

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

**Genexpressionsanalyse der Zusammensetzung des
Microenvironments im klassischen Hodgkin-
Lymphom bei Erstdiagnose und im Rezidiv**

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

vorgelegt von

ANTJE SCHNITTER

aus Eisenach

Kiel (2021)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfram Klapper, Institut für Pathologie
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Alexander Claviez, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 28.10.2022

gez.: Prof. Dr. Wolfram Klapper
(Vorsitzende/r der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
1. Einleitung	1
Fragestellung	3
2. Material und Methoden	
2.1. Auswahl des Patientenkollektivs	4
2.2. Histopathologie und Immunphänotyp	6
2.3. Erstellung der immunhistochemischen Färbungen für CD68 und CD163.....	6
2.4. Auswertung der Färbungen für CD68, CD163 und S100	8
2.5. Genexpressionsanalyse	8
2.6. Statistische Analysen	10
3. Ergebnisse	
3.1. Verteilung der histologischen Subtypen	11
3.2. Veränderungen des histologischen Subtypes zwischen Primär - und Rezidivbiopsie	11
3.3. Veränderungen im Immunphänotyp der Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen	12
3.4. Genexpressionsanalyse	13
3.5. Validierung der Genexpression mittels Immunhistochemie	15
3.5.1. CD 163	16
3.5.2. CD 68	17
3.5.3. S 100	19
4. Diskussion	23
5. Zusammenfassung	30

6. Literaturverzeichnis	32
Publikation der Ergebnisse	38
Danksagung	39

Abkürzungsverzeichnis

ABVD	Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin
BEACOPP	Bleomycin, Etoposid, Adriamycin, Vincristin (Oncovin) Procarbazin, Prednisolon
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
eBEACOPP	BEACOPP eskaliert
GHS	German Hodgkin Study Group

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der 8 signifikant vermehrt exprimierten und 20 signifikant vermindert exprimierten Genen im Rezidiv mittels Heatmap	14
Abbildung 2: Darstellung des CD163 Zellgehaltes in Primär- und Rezidivbiopsie	16
Abbildung 3: Darstellung des CD68 Zellgehaltes in Primär- und Rezidivbiopsie in der eigenen Testkohorte	17
Abbildung 4: Darstellung des CD68 Zellgehaltes in Primär- und Rezidivbiopsie in der Validierungskohorte	18
Abbildung 5: Verteilung S100 positiver Zellen	19
Abbildung 6: Morphologie S100 positiver Zellen	20
Abbildung 7: Darstellung des S100 Zellgehaltes in Primär- und Rezidivbiopsie in der eigenen Testkohorte	21
Abbildung 8: Darstellung des S100 Zellgehaltes in Primär- und Rezidivbiopsie in der Validierungskohorte	22

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Absolute und prozentuale Verteilung der Subtypen	11
Tabelle 2: Änderungen im histologischen Subtyp	12
Tabelle 3: Veränderungen im Immunphänotyp	13

1. Einleitung

Das Hodgkin-Lymphom ist eine maligne lymphatische Systemerkrankung (Swerdlow et al. 2008). Die Lymphknoten stellen dabei den Hauptmanifestationsort dar (Klapper et al. 2014). Nach heutigen Erkenntnissen geht man davon aus, dass es sich um ein B-Zell-Lymphom handelt (Küppers 2009). Laut WHO unterscheidet man das klassische Hodgkin-Lymphom vom lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphom (Swerdlow et al. 2008).

Im Folgenden wird das lymphozytenprädominante Hodgkin-Lymphom nicht weiter thematisiert, da für diese Arbeit ausschließlich das klassische Hodgkin-Lymphom untersucht wurde.

Das klassische Hodgkin-Lymphom wird aufgrund seiner unterschiedlichen histologischen Erscheinung weiter unterteilt. Man unterscheidet die noduläre Sklerose, den Mischtyp, das lymphozytenreiche und das lymphozytenarme klassische Hodgkin-Lymphom (Swerdlow et al. 2008).

Betrachtet man die Architektur des Tumors, so stellt man fest, dass diese eine ganz Spezielle ist. Wir sprechen von einem paucicellulären Tumor. Das heißt, dass nur ein kleiner Teil der Tumormasse aus Tumorzellen besteht, den sogenannten Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen (in der Regel unter 1%) (Swerdlow et al. 2008).

Den weitaus größeren Teil der Tumormasse stellt das Microenvironment dar. Hier findet man nicht-neoplastische Zellen des Immunsystems, wie CD4- und CD8-positive T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen, Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen, eosinophile und neutrophile Granulozyten und Fibroblasten (Küppers et al. 2012). Bei der Entstehung dieses Microenvironments spielen die Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen eine entscheidende Rolle. Durch die Ausschüttung verschiedener Zyto- und Chemokine bestimmen sie wesentlich die Zusammensetzung des Microenvironments (Küppers et al. 2012).

In der Vergangenheit haben bereits einige Arbeitsgruppen das Microenvironment des klassischen Hodgkin-Lymphoms mittels Genexpressionsanalyse charakterisiert. Durch diesen experimentellen Ansatz war es möglich eine umfangreiche

Einschätzung zu der zellulären Zusammensetzung des Microenvironments zu gewinnen. Zugleich war es im Weiteren sogar möglich, mit Hilfe dieser Genexpressionssignaturen Vorhersagen über die Prognose der Erkrankung zu treffen. Führend sind hier Steidl et al. (2010), welche publizierten, dass eine hohe Zahl an CD68 positiven Makrophagen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit assoziiert ist ein Rezidiv zu erleiden. Weiterhin konnte diese Aussage in derselben Studie an einer unabhängigen Kohorte mittels Immunhistochemie, als in der Routinediagnostik anwendbare Technik, validiert werden. Dieses Ergebnis wurde unter anderem sowohl von Kamper et al. (2011), als auch von Scott et al. (2013) bestätigt. Andere Arbeitsgruppen, wie z.B. Azambuja et al. (2012) konnten keinen Zusammenhang zwischen dem Makrophagengehalt des Microenvironments und der Erkrankungsprognose feststellen. Eventuelle Ursachen für diesen Unterschied könnten in den Eigenschaften der Studienkollektive der Arbeitsgruppen zu suchen sein.

Alle diese Studien, welche bisher zur Untersuchung des Microenvironments mittels Genexpressionsanalyse durchgeführt wurden, haben jedoch eine Gemeinsamkeit. Es wurden ausschließlich Gewebeproben zum Zeitpunkt der Erstmanifestation der Erkrankung untersucht, jedoch keine Gewebeproben zum Zeitpunkt des Rezidivs. Lediglich eine weitere Arbeitsgruppe hat bislang gepaarte Biopsien zum Zeitpunkt der Primärdiagnose und im Rezidiv untersucht (Chan et al. 2017).

Daher hat diese Arbeit das Ziel, das Microenvironment von Primär- und Rezidivproben mittels Genexpressionsanalyse zu untersuchen. Der Fokus liegt hierbei jedoch nicht auf der prognostischen Relevanz, sondern dem Zeitverlauf der Erkrankung und damit der Dynamik der Zusammensetzung des Microenvironments.

Fragestellung

1. Ist die Zusammensetzung des Microenvironments im klassischen Hodgkin-Lymphom zum Zeitpunkt des Rezidivs ebenso heterogen wie im Gewebe vor der Therapie?
2. Ist die Zusammensetzung des Microenvironments im klassischen Hodgkin-Lymphom stabil zwischen dem Zeitpunkt der Erstmanifestation und dem Rezidiv?
3. Lassen sich aus der Dynamik des Microenvironments Rückschlüsse auf spezifische Eigenschaften der Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen im Rezidiv ziehen?
4. Lassen sich aus den Betrachtungen der Dynamik des Microenvironments prognostische oder prädiktive Surrogatmarker ableiten?

2. Material und Methoden

2.1. Auswahl des Patientenkollektivs

Um das geplante Projekt zu realisieren, musste zunächst eine entsprechende Kohorte zusammengestellt werden. Als Grundlage der Materialsuche diente das Lymphknotenregister des Instituts für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. In diesem Register werden Paraffinproben von Patienten mit Erkrankungen des lymphatischen Systems archiviert. Zunächst wurde die Datenbank mit Hilfe des Schlüssels der Internationalen Klassifikation der Krankheiten für die Onkologie nach Patienten mit der Diagnose klassisches Hodgkin-Lymphom durchsucht. Dabei wurde ein Zeitraum von circa 15 Jahren ausgewählt. War ein Patient mit klassischem Hodgkin-Lymphom identifiziert, so wurde im nächsten Schritt überprüft, ob weitere Paraffinproben des entsprechenden Patienten vorliegen und somit möglicherweise ein Rezidiv der Erkrankung besteht. Die Datenbank gezielt nach Patienten mit einem Rezidiv ihrer Erkrankung zu durchsuchen ist aktuell leider nicht möglich.

Letztlich wurden auf diese Art und Weise 33 Patienten identifiziert, welche ein oder mehrere Rezidive ihres klassischen Hodgkin-Lymphoms erlitten haben. Im Anschluss wurde überprüft, ob von jedem Patienten die Paraffinblöcke vorhanden sind, eine entsprechende Größe haben und dementsprechend noch über genügend Lymphknotenmaterial verfügen. Es wurde ebenfalls überprüft, ob die entsprechenden Proben Lymphknotengewebe enthalten oder aber aus anderem Gewebe bestehen. Mikroskopisch wurde im nächsten Schritt die Morphologie überprüft und analysiert, ob das Lymphom in den entsprechenden Schnitten vorhanden ist. Ebenfalls wurde überprüft, ob die Diagnose, die zum Teil vor mehr als 15 Jahren gestellt wurde, nach aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen noch zutreffend ist. Auf diese Art und Weise wurden final 17 Patienten (Testkohorte) ausgewählt, bei welchen eine korrekte Diagnose vorhanden war und die Paraffinblöcke in entsprechender Qualität zur Verfügung standen (n=17 Patienten).

Bei drei Patienten waren jeweils Biopsien von zwei Rezidiven vorhanden (n=37 Proben gesamt).

Nach Erhalt der Ergebnisse aus der Genexpressionsanalyse wurde eine zweite unabhängige Kohorte zur Validierung der Ergebnisse auf Proteinebene zusammengestellt. Dazu stellten die pathologischen Institute der Universitäten Lübeck, Tübingen und Frankfurt weitere Paraffinproben von Patienten mit rezidiviertem klassischem Hodgkin-Lymphom zur Verfügung. Die Paraffinproben wurden nach denselben Kriterien, wie die Testkohorte, selektiert. Somit stand letztendlich eine unabhängige Kohorte mit 14 Patienten zur immunhistochemischen Validierung zur Verfügung (n= 14 Patienten).

Die mittlere Zeit zwischen Primär- und Rezidivbiopsie betrug in der Testkohorte 38 Monate (12 Monate bis 98 Monate). In der Validierungskohorte waren es 30 Monate (12 Monate bis 105 Monate). Klinische Daten der Patienten lagen aufgrund des retrospektiven Charakters der Studie nicht vor.

Es wurde entsprechend den Empfehlungen der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zur Verwendung von Gewebeproben aus dem Archiv des Lymphknotenregisters gearbeitet. Patientenbezogene Daten wurden nach der Datenbankrecherche umgehend anonymisiert und auch nur anonymisiert veröffentlicht.

2.2. Histopathologie und Immunphänotyp

Der histologische Subtyp und der Immunphänotyp der einzelnen Proben wurde mikroskopisch, gemeinsam mit mindestens einem erfahrenen Hämatopathologen, bestimmt. Anhand von maschinellen Giemsa- und Hämatoxylin-Eosin-Färbungen wurde der histologische Subtyp bestimmt. Zur Bestimmung des Immunphänotyps wurden Färbungen der, für die Diagnostik des klassischen Hodgkin-Lymphoms, üblichen Marker angefertigt. Dazu zählen: CD20, CD30, CD15, CD3, PAX5 und LMP1. Diese Färbungen wurden maschinell entsprechend der üblichen pathologischen Standards hergestellt. Es erfolgte die mikroskopische Auswertung und sobald ein Teil einer Hodgkin-Reed-Sternberg Zelle eingefärbt war, wurde dieser Marker als positiv gewertet.

Um eine Aussage über den Anteil der Makrophagen zu treffen, wurden zusätzlich von Hand CD68 und CD163 gefärbt. Nach Abschluss der Genexpressionsanalyse wurde das Markerpanel noch um S100 ergänzt, welches maschinell gefärbt wurde. Mit der Validierungskohorte wurde in selber Weise verfahren. Es wurde der entsprechende Immunphänotyp bestimmt, sowie die Färbungen für S100 und CD68 durchgeführt. Auf den zweiten Makrophagenmarker CD163 wurde jedoch verzichtet, da die Ergebnisse der Genexpression im Hinblick auf den Makrophagengehalt keine signifikanten Änderungen zeigten.

2.3. Erstellung der immunhistochemischen Färbungen für CD68 und CD163

Grundprinzip einer solchen immunhistochemischen Färbung ist die Antikörper-Antigen-Reaktion. Der eingesetzte primäre Antikörper bindet spezifisch an das entsprechende Antigen bzw. dessen Epitop. Im weiteren Verlauf wird ein zweiter Antikörper, der sekundäre Antikörper, verwendet, welcher sich gegen den zuvor verwendeten Primärantikörper richtet und an diesen bindet. Dieser

Sekundärantikörper ist mit einem Enzym gekoppelt und durch eine Enzym-Substratreaktion entsteht letztlich ein sichtbarer Farbstoff.

Die benötigten Schnitte für die Färbungen von CD68 und CD163 wurden am Schlittenmikrotom angefertigt und wiesen eine Dicke von 2-3 µm auf.

Im ersten Schritt des Färbeprotokolls wurde zunächst das Paraffin mittels Xylol entfernt und durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert.

Im nächsten Schritt wird mit einer Mischung aus Methanol und Wasserstoffperoxid die endogene Peroxidase blockiert. Dieser Schritt ist nötig um endogene Enzyme im Präparat zu blockieren und somit eine Hintergrundreaktion und ein falsch positives Ergebnis zu vermeiden. Anschließend erfolgt die Demaskierung der Antigene durch Kochen für 3 bis 4 Minuten in Citratpuffer bei pH 6. Nun wird der primäre Antikörper aufgetragen. Der Antikörper wurde jedoch nicht pur aufgetragen, sondern sowohl bei CD68, als auch bei CD163 in einer 1:50 Verdünnung. Nach einer Stunde Einwirkzeit wurden die Präparate in Tris-Waschpuffer gespült. Im Folgenden wurde der Sekundärantikörper auf das Präparat gegeben. Dieser wirkt für weitere 30 Minuten ein. Nach erneutem Waschen mit Tris-Waschpuffer erfolgte die Zugabe von DAB (Diaminobenzidintetrahydrochlorid). Das DAB ist hierbei das Substrat für das Enzym (in diesem Fall Peroxidase), welches an den Sekundärantikörper gekoppelt ist. Es entsteht eine braune Farbreaktion. Nach Spülen in Wasser wird nun eine Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer zur besseren Kontrastgebung durchgeführt. Anschließend erfolgt nochmaliges Spülen in Wasser und abschließend die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe, sowie Xylol. Aus Xylol heraus wurden die Präparate maschinell mit dem Eindeckmedium Pertex eingedeckelt.

Verwendete Antikörper:

CD68: Dako M0876, Klon PG-M1, Herkunft: Maus, Verdünnung 1:50, Histofine

CD163: Leica-NCL-CD163, Klon 10D6, Herkunft: Maus, Verdünnung 1:50, Histofine

S100: Dako ER1-pH6, Herkunft: Hase, Leica Bond Färbeautomat

2.4. Auswertung der Färbungen für CD68, CD163 und S100

Bei der Auswertung der Färbungen für CD68, CD163 und S100 stand im Gegensatz zum klassischen Markerpanel für die Diagnostik (CD20, CD30, CD15, CD3, PAX5 und LMP1) nicht allein die Positivität der Probe für den entsprechenden Marker im Vordergrund, sondern es sollte eine Quantifizierung der, für den Marker, positiven Zellen vorgenommen werden. Diese Quantifizierung wurde mit Hilfe des Hauptgesichtsfeldes am Lichtmikroskop vorgenommen. Dafür wurde eine Hodgkin-Reed-Sternberg Zelle identifiziert und bei 1000-facher Vergrößerung (mit Ölimmersion) in der Mitte des Feldes eingestellt. Anschließend wurden alle, für den entsprechenden Marker, positiven Zellen im Gesichtsfeld ausgezählt. Dieser Vorgang wurde für jeden Marker dreimal durchgeführt und ein Durchschnitt für die spätere Analyse ermittelt. Mit dieser Vorgehensweise wurde versucht, das Microenvironment in unmittelbarer Nähe zur Tumorzelle zu erfassen.

2.5. Genexpressionsanalyse

Zur Analyse der Genexpression wurde die Technologie der Firma Nanostring (nCounter) angewendet. Mittels dieses Verfahrens zur Genexpressionsanalyse ist es möglich direkt die ursprüngliche RNA zu analysieren, ohne die RNA mittels reverser Transkription in cDNA zu überführen. An die zu detektierende RNA lagert sich jeweils ein spezifisches Sondenpaar an. Dieses Sondenpaar besteht aus einer

„capture“-Sonde und einer „reporter“-Sonde. Die sogenannte „capture“-Sonde besteht aus 35-50 komplementären Basen und Biotin. Das Biotin hat die Aufgabe, die später gebildeten Komplexe zu immobilisieren, sodass sie gescannt und gezählt werden können. Die „reporter“-Sonde besteht ebenfalls aus 35-50 komplementären Basen und einem spezifischen Farbbarcode. Jedes Gen, welches man detektieren möchte, besitzt seinen eigenen Farbbarcode. Durch Hybridisierung entsteht ein Komplex aus einem RNA-Molekül und seinem spezifischen Sondenpaar. Im Gerät werden dann die überschüssigen Sonden entfernt, die entstandenen Komplexe in dieselbe Richtung ausgerichtet und immobilisiert, um die Farbbarcodes mittels eines automatischen Fluoreszenzmikroskops zu scannen und anschließend auszuzählen (Geiss et al. 2008).

Zunächst muss zur Durchführung der Genexpressionsanalyse die RNA aus dem Paraffinmaterial gewonnen werden. Dazu wurde das ExpressArt FFPE Clear RNA Ready Kit (AmpTec Hamburg, Deutschland) verwendet und nach Herstellervorgabe und wie bereits bei Masqué-Soler et al. (2013) beschrieben, vorgegangen.

Nach Extraktion der RNA wurden die Proben zunächst auf ihren RNA-Gehalt und ihre Reinheit analysiert, um zu sehen ob, aus dem Paraffinmaterial genug RNA in entsprechender Qualität für die Analyse mit dem nCounter gewonnen werden konnte. Zum einen erfolgte dies mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent, Santa Clara, USA). Dieses System basiert auf einer automatisierten Elektrophorese, mit welcher man feststellen kann, wieviel RNA-Gehalt in den einzelnen Proben vorhanden ist. Als zweites Gerät wurde der NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Spektralphotometer zur Bestimmung der Reinheit der RNA, sowie zu ihrer Quantifizierung. Beide Methoden haben den Vorteil, dass jeweils nur kleinste Mengen der extrahierten RNA zur Analyse benötigt werden, da aus Paraffinmaterial in der Regel nur wenig RNA extrahiert werden kann.

Nachdem alle Proben auf ihre entsprechende Qualität überprüft wurden, wurde die Genexpressionsanalyse entsprechend der Herstellervorgabe durchgeführt. Es wurde das Immunology Code Set Kit (nCounter, nanoString, Seattle, USA) verwendet.

Dieses enthält 594 Gene, welche mit dem Immunsystem assoziiert sind. In diesen 594 Genen sind auch 15 Haushaltsgene enthalten.

Nach der Genexpressionsanalyse wurde eine Qualitätskontrolle der analysierten RNA mittels der Software NanoStringQCPro Version 1.8.0 (Bioconductor) durchgeführt, um mögliche Ausreißer innerhalb der Proben zu erkennen. Aufgrund eines zu niedrigen RNA-Gehaltes wurde die Anzahl der Paare (Primär- und Rezidivbiopsie), welche in die Analyse eingeflossen sind, von n=17 auf n=14 reduziert (davon 1 Fall mit 2 Rezidiven) reduziert.

2.6. Statistische Analysen

Um Genexpressionsdaten eines Verfahrens der Genexpressionsanalyse vergleichbar mit anderen Verfahren zu machen, ist es notwendig, die Daten zu normalisieren.

Dafür wurde zuerst der Logarithmus zur Basis zwei (\log_2) aus den Rohdaten berechnet. Anschließend wurde die individuelle mediane Genzahl von jeder Probe substrahiert. Als nächster Schritt wurde der Median aus allen Medianen der einzelnen Proben zu jeder Probe addiert. Somit kann man gewährleisten, dass man für jedes Gen die positiv normalisierten Zählwerte erhält.

Eine differentielle Genexpressionsanalyse wurde mit Hilfe verallgemeinerter linearer Modelle der negativen Binominalfamilie durchgeführt. Diese sind in der Software NanoStringDiff Version 1.6.0 vorhanden (Malkov et al. 2009; Wang et al. 2016; NanoStringDiff).

Zusätzlich wurde das Design der Kohorte, also die gepaarten Proben, in das Modell eingeschlossen. Die Haushaltsgene (n=15) wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die resultierenden p-Werte wurden für Mehrfachtests nach Benjamini und Hochberg angepasst (Benjamini und Hochberg 1995). Das Signifikanzniveau für die differentielle Expression wurde auf eine Falscherkennungsrate (FDR) von 0,05 festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Verteilung der histologischen Subtypen

Die Verteilung der histologischen Subtypen wurde zunächst für alle 37 Proben betrachtet. Das heißt es wurden alle Proben unabhängig von ihrem Status (Primär- oder Rezidivbiopsie) gemeinsam ausgewertet.

Es zeigte sich, dass die überwiegende Mehrheit der Proben dem Subtyp der Nodulären Sklerose zuzuordnen sind (59,5%, 22/37). Am zweithäufigsten zeigte sich der Mischtyp (37,8%, 14/37). Lediglich ein Fall gehört der Gruppe der lymphozytenreichen klassischen Hodgkin-Lymphome an (2,7%, 1/37). Das lymphozytenarme klassische Hodgkin-Lymphom ist in der Testkohorte nicht vorhanden. In Tabelle 1 wird die Verteilung dargestellt.

Noduläre Sklerose	Mischtyp	lymphozytenreich	lymphozytenarm
22/37 (59,5%)	14/37 (37,8%)	1/37 (2,7%)	0/37 (0%)

Tabelle 1: Absolute und prozentuale Verteilung der histologischen Subtypen

3.2. Veränderungen des histologischen Subtyps zwischen Primär- und Rezidivbiopsie

Die Analysen des histologischen Subtyps zwischen Primär- und Rezidivbiopsie zeigte sich in der Mehrzahl der Fälle ohne Dynamik (83%). In neun Paaren war der Subtyp der Nodulären Sklerose stabil über den Primärfall und das Rezidiv (53%, 9/17). Der Mischtyp zeigte sich in fünf Paaren unverändert (29%, 5/17).

Es war allerdings auch in wenigen Paaren eine Veränderung des histologischen Subtyps zu verzeichnen. Diese Veränderung erfolgte vom Mischtyp zur Nodulären Sklerose und in Fällen mit mehr als einer Rezidivbiopsie auch in komplexen Mustern (18%, 3/17). Eine Übersicht ist in Tabelle 2 dargestellt.

Mischtyp Primär und Rezidiv	5/17 (29%)
Noduläre Sklerose Primär und Rezidiv	9*/17 (53%)
Mischtyp Primär und Noduläre Sklerose im Rezidiv	3**/17 (18%)
*Ein Patient Primär Noduläre Sklerose, Mischtyp im ersten und Noduläre Sklerose im 2. Rezidiv.	
** Ein Patient Primär Mischtyp, Lymphozyten-reich im ersten Rezidiv und Noduläre Sklerose im zweiten Rezidiv.	

Tabelle 2: Änderungen im histologischen Subtyp

3.3. Veränderungen im Immunphänotyp der Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen

Bei zwei von fünf erhobenen Parametern gab es keine Veränderungen im Immunphänotyp. CD30 war in allen 17 Paaren unverändert positiv (100 %, 17/17). Der EBV-Status, abgebildet durch LMP1, änderte sich ebenfalls nicht. Entweder lag ein positiver EBV-Status (53 %, 9/17) vor oder der EBV-Status blieb unverändert negativ (47%, 8/17).

Wenig Veränderung ergab sich hinsichtlich des Status für CD3. Lediglich in einem Fall veränderte sich der Status von positiv zu negativ (6%, 1/17). Alle anderen Fälle waren negativ für CD3 (94%, 16/17). CD20 und CD15 präsentierten sich variabel in ihrem Verhalten. Die Merkmale waren in einigen Fällen stabil über Primär- und Rezidivbiopsie. In anderen Fällen fand ein Wechsel von positiv zu negativ oder von negativ zu positiv statt.

In der folgenden Tabelle sind diese Veränderungen im Einzelnen dargestellt.

Primär/Rezidiv	CD20	CD3	CD30	CD15	LMP1
positiv/positiv	0/17 (0%)	0/17 (0%)	17/17 (100%)	7/17 (41%)	9/17 (53%)
positiv/negativ	4/17 (24%)	1/17 (6%)	0/17 (0%)	3/17 (18%)	0/17 (0%)
negativ/positiv	2/17 (12%)	0/17 (0%)	0/17 (0%)	6/17 (35%)	0/17 (0%)
negativ/negativ	11/17 (65%)	16/17 (94%)	0/17 (0%)	1/17 (6%)	8/17 (47%)

Tabelle 3: Veränderungen im Immunphänotyp

3.4. Genexpressionsanalyse

Insgesamt wurden 594 Gene analysiert. Dabei zeigte sich bei acht Genen eine signifikante Steigerung der Expression im Rezidiv und bei 20 Genen eine signifikante Verminderung der Expression im Rezidiv ($p \leq 0.05$). Bei diesen Genen zeigte sich in mindestens 75% aller Fälle (11/14 Paaren) eine beständige Regulationsrichtung (log Fold Change).

Gene, welche für T-Zellen kodieren, zeigten sich im Rezidiv signifikant vermindert. Zu diesen Genen zählen zum Beispiel CD3E oder aber auch CD7. Eine signifikante Steigerung zeigte sich für Gene aus der S100 Familie (S100A8, S100A9). Auch CD163, ein Gen, welches einen Makrophagenmarker darstellt, wurde betrachtet. Hier konnte weder eine signifikante Steigerung noch eine signifikante Verminderung der Expression im Rezidiv festgestellt werden. Ebenso verhalten sich Gene, welche B-Zellen widerspiegeln (CD79A, CD22, CD79B, CD19).

Die weiteren Gene, welche eine signifikante Verminderung oder Steigerung der Expression zeigen, kodieren unspezifisch für Bestandteile des Immunsystems und aus ihnen lässt sich kein Hinweis auf weitere, im klassischen Hodgkin-Lymphom interessante, Zellpopulationen ableiten.

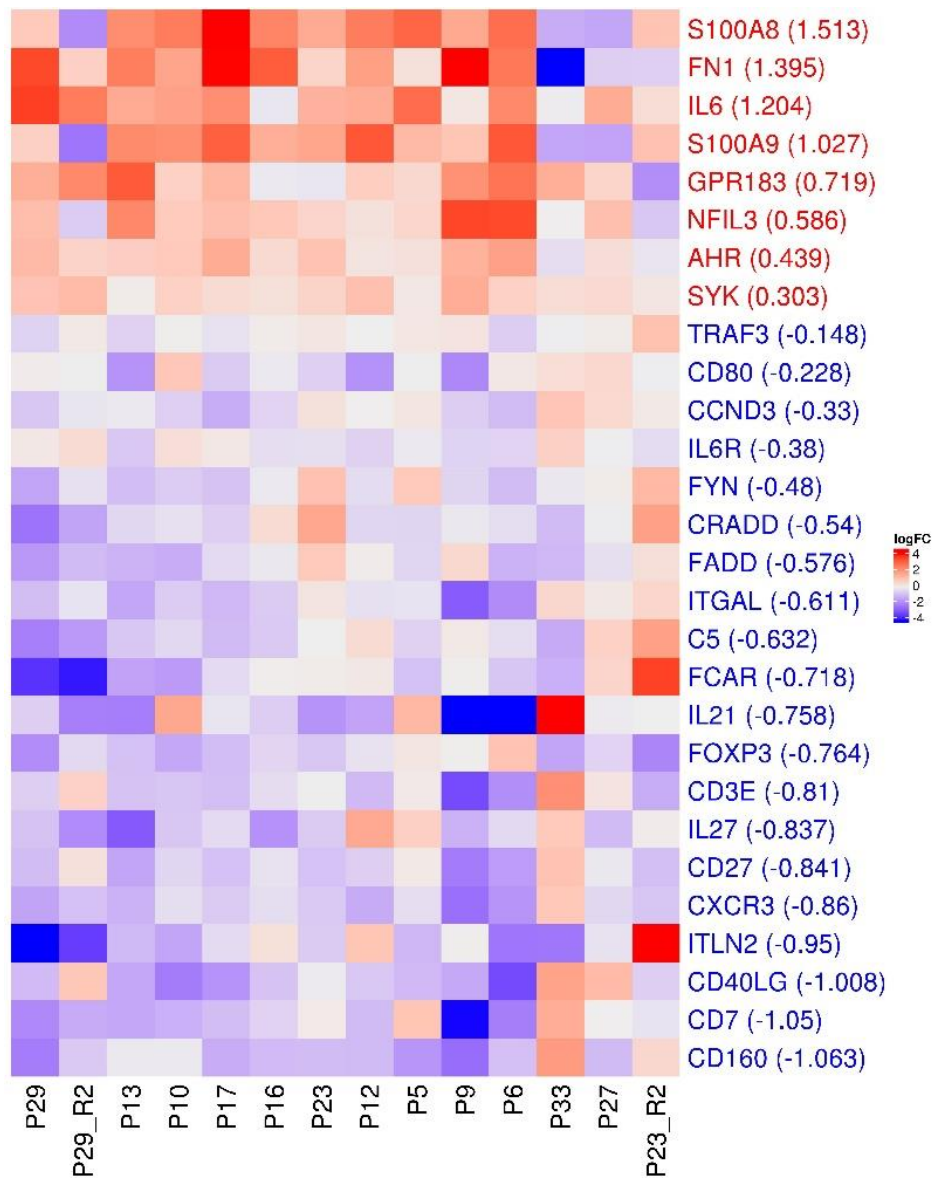


Abbildung 1: Darstellung der 8 signifikant vermehrt exprimierten und 20 signifikant vermindert exprimierten Genen im Rezidiv mittels Heatmap ($p \leq 0.05$) Die Farbe kodiert die jeweilige Regulationsrichtung (rot= vermehrte Expression; blau=verminderte Expression).

3.5. Validierung der Genexpression mittels Immunhistochemie

Für die Validierung mittels Immunhistochemie wurden die Marker S100, CD68 und CD163 ausgewählt. CD68 und CD163 wurden ausgewählt, da sie in zuvor durchgeführten Studien mit der Prognose der Erkrankung assoziiert waren. Sie sind beide als typische Makrophagenmarker bekannt. S100 ist in der Genexpressionsanalyse mit einer signifikanten Expressionssteigerung aufgefallen. Daher wurde dieser Marke ebenfalls im Rahmen der immunhistochemischen Färbung analysiert. Bisher ist S100 noch nicht im Zusammenhang mit dem klassischen Hodgkin-Lymphom in Erscheinung getreten und war dementsprechend auch noch nicht Teil wissenschaftlicher Untersuchungen. Typischerweise wird S100 von Glia- und Ependymzellen im zentralen Nervensystem exprimiert, weiterhin weisen auch Melanozyten diesen Marker auf.

3.5.1 CD163

Für den Makrophagenmarker CD163 wurde lediglich die eigene Testkohorte zur Validierung verwendet.

Für CD163 konnte das Ergebnis aus der Genexpressionsanalyse bestätigt werden. Auch auf Proteinebene mittels immunhistochemischer Färbung konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen Primär- und Rezidivbiopsie festgestellt werden ($p = 0,3068$; gepaarter T-Test).

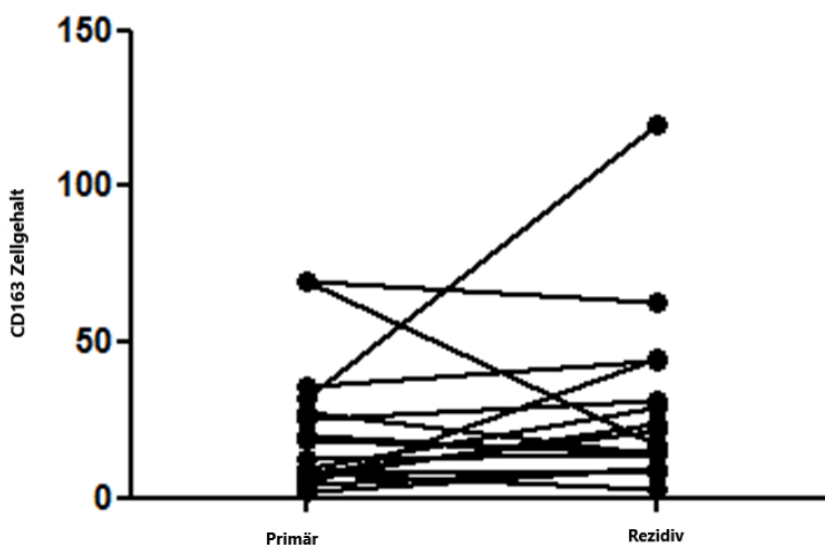


Abbildung 2: Darstellung des CD163 Zellgehaltes in Primär- und Rezidivbiopsie.

Auf der X-Achse stellt ein Punkt jeweils die Primärbiopsie dar, welche durch eine Linie mit der entsprechenden Rezidivbiopsie verbunden ist. Auf der Y-Achse ist der Durchschnitt des CD163 Zellgehaltes dargestellt, welcher aus 3 Hauptgesichtsfeldern ermittelt wurde ($p = 0,3068$; gepaarter T-Test).

3.5.2. CD68

Für den Marker CD68 wurden die Färbungen sowohl für die eigene Testkohorte, als auch für die unabhängig Validierungskohorte durchgeführt. Es konnte auch hier analog zu CD163 weder an der eigenen Testkohorte ($p = 0,2403$; gepaarter T-Test), noch an der unabhängigen Validierungskohorte ($p = 0,7839$; gepaarter T-Test) ein signifikanter Unterschied zwischen Primär – und Rezidivbiopsie festgestellt werden.

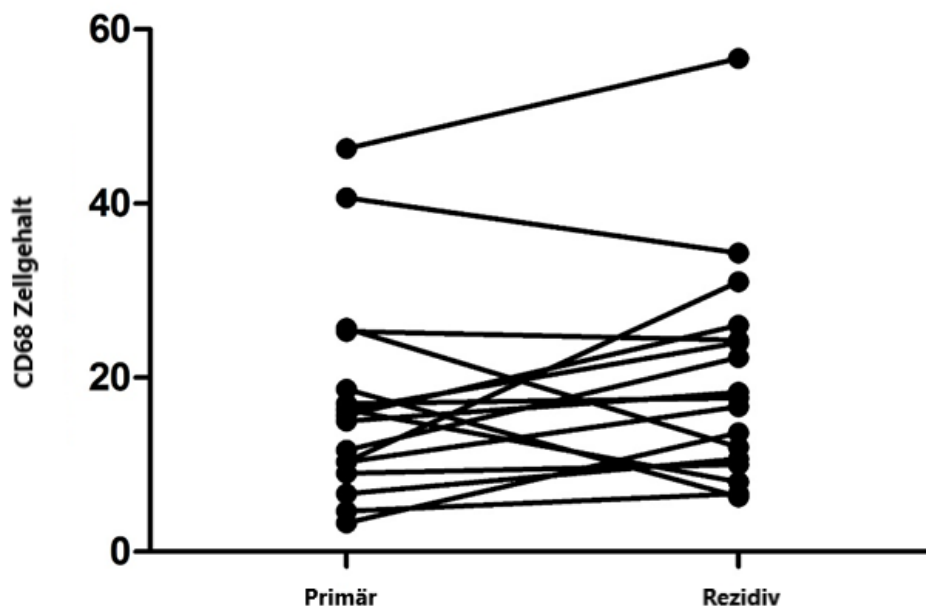


Abbildung 3: Darstellung des CD68 Zellgehaltes in Primär- und Rezidivbiopsie in der eigenen Testkohorte. Auf der X-Achse stellt ein Punkt jeweils die Primärbiopsie dar, welche durch eine Linie mit der entsprechenden Rezidivbiopsie verbunden ist. Auf der Y-Achse ist der Durchschnitt des CD68 Zellgehaltes dargestellt, welcher aus 3 Hauptgesichtsfeldern ermittelt wurde ($p = 0,2403$; gepaarter T-Test).

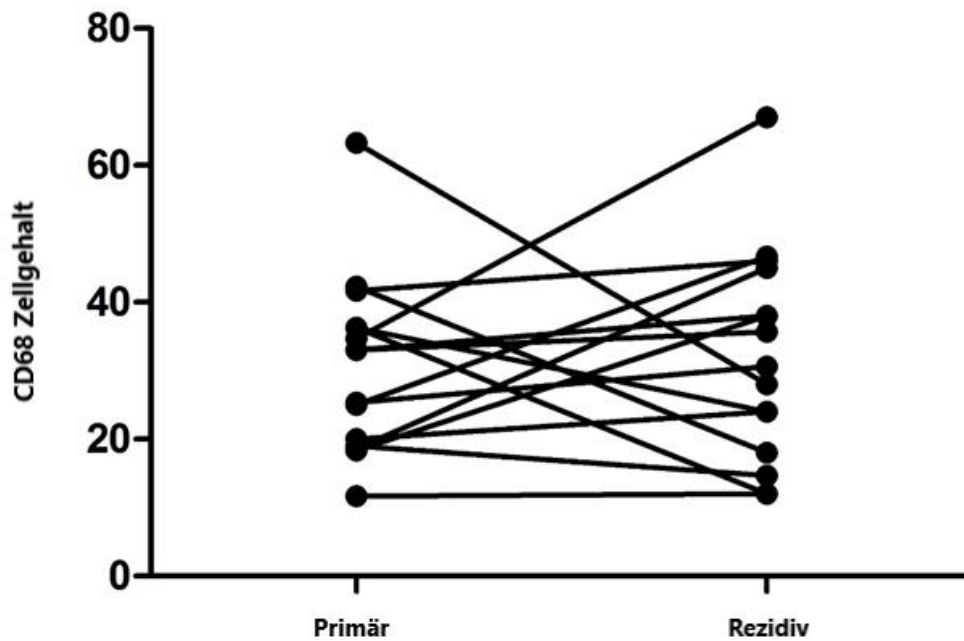


Abbildung 4: Darstellung des CD68 Zellgehaltes in Primär- und Rezidivbiopsie in der Validierungskohorte. Auf der X-Achse stellt ein Punkt jeweils die Primärbiopsie dar, welche durch eine Linie mit der entsprechenden Rezidivbiopsie verbunden ist. Auf der Y-Achse ist der Durchschnitt des CD68 Zellgehaltes dargestellt, welcher aus 3 Hauptgesichtsfeldern ermittelt wurde ($p = 0,7839$; gepaarter T-Test).

3.5.3. S100

Im Gegensatz zur Genexpressionsanalyse verhielt sich der S100 Zellgehalt in der immunhistochemischen Analyse zwischen Primär- und Rezidivbiopsie genau umgekehrt. Die Rezidivbiopsien wiesen einen niedrigeren Gehalt an S100 positiven Zellen auf, als die Primärbiopsien. Weiterhin war auffällig, dass die S100 positiven Zellen sehr ungleichmäßig im Lymphomgewebe verteilt waren (Abbildung 5). Zusätzlich zeigten die gefärbten Zellen sehr unterschiedliche Morphologien (Abbildung 6).

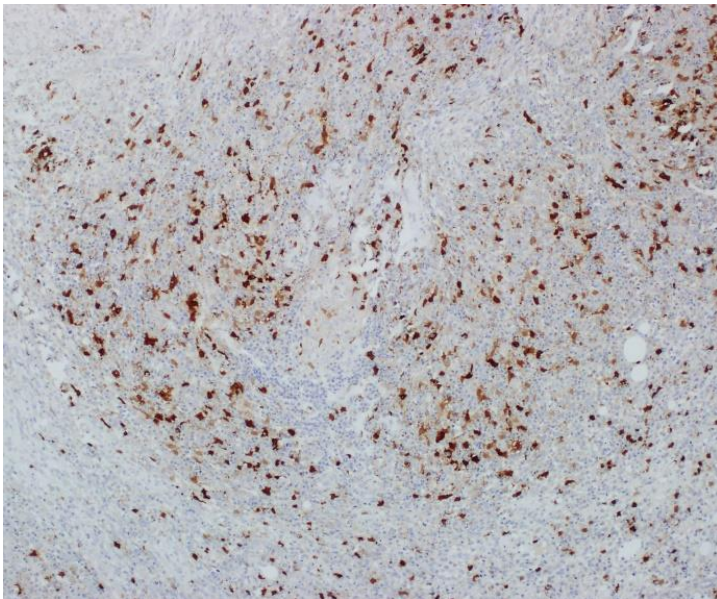


Abbildung 5: Es wird die ungleichmäßige Verteilung der S100 positiven Zellen dargestellt, welche jedoch mit der nodulären Struktur des klassischen Hodgkin-Lymphoms assoziiert ist.

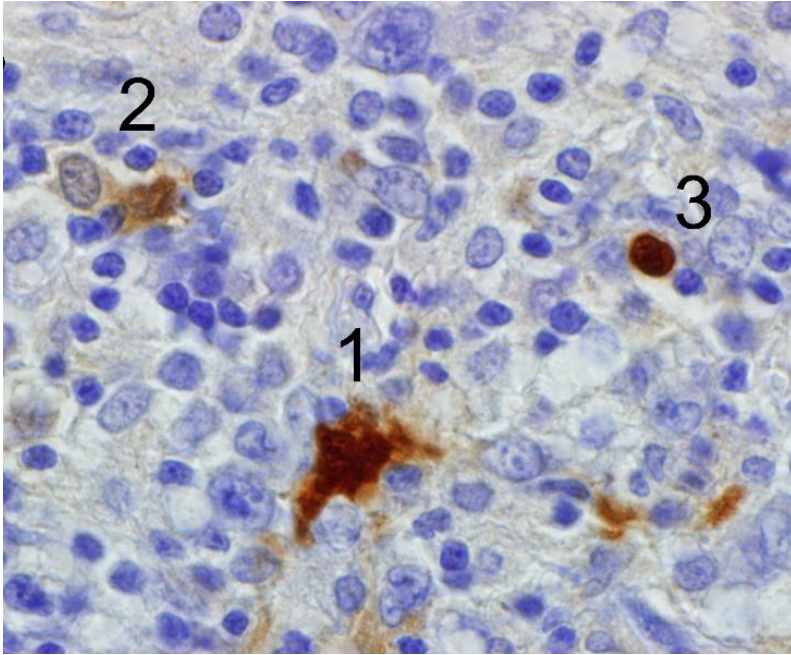


Abbildung 6: Die S100 positiven Zellen ähneln großen dendritischen Zellen (1), Makrophagen ähnlichen Zellen (2), aber auch in wenigen Fällen kleinen lymphoiden Zellen (3).

Der Unterschied der abnehmenden Zellzahl ist zwar optisch, vor allem in der Validierungskohorte, deutlich in der Grafik (Abbildung 7 und 8) sichtbar, erreicht jedoch keine statistische Signifikanz. Weder in der eigenen Testkohorte ($p= 0,0891$; gepaarter T-Test), noch in der Validierungskohorte ($p= 0,8836$; gepaarter T-Test).

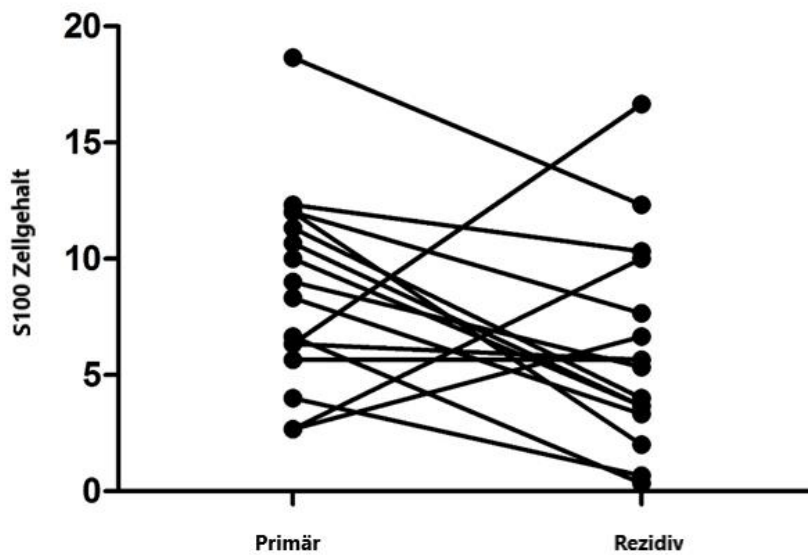


Abbildung 7: Darstellung des S100 Zellgehaltes in Primär- und Rezidivbiopsie in der eigenen Testkohorte. Auf der X-Achse stellt ein Punkt jeweils die Primärbiopsie dar, welche durch eine Linie mit der entsprechenden Rezidivbiopsie verbunden ist. Auf der Y-Achse ist der Durchschnitt des S100 Zellgehaltes dargestellt, welcher aus 3 Hauptgesichtsfeldern ermittelt wurde ($p= 0,0891$; gepaarter T-Test).

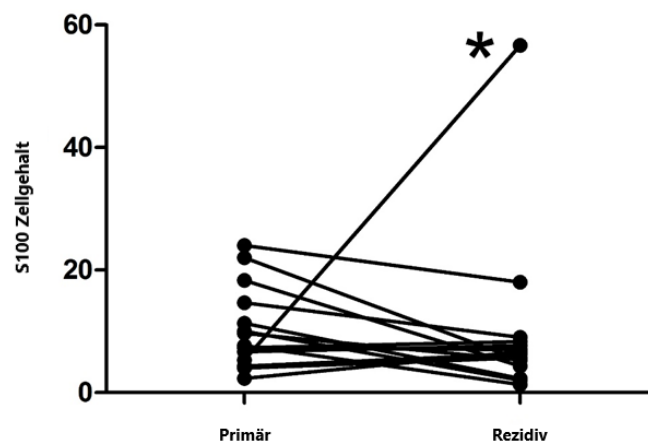


Abbildung 8: Darstellung des S100 Zellgehaltes in Primär- und Rezidivbiopsie in der Validierungskohorte. Auf der X-Achse stellt ein Punkt jeweils die Primärbiopsie dar, welche durch eine Linie mit der entsprechenden Rezidivbiopsie verbunden ist. Auf der Y-Achse ist der Durchschnitt des S100 Zellgehaltes dargestellt, welcher aus 3 Hauptgesichtsfeldern ermittelt wurde ($p = 0,8836$; gepaarter T-Test).

Der in Abbildung acht mit Stern markierte Fall stellt eine Besonderheit dar. Der Anstieg der S100 positiven Zellen wurde durch die Anwesenheit von S100 positiven Granulozyten bedingt. Dieses Phänomen konnte in keinem anderen Fall beobachtet werden. Schließt man diesen Fall aus der Analyse aus, weisen die Rezidivbiopsien einen signifikant verminderten Gehalt an S100 positiven Zellen auf ($p = 0,0235$; gepaarter T-Test).

4. Diskussion

Im klassischen Hodgkin-Lymphom besteht der größte Teil der Tumormasse aus nicht-neoplastischen Zellen des Immunsystems. Anhand der unterschiedlichen Zusammensetzung des Microenvironments konnten in den letzten Jahren prognostische Faktoren abgeleitet werden, um eine Aussage über den Verlauf der Erkrankung zu treffen und möglicherweise auch neue therapeutische Ziele ableiten zu können.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren Signaturen im Microenvironment identifizieren können, welche mit der Prognose der Erkrankung assoziiert sind (Chetaille et al. 2009; Sánchez-Aguilera et al. 2006; Steidl et al. 2010). Im Fokus standen hier vor allem die tumorassoziierten Makrophagen, welche mit einer höheren Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv zu erleiden assoziiert sind (Sánchez-Aguilera et al. 2006; Steidl et al. 2010).

Steidl et al. (2010) zeigten, dass eine hohe Zahl an CD68 positiven Makrophagen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit assoziiert ist, ein Rezidiv zu erleiden. Diese Aussage konnte des Weiteren in derselben Studie an einer unabhängigen Kohorte mittels Immunhistochemie, als in der Routinediagnostik anwendbare Technik, validiert werden. Dieses Ergebnis wurde u.a. sowohl von Kamper et al. (2011), als auch von Scott et al. (2013) bestätigt.

Ähnlich, wie z.B. Azambuja et al. (2012), konnten in unserer Kohorte keine signifikanten Unterschiede bei der Expression der Makrophagen-Marker festgestellt werden. In der Genexpressionsanalyse zeigte sich sowohl für CD68, als auch für CD163 variable Expressionslevel in den Primär- und Rezidivbiopsien ohne statistische Signifikanz. Auch in der Immunhistochemie konnte weder in unserer eigenen Kohorte noch in der unabhängigen Validierungskohorte signifikante Unterschiede gezeigt werden (wobei CD163 nur an der eigenen Kohorte gefärbt wurde). Anhand der zuvor publizierten Ergebnisse von Steidl et al. (2010) wäre zu erwarten gewesen, dass alle Primärbiopsien ein hohes Level an CD68 positiven Makrophagen enthalten. Bei der untersuchten Kohorte handelt es sich schließlich um

eine Kohorte, die ausschließlich aus Biopsien von rezidierten Erkrankungen besteht, somit aus Fällen, die letztlich alle eine schlechte Prognose hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens hatten. Anhand der Abbildung drei und vier zeigen sich bei der immunhistochemischen Färbung sowohl in der eigenen Testkohorte, als auch in der unabhängigen Validierungskohorte bereits im Bereich der Primärbiospien völlig unterschiedliche Zellgehalte an CD68 positiven Makrophagen. Ebenso verhält sich der Zellgehalt der Rezidivbiopsien.

Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten im Zusammenhang mit dem unterschiedlichen Studiendesign stehen. Steidl et al. (2010) nutzten Kryolympfknotenmaterial für die Genexpressionsanalyse. In dieser Studie wurde jedoch in Formalin fixiertes und Paraffin eingebettetes Material verwendet. Auch die verwendete Methode zur Genexpressionsanalyse unterscheidet sich. Steidl et al. (2010) verwendeten Microarrays (Affymetrics Array). Diese Studie nutzte die Nanostring Technologie. Mittels Nanostring wird die mRNA direkt analysiert, wohin gegen die Microarray Technologie einen Zwischenschritt nutzt und die mRNA in cDNA überführt und diese dann analysiert.

Ein weiterhin festzuhaltender Kritikpunkt ist die hier verwendete Auswertung der immunhistochemischen Färbung. Es wird lediglich ein kleiner Ausschnitt des Microenvironments in unmittelbarer Nähe der Tumorzelle erfasst und nicht das gesamte Gewebe. Somit gibt es möglicherweise besser geeignete Methoden, um die Gesamtheit des Gewebes zu erfassen. Weiterhin ist es bei dieser Art der Auswertung abhängig vom Untersucher, ab wann eine Zelle als positiv für den jeweiligen Marker gewertet wird. Somit ist es möglich, dass es bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen zu einer Interobserver-Variabilität kommt. Um diese ausschließen zu können, müssten die immunhistochemischen Färbungen von mehreren erfahrenen Histopathologen an unterschiedlichen Standorten ausgewertet werden.

Die softwaregestützte Bildanalyse des gesamten gefärbten Gewebes erweist sich hier als eine möglicherweise besser geeignete Methode. Mittels dieser Methode konnten

prognostische Faktoren für das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben identifiziert werden (Jachimowicz et al. 2021b).

Weiterhin konnten Jachimowicz et al. (2021b) zeigen, dass eine Interobserver-Variabilität ausgeschlossen werden kann.

Auch wenn es in den letzten Jahren große Fortschritte in der Therapie der Rezidiverkrankungen des klassischen Hodgkin-Lymphoms gab, sind bislang kaum Studien erfolgt, welche die Biologie des Lymphomgewebes im Primär- und Rezidivtumor untersuchen. Die einzige Studie welche bislang parallel zu dieser Arbeit die Untersuchung von sequentiellen Biopsien von Primärtumor und Rezidiv durchgeführt hat, ist von Chan et al. (2017) publiziert worden. Daher kann bislang weder gesagt werden, ob die bekannten und teils prognostischen Biomarker, welche in der Vergangenheit identifiziert worden, stabil zwischen Primär- und Rezidivbiopsie bleiben, noch ob das initial festgestellte Panel an Biomarkern auch für das Rezidiv übertragen werden kann (z.B. der Immunphänotyp).

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zu einer Veränderung des Phänotyps im Rezidiv nach initial erfolgter Chemotherapie kommt. Dies wird zum einen durch Veränderungen im morphologischen Subtyp, als auch zum anderen durch Veränderungen im Immunphänotyp der HRS-Zellen gezeigt. Die Änderung des morphologischen Subtyps zeigte sich, wie bei Chan et al. (2017), im Übergang des Mischtyps zur nodulären Sklerose. Der überwiegende Anteil der Hodgkin-Lymphome blieb hinsichtlich des morphologischen Subtyps unverändert und weist die für Deutschland typische Verteilung der Subtypen auf (GHSG, 2021). Damit kann, wie bereits bei Asano et al. (2006), Hess et al. (1994) oder auch van Spronsen et al. (1997) festgehalten werden, dass der histologische Subtyp keinen Einfluss auf die Prognose der Erkrankung hat. Denn letztlich handelt es sich bei dem betrachteten Patientenkollektiv um eine Gruppe, in der alle Patienten ein Rezidiv erlitten haben. Es sticht jedoch kein histologischer Subtyp besonders hervor.

Im Hinblick auf den Immunphänotyp konnten Änderungen im Status der Expression von CD15, CD3 und CD20 gezeigt werden. Der EBV-Status (Expression von LMP1) zeigte keine Veränderung.

Im Gegensatz zu Vasef et al. (1997), Chu et al. (1992) und Ohsawa et al. (1993) konnte anhand der Daten gezeigt werden, dass CD30 in den Primär- und Rezidivbiopsien konstant exprimiert wird. Somit stellt CD30 auch in der Rezidiverkrankung ein gutes Therapieziel dar.

Dementsprechend hat sich die Einführung der Immuncheckpoint-Inhibitoren, welche potenziell die Interaktion zwischen Hodgkin-Reed-Sternberg Zelle und Mikroenvironment stören, als sehr effektive Therapie im klassischen Hodgkin-Lymphom gezeigt (Ansell et al. 2015). Da jedoch die meisten Hodgkin-Lymphome initial bereits sehr gut mit der konventionellen Chemotherapie therapiert werden können, werden die neu entwickelten Medikamente wie z.B. das CD-30 Antikörper-Wirkstoffkonjugat Brentuximab-Vedotin überwiegend an Patienten mit einem Rezidiv der Erkrankung eingesetzt (Momotow et al. 2021; Bennani-Baiti et al. 2016). Auch der Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren hat sich als sehr effektiv im Rahmen der Rezidivtherapie gezeigt. Der Fokus liegt hier auf der PD-1 Blockade (Sasse et al. 2020).

In der aktuellen HD-21 Studie der GHSG (German Hodgkin Study Group) wird sogar der Einsatz eines modifizierten BEACOPP-Schemas (Bleomycin, Etoposid, Adriamycin, Vincristin (Oncovin), Procarbazin, Prednisolon) in Kombination mit dem CD-30 Antikörper-Wirkstoffkonjugat Brentuximab-Vedotin im Vergleich zum klassischen eBEACOPP-Schema (BEACOPP eskaliert) im Rahmen der Primärtherapie bei fortgeschrittenem Hodgkin-Lymphom untersucht. Ziel ist es, zu zeigen, dass die gleiche Wirksamkeit mit besserer Verträglichkeit durch das modifizierte BEACOPP-Schema in Kombination mit Brentuximab-Vedotin erreicht werden kann. Phase II wurde bereits abgeschlossen, aktuell befindet sich diese Studie in Phase III (Eichenauer et al. 2017).

Klinische Daten der untersuchten Primär- und Rezidivbiopsien dieser Arbeit lagen nicht vor und haben auch für die primäre Fragestellung keine Rolle gespielt. Es kann

nur vermutet werden, dass die Patienten entsprechend der gültigen Leitlinie mit konventioneller Chemotherapie behandelt worden sind. Inwieweit die verschiedenen Chemotherapie-Protokolle (ABVD (Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin) versus BEACOPP) oder der Einsatz der Checkpoint-Inhibitoren bzw. der Einsatz des CD30-Antikörpers die Zusammensetzung des Mikroenvironments oder auch den Immunphänotyp der Hodgkin-Reed-Sternberg Zelle beeinflussen, ist zum aktuellen Zeitpunkt weitestgehend unklar. Es gibt Hinweise darauf, dass das Microenvironment durch die Blockade des Checkpointmoleküls PD-1 beeinflusst wird (Momotow et al. 2021). Auch das eine vorhergegangene Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren den Patienten möglicherweise für eine darauffolgende Chemotherapie sensibilisiert, lässt mutmaßen, dass durch diese Therapie Veränderungen im Microenvironment stattfinden (Carreau et al. 2020).

Somit werden in der Zukunft weitere Studien von Primär- und Rezidivbiopsien des klassischen Hodgkin-Lymphoms im Vergleich notwendig sein. Besonderer Fokus sollte hier auf die Therapie, welche der Patient erhalten hat, gelegt werden. So könnten Einflüsse verschiedener Chemotherapieregime, der Einsatz von Checkpoint-Inhibitoren und Brentuximab-Vedotin auf die Biologie des Microenvironments untersucht werden. Interessant wäre hier sicher auch ein direkter Vergleich von Biopsien des Patienten vor und nach der entsprechenden Therapie. Möglicherweise könnten auf diesem Weg weitere Therapieansätze, vielleicht aber auch Risikofaktoren, welche die Prognose der Erkrankung beeinflussen, identifiziert werden.

Aktuelle Studien zeigen, dass die Genexpressionsanalyse nicht uneingeschränkt die Prognose der Erkrankung vorhersagen kann. Jachimowicz et al. (2021a) konnten zeigen, dass das von Scott et al. (2013) entwickelt Modell zur Vorhersage des Gesamtüberlebens anhand von Genexpressionsanalyse nicht uneingeschränkt anzuwenden ist. Das bestehende Modell wurde von Jachimowicz et al. (2021a) anhand von Proben von fortgeschrittenen Erkrankungsstadien von Patienten mit klassischem Hodgkin-Lymphom, welche mittels BEACOPP-Schemas behandelt

wurden, überprüft. Es konnte in dieser Patientenkohorte keine Vorhersage hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens oder des Gesamtüberlebens anhand des bestehenden Modells getroffen werden (Jachimowicz et al. 2021a).

Scott et al. (2013) entwickelten ihr Modell seiner Zeit anhand von Proben von Patienten, welche mittels ABVD therapiert worden waren. Ob das gewählte Chemotherapieregime einen Einfluss auf die Biologie des Microenvironments hat, ist bislang auch weitgehend unklar.

Erstmals rückte in dieser Studie eine Zellpopulation in den Vordergrund, welche bislang nicht im Zusammenhang mit dem klassischen Hodgkin-Lymphom untersucht wurde.

In der Genexpressionsanalyse zeigten S100 positive Zellen eine signifikant erhöhte Expression in den Rezidivbiopsien. Dieses Ergebnis konnte jedoch mittels Immunhistochemie nicht bestätigt werden, es zeigte sich sogar eher der Trend einer verminderten Anzahl dieser Zellen im Rezidiv. Eine statistische Signifikanz wurde allerdings nicht erreicht.

S100-Proteine sind eine Familie von kalziumbindenden Proteinen mit 24 Mitgliedern, welche von verschiedenen Zelltypen exprimiert werden. Die immunhistochemische Färbung für S100 wird normalerweise dazu verwendet, um interdigitierende dendritische Zellen darzustellen.

In der immunhistochemischen Färbung ähneln die S100 positiven Zellen morphologisch großen dendritischen Zellen, Makrophagen-ähnlichen Zellen, aber auch in wenigen Fällen kleinen lymphoiden Zellen.

Über die Funktion dieser Zellen im klassischen Hodgkin-Lymphom kann nur spekuliert werden. Möglicherweise funktionieren diese Zellen als antigenpräsentierende Zellen für T-Zellen.

Letztlich müssen Veränderungen im Microenvironment, welche mittels Genexpressionsanalyse nachgewiesen werden können, nicht zwangsweise Veränderungen der Zellzahlen im Gewebe darstellen. Vielleicht wird die Proteinexpression durch posttranskriptionelle Mechanismen beeinflusst.

Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die Expression des zu identifizierenden Gens bzw. Proteins innerhalb einer Zellpopulation unterschiedlich hoch sein kann. Diese Unterschiede im Expressionsspektrum werden jedoch mit der Immunhistochemie nicht abgebildet. Sobald eine Zelle das zu identifizierende Protein exprimiert und angefärbt wird, wird sie als positiv registriert.

Ein weiterer Kritikpunkt der Arbeit ist die geringe Größe der Kohorten. Bedenken muss man dabei jedoch, dass das Hodgkin-Lymphom per se eine seltene Erkrankung ist. Die Zahl der Neuerkrankungen liegt in Deutschland pro Jahr bei 2-3 auf 100.000. Die Erkrankung ist eine der am besten zu therapierenden Krebserkrankungen, sodass auch das Rezidivrisiko nicht sehr hoch ist. Um eine größere Kohorte zu generieren, muss diese Studie als Multicenterstudie in ganz Deutschland, besser noch ganz Europa, erfolgen. Damit könnten ähnliche Kohortengrößen wie bei Chan et al. (2017) oder auch Steidl et al. (2010) generiert werden. Damit könnte auch geklärt werden, ob es sich bei S100 positiven Zellen um einen Zufallsfund handelt oder ob S100 tatsächlich eine Rolle im Microenvironment des klassischen Hodgkin-Lymphom spielt und welche genaue Bedeutung ihm zukommt.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten vier Fragestellungen bearbeitet werden.

Zum einen sollte geklärt werden, ob die Zusammensetzung des Microenvironments im Rezidiv ebenso heterogen ist, wie im Gewebe vor der Therapie. Diese Fragestellung kann mit ja beantwortet werden. Es konnte gezeigt werden, dass es zwar zu Veränderungen des morphologischen Subtyps im klassischen Hodgkin-Lymphom kommt, aber im Großteil der untersuchten Biopsien konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Da der morphologische Subtyp im Wesentlichen durch das Microenvironment definiert wird, kann als davon ausgegangen werden, dass es im Rezidiv weiterhin heterogen ist. Auch die Genexpressionsanalyse zeigte hinsichtlich der Vielzahl der untersuchten Gene nur wenig signifikant vermindert oder erhöht exprimierte Gene, sodass man auch daran sehen kann, dass weiterhin eine Heterogenität im Microenvironment des Rezidivs vorhanden ist.

Eine weitere zu beantwortende Frage war, ob die Zusammensetzung des Microenvironments stabil zwischen dem Zeitpunkt der Erstmanifestation und dem Rezidiv ist. Im Rahmen der Genexpressionsanalyse fanden sich durchaus Gensignaturen, welche vermindert oder vermehrt im Rezidiv exprimiert wurden. Damit kann davon ausgegangen werden, dass die Zusammensetzung des Microenvironments nicht stabil ist, sondern eine gewisse Dynamik aufweist. Mittels der immunhistochemischen Analysen konnten diese Ergebnisse jedoch nicht validiert werden.

Aus der zu vermutenden Dynamik des Microenvironments konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch keine Rückschlüsse auf spezifische Eigenschaften der Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen im Rezidiv gezogen werden.

Die abschließend zu klärende Fragestellung war, ob sich aus den Betrachtungen der Dynamik des Microenvironment prognostische oder prädiktive Surrogatmarker ableiten lassen. Es gelang nicht, aus den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse eine spezifischen prognostischen oder prädiktiven Surrogatmarker abzuleiten, wie es Steidl et al. (2010) mit den Makrophagen gelang. Dennoch rückten erstmalig S100

positive Zellen im Zusammenhang mit dem Microenvironment in den Fokus. Hier ist jedoch mit Hilfe weiterer Studien zu klären, welche genaue Funktion diese Zellpopulation im klassischen Hodgkin-Lymphom erfüllt und ob sich daraus möglicherweise ein Surrogatmarker ableiten lässt.

6. Literaturverzeichnis

Ansell, Stephen M.; Lesokhin, Alexander M.; Borrello, Ivan; Halwani, Ahmad; Scott, Emma C.; Gutierrez, Martin et al. (2015): PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. In: *The New England journal of medicine* 372 (4), S. 311–319.

Asano, Naoko; Oshiro, Aya; Matsuo, Keitaro; Kagami, Yoshitoyo; Ishida, Fumihiro; Suzuki, Ritsuro et al. (2006): Prognostic significance of T-cell or cytotoxic molecules phenotype in classical Hodgkin's lymphoma. A clinicopathologic study. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (28), S. 4626–4633.

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. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 23 (3), S. 736–742.

Benjamini, Yoav; Hochberg, Yosef (1995): Controlling the False Discovery Rate. A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. In: *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 57 (1), S. 289–300.

Bennani-Baiti, Nabila; Thanarajasingam, Gita; Ansell, Stephen (2016): Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Hodgkin Lymphoma. In: *Expert review of clinical immunology* 12 (6), S. 673–679.

Carreau, Nicole A.; Pail, Orrin; Armand, Philippe; Merryman, Reid; Advani, Ranjana H.; Spinner, Michael A. et al. (2020): Checkpoint Blockade Treatment May Sensitize Hodgkin Lymphoma to Subsequent Therapy. In: *The oncologist* 25 (10), S. 878–885.

Chan, Fong Chun; Mottok, Anja; Gerrie, Alina S.; Power, Maryse; Nijland, Marcel; Diepstra, Arjan et al. (2017): Prognostic Model to Predict Post-Autologous Stem-Cell Transplantation Outcomes in Classical Hodgkin Lymphoma. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (32), S. 3722–3733.

Chetaille, Bruno; Bertucci, François; Finetti, Pascal; Esterni, Benjamin; Stamatoullas, Aspasia; Picquenot, Jean Michel et al. (2009): Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. In: *Blood* 113 (12), S. 2765–3775.

Chu, W. S.; Abbondanzo, S. L.; Frizzera, G. (1992): Inconsistency of the immunophenotype of Reed-Sternberg cells in simultaneous and consecutive specimens from the same patients. A paraffin section evaluation in 56 patients. In: *The American journal of pathology* 141 (1), S. 11–17.

Eichenauer, Dennis A.; Plütschow, Annette; Kreissl, Stefanie; Sökler, Martin; Hellmuth, Johannes C.; Meissner, Julia et al. (2017): Incorporation of brentuximab vedotin into first-line treatment of advanced classical Hodgkin's lymphoma. Final analysis of a phase 2 randomised trial by the German Hodgkin Study Group. In: *The Lancet. Oncology* 18 (12), S. 1680–1687.

Geiss, Gary K.; Bumgarner, Roger E.; Birditt, Brian; Dahl, Timothy; Dowidar, Naeem; Dunaway, Dwayne L. et al. (2008): Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. In: *Nature biotechnology* 26 (3), S. 317–325.

GHSB (2021): Das Hodgkin-Lymphom, Histologie. In: GHSB, 2021 <https://www.ghsb.org/histologie> (abgerufen am 03.04. 2021).

Hess, Jay L.; Bodis, Stephan; Pinkus, Geraldine; Silver, Barbara; Mauch, Peter (1994): Histopathologic grading of nodular sclerosis hodgkin's disease. Lack of prognostic significance in 254 surgically staged patients. In: *Cancer* 74 (2), S. 708–714.

Jachimowicz, Ron D.; Klapper, Wolfram; Glehr, Gunther; Müller, Horst; Haverkamp, Heinz; Thorns, Christoph et al. (2021a): Gene expression-based outcome prediction in advanced stage classical Hodgkin lymphoma treated with BEACOPP. In: *Leukemia* 35 (12), S. 3589–3593.

Jachimowicz, Ron Daniel; Pieper, Luise; Reinke, Sarah; Gontarewicz, Artur; Plütschow, Annette; Haverkamp, Heinz et al. (2021b): Whole-slide image analysis of the tumor microenvironment identifies low B-cell content as a predictor of adverse outcome in patients with advanced-stage classical Hodgkin lymphoma treated with BEACOPP. In: *Haematologica* 106 (6), S. 1684–1692.

Kamper, Peter; Bendix, Knud; Hamilton-Dutoit, Stephen; Honoré, Bent; Nyengaard, Jens R.; d'Amore, Francesco (2011): Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. In: *Haematologica* 96 (2), S. 269–276.

Klapper, W.; Stein, H.; Rosenwald, A. (2014): Neues von der Histopathologie des Hodgkin-Lymphoms. In: *Onkologie* 20 (5), S. 421–428.

Küppers, Ralf (2009): The biology of Hodgkin's lymphoma. In: *Nature reviews. Cancer* 9 (1), S. 15–27.

Küppers, Ralf; Engert, Andreas; Hansmann, Martin-Leo (2012): Hodgkin lymphoma. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (10), S. 3439–3447.

Malkov, Vladislav A.; Serikawa, Kyle A.; Balantac, Noel; Watters, James; Geiss, Gary; Mashadi-Hosseini, Afshin; Fare, Thomas (2009): Multiplexed measurements of gene signatures in different analytes using the Nanostring nCounter Assay System. In: *BMC research notes* 2, S. 80.

Masqué-Soler, Neus; Szczepanowski, Monika; Kohler, Christian W.; Spang, Rainer; Klapper, Wolfram (2013): Molecular classification of mature aggressive B-cell lymphoma using digital multiplexed gene expression on formalin-fixed paraffin-embedded biopsy specimens. In: *Blood* 122 (11), S. 1985–1986.

Momotow, Jesko; Borchmann, Sven; Eichenauer, Dennis A.; Engert, Andreas; Sasse, Stephanie (2021): Hodgkin Lymphoma-Review on Pathogenesis, Diagnosis, Current and Future Treatment Approaches for Adult Patients. In: *Journal of clinical medicine* 10 (5).

NanoStringQCPro: Quality metrics and data processing methods for NanoString mRNA gene expression data. R package version 1.6.0. [computer program]. 2017.

NanoStringDiff: Differential Expression Analysis of NanoString nCounter Data. R package version 1.6.0. [computer program]. 2015.

Ohsawa, M.; Aozasa, K.; Ikeda, H. (1993): Immunoreactivities of Reed-Sternberg cells and their variants in the sequential biopsy of Hodgkin's disease. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology*, Inc 6 (4), S. 457–462.

Sánchez-Aguilera, Abel; Montalbán, Carlos; La Cueva, Paloma de; Sánchez-Verde, Lydia; Morente, Manuel M.; García-Cosío, Mónica et al. (2006): Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma. In: *Blood* 108 (2), S. 662–668

Sasse, S.; Momotow, J.; Engert, A. (2020): Checkpoint-Inhibitoren bei Hodgkin-Lymphom. In: *Der Internist* 61 (7), S. 660–668.

Scott, David W.; Chan, Fong Chun; Hong, Fangxin; Rogic, Sanja; Tan, King L.; Meissner, Barbara et al. (2013): Gene expression-based model using formalin-fixed paraffin-embedded biopsies predicts overall survival in advanced-stage classical Hodgkin lymphoma. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (6), S. 692–700.

Steidl, Christian; Lee, Tang; Shah, Sohrab P.; Farinha, Pedro; Han, Guangming; Nayar, Tarun et al. (2010): Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. In: *The New England journal of medicine* 362 (10), S. 875–885.

Swerdlow S.H.; Campo E.; Harris N.; Jaffe E.; Pileri S.; Stein H.; Thiele J.; Vardiman J.W. (2008): WHO classification of tumors of the haematopoietic and lymphoid tissue. IARC, Lyon.

van Spronsen, D. J.; Vrints, L. W.; Hofstra, G.; Crommelin, M. A.; Coebergh, J. W.; Breed, W. P. (1997): Disappearance of prognostic significance of histopathological grading of nodular sclerosing Hodgkin's disease for unselected patients, 1972-92. In: British journal of haematology 96 (2), S. 322–327.

Vasef, Mohammad A.; Alsabeh, Randa; Jeffrey Medeiros, L.; Weiss, Lawrence M. (1997): Immunophenotype of Reed-Sternberg and Hodgkin's Cells in Sequential Biopsy Specimens of Hodgkin's Disease. A Paraffin-Section Immunohistochemical Study Using the Heat-Induced Epitope Retrieval Method. In: American Journal of Clinical Pathology 108 (1), S. 54–59.

Wang, Hong; Horbinski, Craig; Wu, Hao; Liu, Yinxing; Sheng, Shaoyi; Liu, Jinpeng et al. (2016): NanoStringDiff. A novel statistical method for differential expression analysis based on NanoString nCounter data. In: Nucleic acids research 44 (20), e151.

Publikationen

Originalarbeit:

Schnitter, A., Kohler, C.W., Reddemann, K. et al. (2019). Therapeutic targets and microenvironment in sequential biopsies of classical Hodgkin lymphoma at diagnosis and relapse. *J Hematopathol* 12, 11–17.

Weitere publizierte Arbeiten:

Sasse, S., Reddemann, K., Diepstra, A., Oschlies, I., Schnitter, A., Borchmann, S., Engert, A., Borchmann, P., & Klapper, W. (2019). Programmed cell death protein-1 (PD-1)-expression in the microenvironment of classical Hodgkin lymphoma at relapse during anti-PD-1-treatment. *Haematologica*, 104(1), e21–e24.

Sasse, S., Reddemann, K., Diepstra, A., Borchmann, S., Oschlies, I., Schnitter, A., Engert, A., Borchmann, P., & Klapper, W. (2019). Programmed cell death protein1 (PD1)-expression in the microenvironment of classical Hodgkin lymphoma at relapse after conventional chemotherapy and at relapse on anti-PD1 treatment. *Haematologica*, 104(1), e45–e46.

Publiziertes Abstract:

Schnitter, A., Szczepanowski, M., Kohler, C., Spang, R., Klapper, W. (2016) Analysis of microenvironmental dynamics in classical Hodgkin Lymphoma using gene expression profiling

Poster 100. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Pathologie:

Schnitter, A., Szczepanowski, M., Kohler, C., Spang, R., Klapper, W. (2016) Genexpressionsanalyse der Zusammensetzung des Microenvironments im klassischen Hodgkin-Lymphom bei Erstdiagnose und im Rezidiv.

Danksagung

Mein Dank gilt zuerst Herrn Prof. Dr. Wolfram Klapper, der mir auf dem, nicht immer einfachen Weg, von der Themenfindung bis zur Fertigstellung der Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Im Weiteren möchte ich Charlotte und Dana für ihre wunderbare technische Unterstützung danken. Auch Monika stand bei der Auswertung mit Rat und Tat zur Seite.

Dank gilt ebenso dem gesamten Team der Hämatopathologie der CAU Kiel, die bei Problemen und Fragen immer ein offenes Ohr hatten und für Diskussionen zur Verfügung standen.

Ein herzliches Dankeschön geht auch nach Regensburg an Christian Kohler für seine Unterstützung bei der Datenauswertung.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die immer ein offenes Ohr für sämtliche Sorgen und Nöte während des Entstehungsprozesses hatte.