

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Dr. Senckenbergisches Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. Peter J. Wild

**3D analyses reveal T cells with activated nuclear features in
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Aresu Sadeghi Shoreh Deli

aus Idar-Oberstein

Frankfurt am Main, 2023

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Dr. Senckenbergisches Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. Peter J. Wild

**3D analyses reveal T cells with activated nuclear features in
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Aresu Sadeghi Shoreh Deli

aus Idar-Oberstein

Frankfurt am Main, 2023

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referentin: Prof. Dr. Sylvia Hartmann
Korreferentin: Prof. Dr. Daniela Krause

Tag der mündlichen Prüfung: 01.09.2023

Inhaltsverzeichnis

Deutschsprachige Zusammenfassung	- 4 -
Englischsprachige Zusammenfassung	- 5 -
Abkürzungsverzeichnis.....	- 6 -
Übergreifende Zusammenfassung	- 7 -
Einleitung	- 7 -
Darstellung des Manuskripts	- 8 -
Ergebnisse des Manuskripts	- 9 -
Diskussion	- 11 -
Übersicht der zur Veröffentlichung angenommenen Publikationen	- 14 -
Publikation	- 15 -
Darstellung des eigenen Anteils	- 25 -
Literaturverzeichnis	- 26 -
Lebenslauf	- 29 -
Danksagung	- 33 -
Schriftliche Erklärung.....	- 34 -

Deutschsprachige Zusammenfassung

Das noduläre lymphozyten-prädominante Hodgkin-Lymphom (NLPHL), als auch das T-Zell histiozytenreiche großzellige B-Zell-Lymphom (THRLBCL) sind seltene Formen maligner Lymphome. Sowohl das NLPHL, als auch das THRLBCL werden besonders bei Männern mittleren Alters beobachtet,^{1,2,3} wobei sich das THRLBCL häufig in einem fortgeschrittenen Ann-Arbor Stadium bei gleichzeitig vorliegenden B-Symptomen manifestiert und mit aggressiveren Verläufen verbunden ist.³ Dennoch sind diese Krankheitsbilder aufgrund der limitierten Anzahl von Tumorzellen im Gewebe gering erforscht und aktuell vorhandene Ergebnisse stützen sich überwiegend auf allgemein molekular-genetische Untersuchungen.

Für ein besseres Verständnis dieser Erkrankungsformen sowie mögliche Unterschiede in den Kerngrößen und Zytoplasmagrößen, stützte sich folgende Arbeit auf den Vergleich der verschiedenen Subtypen des NLPHL mit dem THRLBCL im Hinblick auf Kerngröße und Kernvolumina. Dies erfolgte sowohl mittels 2D, als auch 3D Analyse.

Die 2D Analyse der Kerngröße und Kernvolumina erbrachte keine signifikanten Ergebnisse. Jedoch zeigte sich in der 3D Analyse der NLPHL und THRLBCL ein leicht vergrößertes Kernvolumen im THRLBCL. Im Weiteren zeigten die Auswertungen ein signifikant vergrößertes Zellvolumen der Tumorzellen im THRLBCL im Vergleich zu den NLPHL Formen. Jedoch traten die Unterschiede nicht nur zwischen den Tumorzellen beider Krankheitsbilder auf, sondern auch die T-Zellen präsentierten sich mit signifikant größeren Kernvolumina im THRLBCL. Die B-Zellen, die als Kontrollgruppe galten, zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Krankheitsbildern.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf eine verstärkte Aktivität der T-Zellen im THRLBCL hin, die am ehesten als eine Antwort auf die umliegenden Tumorzellen zu deuten ist und höchstwahrscheinlich zu einer Eindämmung der Proliferation der Tumorzellen führt. Anhand dieser Ergebnisse wird zudem die vermehrte Aussagekraft der 3D Analyse ersichtlich – diese ist der 2D Analyse deutlich überlegen. Daher empfiehlt sich zum besseren Verständnis beider Krankheitsbilder bei weiteren Forschungen die 3D Technik in Kombination mit molekular-genetischen Untersuchungen einzusetzen.

Englischsprachige Zusammenfassung

The Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma (NLPHL) as well as the T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma (THRLBCL) are rare types of malignant lymphomas. Both NLPHL and THRLBCL are frequently observed in middle-aged men^{1,2,3} with THRLBCL presenting frequently with an advanced Ann-Arbor stage with B-symptoms and associated with more aggressive courses.³ However, due to the limited number of tumor cells in the tissue of both NLPHL and THRLBCL, limited numbers of studies have been conducted on these lymphomas and current results are mainly based on general molecular genetic studies.

In order to obtain a better understanding for these disease forms as well as possible changes in their nuclear and cytoplasmatic sizes, the following study relied on the comparison of the different NLPHL forms and THRLBCL in terms of nuclear size and nuclear volume. This was carried out using both 2D and 3D analysis.

During the 2D analysis of nuclear size and nuclear volume no significant differences could be presented between those groups. However, the 3D analysis of NLPHL and THRLBCL pointed out a slightly enlarged nuclear volume in THRLBCL. Furthermore, the analysis indicated a significantly increased cytoplasmatic size of THRLBCL compared to NLPHL forms. Nevertheless, differences occurred not only between the tumor cells of both disease forms, but also the T cells presented a larger nuclear volume in THRLBCL. B cells, which were considered as the control group, did not demonstrate any significant differences between the different groups.

The presented results suggest an increased activity of T cells in THRLBCL, which is most likely to be interpreted as a response against the surrounding tumor cells and probably limits the proliferation of the tumor cells. Based on these results, the importance of 3D analysis is also evident due to the fact that it is clearly superior to 2D analysis. For a better understanding of both disease forms, it is therefore recommended to use the 3D technique in combination with molecular genetic analysis in future research.

Abkürzungsverzeichnis

NLPHL	nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma, Noduläres Lymphozyten-prädominantes Hodgkin- Lymphom
THRLBCL	T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma, T-Zell histiozytenreiche großzellige B-Zell-Lymphom
PTGC	Progressive transformation of germinal centres, Progressive Keimzentren
HL	Hodgkin lymphoma, Hodgkin-Lymphom
LP cells	lymphocyte predominate cells
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
IgD	immunoglobulin D, Immunglobulin D
FDC	Follicular dendritic cells Follikulär dendritische Zellen

Übergreifende Zusammenfassung

Einleitung

Im Verlauf der letzten Jahre beschäftigten sich verschiedene Studien mit dem nodulär Lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphom und den histologischen Wachstumsmustern, sowie mit dem T-Zell histiozytenreichen großzelligen B-Zell-Lymphom.

Das NLPHL zählt mit einem Auftreten von in etwa 5-10% zu den seltenen Untergruppen der Hodgkin-Lymphome.⁴ Es entsteht aus Keimzentrums-B-Zellen⁵ und betrifft hauptsächlich Männer jungen bis mittleren Alters.¹ Ein fortgeschrittenes Ann-Arbor-Stadium, sowie B-Symptome (Fieber, nächtliches Schwitzen, ungewollter Gewichtsverlust) sind selten zu beobachten, zumal die allermeisten PatientInnen die Diagnose in frühen Stadien erhalten.⁶ Histopathologisch wird das NLPHL nach Fan et al.⁷ in sechs Subgruppen (A-F) unterteilt, unter denen PatientInnen mit den atypischen histopathologischen Muster C bis F sich häufiger in einem fortgeschrittenen Stadium vorgestellt haben.¹ Zudem war das Risiko für einen Rückfall in dieser Patientengruppe erhöht.¹

Das THRLBCL stellt eine Entität der aggressiven B-Zell-Lymphome dar. Auch hier sind vor allem Männer mittleren Alters (57-88%)^{2,3} betroffen, jedoch erfolgt die Vorstellung dieser in einem fortgeschrittenen Ann-Arbor-Stadium mit zusätzlichem Auftreten von B-Symptomen.³

Obgleich Informationen über die klinische Präsentation beider Entitäten vorliegen, bestehen trotz dessen Schwierigkeiten zur Unterscheidung beider Gruppen voneinander. Hier stellt sich vor allem die Differenzierung zwischen THRLBCL und der Untergruppe E des NLPHL als schwierig dar – sowohl in Bezug auf Morphologie, als auch Genexpression sowie vorhandene genetische Daten. Die Differenzierung des NLPHL und des THRLBCL ist jedoch entscheidend für die Behandlungsstrategie, da Fehldiagnosen und eine falsche Behandlung von THRLBCL zu einer schlechteren Prognose führen.

Aktuell vorhandene Ergebnisse beschäftigen sich überwiegend mit allgemein molekulargenetische Untersuchungen. Jedoch können Form und Größe von Tumorkernen

ebenfalls die genomische Komplexität einer Tumorentität widerspiegeln, sodass in der vorliegenden Studie die Kerne und kompletten Zellkörper der Tumorzellen der unterschiedlichen histopathologischen Untergruppen von NLPHL sowie von THRLBCL analysiert und miteinander verglichen wurden.

Darstellung des Manuskripts

Die für diese Veröffentlichung verwendeten Proben stammen aus dem Archiv des Dr. Senckenbergischen Institut für Pathologie der Universität Frankfurt am Main. Die erfolgten Untersuchungen wurden im Rahmen eines DFG-geförderten Projektes durchgeführt. Ein Votum der Ethikkommission der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität/Frankfurt am Main liegt vor. Alle Proben sind anonymisiert und können nicht mit einer Person in Verbindung gebracht werden.

In dieser Publikation wurden das NLPHL, eingeteilt nach Fan et al.⁷, und das THRLBCL in 2D und 3D ausgewertet.

Für die 2D-Auswertung wurden 10 Fälle der jeweiligen NLPHL-Muster und 10 Fälle des THRLBCL analysiert. Für jeden Fall wurden 25 OCT2-negative Lymphozyten, die T-Zellen repräsentierten, und 30 OCT2-positve Tumorzellen ausgewertet. Diese wurden in der Software QuPath manuell eingekreist und die Ergebnisse bezüglich Fläche, Umfang und Durchmesser wurden erfasst.

Mittels eines Konfokalmikroskops wurde die 3D-Bildgebung rekonstruiert.^{8,9} Auch hier wurden jeweils 10 Fälle der NLPHL-Subtypen und 10 Fälle des THRLBCL analysiert. Hierbei wurden die Oberfläche und das Volumen von mindestens 25 OCT2-positve Tumorzellen, sowie die CD79a- und CD20-positiven Zellkörper dieser Tumorzellen ausgewertet. Außerdem wurden die Zellkerne von 20 OCT2-positiven kleinen B-Zellen und 20 DAPI-gefärbten, OCT2-negativen, runden Lymphozytenkerne, die T-Zellen entsprechen, beurteilt. Zusätzlich wurden die T-Zellen mittels PD1-, CD3- und CD8-Immunfärbung untersucht.

Ergebnisse des Manuskripts

Zu Beginn wurden die ausgewerteten Zellen der NLPHL-Unterformen und des THRLBCL im 2D miteinander verglichen. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Um Artefakte ausschließen zu können, wurden daraufhin auch die OCT2-negativen T-Zellen des NLPHL und des THRLBCL untereinander verglichen. Auch hier wurden keine Unterschiede ersichtlich.

Aufgrund der Ergebnisse im 2D, wurden die Zellkerne, sowie das Zytoplasma von Tumorzellen im 3D analysiert. Hierbei wurde sowohl die Oberfläche, als auch das Kernvolumen der OCT-2 markierten LP-Zellen der verschiedenen Varianten des NLPHL sowie des THRLBCL berücksichtigt. Die Auswertungen zeigte, dass die Kernoberfläche der Tumorzellen von NLPHL vergleichbar mit den Kernoberflächen von THRLBCL waren (Mittelwerte von 463–600 μm^2 für NLPHL Subtypen A, C, und E und Mittelwert von 639 μm^2 für THRLBCL). Hierbei stellte sich jedoch das Kernvolumen der Tumorzellen bei THRLBCL größer als das Kernvolumen der NLPHL dar (844 μm^3 für THRLBCL versus 528–728 μm^3 für NLPHL Subtypen), welches zu der Annahme passte, dass die Tumorzellen beim THRLBCL eine eher rundliche Form besitzen. Daran anschließend wurde das mit CD79a-Antikörper fluoreszierende Zytoplasma der Tumorzellen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Oberfläche, als auch das Volumen der Tumorzellen im THRLBCL im Vergleich zum NLPHL signifikant vergrößert ist (Mittelwert Zelloberfläche THRLBCL 782 μm^2 versus Mittelwert NLPHL A 327 μm^2 bei $p < 0.001$ [Einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Mehrfachvergleich], Mittelwert Zellvolumen THRLBCL 763 μm^3 versus Mittelwert NLPHL A 150 μm^3 bei $p < 0.001$ [Kruskal-Wallis-Test mit Dunn Post-hoc-Mehrfachvergleich]). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch durch die CD20-Immunfärbung erzielt (Mittelwert Zelloberfläche THRLBCL 1187 μm^2 versus Mittelwert NLPHL A 555 μm^2 bei $p = 0.0017$ [Ungepaarter t-Test], Mittelwert Zellvolumen THRLBCL 710 μm^3 versus Mittelwert NLPHL A 303 μm^3 bei $p = 0.0007$ [Ungepaarter t-Test]). Um jedoch einen Einfluss der Zellkernvolumina auf das Gesamtvolumen ausschließen zu können, wurde das Verhältnis von Kernvolumen zu Zytoplasmavolumen berechnet, welches bei den NLPHL-Fällen im Vergleich zum THRLBCL signifikant größer war (4.34 versus 1.82 bei $p < 0.05$ [Kruskal-Wallis-Test mit Dunn Post-hoc-Mehrfachvergleich]).

Anknüpfend an die Analyse der Tumorzellen wurden die Oberfläche und das Volumen der T-Zellen und reaktiven B-Zellen bestimmt. Die T-Zellen präsentierten sich als OCT2-negative DAPI-gefärbte Lymphozytenkerne, während die reaktiven B-Zellen sich als schwach OCT2-positive Kerne darstellten. In diesem Zusammenhang dienten die B-Zellen als interne Kontrolle zum Ausschluss von Fixierungsartefakten. Zur weiteren technischen Validierung wurden OCT2-negative und CD3-positive Lymphozyten im NLPHL A und THRLBCL miteinander verglichen. Beide Methoden erzielten ähnliche Ergebnisse. Die Kernoberfläche der T-Zellen im THRLBCL war im Vergleich zu den T-Zellen im NLPHL nur minimal größer (Mittelwert von $194 \mu\text{m}^2$ für THRLBCL versus Mittelwerte von $134\text{--}141 \mu\text{m}^2$ für NLPHL Subtypen A, C, und E). Im Gegensatz hierzu war das Kernvolumen der T-Zellen im THRLBCL im Vergleich zu den Kernvolumina im NLPHL signifikant größer (Mittelwert von $137 \mu\text{m}^3$ für THRLBCL versus Mittelwerte von 71 und $61 \mu\text{m}^3$ für NLPHL A und C bei $p < 0.01$ [Kruskal-Wallis-Test mit Dunn Post-hoc-Mehrfachvergleich]). Zur internen Kontrolle wurden die Kernoberfläche, sowie das Kernvolumen der B-Zellen verglichen und es zeigte sich kein Unterschied zwischen NLPHL und THRLBCL. Zusätzlich wurden die T-Zellen nach ihren Immunphänotypen (PD1-positiv und CD8-positiv) miteinander verglichen. Alle T-Zell-Subtypen von THRLBCL hatten signifikant größere Kernvolumina im Vergleich zum NLPHL A (Mittelwerte von 123 , 110 und $111 \mu\text{m}^3$ für CD3+, CD8+ und PD1+ T-Zellen im THRLBCL versus Mittelwerte von 53 , 59 und $54 \mu\text{m}^3$ für CD3+, CD8+ und PD1+ T-Zellen im NLPHL A bei $p < 0.05$ [Kruskal-Wallis-Test mit Dunn Post-hoc-Mehrfachvergleich]).

Weiterhin wurden die T-Zellen der progressiven Keimzentren analysiert, eine reaktive Lymphknotenveränderung, die starke morphologische Ähnlichkeiten zum NLPHL aufweist. Hier verhielten sich die T-Zellen ähnlich wie beim NLPHL (Mittelwerte von 65 , 61 und $61 \mu\text{m}^3$ für CD3+, CD8+ und PD1+ T-Zellen). Es gab zudem keine signifikanten Unterschiede zwischen PD1-positiven und CD8-positiven Zellen innerhalb der untersuchenden Kategorie.

Im Anschluss wurde die zelluläre Interaktion zwischen den Tumorzellen des NLPHL A und THRLBCL einerseits und der CD8- und PD1-positiven T-Zellen im 3D analysiert. Der Prozentsatz der Tumorzellen mit direktem Kontakt zu CD8-positiven T-Zellen war beim THRLBCL zwar etwas höher als beim NLPHL, jedoch nicht signifikant (66% versus 46%

in THRLBCL versus NLPHL A). Ähnliche Ergebnisse wurden erreicht, als die Überlappungsvolumina zwischen den Zellmembranen von CD8-positiven Zellen und Tumorzellen berechnet wurden (35 versus 12 μm^3 in THRLBCL versus NLPHL A). Im Gegensatz hierzu hatten die Tumorzellen des NLPHL häufiger Kontakt mit PD1-positiven T-Zellen, sowie größere Überlappungsvolumina im Vergleich zu den Tumorzellen aus THRLBCL (57 versus 30 μm^3 in NLPHL A versus THRLBCL). Diese Vergleiche wiesen jedoch keine Signifikanz auf.

Diskussion

Die hier vorgestellte Arbeit konzentrierte sich auf die nukleären Charakteristika und die Zellgröße in den verschiedenen Subtypen des NLPHL, sowie im THRLBCL. Es ist wichtig, zu wissen, dass die Faktoren, die zu solchen Charakteristika führen, multifaktoriell sind und Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der Kernmatrix, in der Chromatintextur, sowie in der Anzahl und strukturellen Organisation der Chromosomen umfassen.¹⁰ Im Unterschied zur 2D-Darstellung der histologischen Schnitte, konnten in den konfokalen 3D-Laserbildern Unterschiede in der Kerngröße, sowie Unterschiede in der Zellkörperoberfläche und Zellkörpervolumen festgestellt werden. Die 3D-Analyse erwies sich als aussagekräftiger als die 2D-Analyse, da im 3D-Raum eine 10%ige Zunahme des Zelldurchmessers zu einer Erhöhung des Volumens um 33% führt.¹¹

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Tumorzellvolumina des THRLBCL verglichen mit dem Subtypen NLPHL A, doch interessanterweise war die Kern-Zytoplasma-Ratio am Größten beim NLPHL A und am Kleinsten beim THRLBCL. Dies war ein unerwartetes Ergebnis und könnte darauf hinweisen, dass Größe und Form der Tumorkerne einerseits die genomische Instabilität widerspiegeln. Andererseits könnte dies auch mit verschiedenen Funktionszuständen zusammenhängen. Weiterhin könnte der Einfluss von folliculären dendritischen Zellen (FDC) auf die Tumorzellen des NLPHL eine Rolle spielen. Es konnte für B-Zellen nachgewiesen werden, dass das Vorhandensein von FDC einen proliferativen Effekt hatte und zudem als Schutz vor Apoptose fungiert.^{12,13,14} Da FDCs im THRLBCL fehlen,^{7,15} könnte das damit auf eine Interaktion von Tumorzellen mit FDCs hinweisen, die eine zusätzliche Wirkung auf das

Kernvolumen, sowie das Zytoplasmavolumen der Tumorzellen haben könnten. Eine weitere Erklärung könnte eine verstärkte Zellschwellung nach einer Zellschädigung sein, die zu einem erhöhten Zytoplasmavolumen führt,^{11,16} zumal ein größeres Zytoplasmavolumen eher in Zellen beobachtet wurde, die zellulärem Stress ausgesetzt waren.^{17,18}

Nicht nur die Tumorzellen, sondern auch die T-Zellen im THRLBCL zeigten größere Nuklei im Vergleich zum NLPHL, welches als Hinweis auf eine unterschiedliche Aktivierung der Mikroumgebung hinweisen könnte. Hierbei ist bekannt, dass eine Aktivierung von T-Zellen zu einer Vergrößerung dieser mit vergrößerten und verlängerten Kernen führt.^{19,20,21} Hieraus stellt sich die Vermutung, dass die T-Zellen im THRLBCL ebenfalls aktiviert sind. Weiterhin unterstützt das häufige Vorkommen von CD8-positiven T-Zellen in unmittelbarer Nähe von Tumorzellen des THRLBCL und das häufige Überlappen der Zelloberflächen die Hypothese, dass die Tumorzellen des THRLBCL einem erhöhten zellulären Stress ausgesetzt sind, die zu einem erhöhten Zellkörpervolumen führen. Zudem exprimieren Tumorzellen und die umgebenden Makrophagen im THRLBCL häufig PDL1.²² Die führt möglicherweise dazu, dass CD8-positiv T-Zellen in einen nicht mehr reagiblen Zustand versetzt werden, damit die Tumorzelle in einem Gleichgewicht zwischen Zytotoxizität und Überleben erhalten bleibt. Die oben beschriebenen Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikroumgebung zwischen NLPHL und THRLBCL,^{23,24} sowie die höhere Anzahl aktivierter CD8-positiv T-Zellen im THRLBCL²⁵ wurden schon in vorangegangenen Studien beobachtet.

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass Unterschiede zwischen THRLBCL und den Subtypen des NLPHL hinsichtlich der Größe der Tumorzellen, sowie Kerngrößen der reaktiven T-Zellen bestehen. Zudem stimmen die Ergebnisse mit Ergebnissen aus vorangegangenen Studien überein,²³ die unterstreichen, dass die Mikroumgebung den größten Unterschied zwischen NLPHL und THRLBCL darstellt.²³ Vor allem bezieht sich dieser Unterschied auf die aktivierte CD8-positiv T-Zellpopulation im THRLBCL, die in engem Kontakt zu den Tumorzellen steht und zu einem zellulären Stress der Tumorzellen führen könnte. Die in der vorliegenden Studie beobachteten kontinuierlichen Zellgrößenveränderungen vom Subtyp NLPHL A, über die atypischen Subtypen des NLPHL bis hin zum THRLBCL könnten auf eine schrittweise Progression hindeuten.

Auch könnte dies eine Erklärung für die Schwierigkeiten der histopathologischen Abgrenzung von THRLBCL und dem Subtypen NLPHL E sein.


Übersicht der zur Veröffentlichung angenommenen Publikationen

Sadeghi Shoreh Deli A, Scharf S, Steiner Y, Bein J, Hansmann ML, Hartmann S. 3D analyses reveal T cells with activated nuclear features in T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma. *Mod Pathol.* 2022;10.1038/s41379-022-01016-8.

ARTICLE OPEN



3D analyses reveal T cells with activated nuclear features in T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma

Aresu Sadeghi Shoreh Deli¹, Sonja Scharf^{2,3}, Yvonne Steiner¹, Julia Bein¹, Martin-Leo Hansmann^{2,4} and Sylvia Hartmann¹ 

© The Author(s) 2022

Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma (NLPHL) can show variable histological growth patterns and present remarkable overlap with T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma (THRLBCL). Previous studies suggest that NLPHL histological variants represent progression forms of NLPHL and THRLBCL transformation in aggressive disease. Since molecular studies of both lymphomas are limited due to the low number of tumor cells, the present study aimed to learn if a better understanding of these lymphomas is possible via detailed measurements of nuclear and cell size features in 2D and 3D sections. Whereas no significant differences were visible in 2D analyses, a slightly increased nuclear volume and a significantly enlarged cell size were noted in 3D measurements of the tumor cells of THRLBCL in comparison to typical NLPHL cases. Interestingly, not only was the size of the tumor cells increased in THRLBCL but also the nuclear volume of concomitant T cells in the reactive infiltrate when compared with typical NLPHL. Particularly CD8⁺ T cells had frequent contacts to tumor cells of THRLBCL. However, the nuclear volume of B cells was comparable in all cases. These results clearly demonstrate that 3D tissue analyses are superior to conventional 2D analyses of histological sections. Furthermore, the results point to a strong activation of T cells in THRLBCL, representing a cytotoxic response against the tumor cells with unclear effectiveness, resulting in enhanced swelling of the tumor cell bodies and limiting proliferative potential. Further molecular studies combining 3D tissue analyses and molecular data will help to gain profound insight into these ill-defined cellular processes.

Modern Pathology; <https://doi.org/10.1038/s41379-022-01016-8>

INTRODUCTION

Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma (NLPHL) is a subtype of Hodgkin lymphoma that accounts for ~5–10% of all Hodgkin cases¹. It is derived from germinal center B cells². The tumor cells, i.e., the lymphocyte-predominant (LP) cells, have functional B-cell receptors and express B-cell antigens like CD20, CD79a, PAX5, and OCT2^{3,4}. NLPHL mainly affects young-to-middle-aged males⁵. Most patients are diagnosed with early stages of the disease⁶. Different histopathological growth patterns have been observed in NLPHL (patterns A-F), described in detail by Fan et al.⁷. Since several histopathological growth patterns are frequently found within one lymph node, we proposed to divide cases into typical NLPHL (comprising patterns A and B according to Fan et al.⁷) and atypical variants comprising all other patterns. Atypical variants (patterns C-F according to Fan et al.⁷) were shown to manifest more frequently with advanced-stage disease and to have an increased risk of relapse when compared with typical nodular growth patterns⁵. Some cases of NLPHL, usually with Fan pattern C, show immunoglobulin heavy chain D (IgD) expression in the tumor cells⁸. We could recently show that these cases are triggered by infection with *M. catarrhalis*⁹. Restriction to particular major histocompatibility complex haplotypes points to an effect of cognate T-cell help in the development of NLPHL⁹. Additionally,

we could show that the LP cells of NLPHL cases with patterns A-C interact with T cells rosetting around the LP cells in immunological synapses^{10,11}. Some NLPHL cases with a variant histology (pattern E according to Fan et al.⁷) are difficult to differentiate from T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma (THRLBCL). Patients with THRLBCL are, like NLPHL patients, frequently middle-aged males (57–88%)^{12,13}. However, in contrast to most NLPHL patients, they usually present with an advanced Ann Arbor stage and B-symptoms¹³. On the grounds of morphology, gene expression, and genetic data, an important overlap between cases of NLPHL Fan pattern E and THRLBCL has been observed. Data characterizing genomic aberrations as well as mutation analyses suggest progression from typical to variant patterns with a final transformation into THRLBCL^{14,15}. However, since the tumor cell content in both NLPHL and THRLBCL is usually below 5% of the total infiltrate, global sequencing studies of the tumor cells are lacking so far. Since the shape and size of tumor nuclei frequently reflect the genomic complexity of a tumor, the present study aimed to analyze the nuclei and complete cell bodies of the tumor cells in different histopathological patterns of NLPHL and compare this to THRLBCL as a surrogate marker for genomic events taking place during the progression from typical NLPHL to variant patterns and THRLBCL.

¹Dr. Senckenberg Institute of Pathology, Goethe University Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, D-60590 Frankfurt am Main, Germany. ²Frankfurt Institute of Advanced Studies, Ruth-Moufang-Str. 1, 60438 Frankfurt am Main, Germany. ³Molecular Bioinformatics, Goethe University Frankfurt am Main, Robert-Mayer-Str. 11-15, 60325 Frankfurt am Main, Germany. ⁴Institute of General Pharmacology and Toxicology, Goethe University Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, D-60590 Frankfurt am Main, Germany. [✉]email: s.hartmann@em.uni-frankfurt.de

Received: 8 October 2021 Revised: 21 January 2022 Accepted: 21 January 2022
Published online: 16 February 2022

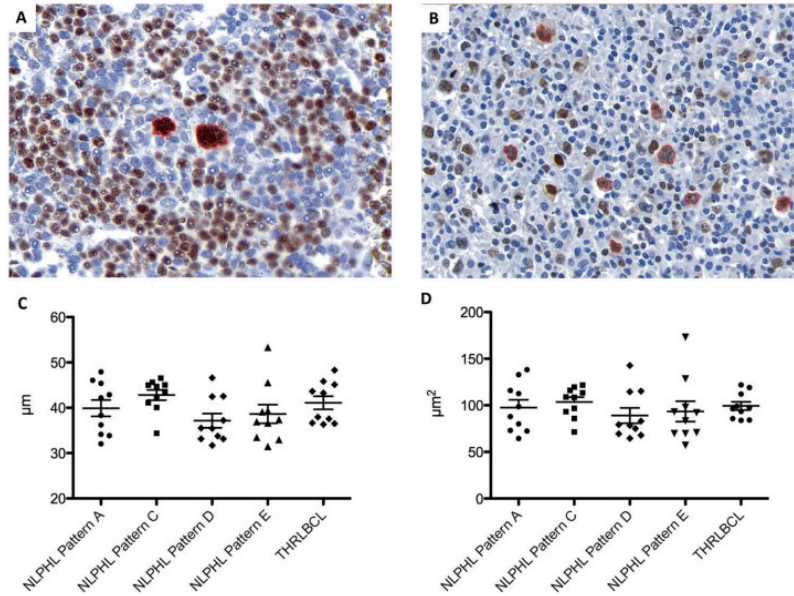


Fig. 1 2D analysis of nuclear characteristics in different growth patterns of NPLHL and THRLBCL. **A** Example of 2D analysis of an NPLHL pattern A case showing LP cells with multilobated nuclei (OCT2-immunostaining, LP cells encircled in red). **B** Example of 2D analysis of a THRLBCL case showing tumor cells with angulated nuclei (OCT2-immunostaining, tumor cells encircled in red). **C** Nuclear perimeters of tumor cells from NPLHL patterns (A, C, D, and E) and THRLBCL in 2D analysis. **D** Nuclear areas of tumor cells from NPLHL patterns (A, C, D, and E) and THRLBCL in 2D analysis.

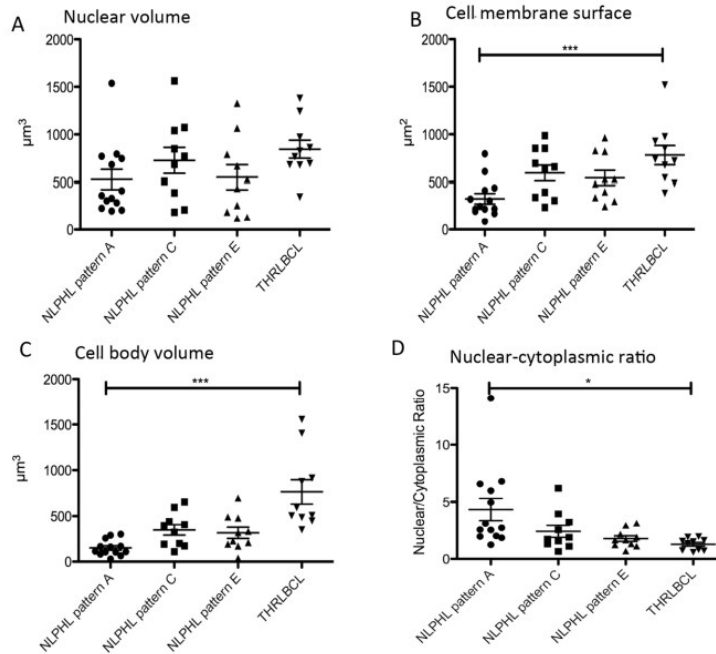


Fig. 2 3D nuclear and cytoplasmic characteristics of the tumor cells of different NPLHL patterns and THRLBCL reveal an enlarged cell size of THRLBCL tumor cells. **A** Nuclear volumes of the tumor cells of NPLHL patterns (A, C, and E) and THRLBCL (** $p < 0.001$, Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test for multiple comparisons). **B** Cell membrane surfaces of the tumor cells of NPLHL patterns (A, C, and E) and THRLBCL (** $p < 0.001$, Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test for multiple comparisons). **C** Cell volumes of the tumor cells of NPLHL patterns (A, C, and E) and THRLBCL (** $p < 0.001$, Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test for multiple comparisons). **D** Ratio of nuclear/cytoplasmic volumes in NPLHL patterns (A, C, and E) and THRLBCL (* $p < 0.05$, Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test for multiple comparisons).

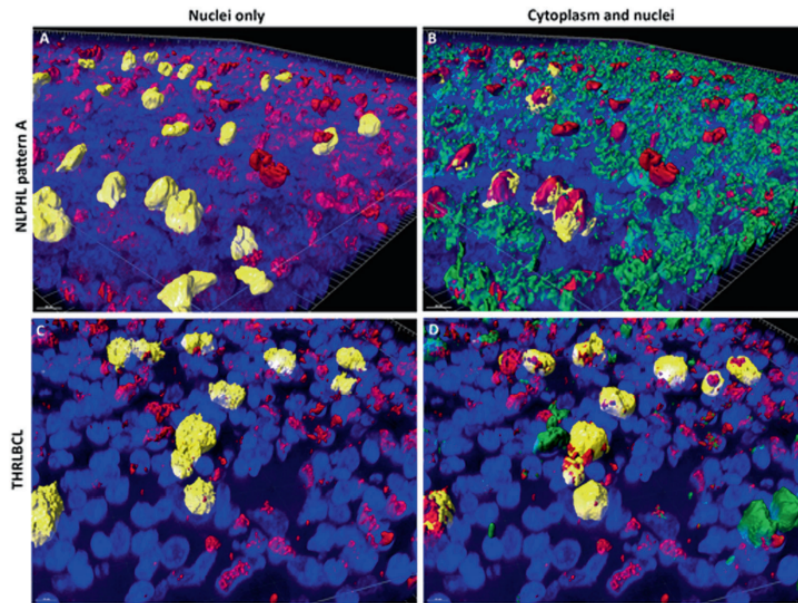


Fig. 3 3D nuclear and cytoplasmic reconstruction of the tumor cells of exemplary NPLHL and THRLBCL cases. **A** 3D reconstruction of an OCT2 (red)-stained thick section of an NPLHL pattern A case. Selected LP cell nuclei are highlighted in yellow as examples of the multilobation of tumor cell nuclei. Nuclei are stained by DAPI (blue). **B** 3D reconstruction of an OCT2 (red) and CD79a (green) double-stained thick section of the NPLHL pattern A case. LP cell nuclei are labeled in red. CD79a⁺ cytoplasm is labeled in green. Cytoplasm of selected LP cells is highlighted in yellow, showing a scant cytoplasmic rim. Nuclei are stained by DAPI (blue). **C** 3D reconstruction of an OCT2 (red)-stained thick section of a THRLBCL case. Selected LP cell nuclei are highlighted in yellow and show examples of a spiculated tumor cell surface. Nuclei are stained by DAPI (blue). **D** 3D reconstruction of an OCT2 (red) and CD79a (green) double-stained thick section of the THRLBCL case. Tumor cell nuclei are labeled in red. CD79a⁺ cytoplasm is labeled in green. Cytoplasm of selected tumor cells is highlighted in yellow, showing a broader cytoplasmic rim. Nuclei are stained by DAPI (blue).

MATERIALS AND METHODS

Samples

Written informed consent was obtained from all patients in accordance with the Declaration of Helsinki, and the study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Frankfurt (157/17).

In this study, cases of different NPLHL variant patterns according to Fan et al. and THRLBCL cases were analyzed in 2D and 3D. Diagnoses were confirmed by two expert hematopathologists (M.L.H. and S.H.).

2D imaging and image analysis

For this part of the project, 10 cases each of NPLHL patterns A, C, D, and E according to Fan et al.⁷ and 10 cases of THRLBCL were analyzed. 2D whole-tissue scans were acquired using a Panoramic Scan II (3D Histech) and the slides were digitalized with a 20x lens. For this step, all slides were stained with an anti-OCT2 antibody and the Envision Flex System was used for visualization. In order to analyze the scanned images, the open-source software QuPath (Version 0.1.2, 2014–2016; The Queen's University of Belfast, Northern Ireland) was used¹⁶. For each case, 30 tumor cells (identified by the presence of large nuclei and strong OCT2 positivity) as well as 25 OCT2-negative lymphocytes, representing T cells, were manually encircled and the values of the area, perimeter, and diameter were acquired.

Preparation of samples for 3D imaging

For 3D imaging, thick sections of up to 26 μm were cut from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue as previously described^{17,18}. Thick sections were deparaffinized according to standard protocols. For immunohistochemical double staining, dilutions of OCT2 (1:100, mouse monoclonal antibody, Cell Marque-Merck, Darmstadt, Germany/308M-18), CD20 (1:500, mouse monoclonal antibody, Agilent-Dako, Santa Clara, CA, USA, L-26), CD3 (1:200, rabbit polyclonal antibody, Agilent-Dako, A0452), PD1 (1:100, rabbit monoclonal antibody, DCS, Hamburg, Germany, EP239), CD8 (mouse monoclonal antibody, 1:100, DAKO, M7103) and CD79a (1:100, rabbit monoclonal antibody, Cell Marque/179R-15 and 1:200, mouse monoclonal

antibody, Agilent-Dako, M7050, Clone JCB117) were applied in a cocktail. For double stainings of T cells and LP cells either CD20 and CD3 were applied as double staining or PD1 and CD79a or CD8 and CD79a. As secondary antibodies, the VectaFluor Duet Immunofluorescence Double Labeling Kit DyLight 488/594 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, Cat. No. DK-8818) was used. In addition, nuclear DAPI staining (D9542; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was performed.

3D imaging and image analysis

A Leica TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) was used for 3D imaging. The settings were as follows: HC PL APO 63x/1.3 GLYC CORR, Cs2; lasers: 405 nm DMOD Compact, Red 594 nm and Green 488 nm. The presented pixel size was 130 nm in each coordinate direction. Furthermore, the z-step had a size of 0.13 μm ^{17,18}. For 3D image analysis, IMARIS Advanced Tracking 9.2 (Bitplane AG, Zurich, Switzerland) was utilized. First, surfaces of objects were calculated with the "Create Surface" tool using the default settings. Afterward, the "Source Channel" (green, red, and blue channel) was selected. "Absolute Intensity" was chosen for "Surface Creation Threshold". The same steps were later carried out for the volume of the object. The surfaces and volumes of the OCT2⁺ nuclei of at least 25 tumor cells as well as their CD79a⁺ or CD20⁺ cell bodies were analyzed. Furthermore, the nuclei of 20 OCT2⁺ small B cells and 20 DAPI-stained, OCT2-negative, round lymphocyte nuclei corresponding to T cells were analyzed per case. T cells were additionally analyzed in CD3-, PD1- and CD8-immunostaining. All cells were identified based on morphology.

RESULTS

Tumor cells of NPLHL and THRLBCL do not differ in nuclear perimeter and area in 2D histological sections

In 2D-scanned total slide sections, the area and perimeter of tumor cell nuclei from NPLHL pattern A, C, D, and E cases and THRLBCL were compared. The nuclear perimeter was slightly

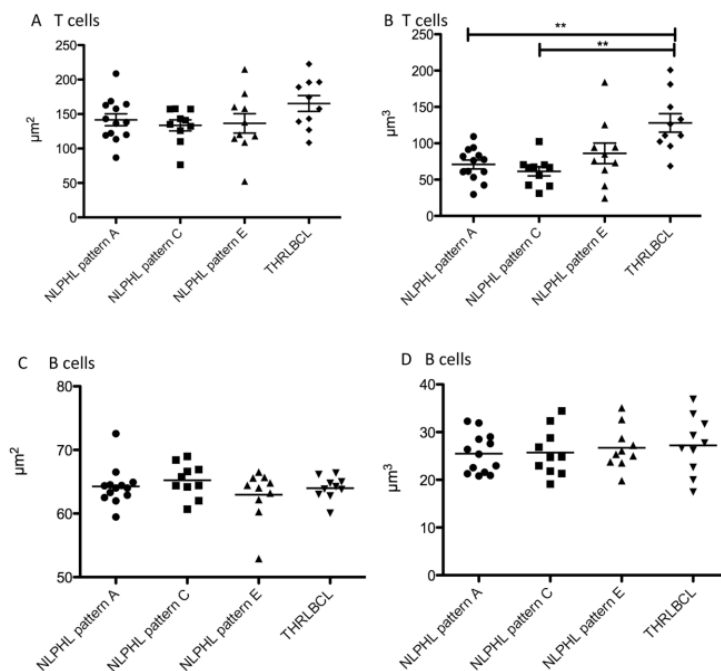


Fig. 4 3D nuclear characteristics of the non-tumor cells of different NLPHL patterns and THRLBCL. **A** Surfaces of the DAPI-stained T cell nuclei of NLPHL patterns (A, C, and E) and THRLBCL. **B** Volumes of the DAPI-stained T cell nuclei are significantly enlarged in THRLBCL when compared with NLPHL patterns A and C (** $p < 0.01$, Kruskal–Wallis test with Dunn’s post hoc test for multiple comparisons). NLPHL pattern E T cells show a broad spectrum of volumes. **C** Surfaces of the OCT2-stained reactive B cell nuclei of NLPHL patterns (A, C, and E) and THRLBCL. **D** Volumes of the OCT2-stained reactive B cell nuclei of NLPHL patterns (A, C, and E) and THRLBCL.

larger in the LP cells from NLPHL pattern C, indicating enhanced lobulation (Fig. 1). However, the difference was not significant. In order to rule out technical artifacts, we also compared the nuclear perimeters of the OCT2-negative T cells from the same scanned slides. However, no differences were seen here (Supplementary Fig. S1).

3D confocal imaging of tumor cells of NLPHL and THRLBCL reveals enlarged nuclear and cell sizes in THRLBCL

Since we did not see any obvious differences between different lymphoma types in 2D histological sections, we analyzed the 3D structure of the nuclei and cytoplasm of tumor cells from 10 cases each of different NLPHL patterns (A, C, and E according to Fan et al.⁷) and THRLBCL cases by confocal microscopy.

We analyzed both the surface of the nuclear membrane and the nuclear volume of the OCT2-labeled tumor cells of different variants of NLPHL as well as THRLBCL, since the LP cells of NLPHL are frequently multilobated, hence creating large nuclear surfaces at a moderate nuclear volume. We expected the tumor cells of THRLBCL to have a round shape at comparable volumes. 3D confocal microscopy revealed that the nuclear surfaces of the tumor cells of THRLBCL were comparable to the nuclear surfaces of NLPHL (means of 463–600 μm^2 for NLPHL patterns A, C, and E and a mean of 639 μm^2 for THRLBCL). However, at the same time, the nuclear volume of the tumor cells of THRLBCL was slightly increased (844 μm^3 for THRLBCL vs. 528–728 μm^3 for different NLPHL types), which fits well with the more roundish shape of the tumor cell nuclei in THRLBCL (Figs. 2A, 3).

We then analyzed the cytoplasm of the tumor cells, which was labeled by the intracellular CD79a antibody in a fluorescent double stain. Here, both the cell surface membrane and the cell volume

were significantly increased in the tumor cells of THRLBCL when compared with typical NLPHL (cell surface THRLBCL mean 782 μm^2 vs. NLPHL pattern A mean 327 μm^2 , $p < 0.001$, one-way-ANOVA with Bonferroni’s post hoc test for multiple testing; cell volume THRLBCL mean 763 μm^3 vs. NLPHL pattern A mean 150 μm^3 , $p < 0.001$, Kruskal–Wallis test with Dunn’s post hoc test for multiple testing; (Figs. 2B, C and 3). Similar results were obtained when the tumor cell size was independently quantified in CD20 immunostaining (cell surface THRLBCL mean 1187 μm^2 vs. NLPHL pattern A mean 555 μm^2 , $p = 0.0017$, unpaired t-test; cell volume THRLBCL mean 710 μm^3 vs. NLPHL pattern A mean 303 μm^3 , $p = 0.0007$, unpaired t test; Supplementary Fig. S2). In order to exclude the effect of the nuclear cell volume on the total cell volume, we also studied the ratio of nuclear/cytoplasmic volume, which was significantly larger in typical NLPHL cases when compared with THRLBCL (4.34 vs. 1.82, $p < 0.05$, Kruskal–Wallis test with Dunn’s post hoc test for multiple testing; Fig. 2D).

T cells in THRLBCL present significantly increased nuclear volumes when compared with NLPHL patterns A and C

In addition to the analysis of tumor cells, nuclear volumes were measured for T cells (OCT2⁻, DAPI-stained lymphocyte nuclei) and reactive B cells (weakly OCT2⁺ nuclei). B cells served here as an internal control to rule out effects of processing and technical preparation. For a technical validation, nuclear sizes of OCT2⁻ lymphocytes (corresponding to T cells) and CD3⁺ lymphocytes (in separately stained thick sections) were compared in NLPHL pattern A and THRLBCL and similar results were obtained with both methods (Supplementary Fig. S3). The nuclear surfaces of the T cells were only slightly increased in the T cells from THRLBCL when compared with NLPHL (mean 194 μm^2 in THRLBCL vs.

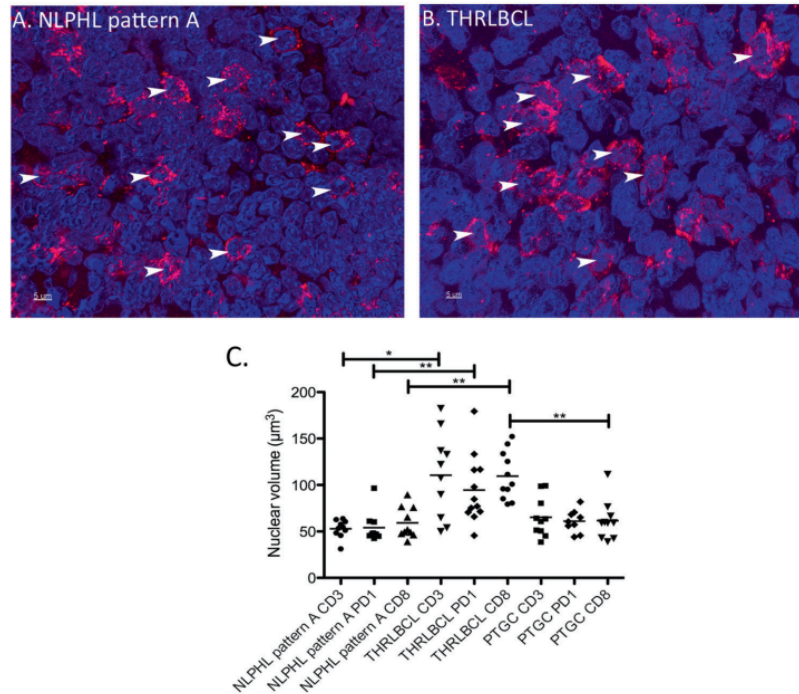


Fig. 5 3D nuclear reconstruction of the T cells of an NLPHL pattern A case and THRLBCL. **A** 3D reconstruction of nuclei in a CD8-stained (red) thick section of an NLPHL pattern A case. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Selected nuclei of T cells are highlighted by arrows. 63x magnification. **B** 3D reconstruction of nuclei in a CD8-stained (red) thick section of a THRLBCL case. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Selected nuclei of T cells are highlighted by arrows. 63x magnification. **C** Nuclear volumes of CD3⁺, PD1⁺ and CD8⁺ T cells in NLPHL pattern A, THRLBCL and PTGC (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, Kruskal–Wallis-Test with Dunn's post-test) quantified in 3D immunostained thick sections.

means of 134–141 μm^2 in NLPHL patterns A, C, and E, not significant; Fig. 4A). Surprisingly, the nuclear volumes of the T cells in THRLBCL were significantly enlarged (mean 137 μm^3) when compared with the T-cell nuclei from NLPHL patterns A and C (means 71 and 61 μm^3 , respectively, *p* < 0.01, Kruskal–Wallis test with Dunn's post hoc test for multiple comparisons; Figs. 4B, 5). In contrast, both the nuclear surfaces and nuclear volumes of normal B cells, serving as internal control, did not vary among the different NLPHL patterns A, C, and E and THRLBCL (Fig. 4C, D).

In order to elucidate if the observed nuclear size changes reflect a different composition of the microenvironment, T-cell nuclei of PD1⁺ and CD8⁺ T cells were analyzed separately and compared. All T-cell subtypes in THRLBCL had significantly larger nuclear volumes (means of 123, 110 and 111 μm^3 for CD3⁺, CD8⁺ and PD1⁺ T cells) when compared with NLPHL pattern A (means of 53, 59 and 54 μm^3 for CD3⁺, CD8⁺ and PD1⁺ T cells, *p* < 0.05, Kruskal–Wallis-Test with Dunn's post-test for multiple testing, Fig. 5). Progressively transformed germinal centers (PTGC), a reactive lesion with a strong morphologic similarity to NLPHL, presented T cells with nuclei similar to NLPHL (means of 65, 61 and 61 μm^3 for CD3⁺, CD8⁺ and PD1⁺ T cells). There were no significant differences between PD1⁺ and CD8⁺ T cells within one category investigated (Fig. 5).

Tumor cells of THRLBCL are in close contact with CD8⁺ T cells

We also studied the cellular interactions between tumor cells of NLPHL pattern A and THRLBCL on the one hand and CD8⁺ and PD1⁺ T cells in 3D thick tissue slices double-stained with CD79a on

the other hand. The percentage of tumor cells that had direct contact with CD8⁺ T cells was slightly higher in THRLBCL when compared with NLPHL pattern A (66% vs. 46% in THRLBCL vs. NLPHL pattern A, not significant, Fig. 6A–E). The same tendency was observed when the overlapping faces between cell membranes of CD8⁺ cells and neoplastic cells were measured (35 vs. 12 μm^3 in THRLBCL vs. NLPHL pattern A, not significant, Fig. 6B, D, F). In contrast, LP cells of NLPHL had more frequent contacts with PD1⁺ T cells and slightly larger overlapping faces with PD1⁺ T cells when compared with tumor cells from THRLBCL (57 vs. 30 μm^3 , not significant, Fig. 6G, H).

DISCUSSION

This paper focuses on the nuclear characteristics and cell sizes in NLPHL and THRLBCL, considering different histological NLPHL variant growth patterns. In previous studies^{14,15,19}, the hypothesis that NLPHL variant patterns represent progression forms of these lymphomas whereas THRLBCL represents transformation into an aggressive lymphoma was generated. Since the aggressiveness of tumors correlates with nuclear atypia, we assessed the nuclear morphology of tumor and bystander cells as well as tumor cell shape. The architecture of cancer cell nuclei is often diagnostic, as are the usually observed popcorn-like nuclei of LP cells in NLPHL²⁰. However, factors leading to such characteristic nuclear morphological features are multifactorial and include differences in the protein composition of the nuclear matrix, differences in chromatin texture related to the activation of different parts of the

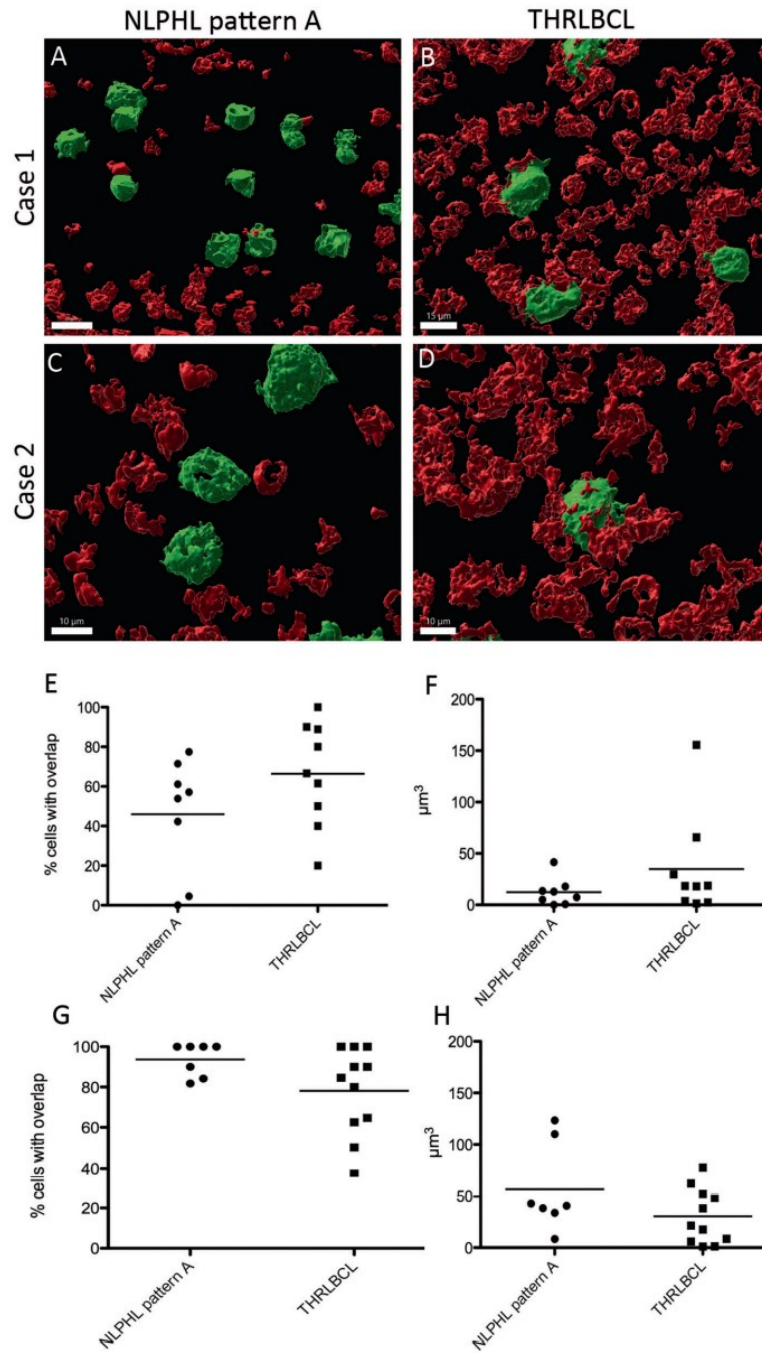


Fig. 6 Tumor cells in THRLBCL have more contacts with CD8⁺ T cells than LP cells in NLPHL pattern A. A–D 3D reconstruction of thick sections double-stained with CD8 and CD79a. Tumor cells were identified by the large cell size and positivity for CD79a. A, C Examples from two NLPHL pattern A cases show little contact faces of tumor cells with CD8⁺ cells. B, D Examples from two cases of THRLBCL present many and relatively large overlapping surfaces between tumor cells and CD8⁺ T cells. E Mean percentage of tumor cells with contact to CD8⁺ T cells in NLPHL and THRLBCL (Mann–Whitney-test, not significant). F Mean volumes of contacts between CD8⁺ T cells and tumor cells in NLPHL and THRLBCL (Mann–Whitney-test, not significant). G Mean percentage of tumor cells with contact to PD1⁺ T cells in NLPHL and THRLBCL (Mann–Whitney-test, not significant). H Mean volumes of contacts between PD1⁺ T cells and tumor cells in NLPHL and THRLBCL (Mann–Whitney-test, not significant).

genome, and differences in the number and structural organization of chromosomes²¹. In 2D histological sections, no apparent difference between the tumor cell nuclei of NLPHL variants and THRLBCL was observed. In contrast, in 3D confocal laser images, there were slight differences in nuclear size and more importantly, differences in the cell body surface and volume. 3D analysis of cell sizes is considered more powerful since in 3D, a 10% increase in cell diameter results in a 33% increase in volume²². An increase in tumor cell volume was observed in the NLPHL variant patterns C and E; suggesting a step-by-step progression. However, the difference in tumor cell volume was significant only in THRLBCL when compared with the typical NLPHL pattern A. Surprisingly, the nuclear volume of tumor cells was only slightly increased in the NLPHL variant patterns and THRLBCL. Also of interest, the nuclear/cytoplasmic ratio was largest in the typical NLPHL pattern A and smallest in the tumor cells of THRLBCL. This contrasts with expected results. The size and shape of tumor nuclei can reflect genomic instability on the one hand and are also related to different functional states on the other. A lower nuclear/cytoplasmic ratio in THRLBCL could be explained, for example, by higher metabolic and transcriptional activity. Another hypothesis may be the influence of follicular dendritic cells (FDCs) on the tumor cells in NLPHL. FDCs are absent in THRLBCL^{7,23}. A pro-proliferative effect and protection from apoptosis was shown for B cells that have intimate contacts with FDCs^{24–26}. Thus, the interaction of tumor cells with FDCs might have an additional effect on nuclear and cytoplasmic volume of the tumor cells. Another alternative hypothesis may be increased cell swelling after cell damage as a possible explanation, leading to enhanced cytoplasmic volume^{22,27}. A larger and hydropic cytoplasmic volume can be seen in cells that have experienced cellular stress^{28,29}. The fact that T cells in THRLBCL, in particular, had significant differences in nuclear volume suggests that the functional state and activation of T cells differs in THRLBCL from NLPHL. Surprisingly, not only CD8⁺ T cells, but T cells in general (CD3, PD1) presented enlarged nuclei in THRLBCL, pointing to a completely different immune microenvironment activation situation. It is known that activation of T cells leads to an increased size³⁰ and also to enlarged and elongated nuclei^{31,32}, suggesting an activation of the T cells in THRLBCL. The fact that CD8⁺ T cells were in close vicinity to tumor cells of THRLBCL with many overlapping cell surfaces supports the hypothesis of cellular stress of the tumor cells in THRLBCL leading to an increased cell body volume (Fig. 3D, Supplementary Fig. S4). Tumor cells and surrounding macrophages in THRLBCL frequently express PD-L1³³ possibly rendering CD8⁺ cells into an unresponsive state so that the tumor remains in a balance between cytotoxic host response and tumor survival via inhibition of effector functions of CD8⁺ cells.

Differences in the composition of the microenvironment of NLPHL and THRLBCL have previously been observed^{34,35}, with a higher number of macrophages and CD8⁺ T cells in THRLBCL. Similarly, Boudova et al.³⁶ found a higher number of activated cytotoxic T cells in the microenvironment of THRLBCL. In the present study we did not quantify the number of CD8⁺ T cells, since they were frequently numerous with confluent cell bodies in THRLBCL. However, in a previous study we observed a gradual increase with a strong individual variability in CD8⁺ cells from NLPHL variants towards THRLBCL and also increased CD8⁺ counts in diffuse large B-cell lymphomas transformed from NLPHL^{19,37}.

In summary, we see differences in the tumor cell size and nuclear size of reactive T cells in THRLBCL when compared with the typical histopathologic growth pattern of NLPHL. Despite the fact that the size and shape of cells remain descriptive, our results are in line with previous data³⁴, emphasizing that the microenvironment is the largest discriminating factor between typical NLPHL and THRLBCL, with an activated CD8⁺ T cell population in

THRLBCL closely attached to tumor cells of THRLBCL leading to cellular stress of the tumor cells, which may explain the low tumor cell content as a result of ineffective proliferation. Furthermore, we observe in the present study gradual changes from NLPHL pattern A over the atypical patterns with a maximum in THRLBCL, suggesting a step-wise progression and transformation process. This may be the reason why the histopathological delineation of THRLBCL from NLPHL pattern E is frequently difficult, particularly in small biopsies.

DATA AVAILABILITY

Original data represent large files of 3D images that are available on request from the corresponding author.

REFERENCES

1. Saariinen, S. et al. High familial risk in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **31**, 938–943 (2013).
2. Braeuninger, A. et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 9337–9342 (1997).
3. Steimle-Grauer, S. A., Tinguely, M., Seada, L., Fellbaum, C. & Hansmann, M. L. Expression patterns of transcription factors in progressively transformed germinal centers and Hodgkin lymphoma. *Virchows Arch* **442**, 284–293 (2003).
4. Menke, J. R. et al. CD20-negative nodular lymphocyte-predominant Hodgkin Lymphoma: a 20-year consecutive case series from a Tertiary Cancer Center. *Arch Pathol. Lab. Med.* **145**, 753–758 (2021).
5. Hartmann, S. et al. The prognostic impact of variant histology in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma: a report from the German Hodgkin Study Group (GHSg). *Blood* **122**, 4246–4252 (2013).
6. Anagnostopoulos, I. et al. European Task Force on Lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. *Blood* **96**, 1889–1899 (2000).
7. Fan, Z., Natkunam, Y., Bair, E., Tibshirani, R. & Warnke, R. A. Characterization of variant patterns of nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma with immunohistologic and clinical correlation. *Am. J. Surg. Pathol.* **27**, 1346–1356 (2003).
8. Prakash, S., Fountaine, T., Raffeld, M., Jaffe, E. S. & Pittaluga, S. IgD positive L&H cells identify a unique subset of nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **30**, 585–592 (2006).
9. Thurner, L. et al. Lymphocyte predominant cells detect Moxarella catarrhalis-derived antigens in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Nat. Commun.* **11**, 2465 (2020).
10. Bein, J., Thurner, L., Hansmann, M. L. & Hartmann, S. Lymphocyte predominant cells of nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma interact with rosetting T cells in an immunological synapse. *Am. J. Hematol.* **95**, 1495–1502 (2020).
11. Hartmann, S. et al. Landscape of 4D Cell Interaction in Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphomas. *Cancers (Basel)*. **13**, 5208 (2021).
12. Abramson, J. S. T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma: biology, diagnosis, and management. *Oncologist* **11**, 384–392 (2006).
13. Achten, R., Verhoef, G., Vanuytsel, L. & De Wolf-Peeters, C. T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma: a distinct clinicopathologic entity. *J. Clin. Oncol.* **20**, 1269–1277 (2002).
14. Hartmann, S. et al. Array comparative genomic hybridization reveals similarities between nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma and T cell/histiocyte rich large B cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* **169**, 415–422 (2015).
15. Schuhmacher, B. et al. JUNB, DUSP2, SGK1, SOCS1 and CREBBP are frequently mutated in T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma. *Haematologica* **104**, 330–337 (2019).
16. Bankhead, P. et al. QuPath: open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* **7**, 16878 (2017).
17. Thomos, M., Wurzel, P., Scharf, S., Koch, I. & Hansmann, M. L. 3D investigation shows walls and wall-like structures around human germinal centres, probably regulating T- and B-cell entry and exit. *PLoS ONE* **15**, e0242177 (2020).
18. Liebers, J., Wurzel, P., Reisinger, K. B. & Hansmann, M. L. 3D image analysis reveals differences of CD30 positive cells and network formation in reactive and malignant human lymphoid tissue (classical Hodgkin Lymphoma). *PLoS ONE* **14**, e0224156 (2019).
19. Hartmann, S. et al. Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma and T cell/histiocyte rich large B cell lymphoma - endpoints of a spectrum of one disease? *PLoS ONE* **8**, e78812 (2013).

20. Swerdlow, S. H. et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. (International Agency for Research on Cancer: Lyon, 2017).
21. Zink, D., Fischer, A. H. & Nickerson, J. A. Nuclear structure in cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 677–687 (2004).
22. Bjorklund, M. Cell size homeostasis: metabolic control of growth and cell division. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1866**, 409–417 (2019).
23. Younes, S., Rojansky, R. B., Menke, J. R., Gratzinger, D. & Natkunam, Y. Pitfalls in the diagnosis of nodular lymphocyte predominant hodgkin lymphoma: variant patterns, borderlines and mimics. *Cancers (Basel)* **13**, 3021 (2021).
24. Cormann, N. et al. Isolation of follicular dendritic cells from human tonsils and adenoids. V. Effect on lymphocyte proliferation and differentiation. *Immunol. Lett.* **14**, 29–35 (1986).
25. Petrasch, S. G., Kosco, M. H., Perez-Alvarez, C. J., Schmitz, J. & Brittinger, G. Proliferation of germinal center B lymphocytes in vitro by direct membrane contact with follicular dendritic cells. *Immunobiology* **183**, 451–462 (1991).
26. Petrasch, S., Brittinger, G., Wacker, H. H., Schmitz, J. & Kosco-Vilbois, M. Follicular dendritic cells in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk. Lymphoma* **15**, 33–43 (1994).
27. Schmoller, K. M. The phenomenology of cell size control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **49**, 53–58 (2017).
28. Lang, F. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J. Am. Coll. Nutr.* **26**, 613S–623S (2007).
29. Dubois, J. M. & Rouzaire-Dubois, B. The influence of cell volume changes on tumour cell proliferation. *Eur. Biophys. J.* **33**, 227–232 (2004).
30. Du, M., Kalia, N., Frumento, G., Chen, F. & Zhang, Z. Biomechanical properties of human T cells in the process of activation based on diametric compression by micromanipulation. *Med. Eng. Phys.* **40**, 20–27 (2017).
31. Gupta, S., Marcel, N., Sarin, A. & Shivashankar, G. V. Role of actin dependent nuclear deformation in regulating early gene expression. *PLoS ONE* **7**, e53031 (2012).
32. Fabrikant, G., Gupta, S., Shivashankar, G. V. & Kozlov, M. M. Model of T-cell nuclear deformation by the cortical actin layer. *Biophys. J.* **105**, 1316–1323 (2013).
33. Griffin, G. K. et al. Spatial signatures identify immune escape via PD-1 as a defining feature of T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma. *Blood* **137**, 1353–1364 (2021).
34. Van Loo, P. et al. T cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma shows transcriptional features suggestive of a tolerogenic host immune response. *Haematologica* **95**, 440–448 (2009).
35. Tousseyn, T. & De Wolf-Peeters, C. T cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma: an update on its biology and classification. *Virchows Arch* **459**, 557–563 (2011).
36. Boudova, L. et al. Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma with nodules resembling T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma: differential diagnosis between nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma and T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma. *Blood* **102**, 3753–3758 (2003).
37. Schuhmacher, B. et al. A strong host response and lack of MYC expression are characteristic for diffuse large B cell lymphoma transformed from nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Oncotarget* <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12363> (2016).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Katrin Bankov for excellent 2D imaging.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.S.S.D.: data acquisition and analysis, drafting of the manuscript; Y.S., J.B., S.S.: data acquisition and interpretation; M.L.H.: data interpretation, revising the manuscript; S.H.: concept, supervision, data interpretation, writing and revising the manuscript.

FUNDING

This project was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant HA6145/3-1). M.L.H. was supported by the BMBF (COMPLS2-087-Patho234). Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Frankfurt (157/17). Written informed consent was obtained from all patients in accordance with the Declaration of Helsinki.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41379-022-01016-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Sylvia Hartmann.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

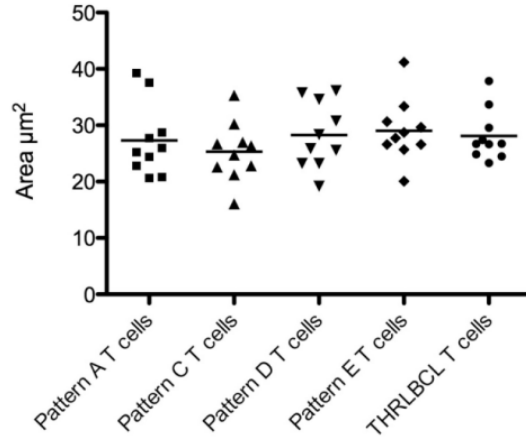
Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



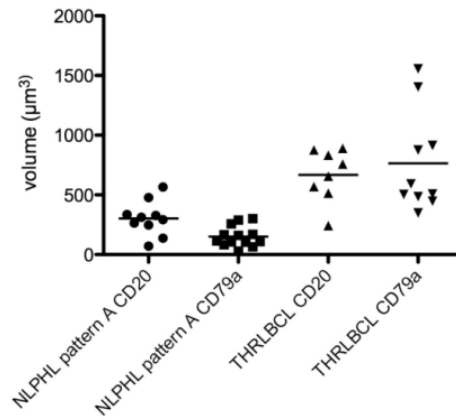
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

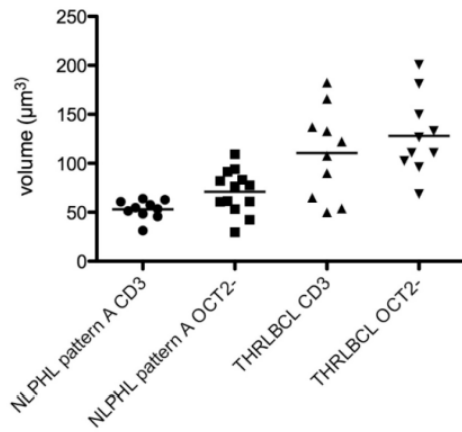
Supplementary Figures



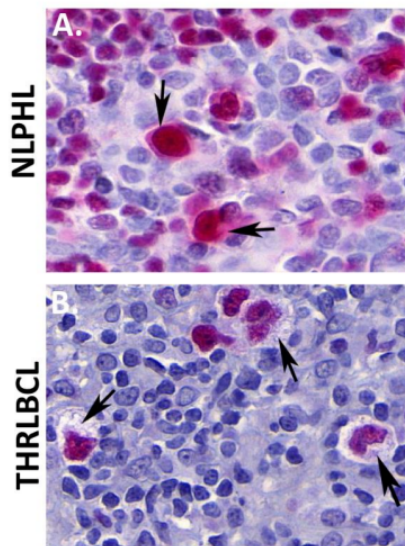
Supplementary Figure S1. Quantification of nuclear area of reactive T cells (OCT2-negative lymphocytes) in different growth patterns (A, C, D and E) of NLPHL and THRLBCL in 2D.



Supplementary Figure S2. Quantification of the 3D volume of the tumor cell body in NLPHL pattern A and THRLBCL. Tumor cell volumes were independently quantified in CD20 and CD79a immunostainings yielding comparable results.



Supplementary Figure S3. Quantification of the 3D nuclear volume of T lymphocytes in NLPHL pattern A and THRLBCL. T lymphocyte nuclear volumes were independently quantified in either OCT2 immunostaining, choosing lymphocytes with OCT2-negative nuclei, or in CD3-immunostaining, choosing positively labelled cells.



Supplementary Figure S4. Examples of 2D histological slides of NLPHL pattern A and THRLBCL with OCT2 staining (40x magnification).

- A. Examples of LP cells in NLPHL pattern A with a scant, moderately OCT2⁺ cytoplasm (highlighted by arrows).
- B. Examples of tumor cells of THRLBCL with a broad and pale, vacuolated cytoplasm hinting at cellular swelling (highlighted by arrows).

Darstellung des eigenen Anteils

Die hier vorgestellte Arbeit stellt eine publikationsbasierte Dissertation dar.

Zur eigenen Leistung zählte das Zusammenstellen eines geeigneten Patientenkollektivs. Dies wurde im ersten Schritt sowohl für das NLPHL, als auch für das THRLBCL erstellt und anschließend doppelt-pseudonymisiert. Anschließend erfolgte das Aufsuchen der einzelnen histologischen Schnitte aus dem Archiv des Referenz- und Konsultationszentrums für Lymphknoten- und Lymphompathologie am Dr. Senckenberg Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Frankfurt am Main. Zur weiteren eigenen Leistung zählte die zwei- und dreidimensionale Auswertung der histologischen Schnitte, sowie die tabellarische Präsentation dieser.

Zu guter Letzt erfolgte die Literaturrecherche und das Erstellen eines Entwurfes des Manuskripts, welches dann durch alle Beteiligten korrigiert und vervollständigt wurde. Das Peer-Review-Verfahren, das im Anschluss an das Einreichen erfolgte, führte zu weiteren Auswertungen und wurde durch eigene Leistung erbracht. Hierbei kam es zu Änderungen am finalen Manuskript, welches mit Hilfe aller ergänzt wurde.

Literaturverzeichnis

1. Hartmann S, Eichenauer DA, Plütschow A, et al. The prognostic impact of variant histology in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma: a report from the German Hodgkin Study Group (GHSg). *Blood*. 2013;122(26):4246-4292.
2. Abramson JS. T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma: biology, diagnosis, and management. *Oncologist*. 2006;11(4):384-392.
3. Achten R, Verhoef G, Vanuytsel L, De Wolf-Peeters C. T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma: a distinct clinicopathologic entity. *J Clin Oncol*. 2002;20(5):1269-1277.
4. Saarinen S, Pukkala E, Vahteristo P, Mäkinen MJ, Franssila K, Aaltonen LA. High familial risk in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol*. 2013;31(7):938-943.
5. Braeuninger A, Küppers R, Strickler JG, Wacker HH, Rajewsky K, Hansmann ML. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(17):9337-9342.
6. Anagnostopoulos I, Hansmann ML, Franssila K, et al. European Task Force on Lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. *Blood*. 2000;96(5):1889-1899.
7. Fan Z, Natkunam Y, Bair E, Tibshirani R, Warnke RA. Characterization of variant patterns of nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma with immunohistologic and clinical correlation. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(10):1346-1356.

8. Thomos M, Wurzel P, Scharf S, Koch I, Hansmann ML. 3D investigation shows walls and wall-like structures around human germinal centres, probably regulating T- and B-cell entry and exit. *PLoS One*. 2020;15(11):e0242177.
9. Liebers J, Wurzel P, Reisinger KB, Hansmann ML. 3D image analysis reveals differences of CD30 positive cells and network formation in reactive and malignant human lymphoid tissue (classical Hodgkin Lymphoma). *PLoS One*. 2019;14(10):e0224156.
10. Zink D, Fischer AH, Nickerson JA. Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(9):677-687.
11. Björklund M. Cell size homeostasis: Metabolic control of growth and cell division. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2019;1866(3):409-417.
12. Cormann N, Lesage F, Heinen E, Schaaf-Lafontaine N, Kinet-Denoel C, Simar LJ. Isolation of follicular dendritic cells from human tonsils and adenoids. V. Effect on lymphocyte proliferation and differentiation. *Immunol Lett*. 1986;14(1):29-35.
13. Petrasch SG, Kosco MH, Perez-Alvarez CJ, Schmitz J, Brittinger G. Proliferation of germinal center B lymphocytes in vitro by direct membrane contact with follicular dendritic cells. *Immunobiology*. 1991;183(5):451-462.
14. Petrasch S, Brittinger G, Wacker HH, Schmitz J, Kosco-Vilbois M. Follicular dendritic cells in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 1994;15(1-2):33-43.
15. Younes S, Rojansky RB, Menke JR, Gratzinger D, Natkunam Y. Pitfalls in the Diagnosis of Nodular Lymphocyte Predominant Hodgkin Lymphoma: Variant Patterns, Borderlines and Mimics. *Cancers (Basel)*. 2021;13(12):3021.
16. Schmoller KM. The phenomenology of cell size control. *Curr Opin Cell Biol*. 2017;49:53-58.

17. Lang F. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J Am Coll Nutr.* 2007;26(5 Suppl):613S-623S.
18. Dubois JM, Rouzair-Dubois B. The influence of cell volume changes on tumour cell proliferation. *Eur Biophys J.* 2004;33(3):227-232.
19. Du M, Kalia N, Frumento G, Chen F, Zhang Z. Biomechanical properties of human T cells in the process of activation based on diametric compression by micromanipulation. *Med Eng Phys.* 2017;40:20-27.
20. Gupta S, Marcel N, Sarin A, Shivashankar GV. Role of actin dependent nuclear deformation in regulating early gene expression. *PLoS One.* 2012;7(12):e53031.
21. Fabrikant G, Gupta S, Shivashankar GV, Kozlov MM. Model of T-cell nuclear deformation by the cortical actin layer. *Biophys J.* 2013;105(6):1316-1323.
22. Griffin GK, Weirather JL, Roemer MGM, et al. Spatial signatures identify immune escape via PD-1 as a defining feature of T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma. *Blood.* 2021;137(10):1353-1364.
23. Van Loo P, Tousseyn T, Vanhentenrijk V, et al. T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma shows transcriptional features suggestive of a tolerogenic host immune response. *Haematologica.* 2010;95(3):440-448.
24. Tousseyn T, De Wolf-Peeters C. T cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma: an update on its biology and classification. *Virchows Arch.* 2011;459(6):557-563.
25. Boudová L, Torlakovic E, Delabie J, et al. Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma with nodules resembling T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma: differential diagnosis between nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma and T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma. *Blood.* 2003;102(10):3753-3758.

Lebenslauf

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Beteiligten, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt und motiviert haben, meinen großen Dank aussprechen.

Zu allererst möchte ich mich bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. Sylvia Hartmann, für ihre herausragende Unterstützung und ständigen Beistand während der gesamten Arbeit bedanken. Ich schätze ihr Vertrauen in mich und unsere wundervolle Zusammenarbeit sehr, zumal diese die treibende Kraft zum Erstellen der Dissertation waren.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. Dr. h.c. Dipl. Biol. Martin-Leo Hansmann, der mir im Rahmen meiner Dissertation die notwendigen Materialien zur Auswertung zur Verfügung gestellt hat und mir mit produktiven Anregungen zur Seite stand, meinen Dank aussprechen.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Yvonne Steiner bedanken, die mich während meiner gesamten Dissertation begleitet, die Arbeit am konfokalen Mikroskop übernommen und die dreidimensionalen Schnitte für mich zur Verfügung gestellt hat. Zudem bedanke ich mich für die lieben Worte und die netten Gespräche, die ich während meiner gesamten Zeit im Labor mit ihr führen konnte.

Auch möchte ich Frau Katrin Bankov für die hervorragende Unterstützung zur Erstellung der zweidimensionalen Schnitte bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter, Afsaneh Ghorashi, sowie meinem Vater, Biyouk Sadeghi Shoreh Deli, denen ich meine Dissertation widme. Ich bedanke mich für euer bedingungslose Liebe und euer Glauben an mich. Dank euch habe ich gelernt, stark zu sein und an mich selbst zu glauben. Vielen Dank, dass ihr immer für mich da seid und mir immer in jeglichen Situationen meines Lebens zur Seite steht.

Auch bedanke ich mich bei meiner Schwester, Ayda Sadeghi Shoreh Deli. Danke, dass du mich in jeglichen Situationen begleitet, mich motiviert und mir immer ein Grund zum Lachen gezeigt hast. Danke, dass ich immer auf dich zählen kann.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner restlichen Familie, sowie bei meinen FreundInnen für ihre moralische Unterstützung und ihre Aufmunterung an stressigen Tagen bedanken. Danke, dass ihr für mich da seid.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

3D analyses reveal T cells with activated nuclear features in T-cell/histiocyte-rich large B-Cell lymphoma

am Dr. Senckenbergisches Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. med. Sylvia Hartmann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht*. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden (oder werden) in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Sadeghi Shoreh Deli A, Scharf S, Steiner Y, Bein J, Hansmann ML, Hartmann S. 3D analyses reveal T cells with activated nuclear features in T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma. *Mod Pathol.* 2022;10.1038/s41379-022-01016-8.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

*) im Falle des Nichtzutreffens entfernen