen eine Rolle im TME. Ihre Aufgabe ist es, die unterexprimierten MHC-Moleküle oder andere Antigene der Tumorzelle zu detektieren und sie zu eliminieren. Sie wird jedoch durch das tumorunterstützende TME sowie durch die Tumorzelle gehemmt und ist im erkrankten Gewebe fünfmal weniger als im physiologischen zu finden. Das gute Ansprechen auf PD-1-Hemmer wird in einem Großteil auch durch die Reaktivierung der NK-Zelle ermöglicht (Chiu et al., 2018).

Die eher geringen Zahlen von NK-Zellen, Eosinophilen und Mastzellen scheinen somit nicht die zunehmende Population zu stellen.

Einen weiteren Anteil im TME stellt die Extrazellulärmatrix. Die durch Zytokine stimulierten Fibroblasten produzieren Kollagen, welches mit der HRS-Zelle über den membranständigen DDR1 Rezeptor interagiert. Dabei führt eine Stimulation dieses Rezeptors zum Wachstum der Tumorzelle. Dies wiederum stimuliert die Produktion von Kollagen durch Zytokine, die sie sezernieren und stellt einen den tumorunterstützenden Mechanismus dar (Carbone und Gloghini, 2013).

Um die Veränderung des Anteils der Fibrose im Lymphknoten zu untersuchen, wurden 28 zur Verfügung stehende Primär- und Rezidivgewebe mit SiriusRed, einem Marker für Kollagen, gefärbt und die positiv gefärbte Fläche auf die gesamt analysierte Fläche

berechnet. Insgesamt ist diese Färbung sehr schwer auszuwerten, da sie keinen guten Kontrast darstellt und somit bei der digitalen Bildanalyse sehr vom Untersucher*in abhängig ist. Die Anteile lagen bei ungefähr 20% und zeigten im gepaarten t-Test keine signifikante Veränderung. Den gleichen Ansatz verfolgend wurde die Zellularität der Schnitte untersucht, sie zeigte ebenso keine signifikante Veränderung. Die Befunde scheinen darauf hinzuweisen, dass der Anteil der Fibrose nicht den zunehmenden Faktor im Rezidiv darstellt.

Mit dieser Arbeit können die Ergebnisse von Chan et al. nicht erklärt werden, die anhand von Genexpressionsanalysen eine stark veränderte Genexpression im TME im Rezidiv mit einer schlechten Prognose assoziiert haben (Chan et al., 2017). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Zellen des TME sich nicht in ihrer Anzahl, sondern ihrer Genexpression verändern und somit ein Rezidiv der Krankheit erlauben.

CD8 und FoxP3 pos. T-Zellen zeigen keine Dynamik

In Studien zur prognostischen Bedeutung werden die T-Zellen in ihren Subpopulationen unterschieden. (Cirillo et al., 2019, Steidl et al., 2011).

Im TME des klassischen Hodgkin Lymphoms stellt meistens die CD4 pos. Subpopulation den größten Anteil der T-Zellen (Steidl et al., 2011, Cader et al., 2018). Hierzu gehören die Treg (FoxP3 pos.). Die anderen Subpopulation sind CD8 pos. T-Zellen, die zum größten Teil aus den CTL bestehen. Während ein hoher Anteil von FoxP3 pos. Treg in den meisten Studien mit einem besseren Überleben korreliert, verhält es sich mit einem hohen Anteil von CTL genau umgekehrt (Chetaille et al., 2009, Devilard et al., 2002, Alvaro-Naranjo et al., 2005, ten Berge et al., 2001, Asano et al., 2006, Greaves et al., 2013, Kelley et al., 2007). Dass diese Biomarker nicht immer reproduzierbar sind, zeigen andere Studien (Schreck et al., 2009, Hollander et al., 2018, Koreishi et al., 2010). Mithilfe von computergestützter oder manueller Auszählung von TMA bzw. HPF zeigte sich in diesen Arbeiten ein niedriger Anteil von FoxP3 mit einem längeren progressionsfreien Überleben assoziiert (Hollander et al., 2018, Schreck et al., 2009). Diese Aussagen stimmen mit den Erkenntnissen in soliden Tumoren überein, in denen ein hoher Anteil von Treg-Zellen durch die Hemmung des Immunsystems meistens prognostisch schlechter ist (Menetrier-Caux et al., 2009, Wolf et al., 2015).

In der Literatur wird die Abkürzung CTL nicht einheitlich genutzt. Zum einen Teil beschreiben CTL nur die zytotoxische T-Lymphozyten, zum anderen Teil werden unter CTL alle zytotoxischen Zellen, die Granzyme B in ihren Granula haben, zusammengefasst. Zu ihnen gehören die CD8 pos. T-Zellen, die CD57 pos. NK-Zellen und die Granzym B pos. Zellen. In dieser Arbeit sollen die CTL die CD8 pos. zytotoxischen T-Zellen beschreiben.

Um die T-Zell-Subpopulationen zu betrachten und die Subpopulation zu detektieren, die für die signifikante Abnahme der CD pos. T-Zellen verantwortlich war, wurden die 30 zur Verfügung stehenden Gewebe für CD8 und FoxP3 gefärbt. Eine CD4 Färbung wurde wegen ihrer niedrigen Spezifität für T-Zellen und einer häufig starken Hintergrundfärbung nicht untersucht und der Anteil der CD4 pos. Zellen als Differenz zwischen CD3 pos. und CD8 pos. Zellen angenommen.

CD8 pos. Zellen machten knapp weniger als die Hälfte der CD3 pos. Population aus (Prim.=45,63% Rez.=46,93%). Im gepaarten t-Test fand sich keine signifikante Veränderung zum Rezidiv. Die Treg-Zellen, die zu den CD4 pos. T-Zellen gehören und anhand ihres Transkriptionsfaktor FoxP3 gefärbt wurden, zeigten ebenso keine signifikante Veränderung (Prim.=7,33% Rez.=10,64%).

Da es wenige bis keine Untersuchungen in cHL aller Risikogruppen gibt, ist es schwer einzuschätzen, ob der Anteil der T-Zell Subpopulationen in dieser aggressiven Kohorte als hoch oder niedrig zu werten ist. Orientieren kann man sich jedoch zum Beispiel an der Kohorte von Cader et al, die mithilfe von CyTOF (=cytometry by time of flight) Analysen die Zellzusammensetzung in neu aufgetretener klassischen Hodgkin Lymphomen von 7 Patienten untersuchte (Cader et al., 2018). Dort zeigten die Treg einen Anteil von ungefähr einem Drittel der CD4 pos. Zellen. An der in dieser Arbeit hypothetisch errechneten CD4 pos. Population stellten sie einen geringeren Anteil, ungefähr ein Sechstel.

Die CD8 pos. CTL stellen in der CyTOF Analyse nur ungefähr ein Sechstel der gesamten CD3 pos. Population, während in unserer Arbeit der Anteil mit knapp der Hälfte viel höher liegt. Damit liegt in dieser Untersuchung das Verhältnis der CD4 pos. zu den CD8 pos. Zellen bei 1:1 und unterscheidet sich damit von dem in der Literatur zu findenden Relation von 5:1 (Cader et al., 2018). Dieser Unterschied könnte an der durch diese Arbeit analysierten aggressiven Kohorte, der geringen Zahl der untersuchten Patienten in der Arbeit von Cader et al. oder der unterschiedlichen Analysetechnik liegen. Außerdem würde es zu der

Beobachtung passen, dass HRS-Zellen häufig kein MHC1-Molekül tragen, somit eine effektive Immunantwort der vielen CD8 pos. Zelle nicht möglich ist und das cHL rezidivieren kann. Ten Berge et al. und Koreishi et al. ermittelten in ihren Untersuchungen Grenzwerte der Subpopulationen, die mit einer besseren Prognose assoziiert waren. Diese bezogen sich auf IHC gefärbte TMA. In der Studie von Ten Berge et al. zeigte sich ein Anteil der CTL von <15% bzw. für FoxP3 von >25% und bei Koreishi et al. für CTL bei <50% als prognostisch günstiger (ten Berge et al., 2001, Koreishi et al., 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit würde bei Betrachtung dieser Grenzwerte die Hypothese unterstützen, dass ein niedriger Gehalt an FoxP3 pos. Treg und ein hoher Gehalt an CD8 pos. CTL prognostisch ungünstig sind, da sie hier in einer Kohorte von aggressiven rezidivierten cHL gemessen worden sind. Damit deckt sich die durch WSI ermittelte Aussage mit der eines Großteils der Literatur (Chetaille et al., 2009, Devillard et al., 2002, Alvaro-Naranjo et al., 2005, ten Berge et al., 2001, Asano et al., 2006, Greaves et al., 2013, Kelley et al., 2007).

Der Pathomechanismus dahinter könnte sein, dass die CTL durch die HRS-Zelle über PD-1 erfolgreich unterdrückt werden und ineffektiv sind. Dazu kommt, dass die Tumorzelle häufig Mutationen im Gen für MHC1 besitzt, die für die Erkennung durch die CTL benötigt wird (Aoki und Steidl, 2018, Cader et al., 2018).

Auf der Suche nach der CD3 pos. Subpopulation, die im Rezidiv signifikant abnimmt, zeigten die CD8 pos. und FoxP3 pos. T-Zellen keine signifikante Veränderung. So kommt die Frage auf, ob die abnehmende Population der T-Zellen, zum Beispiel die restliche CD4 pos. Population, also die Th1- oder Th2-Zellen, stellen, die nach Cader et al. eine wichtige Komponente in der Abwehr des cHL sind (Cader et al., 2018). Diese Aussage müsste durch weitere Untersuchungen überprüft werden.

Die T-Zell Rezeptor Klonalität nimmt im Rezidiv zu

Um zunächst die Validität der TZR Analysen zu prüfen, wurden Korrelationen zwischen der Anzahl der detektierten Rearrangements, der T-Zellanteile durch WSI und der Diversität durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Diversität der TZR von der Anzahl der detektierten Rearrangements abhängig ist - je weniger Rearrangements, desto höher war die Diversität. Dieser Zusammenhang könnte die Aussage der TZR Analyse über die Klone schwächen.

Es konnte nicht gezeigt werden, dass die Anzahl der TZR Rearrangements als weitere Messmethode für den T-Zellanteil genutzt werden kann. Dass diese beiden Parameter nicht korrelierten, könnte an der niedrigen Qualität der aus den FFPE fixierten Gewebe extrahierten DNA liegen. Dafür spricht die mittelstarke Korrelation ($r=0,555$) des Jahres der Erstdiagnose mit der Anzahl der extrahierten und detektierten Rearrangements – je älter das Gewebe, desto weniger Rearrangements wurden gefunden.

Weiter sind die Rearrangements auch von den Klongrößen abhängig, da sie nur die Anzahl der unterschiedlichen spezifischen Rezeptoren misst, während die Ganzschnittbildanalyse jede T-Zelle unabhängig vom Rezeptorklon detektiert.

Die Analyse der TZR an 16 Patient*innen der Kohorte wies darauf hin, dass sich im TME T-Zellklone vermehren. Dafür spricht die geringere Pielou's Evenness im Rezidiv (p -Wert=0,0025) sowie der erhöhte Anteil der 10 häufigsten Klone (nicht signifikant). Diese vermehrte Klonalität lässt eine reaktivierte adaptive Immunantwort vermuten, die den Tumor nicht suffizient unterdrücken kann.

Im Anteil der 10 häufigsten Klone des Rezidivs zeigten sich in 11 von 16 sequentiellen Biopsien mindestens 1 Klon bis maximal 6 Klone, die bereits im Primärtumor unter den 10 häufigsten Klonen zu finden waren. Dieses Ergebnis könnte abhängig von der Qualität der DNA-Proben und dem Entnahmeort im Lymphknoten sein. Außerdem könnten die Klone, die nicht unter den 10 häufigsten aufgeführt wurden, dennoch im Rezidiv proliferiert haben. Insgesamt lässt das Ergebnis den Rückschluss zu, dass es im Rezidiv eine tumorspezifische Immunantwort gibt.

Bis jetzt gibt es nur wenige Arbeiten zu den Veränderungen der TZR im TME von Malignomen und ihre Assoziation mit der Prognose oder dem Ansprechen auf eine Checkpointinhibition.

Die Arbeiten zum Melanom und Lungenkarzinom zeigen, dass in diesen zwei soliden Tumoren im Gegensatz zum gesunden Gewebe tumorspezifische Klone zu finden sind (Beausang et al., 2017, Mansfield et al., 2018). In Hirnmetastasen vom Lungenkarzinom werden im Gegensatz zum Primärtumor ein höherer Anteil eines Klons, weniger unterschiedlich funktionelle T-Zellen und nur wenig überlappende TZR gefunden (Mansfield et al., 2018). Dies spricht dafür, dass eine Zunahme der Klonalität der T-Zellen eher mit einer guten Unterdrückung der Immunantwort durch die Tumorzelle assoziiert ist. Im Gegensatz

zu soliden Tumoren ist die adaptive Immunantwort im cHL nur sehr schwach, was sich an dem vergleichsweise geringen Anteil der 10 häufigsten Klone und der geringen Zunahme zum Rezidiv zeigt.

Auch in Untersuchungen zum DLBCL waren dominante Klone mit einem schlechteren Überleben assoziiert. Hierbei wurde eine diverse nicht klonale T-Zell Antwort mit einer guten Immunantwort in Verbindung gebracht. Gegen diese breite Immunantwort der T-Zellen scheinen die malignen B-Zellen im DLBCL mit einer angepassten Unterdrückung des Immunsystems mithilfe von vermehrter Expression von PD-1, PD-L1 und PD-L2 zu reagieren, um zu überleben (Keane et al., 2017). Dieser Umstand kann mit den Checkpointinhibitoren genutzt und der Tumor durch das enthemmt Immunsystem wieder angegriffen werden. Bei metastasierten Melanompatient*innen korrelierte ein gutes Ansprechen auf eine Checkpointinhibition mit einer Kombination aus einer hohen Diversität der TZR und der Zahl der PD-1, PD-L1 und PD-L2 Proteine sowie den CD8 pos. Zellen im TME (Tumeh et al., 2014). Hierbei muss beachtet werden, dass in Melanom Patient*innen eine hohe Anzahl von CTL, also CD8 pos. T-Zellen, eher mit einer guten Prognose und einem guten Ansprechen auf Checkpointinhibitoren assoziiert sind. Im cHL hingegen werden im Großteil der Literatur wenige CTL als prognostisch günstiger angesehen (Steidl et al., 2011, Reinke et al., 2020). Dieser Unterschied könnte auf unterschiedlich ablaufende Immunantworten hindeuten. Dies wird auch durch die CyTOF Arbeit von Cader et al. unterstützt, die im cHL eher die CD4 pos. T-Zellen als wichtigsten Bestandteil der Immunantwort postuliert (Cader et al., 2018). Da die HRS-Zelle ihren Ursprung in einer Immunzelle hat, lässt sich vermuten, dass die Interaktion mit dem TME über andere Wege verläuft als mit Tumorzellen anderen Ursprungs.

Ansätze zur Pathophysiologie der Rezidiventstehung

Die zum Rezidiv zunehmende klonale Expansion der T-Zellen im cHL spricht für eine adaptierte Immunantwort, die jedoch im Vergleich mit soliden Tumoren eher gering ausfällt (Reinke et al., 2020). Wie die Mechanismen der HRS-Zellen funktionieren, mit der sie einer effektiven adaptiven Immunantwort entgehen, kann aus den Ergebnissen der Arbeit zu den T-Zellen mit einem Blick auf die Literatur nur vermutet werden.

Erklärungsansätze dafür könnten sein, dass HRS-Zellen im Laufe ihrer Entstehung co-stimulierende Oberflächenproteine wie z.B. den MHC1-Komplex verlieren oder über das

hemmende Oberflächenprotein PD-L1 eine Anergie der T-Zellen auslösen (Tumeh et al., 2014). Weitere Ideen sind, dass HRS-Zellen heterogen in ihren Neoantigenen sind oder ein T-Zellklon einen selektiven Druck auf die Tumorzelle ausübt, sodass diese durch Mutationen ihrer Antigene dem T-Zellklon entgehen kann (Keane et al., 2017). Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die durch die HRS-Zelle zur Unterstützung und Abwehr angelockten unspezifischen T-Zellen, eine Verdünnung der klonalen T-Zellen bewirken und den Anschein erwecken, dass nur ein scheinbar kleiner Anteil von T-Zellen im TME vom cHL klonal expandiert, die trotzdem keine suffiziente Immunantwort auslösen können.

Weitere Untersuchungen zur Rolle der T-Zellen werden benötigt

Diese Arbeit zeigt die Bedeutsamkeit der Interaktion von T-Zellen im TME des cHL. Die signifikante Abnahme der CD3 pos. T-Zellen im Rezidiv ist bisher in keiner Arbeit beschrieben worden. Um die Pathophysiologie und das Tumorüberleben durch Interaktion der Tumorzellen mit den umgebenden Entzündungszellen besser zu verstehen, ist eine weitere Betrachtung der Rolle der T-Zellen und ihren Subpopulationen in der Tumorabwehr notwendig. Dazu sollten in weiteren Arbeiten den Fragen nachgegangen werden, welcher pathophysiologische Mechanismus der T-Zellabnahme zugrunde liegt, welche Subpopulation davon betroffen ist, welche Zellpopulation antiproportional anteilig zunimmt und ob dadurch eine Rezidiventstehung ermöglicht wird und welche Rolle die CD4 pos. T-Zellen im TME spielen. Interessant wäre es herauszufinden, ob eine Abnahme der CD4 pos. T-Zellen ein Rezidiv begünstigt.

Die Veränderungen der CD3 pos. T-Zellen in ihrer Zahl und ihrem TZR Repertoire nach einer konventionellen Chemotherapie stellen einen vielversprechenden Ansatz für weitere Forschungen in Bezug auf die Therapie und Prognose im klassischen Hodgkin Lymphom dar. Es ist interessant zu sehen, wie nicht nur die Zellpopulationen des TME, sondern auch die einzelnen T-Zellsubpopulationen unterschiedliche Rollen in der Tumorabwehr und -unterstützung besetzen, die nicht vollständig verstanden sind. Dabei werden sie durch die HRS-Zellen in ihrer ursprünglichen Funktion noch verändert, z.B. zu T-Zellen, die eine mechanische Barriere um die Tumorzelle bilden, anstatt die sie anzugreifen. Um das Tumormikromilieu als therapeutischen Ansatzpunkt besser nutzen zu können, gilt es die

einzelnen Aufgaben des komplexen Systems weiter aufzuschlüsseln und jede einzelne Subpopulation darin als Akteur wahrzunehmen. Es sollte dabei beachtet werden, dass heutzutage in Studien bereits bei der primären Erkrankung auf Immuncheckpointinhibitoren, die ein gutes Therapieansprechen durch Eingriff in das TME erzielen, zurückgegriffen wird, z.B. NIVAHL Studie (Reinke et al., 2020). Da diese gezielt in die Interaktion des TME eingreifen, ist die Vergleichbarkeit mit unseren Ergebnissen unter konventioneller Chemotherapie eingeschränkt.

Um die prognostische Relevanz der in dieser Arbeit herausgefundenen Ergebnisse besser einschätzen zu können, sind weitere WSI Analysen in einem prospektiven Studienansatz mit einer Kohorte, die cHL Patient*innen vom frühen bis zum fortgeschrittenen Stadium unter konventioneller Chemotherapie einschließt, notwendig. Welche Prädiktoren als Zellanteile des TME schon im Primärtumor zu finden sind und eine Rezidiventstehung suffizient vorhersagen können, sollen dabei gefunden werden.

Die digitale Ganzschnittanalyse stellt dabei einen modernen Ansatz in der Analyse von größeren Gewebeschnitten dar. Mithilfe künstlicher Intelligenz und genügend eingebrachten histologischen Präparaten wäre eine effiziente Untersuchung des TME im klassischen Hodgkin Lymphoms in der Routinediagnostik denkbar. Daraus könnte eine personalisiertere Therapie des cHL resultieren und eine Übertherapie von Patienten vermieden werden.

6 Zusammenfassung

Das klassische Hodgkin Lymphom (cHL) ist eine seltene onkologische Erkrankung, die vor allem im jungen Alter auftritt und durch ein dominierendes Tumormikromilieu gekennzeichnet ist. Die Tumorzellen sind dabei abhängig von Überlebenssignalen und Interaktionen mit reaktiven Immunzellen, Fibroblasten und extrazellulärer Matrix (Steidl et al., 2011). Auch wenn das cHL eine Heilungschance von über 80% hat, besteht durch die intensive Therapie ein hohes Risiko für Langzeitfolgen (de Vries et al., 2018). Ziel aktueller Forschungsarbeiten ist es daher, frühzeitig aggressivere von milden Verläufen zu differenzieren, um anschließend Patient*innen risikoadaptiert zu therapieren. In der Literatur werden unterschiedliche prognostisch prädiktive Anteile und Verhältnisse von Zellpopulationen im Tumormikromilieu kontrovers diskutiert, da Studien verschiedener Kohortenzusammensetzungen und Methoden sich widersprechen oder nicht reproduzieren können (Cirillo et al., 2019).

Leitfrage dieser Arbeit ist, ob sich die Zusammensetzung und damit die Biologie des Tumormikromilieus von Ersterkrankung zum Rezidiv signifikant verändert.

Dafür wurde die moderne digitale Ganzschnittbildanalyse genutzt, mithilfe derer ein Lymphknotenganzschnitt mit vielen Zellen pro Schnitt analysiert werden konnte.

Herkömmliche histologische Untersuchungen mit sogenannten *tissue microarrays* untersuchen hingegen nur ungefähr 1mm² große tumorzellnahe Ausschnitte und sind damit bedingt geeignet, die Heterogenität des Tumormikromilieus abzubilden. In gepaarten immunhistochemisch gefärbten Schnitten aus Primärtumor und Rezidiv wurde der Anteil von T-Zellen, B-Zellen, Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen und Makrophagen sowie regulatorischen und zytotoxischen T-Zellen ermittelt sowie der Fibrosegrad und die T-Zellrezeptor Klonalität bestimmt.

Die T-Zellpopulation als größte Fraktion im Tumormikromilieu des cHL zeigte eine signifikante Abnahme, wie sie bisher noch nicht beschrieben worden ist. Die gleichzeitig zum Rezidiv zunehmende T-Zell-Rezeptor Klonalität kann dabei als adaptive Immunantwort gedeutet werden. Die restlichen untersuchten Populationen wiesen keine signifikante Dynamik in ihren Anteilen auf. Die in der Literatur häufig mit einer prognostischen Bedeutung versehenen Makrophagen hatten nur einen Anteil von 6-7% und zeigten keine Veränderung (Steidl et al., 2010). Der nach der Literatur viel höher erwartete Anteil der Makrophagen und die nicht signifikante Dynamik zum Rezidiv könnten Folge verschieden

angewandter Untersuchungsmethoden sein und die Bedeutung der durch die *tissue microarray* untersuchten tumorzellnahen Makrophagen und nicht der Makrophagen im gesamten Tumor unterstreichen.

Die Mechanismen, mithilfe derer sich die Tumorzellen dem Immunsystem entziehen und es zu einem Rezidiv kommen kann, scheinen vielfältig zu sein (Cirillo et al., 2019). Eine T-Zellabnahme scheint hierbei eine Rolle zu spielen. Außerdem könnte der Verlust von Co-Stimulatoren und eine Heterogenität von Neoantigenen auf der Tumorzelle eine Immunantwort erschweren (Diepstra et al., 2007).

Diese Erkenntnisse stützen den erfolgreichen Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren (NIVAHL Studie), die das Tumormikromilieu beeinflussen (Reinke et al., 2020). Weitere Untersuchungen zum Verständnis der Rolle von T-Zellsubpopulationen in der Entstehung von Rezidiven, wie z.B. MHC1/2-Expression im Rezidiv, sollten folgen. Außerdem wird eine prospektive Studie mit digitaler Ganzschnittanalyse in allen Stadien zur Einordnung der Ergebnisse und Suche von prädiktiven Zusammensetzungen des Tumormikromilieu im Primärtumor benötigt.

7 Literaturverzeichnis

- Al-Zoughbi W., Huang J., Paramasivan G. S., Till H., Pichler M., Guertl-Lackner B., Hoefler G. (2014). Tumor macroenvironment and metabolism. *Semin Oncol*, 41, 281-95.
- Aldinucci D., Celegato M., Casagrande N. (2016). Microenvironmental interactions in classical Hodgkin lymphoma and their role in promoting tumor growth, immune escape and drug resistance. *Cancer Lett*, 380, 243-52.
- Alvaro-Naranjo T., Lejeune M., Salvado-Usach M. T., Bosch-Princep R., Reverter-Branchat G., Jaen-Martinez J., Pons-Ferre L. E. (2005). Tumor-infiltrating cells as a prognostic factor in Hodgkin's lymphoma: a quantitative tissue microarray study in a large retrospective cohort of 267 patients. *Leukemia Lymphoma*, 46, 1581-91.
- Andersen M. D., Kamper P., Nielsen P. S., Bendix K., Riber-Hansen R., Steiniche T., Hamilton-Dutoit S., Clausen M., d'Amore F. (2016). Tumour-associated mast cells in classical Hodgkin's lymphoma: correlation with histological subtype, other tumour-infiltrating inflammatory cell subsets and outcome. *Eur J Haematol*, 96, 252-9.
- Aoki T., Steidl C. (2018). Novel biomarker approaches in classic Hodgkin lymphoma. *Cancer J*, 24, 206-214.
- Asano N., Oshiro A., Matsuo K., Kagami Y., Ishida F., Suzuki R., Kinoshita T., Shimoyama Y., Tamaru J., Yoshino T., Kitamura K., Fukutani H., Morishima Y., Nakamura S. (2006). Prognostic significance of T-cell or cytotoxic molecules phenotype in classical Hodgkin's lymphoma: a clinicopathologic study. *J Clin Oncol*, 24, 4626-33.
- AWMF, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe. (2019). *Leitlinienprogramm Onkologie: Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Hodgkin Lymphoms bei erwachsenen Patienten, Langversion 2.1* [Online]. Leitlinienprogramm Onkologie. Abgerufen unter: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hodgkin-lymphom/> [Stand: 01.10.2019].
- Azambuja D., Natkunam Y., Biasoli I., Lossos I. S., Anderson M. W., Morais J. C., Spector N. (2012). Lack of association of tumor-associated macrophages with clinical outcome in patients with classical Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*, 23, 736-42.
- Beausang J. F., Wheeler A. J., Chan N. H., Hanft V. R., Dirbas F. M., Jeffrey S. S., Quake S. R. (2017). T cell receptor sequencing of early-stage breast cancer tumors identifies altered clonal structure of the T cell repertoire. *Pr Natl Acad Sci USA*, 114, E10409-e10417.

- Brockelmann P. J., Goergen H., Kohnhorst C., von Tresckow B., Moccia A., Markova J., Meissner J., Kerkhoff A., Ludwig W. D., Fuchs M., Borchmann P., Engert A. (2017). Late relapse of classical Hodgkin Lymphoma: An analysis of the German Hodgkin Study Group HD7 to HD12 trials. *J Clin Oncol*, 35, 1444-1450.
- Cader F. Z., Schackmann R. C. J., Hu X., Wienand K., Redd R., Chapuy B., Ouyang J., Paul N., Gjini E., Lipschitz M., Armand P., Wu D., Fromm J. R., Neuberg D., Liu X. S., Rodig S. J., Shipp M. A. (2018). Mass cytometry of Hodgkin lymphoma reveals a CD4(+) regulatory T-cell-rich and exhausted T-effector microenvironment. *Blood*, 132, 825-836.
- Carbone A., Gloghini A. (2013). Activated DDR1 increases RS cell survival. *Blood*, 122, 4152-4.
- Carbone P. P., Kaplan H. S., Musshoff K., Smithers D. W., Tubiana M. (1971). Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res*, 31, 1860-1.
- Casulo C., Arcila M., Bohn O. L., Teruya-Feldstein J., Maragulia J., Moskowitz C. H. (2013). Tumor associated macrophages in relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *Leukemia Res*, 37, 1178-83.
- Chan F. C., Mottok A., Gerrie A. S., Power M., Nijland M., Diepstra A., van den Berg A., Kamper P., d'Amore F., d'Amore A. L., Hamilton-Dutoit S., Savage K. J., Shah S. P., Connors J. M., Gascoyne R. D., Scott D. W., Steidl C. (2017). Prognostic model to predict post-autologous stem-cell transplantation outcomes in classical Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol*, 35, 3722-3733.
- Chetaille B., Bertucci F., Finetti P., Esterni B., Stamatoullas A., Picquenot J. M., Copin M. C., Morschhauser F., Casasnovas O., Petrella T., Molina T., Vekhoff A., Feugier P., Bouabdallah R., Birnbaum D., Olive D., Xerri L. (2009). Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood*, 113, 2765-3775.
- Chiu J., Ernst D. M., Keating A. (2018). Acquired natural killer cell dysfunction in the tumor microenvironment of classic Hodgkin Lymphoma. *Front Immunol*, 9, 267.
- Cirillo M., Borchmann S. (2020). An update on disease biomarkers for Hodgkin lymphoma. *Expert Rev Hematol*, 1-8.
- Cirillo M., Reinke S., Klapper W., Borchmann S. (2019). The translational science of hodgkin lymphoma. *Brit J Haematol*, 184, 30-44.
- Claviez A. (2018). *Morbus Hodgkin Lymphom im Kindesalter - AWMF Leitlinie* [Online]. AWMF online. Abgerufen unter: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-012I-S1_Hodgkin_Lymphom_2019-01.pdf [Stand: 14.11.2019].

- de Vries S., Schaapveld M., van Nimwegen F. A., Jozwiak K., Lugtenburg P. J., Daniels L. A., Roesink J. M., van der Maazen R. W. M., Kok W. E. M., Aleman B. M. P., van Leeuwen F. E. (2018). High burden of subsequent malignant neoplasms and cardiovascular disease in long-term Hodgkin lymphoma survivors. *Brit J Cancer*, 118, 887-895.
- Deau B., Bachy E., Ribrag V., Delarue R., Rubio M. T., Bosq J., Varet B., Brousse N., Hermine O., Canioni D. (2013). Macrophage, mast cell and T lymphocyte infiltrations are independent predictive biomarkers of primary refractoriness or early relapse in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia Lymphoma*, 54, 41-5.
- Devillard Elisabeth, Bertucci François, Trempat Pascal, Bouabdallah Reda, Loriod Béatrice, Giaconia Aurélie, Brousset Pierre, Granjeaud Samuel, Nguyen Catherine, Birnbaum Daniel, Birg Françoise, Houlgatte Remi, Xerri Luc (2002). Gene expression profiling defines molecular subtypes of classical Hodgkin's disease. *Oncogene*, 21, 3095-3102.
- Diepstra A., van Imhoff G. W., Karim-Kos H. E., van den Berg A., te Meerman G. J., Niens M., Nolte I. M., Bastiaannet E., Schaapveld M., Vellenga E., Poppema S. (2007). HLA class II expression by Hodgkin Reed-Sternberg cells is an independent prognostic factor in classical Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 25, 3101-8.
- Drexler H. G., Pommerenke C., Eberth S., Nagel S. (2018). Hodgkin lymphoma cell lines: to separate the wheat from the chaff. *Biol Chem*, 399, 511-523.
- Enblad G., Sundstrom C., Glimelius B. (1993). Infiltration of eosinophils in Hodgkin's disease involved lymph nodes predicts prognosis. *Hematol Oncol*, 11, 187-93.
- Evens A. M., Antillón M., Aschebrook-Kilfoy B., Chiu B. C.-H. (2012). Racial disparities in Hodgkin's lymphoma: a comprehensive population-based analysis. *Ann Oncol*, 23, 2128-2137.
- German-Hodgkin-Study-Group. (2020). *Histologie klassisches Hodgkin Lymphom* [Online]. Abgerufen unter: <https://www.ghsg.org/histologie> [Stand: 07.05.2020].
- Glimelius I., Rubin J., Rostgaard K., Amini R. M., Simonsson M., Sorensen K. M., Smedby K. E., Venge P., Hjalgrim H., Molin D., Enblad G. (2011). Predictors of histology, tissue eosinophilia and mast cell infiltration in Hodgkin's lymphoma - a population-based study. *Eur J Haematol*, 87, 208-16.
- Gotti M., Nicola M., Lucioni M., Fiaccadori V., Ferretti V., Sciarra R., Costanza M., Bono E., Molo S., Maffi A., Croci G. A., Varettoni M., Frigeni M., Pascutto C., Arcaini L., Bonfichi M., Paulli M., Cazzola M. (2017). Independent prognostic impact of tumour-infiltrating macrophages in early-stage Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol*, 35, 296-302.

- Greaves P., Clear A., Coutinho R., Wilson A., Matthews J., Owen A., Shanyinde M., Lister T. A., Calaminici M., Gribben J. G. (2013). Expression of FOXP3, CD68, and CD20 at diagnosis in the microenvironment of classical Hodgkin lymphoma is predictive of outcome. *J Clin Oncol*, 31, 256-62.
- Guo B., Cen H., Tan X., Ke Q. (2016). Meta-analysis of the prognostic and clinical value of tumor-associated macrophages in adult classical Hodgkin lymphoma. *BMC Med*, 14, 159.
- Hasenclever D., Diehl V. (1998). A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International prognostic factors project on advanced Hodgkin's Disease. *New Engl J Med*, 339, 1506-14.
- Hodgkin T. (1832). On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chir Trans*, 17, 68-114.
- Hollander P., Kamper P., Smedby K. E., Enblad G., Ludvigsen M., Mortensen J., Amini R. M., Hamilton-Dutoit S., d'Amore F., Molin D., Glimelius I. (2017). High proportions of PD-1(+) and PD-L1(+) leukocytes in classical Hodgkin lymphoma microenvironment are associated with inferior outcome. *Blood Adv*, 1, 1427-1439.
- Hollander P., Rostgaard K., Smedby K. E., Molin D., Loskog A., de Nully Brown P., Enblad G., Amini R. M., Hjalgrim H., Glimelius I. (2018). An anergic immune signature in the tumor microenvironment of classical Hodgkin lymphoma is associated with inferior outcome. *Eur J Haematol*, 100, 88-97.
- Hude I., Sasse S., Brockelmann P. J., von Tresckow B., Momotow J., Engert A., Borchmann S. (2018). Leucocyte and eosinophil counts predict progression-free survival in relapsed or refractory classical Hodgkin Lymphoma patients treated with PD1 inhibition. *Brit J Haematol*, 181, 837-840.
- Jachimowicz R. D., Pieper L., Reinke S., Gontarewicz A., Plütschow A., Haverkamp H., Frauenfeld L., Fend F., Overkamp M., Jochims F., Thorns C., L. Hansmann M., Möller P., Rosenwald A., Stein H., Reinhardt H. C., Borchmann P., von Tresckow B., Engert A., Klapper W. (2020). Analysis of the tumor microenvironment by whole-slide image analysis identifies low B cell content as a predictor of adverse outcome in advanced-stage classical Hodgkin Lymphoma. *Haematologica*.
- Kahn J. M., Kelly K. M., Pei Q., Bush R., Friedman D. L., Keller F. G., Bhatia S., Henderson T. O., Schwartz C. L., Castellino S. M. (2019). Survival by race and ethnicity in pediatric and adolescent patients with Hodgkin Lymphoma: A Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol*, Jco1900812.

- Kanzler H., Kuppers R., Hansmann M. L., Rajewsky K. (1996). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med*, 184, 1495-505.
- Kapatai G., Murray P. (2007). Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *J Clin Pathol*, 60, 1342-9.
- Kaplan H. S., Gartner S. (1977). "Sternberg-reed" giant cells of Hodgkin's Disease: cultivation in vitro, heterotransplantation, and characterization as neoplastic macrophages. *Int J Cancer*, 19, 511-25.
- Keane C., Gould C., Jones K., Hamm D., Talaulikar D., Ellis J., Vari F., Birch S., Han E., Wood P., Le-Cao K. A., Green M. R., Crooks P., Jain S., Tobin J., Steptoe R. J., Gandhi M. K. (2017). The T-cell receptor repertoire influences the tumor microenvironment and is associated with survival in aggressive B-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res*, 23, 1820-1828.
- Kelley T. W., Pohlman B., Elson P., Hsi E. D. (2007). The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression. *Am J Clin Pathol*, 128, 958-65.
- Kirsch I., Vignali M., Robins H. (2015). T-cell receptor profiling in cancer. *Mol Oncol*, 9, 2063-70.
- 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, 381-7.
- Koreishi A. F., Saenz A. J., Persky D. O., Cui H., Moskowitz A., Moskowitz C. H., Teruya-Feldstein J. (2010). The role of cytotoxic and regulatory T cells in relapsed/refractory Hodgkin lymphoma. *Appl Immunohisto M M*, 18, 206-11.
- Kuppers R. (2009). The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer*, 9, 15-27.
- Kuppers R., Engert A., Hansmann M. L. (2012). Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest*, 122, 3439-47.
- Kuppers R., Hansmann M. L. (2005). The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. *Int J Biochem Cell B*, 37, 511-7.
- LaCasce A. S. (2019). Treating Hodgkin lymphoma in the new millennium: Relapsed and refractory disease. *Hematol Oncol*, 37 Suppl 1, 87-91.

- Liu W. R., Shipp M. A. (2017). Signaling pathways and immune evasion mechanisms in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 130, 2265-2270.
- Liu Y., Sattarzadeh A., Diepstra A., Visser L., van den Berg A. (2014). The microenvironment in classical Hodgkin lymphoma: an actively shaped and essential tumor component. *Semin Cancer Biol*, 24, 15-22.
- Mansfield A. S., Ren H., Sutor S., Sarangi V., Nair A., Davila J., Elsbernd L. R., Udell J. B., Dronca R. S., Park S., Markovic S. N., Sun Z., Halling K. C., Nevala W. K., Aubry M. C., Dong H., Jen J. (2018). Contraction of T cell richness in lung cancer brain metastases. *Sci Rep*, 8, 2171.
- Mauz-Korholz C., Hasenclever D., Dorffel W., Ruschke K., Pelz T., Voigt A., Stiefel M., Winkler M., Vilser C., Dieckmann K., Karlen J., Bergstrasser E., Fossa A., Mann G., Hummel M., Klapper W., Stein H., Vordermark D., Kluge R., Korholz D. (2010). Procarbazine-free OEPA-COPDAC chemotherapy in boys and standard OPPA-COPP in girls have comparable effectiveness in pediatric Hodgkin's lymphoma: the GPOH-HD-2002 study. *J Clin Oncol*, 28, 3680-6.
- Menetrier-Caux C., Gobert M., Caux C. (2009). Differences in tumor regulatory T-cell localization and activation status impact patient outcome. *Cancer Res*, 69, 7895-8.
- Mina A. A., Vakkalagadda C., Pro B. (2019). Novel therapies and approaches to relapsed/refractory HL beyond chemotherapy. *Cancers*, 11.
- Moccia A. A., Donaldson J., Chhanabhai M., Hoskins P. J., Klasa R. J., Savage K. J., Shenkier T. N., Slack G. W., Skinnider B., Gascoyne R. D., Connors J. M., Sehn L. H. (2012). International prognostic score in advanced-stage Hodgkin's lymphoma: altered utility in the modern era. *J Clin Oncol*, 30, 3383-8.
- Mosmann T R, Cherwinski H, Bond M W, Giedlin M A, Coffman R L (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136, 2348-2357.
- Muschen M., Rajewsky K., Brauninger A., Baur A. S., Oudejans J. J., Roers A., Hansmann M. L., Kuppers R. (2000). Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med*, 191, 387-94.
- Newcom S. R., Kadin M. E., Phillips C. (1988). L-428 Reed-Sternberg cells and mononuclear Hodgkin's cells arise from a single cloned mononuclear cell. *Int J Cell Cloning*, 6, 417-31.

- Panico L., Tenneriello V., Ronconi F., Lepore M., Cantore N., Dell'Angelo A. C., Ferbo L., Ferrara F. (2015). High CD20+ background cells predict a favorable outcome in classical Hodgkin lymphoma and antagonize CD68+ macrophages. *Leukemia Lymphoma*, 56, 1636-42.
- Ramos C. A., Ballard B., Zhang H., Dakhova O., Gee A. P., Mei Z., Bilgi M., Wu M. F., Liu H., Grilley B., Bollard C. M., Chang B. H., Rooney C. M., Brenner M. K., Heslop H. E., Dotti G., Savoldo B. (2017). Clinical and immunological responses after CD30-specific chimeric antigen receptor-redirected lymphocytes. *J Clin Invest*, 127, 3462-3471.
- Rancea M., Monsef I., von Tresckow B., Engert A., Skoetz N. (2013). High-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation for patients with relapsed/refractory Hodgkin lymphoma. *Cochrane DB Syst Rev*, Cd009411.
- Reed D. M. (1902). On the pathological changes in Hodgkin's disease, with special reference to its relation to tuberculosis. *Johns Hopkins Hosp Rep*, 10, S. 133.
- Reinke S., Bröckelmann P. J., Iaccarino I., Garcia-Marquez M., Borchmann S., Jochims F., Kotrova M., Pal K., Brüggemann M., Hartmann E., Sasse S., Kobe C., Mathas S., Soekler M., Keller U., Bormann M., Zimmermann A., Richter J., Fuchs M., von Tresckow B., Borchmann P., Schlößer H., von Bergwelt-Baildon M., Rosenwald A., Engert A., Klapper W. (2020). Tumor and microenvironment response but no cytotoxic T-cell activation in classic Hodgkin lymphoma treated with anti-PD1. *Blood*, 136, 2851-2863.
- Robert-Koch-Institut (2019). Krebs in Deutschland für 2015/2016. In: Robert-Koch-Institut (ed.). Berlin.
- Sanchez-Aguilera A., Montalban C., de la Cueva P., Sanchez-Verde L., Morente M. M., Garcia-Cosio M., Garcia-Larana J., Bellas C., Provencio M., Romagosa V., de Sevilla A. F., Menarguez J., Sabin P., Mestre M. J., Mendez M., Fresno M. F., Nicolas C., Piris M. A., Garcia J. F. (2006). Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma. *Blood*, 108, 662-8.
- Sanchez-Espiridion B., Martin-Moreno A. M., Montalban C., Medeiros L. J., Vega F., Younes A., Piris M. A., Garcia J. F. (2012). Immunohistochemical markers for tumor associated macrophages and survival in advanced classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, 97, 1080-4.
- Sauer M., Plutschow A., Jachimowicz R. D., Kleefisch D., Reiners K. S., Ponader S., Engert A., von Strandmann E. P. (2013). Baseline serum TARC levels predict therapy outcome in patients with Hodgkin lymphoma. *Am J Hematol*, 88, 113-5.
- Schmitz R., Stanelle J., Hansmann M. L., Kuppers R. (2009). Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu Rev Pathol*, 4, 151-74.

- Schnitter Antje, Kohler Christian W., Reddemann Katharina, Reinke Sarah, Thorns Christoph, Fend Falko, Federmann Birgit, Möller Peter, Szczepanowski Monika, Spang Rainer, Klapper Wolfram (2019). Therapeutic targets and microenvironment in sequential biopsies of classical Hodgkin lymphoma at diagnosis and relapse. *J Hematop*, 12, 11-17.
- Schreck S., Friebel D., Buettner M., Distel L., Grabenbauer G., Young L. S., Niedobitek G. (2009). Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol*, 27, 31-9.
- Scott D. W., Chan F. C., Hong F., Rogic S., Tan K. L., Meissner B., Ben-Neriah S., Boyle M., Kridel R., Telenius A., Woolcock B. W., Farinha P., Fisher R. I., Rimsza L. M., Bartlett N. L., Cheson B. D., Shepherd L. E., Advani R. H., Connors J. M., Kahl B. S., Gordon L. I., Horning S. J., Steidl C., Gascoyne R. D. (2013). Gene expression-based model using formalin-fixed paraffin-embedded biopsies predicts overall survival in advanced-stage classical Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol*, 31, 692-700.
- Scott D. W., Steidl C. (2014). The classical Hodgkin lymphoma tumor microenvironment: macrophages and gene expression-based modeling. *Hematol-Am Soc Hemat*, 2014, 144-50.
- Seitz V., Hummel M., Marafioti T., Anagnostopoulos I., Assaf C., Stein H. (2000). Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood*, 95, 3020-4.
- Steidl C., Connors J. M., Gascoyne R. D. (2011). Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment. *J Clin Oncol*, 29, 1812-26.
- Steidl C., Lee T., Shah S. P., Farinha P., Han G., Nayar T., Delaney A., Jones S. J., Iqbal J., Weisenburger D. D., Bast M. A., Rosenwald A., Muller-Hermelink H. K., Rimsza L. M., Campo E., Delabie J., Braziel R. M., Cook J. R., Tubbs R. R., Jaffe E. S., Lenz G., Connors J. M., Staudt L. M., Chan W. C., Gascoyne R. D. (2010). Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *New Engl J Med*, 362, 875-85.
- Sternberg C. (1898). Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberculose des lymphatischen Apparates. *Zeitschrift für Heilkunde*, 19, S. 21.
- Swerdlow S. H., Campo E., Harris N. L., Jaffe E. S., Pileri S. A., Stein H., Thiele J., Vardiman J. W. (2008). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues - 4th edition. *IARC*.

- ten Berge R. L., Oudejans J. J., Dukers D. F., Meijer J. W., Ossenkoppele G. J., Meijer C. J. (2001). Percentage of activated cytotoxic T-lymphocytes in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin's disease: an independent biological prognostic marker. *Leukemia*, 15, 458-64.
- Touati M., Delage-Corre M., Monteil J., Abraham J., Moreau S., Remenieras L., Gourin M. P., Dmytruk N., Olivrie A., Turlure P., Girault S., Labrousse F., Preux P. M., Jaccard A., Bordessoule D. (2015). CD68-positive tumor-associated macrophages predict unfavorable treatment outcomes in classical Hodgkin lymphoma in correlation with interim fluorodeoxyglucose-positron emission tomography assessment. *Leukemia Lymphoma*, 56, 332-41.
- Tumeh P. C., Harview C. L., Yearley J. H., Shintaku I. P., Taylor E. J., Robert L., Chmielowski B., Spasic M., Henry G., Ciobanu V., West A. N., Carmona M., Kivork C., Seja E., Cherry G., Gutierrez A. J., Grogan T. R., Mateus C., Tomasic G., Glaspy J. A., Emerson R. O., Robins H., Pierce R. H., Elashoff D. A., Robert C., Ribas A. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 515, 568-71.
- von Wasielewski R., Seth S., Franklin J., Fischer R., Hubner K., Hansmann M. L., Diehl V., Georgii A. (2000). Tissue eosinophilia correlates strongly with poor prognosis in nodular sclerosing Hodgkin's disease, allowing for known prognostic factors. *Blood*, 95, 1207-13.
- Weinreb M., Day P. J., Niggli F., Green E. K., Nyong'o A. O., Othieno-Abinya N. A., Riyat M. S., Raafat F., Mann J. R. (1996). The consistent association between Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease in children in Kenya. *Blood*, 87, 3828-36.
- Weniger M. A., Kuppers R. (2016). NF-kappaB deregulation in Hodgkin lymphoma. *Semin Cancer Biol*, 39, 32-9.
- Wolf D., Sopper S., Pircher A., Gastl G., Wolf A. M. (2015). Treg(s) in cancer: Friends or foe? *J Cell Physiol*, 230, 2598-605.
- Yang L., Pang Y., Moses H. L. (2010). TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol*, 31, 220-7.

8 Publikationen der Ergebnisse

Poster

International Symposium of Hodgkin Lymphoma in Köln - Poster P013 (0088) - 10/2018

Digital image analysis: Comparing the microenvironment of primary tumor and relapse in classical Hodgkin lymphoma

Franziska Jochims, Sarah Kretschmer, Ron Jachimowicz, Falko Fend, German Ott, Martin-Leo Hansmann, Christoph Thorns, Annette Plütschow, Andreas Engert, Wolfram Klapper

Paper

Haematologica - 04/2020

Analysis of the tumor microenvironment by whole-slide image analysis identifies low B cell content as a predictor of adverse outcome in advanced-stage classical Hodgkin Lymphoma

Dr. Ron Jachimowicz, Luise Pieper, Sarah Reinke, Artur Gontarewicz, Dr. Annette Pluetschow, Heinz Haverkamp, Dr. Leonie Frauenfeld, Falko Fend, Mathis Overkamp, **Franziska Jochims**, Christoph Thorns, Dr. Martin Hansmann, Prof. Peter Möller, Prof. Andreas Rosenwald, Prof. Harald Stein, Prof. Hans Reinhardt, Dr. Peter Borchmann, Bastian von Tresckow, Prof. Andreas Engert, Prof. Wolfram Klapper

Blood - 10/2020

Tumor and microenvironment response but no cytotoxic T-cell activation in classic Hodgkin lymphoma treated with anti-PD1

Sarah Reinke, Paul J Bröckelmann, Ingram Iaccarino, Maria Alejandra Garcia-Marquez, Sven Borchmann, **Franziska Jochims**, Michaela Kotrova, Karol Pal, Monika Brüggemann, Elena Hartmann, Stephanie Sasse, Carsten Kobe, Stephan Mathas, Martin Soekler, Ulrich Keller, Matthias Bormann, Andreas Zimmermann, Julia Richter, Michael Fuchs, Bastian von Tresckow, Peter Borchmann, Hans Schlößer, Michael von Bergwelt-Baildon, Andreas Rosenwald, Andreas Engert, Wolfram Klapper

9 Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfram Klapper für das mir entgegengebrachte Vertrauen, seine stets schnellen Rückmeldungen, die angeregten fachlichen Diskussionen und die Überlassung des Dissertationsthemas.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister bedanken, die mich wie selbstverständlich in ihr Team aufgenommen haben und mich immer bei Fragen unterstützt haben.

Hervorheben möchte ich hierbei meine Betreuerin Dr. rer. nat. Sarah Reinke. Mit ihr habe ich die meiste Zeit verbracht. Vielen Dank für die unverzüglichen Rückmeldungen, die tatkräftige Unterstützung, das immer offenstehende Ohr für meine Probleme und die Ausdauer.

Ein großes Dankeschön auch an Charlotte Botz-von Drathen und Dana Germer für die Komplettierung der Kohorte durch Schneiden, Färben und Einscannen der Präparate.

Mein herzlichster Dank geht an Luise Pieper. Danke für die Einarbeitung in die digitale Bildanalyse, die Kritik, die Unterstützung und die Freundschaft. Die gemeinsamen Diskussionen haben diese Dissertation bereichert und viele gute Ideen angestoßen.

Ich danke den Pathologischen Instituten des Uniklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen, der Goethe-Universität in Frankfurt am Main und des Robert-Bosch-Krankenhauses in Stuttgart für die Überlassen und Zusendung von weiteren Patientenfällen.

Vielen Dank an Jördis, Mama und Papa für das Korrekturlesen.

Mein letzter Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und Bo für eure Motivation, eure Unterstützung, euer Antreiben und eure Liebe. Ohne euch wäre ich in meinem Leben nicht dort, wo ich jetzt bin.

10 Eidesstattliche Erklärung

Mit meiner Unterschrift erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der im Literaturverzeichnis aufgeführten Quellen erarbeitet worden ist. Die Stellen meiner Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, habe ich in jedem Fall unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht. Die Angaben sind für jede einzelne Quelle als Fußnote mit Verweis auf die Quelle aufgeführt. Dasselbe gilt sinngemäß für Tabellen, Karten und Abbildungen, auch solche, die aus Internetquellen stammen.

Ort, Datum

Unterschrift