

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

betreut am
Dr. Senckenbergischen Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. Martin-Leo Hansmann

**Charakterisierung des reaktiven Begleitinfiltrats im HIV-assoziierten
klassischen Hodgkin-Lymphom, nodulären Lymphozyten-prädominanten
Hodgkin-Lymphom und T-Zell/Histiozyten-reichen großzelligen B-Zell-
Lymphom**

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

vorgelegt von

Christina Jakobus

aus Stuttgart

Frankfurt am Main, 2016

Dekan:	Prof. Dr. Josef Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. Sylvia Hartmann
Korreferent:	Prof. Dr. Peter Kraiczky
Tag der mündlichen Prüfung:	15.05.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Maligne Lymphome.....	1
1.2 Das Hodgkin-Lymphom	1
1.2.1 Das klassische Hodgkin-Lymphom.....	3
1.2.2 Das klassische Hodgkin-Lymphom bei HIV-Patienten.....	5
1.2.3 Das noduläre lymphozyten-prädominante Hodgkin-Lymphom.....	5
1.3 Das T-Zell/Histiozyten-reiche großzellige B-Zell-Lymphom	8
1.4 Klinische, morphologische und immunhistochemie Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen NLPHL und THRLBCL	8
1.5 Epstein-Barr-Virus (EBV): Epidemiologie und Zusammenhang mit cHL	9
1.6 CD4+ T-Zell-Subtypen und ihre Funktionen im Hodgkin-Lymphom	11
1.7 Humanes Immundefizienz Virus (HIV)	13
1.7.1 Epidemiologie, Typen und Aufbau des HIV	13
1.7.2 Pathophysiologie der HIV-Infektion	14
1.7.3 Reaktion des Immunsystems auf die HIV-Infektion.....	15
1.7.4 Natürlicher Verlauf der HIV-Infektion.....	16
1.7.5 Antiretrovirale Therapie und Verlauf der HIV-Infektion unter Therapie .	17
1.8 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Materialien	19
2.2 Methoden	22
2.2.1 Patientenkollektiv der HIV-assoziierten cHL-Fälle	22

2.2.2	Patientenkollektiv der NLPHL- und THRLBCL-Fälle	22
2.2.3	Herstellung von Paraffinschnitten	23
2.2.4	Immunhistochemische Färbung.....	24
2.2.5	Quantifizierung.....	24
2.2.6	Kokulturen.....	26
2.2.7	Statistik.....	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Ergebnisse der HIV- und Nicht-HIV-cHL-Fälle	33
3.1.1	Klinische Daten der Patienten	33
3.1.2	Zusammensetzung des Begleitinfiltrats.....	34
3.1.3	Rosetten um Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen	38
3.1.4	Kokulturen.....	40
3.1.5	Klinische Daten und Gewebehistologie	47
3.2	Ergebnisse der NLPHL- und THRLBCL-Fälle	49
3.2.1	Klinische Daten der Patienten	49
3.2.2	Zusammensetzung des Begleitinfiltrats.....	49
3.2.3	T-Zell-Rosetten um Tumorzellen	54
3.3	Vergleich der Ergebnisse der HIV/Nicht-HIV-Fälle und der NLPHL/THRLBCL-Fälle.....	55
4	Diskussion	57
4.1	Diskussion der Ergebnisse der HIV- und Nicht-HIV-cHL-Fälle	57
4.1.1	Zusammensetzung des Begleitinfiltrats.....	58
4.1.2	Makrophagen im HIV-assoziierten cHL	59
4.1.3	Immunstatus und Zusammenhang mit Prognose bei cHL-Patienten.....	63
4.1.4	EBV: Assoziation mit Makrophagenmigration ins Tumorgewebe und mit klinischem Verlauf?	64
4.2	Diskussion der Ergebnisse der NLPHL- und THRLBCL-Fälle	65

4.2.1	Zusammensetzung des Begleitinfiltrats.....	66
4.2.2	THRLBCL-like NPLHL und THRLBCL: Eine Entität?.....	67
4.3	Ähnlichkeiten des Begleitinfiltrats im THRLBCL-like NPLHL /THRLBCL und HIV-assoziierten cHL	69
5	Zusammenfassung	71
6	Summary.....	72
7	Literaturverzeichnis	73
8	Schriftliche Erklärung.....	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Skizzierung der verschiedenen Muster im NLPHL.	7
Abbildung 2: Antiapoptotischer Mechanismus von EBV in HRS-Zellen.	11
Abbildung 3: Aufbau eines HIV-Virions.	14
Abbildung 4: Der natürliche Verlauf der HIV-Infektion.	17
Abbildung 5: Wachstumsmuster von NLPHL, THRLBCL-like NLPHL und THRLBCL.	23
Abbildung 6: CD163+ Makrophagen im HIV-cHL.	25
Abbildung 7: CD4+ T-Zellen im HIV-cHL.	26
Abbildung 8: Skizzierung der 6-Well-Zellkulturplatte.	31
Abbildung 9: Verteilung der HIV-cHL-Fälle (n = 24).	34
Abbildung 10: CD4-Immunfärbung im HIV-cHL und im Nicht-HIV-cHL.	34
Abbildung 11: CD8-Immunfärbung im HIV-cHL und im Nicht-HIV-cHL.	35
Abbildung 12: CD163-Immunfärbung im HIV-cHL und im Nicht-HIV-cHL.	35
Abbildung 13: S100-Immunfärbung im HIV-cHL und im Nicht-HIV-cHL.	36
Abbildung 14: CD30-Immunfärbung im HIV-cHL und im Nicht-HIV-cHL.	36
Abbildung 15: Quantifizierung des Begleitinfiltrats im HIV-assoziierten cHL und HIV-negativen cHL.	37
Abbildung 16: CD4-Immunfärbung im Nicht-HIV-cHL zeigt eine große Anzahl an CD4+ T-Zellen, die sich als Rosetten um die HRS-Zellen anlagern.	39
Abbildung 17: CD163-Immunfärbung im HIV-cHL zeigt eine große Anzahl an CD163+ Makrophagen, die sich als Rosetten um die HRS-Zellen anlagern.	39
Abbildung 18: CD163+ Makrophagen-Rosette im HIV-cHL um eine HRS-Zelle.	40
Abbildung 19: FACS-Reinheitsbestimmung der durch MACS erhaltenen CD4-T-Zellsuspension.	41
Abbildung 20: FACS-Reinheitsbestimmung: der durch MACS erhaltenen CD14-Monozytensuspension.	42
Abbildung 21: Ausmessung der Cluster in der Kokultur von Zelllinie L-428 mit CD4+ T-Zellen.	43
Abbildung 22: Ausmessung der Cluster in der Kokultur von Zelllinie L-428 mit CD14+ Monozyten.	43
Abbildung 23: Ausmessung der Cluster in der Kokultur von Zelllinie L-428 mit	

CD4/CD14-Gemisch.	44
Abbildung 24: Fotografien der Wells.....	45
Abbildung 25: Durchmesser der Cluster.....	46
Abbildung 26: Ausstriche der Kokultur L-428 mit adhärenen Zellen.	47
Abbildung 27: Verteilung der NLPHL- und THRLBCL-Fälle (n = 68) nach Anzahl und Entität.	49
Abbildung 28: CD4-Immunfärbung im typisch knotigen NLPHL Typ A zeigt eine große Anzahl an CD4+ T-Zellen.....	50
Abbildung 29: CD4-Immunfärbung im THRLBCL-like NLPHL zeigt eine geringe Anzahl an CD4+ T-Zellen.	51
Abbildung 30: CD4-Immunfärbung im THRLBCL zeigt eine geringe Anzahl an CD4+ T-Zellen.	51
Abbildung 31: CD163-Immunfärbung im typisch knotigen NLPHL Typ A zeigt eine geringe Anzahl an CD163+ Makrophagen.	52
Abbildung 32: CD163-Immunfärbung im THRLBCL-like NLPHL zeigt eine große Anzahl an CD163+ Makrophagen.....	53
Abbildung 33: CD163-Immunfärbung im THRLBCL zeigt eine große Anzahl an CD163+ Makrophagen.	53
Abbildung 34: Quantifizierung des Begleitinfiltrats im typischen NLPHL Typ A und NLPHL Typ C, THRLBCL-like NLPHL und THRLBCL.	54
Abbildung 35: Quantifizierung des Begleitinfiltrats im NLPHL Typ A, NLPHL Typ B, THRLBCL-like NLPHL und THRLBCL, HIV-assoziierten cHL und HIV-negativen cHL.....	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	19
Tabelle 2: Antikörper für die Immunfärbung	19
Tabelle 3: Antikörper für die Durchflusszytometrie	20
Tabelle 4: Chemikalien und Lösungen	20
Tabelle 5: Kits.....	20
Tabelle 6: Medien und Puffer	21
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 8: Zelllinien.....	21
Tabelle 9: Verwendete Software	22
Tabelle 10: CD4+ T-Zell-Rosetten und CD163+ Makrophagen-Rosetten im Vergleich bei HIV-cHL-Fällen und bei Nicht-HIV-cHL-Fällen.....	38

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Erworbenes Immundefektsyndrom (engl. acquired immune deficiency syndrome)
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BCR	B-Zell-Rezeptor
cART	Kombinierte antiretrovirale Therapie (engl. combined antiretroviral therapy)
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cHL	Klassisches Hodgkin-Lymphom
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (engl. diffuse large B- cell lymphoma)
EBER	Epstein-Barr virus-encoded small RNA
EBV	Epstein-Barr-Virus
EBNA	EBV-spezifisches nukleäres Antigen (engl. Epstein-Barr virus nuclear antigen)
FACS	Durchflusszytometrie (engl. fluorescence- activated cell sorting)
FDC	Follikuläre dendritische Zellen (engl. follicular dendritic cells)
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Scatter)
GC	Keimzentrum (engl. germinal center)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HL	Hodgkin-Lymphom
HRS	Hodgkin-Reed-Sternberg
JAK/STAT	Janus kinase and Signal Transducer and Activator of Transcription
KS	Kaposi-Sarkom
LDCHL	Lymphozytenarmer Typ (engl. Lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma)
LMP	Latentes Membranprotein
LRCHL	Lymphozytenreicher Typ (engl. Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma)
MACS	Magnetische Zellseparation (engl. Magnetic Activated Cell Sorting)
MCCHL	Mischtyp (engl. Mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma)

Abkürzungsverzeichnis

NF- κ B	Engl. nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NLPHL	Noduläres Lymphozyten-prädominantes Hodgkin-Lymphom
NSCHL	Noduläre Sklerose (engl. Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma)
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. Peripheral Blood Mononuclear Cell)
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
THRLBCL	T-Zell/Histiozyten-reiches großzelliges B-Zell-Lymphom (engl. T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
RT	Reverse Transkriptase
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. Side Scatter)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organisation)

1 Einleitung

1.1 Maligne Lymphome

Als maligne Lymphome bezeichnet man klonale Neoplasien des lymphatischen Systems. Jährlich erkranken 12-15 von 100 000 Einwohnern an einem malignen Lymphom. Der Häufigkeitsgipfel liegt im höheren Lebensalter mit einer leichten Tendenz zum männlichen Geschlecht (m:w = 1,5:1) (Herold 2014).

Aufgrund der Diversität der Lymphome war die internationale Klassifikation lange Zeit uneinheitlich. Nach Zusammenstellen eines Expertengremiums aus Pathologen konnte 2001 die World Health Organisation (WHO) eine einheitliche Klassifikation der malignen Lymphome veröffentlichen, die sich in 2 Gruppen unterteilen lässt: Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) und Hodgkin-Lymphome (HL) (Eickernjäger 2010).

Die NHL-Einteilung erfolgt nach klinischen, morphologischen, immunphänotypischen und molekulargenetischen Kriterien, wobei die zelluläre Herkunft ganz wesentlich diese Kriterien bestimmt. NHL gehen entweder von B-Zellen (ca. 90%) oder T-Zellen (ca. 10%) und zu einem sehr kleinen Teil von „Natural Killer“ (NK)-Zellen aus. Innerhalb dieser Lymphome wird noch zwischen Vorläufer-B- und T-Zell-Lymphomen und reifen B- und T-Zell-Lymphomen unterschieden. Die reifen B- und T-Zell-Lymphome bestehen wiederum aus zahlreichen Subtypen und Varianten, welche mithilfe histologischer und immunphänotypischer Merkmale charakterisiert werden können (Jaffe 2009). Bei der klinischen Einteilung werden indolente und aggressive NHL unterschieden (Herold 2014).

Die Hodgkin-Lymphome werden hauptsächlich nach histologischen Gesichtspunkten eingeteilt.

1.2 Das Hodgkin-Lymphom

Das HL zählt mit einer Inzidenz von 3 Neuerkrankungen auf 100 000 Personen jährlich zu den eher häufigen malignen Lymphomen. In den Industriestaaten wie Europa und Amerika gibt es zwei Häufigkeitsgipfel. Der erste liegt zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr und der zweite um das 60. Lebensjahr. Dabei steht die Häufigkeit von Mann zu Frau im Verhältnis 3:2, wobei diese in den verschiedenen Subtypen des Lymphoms voneinander abweichen (Swerdlow 2008; Herold 2014).

Es gibt keine klar definierten Risikofaktoren für die Erkrankung an einem HL und es ist immer noch unklar, was die genaue Ursache für die Entstehung dieser Erkrankung ist. Jedoch scheint Familienzugehörigkeit, Immunstatus und Epstein-Barr-Virus (EBV)-Exposition in Zusammenhang mit dem HL zu stehen (Glaser und Jarrett 1996).

Das HL ist ein monoklonales B-Zell-Lymphom. Es besteht aus Tumorzellen und Begleitinfiltrat. Die malignen Tumorzellen werden Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) genannt (Swerdlow 2008). Sie haben ihren Ursprung in B-Lymphozyten, die im Keimzentrum der Lymphknoten eine somatische Hypermutation und Klassenwechsel durchlaufen. Dies konnte mithilfe von Einzelzell-PCR und dadurch detektierten rearrangierten Immunglobulingenen, die nur in B-Zellen vorkommen, nachgewiesen werden (Küppers et al. 1994). In einem befallenen Lymphknoten machen die mehrkernigen Sternberg-Riesenzellen und die einkernigen Hodgkinzellen nur ca. 1% des Zellinfiltrates aus. Das die Tumorzellen umgebende Zellinfiltrat ist heterogen und wird von einer variablen Anzahl von CD4-positiven Lymphozyten, Makrophagen, Plasmazellen, Eosinophilen, Granulozyten und Fibroblasten gebildet (Pileri et al. 2002; Steidl et al. 2011; Skinnider 2002), wobei CD4+ T-Zellen den überwiegenden Anteil ausmachen (Poppema et al. 1982). Um ein malignes Lymphom als HL zu klassifizieren, ist sowohl das Vorhandensein von HRS-Zellen als auch das die Tumorzellen umgebende Begleitinfiltrat essentiell. Da der Tumorzellgehalt sehr gering ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass für die Pathophysiologie der HL das zelluläre Begleitinfiltrat mit den darin befindlichen CD4+ T-Zellen (Poppema et al. 1982; Aisenberg und Wilkes 1982) eine essentielle Rolle spielen muss. Diese CD4+ T-Zellen lagern sich häufig als Rosetten um die HRS-Zellen an (Morris und Stuart 1984; Sanders et al. 1988; Trümper et al. 2001).

Die Klassifikation der WHO unterscheidet zwei Gruppen (Swerdlow 2008):

1. Das klassische Hodgkin-Lymphom = cHL (ca. 95%)
2. Das noduläre lymphozyten-prädominante Hodgkin-Lymphom = NLPHL (ca. 5%)

Diese beiden unterscheiden sich morphologisch, molekulargenetisch, immunhistochemisch und klinisch.

1.2.1 Das klassische Hodgkin-Lymphom

1.2.1.1 Morphologie

Das cHL wird nach seiner morphologischen bzw. histologischen Erscheinung in 4 Subgruppen unterteilt:

Noduläre Sklerose (NSCHL)

Das nodulär-sklerosierende cHL ist der mit Abstand am häufigsten vorkommende Typ der cHL (ca. 70%). Der Lymphknoten wird durch fibroblastenarme Kollagenfasern in Knoten unterteilt. Es muss mindestens ein Knoten von Kollagenfasern umschlossen sein, damit die Definition noduläre Sklerose zutrifft. Dieser Fibroseprozess ist meist verbunden mit einer deutlich verdickten Lymphknotenkapsel. Die HRS-Zellen neigen zur vermehrten Lobulierung des Kerns und tendieren zu mehr Zytoplasma als in den anderen cHL-Subtypen. In Formalin fixierten Schnitten zeigen sie eine Retraktion des Zytoplasmas und es scheint so, als sitzen die Tumorzellen in einer Lakune. Dieses Artefakt gibt den Zellen den Namen „Lakunarzellen“. Das restliche Infiltrat besteht aus zahlreichen eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie Histiozyten und Plasmazellen (Swerdlow 2008).

Mischtyp (MCCHL)

Der Mischtyp ist der zweithäufigste Subtyp unter den cHL. Die Lymphknotenstruktur ist meist völlig ausgelöscht, z. T. ist eine interstitielle Fibrose vorhanden, jedoch nicht so ausgeprägt wie beim nodulär-sklerosierenden Typ. Auch die Lymphknotenkapsel ist nicht verdickt. Das zelluläre Infiltrat variiert sehr stark und setzt sich aus Eosinophilen, Neutrophilen, Histiozyten und Plasmazellen zusammen, wobei ein Zelltyp meist dominant ist. In Fällen mit EBV-Infektion neigen die Histiozyten dazu Epitheloidzellmerkmale auszubilden und sich zu Granulom-ähnlichen Clustern zu gruppieren (Swerdlow 2008).

MCCHL kommt gehäuft bei Kinder und älteren Menschen vor und befindet sich bei Diagnosestellung meist im fortgeschrittenen Stadium mit schlechterer Prognose (Ansell 2012).

Lymphozytenreicher Typ (LRCHL)

Der Lymphozytenreiche Typ macht ca. 5% aller cHL aus. Es gibt zwei verschiedene Muster: eine knotige und eine weniger häufig vorkommende diffuse Lymphknoteninfiltration. Beim knotigen Typ ist die T-Zone des Lymphknotens meist verkleinert, da die Knoten das gesamte Gewebe einnehmen. Die Knoten setzen sich aus zahlreichen kleinen B-Lymphozyten zusammen und weisen gelegentlich kleine exzentrisch gelegene und verkümmerte Keimzentren (GC) auf.

Eosinophile und neutrophile Granulozyten sind kaum vorhanden und falls doch, liegen sie zwischen den Knoten. Die HRS-Zellen ähneln den LP-Zellen, den Tumorzellen des nodulären Lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphom (NLPHL), was zur Verwechslung mit dem NLPHL führen kann (Swerdlow 2008).

Auch klinisch zeigt dieser Subtyp Ähnlichkeiten zum NLPHL und weist ein Risikoprofil zwischen dem indolenten NLPHL (siehe Kapitel 1.2.3) und den anderen cHL-Typen auf (Diehl et al. 1999).

Lymphozytenarmer Typ (LDCHL)

Der Lymphozytenarme Typ kommt am seltensten vor (< 1%). Das Erscheinungsbild ist relativ variabel, jedoch besteht immer eine Gemeinsamkeit: Die relative Mehrheit der HRS-Zellen im Vergleich zum umgebenden lymphozytären Infiltrat. Oft ist das die Tumorzellen umgebende Gewebe fibrotisch umgebaut und zeigt ein sarkomatoides Erscheinungsbild (Swerdlow 2008).

1.2.1.2 Immunhistochemie

In fast allen cHL-Fällen sind die HRS-Zellen CD30-positiv und zum überwiegenden Teil auch CD15-positiv. Für gewöhnlich sind die HRS-Zellen CD45- und J-Ketten-negativ. Ein kleiner Teil der cHL-Fälle zeigt eine CD20- und ein noch kleinerer Teil CD79a-Expression. Dies ist jedoch im Gegensatz zum NLPHL, welches regelmäßig B-Zell-spezifische Oberflächenmoleküle aufweist (siehe Kapitel 1.2.3), die Ausnahme. Als einziger B-Zell-spezifischer Marker ist das Protein PAX5, ein B-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor, im Großteil der HRS-Zellen nachweisbar. Der Plasmazell-spezifische Transkriptionsfaktor MUM1 ist durchweg positiv (Swerdlow 2008).

1.2.2 Das klassische Hodgkin-Lymphom bei HIV-Patienten

Heutzutage haben HIV-Patienten, dank der verbesserten Therapiemöglichkeiten durch die kombinierte antiretrovirale Therapie (cART), ein deutlich geringeres Risiko AIDS-definierende Erkrankungen (z. B. Kaposi-Sarkom und Non-Hodgkin-Lymphom) zu erleiden. Die verbesserte Immunlage scheint die Patienten jedoch nicht davor zu schützen, die Nicht-AIDS-definierende Erkrankung cHL zu entwickeln (Bohlius et al. 2011; Powles et al. 2009). HIV-Infizierte haben im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ein ca. 10-fach höheres Risiko an einem cHL zu erkranken (Biggar et al. 2006; Lanoy et al. 2011; Herida et al. 2003; Powles et al. 2009).

Das cHL bei HIV-Patienten wird meist im fortgeschrittenen Stadium (Stadium III und IV) diagnostiziert und zeigt eine deutlich aggressivere Klinik mit extranodalem Befall, B-Symptomatik, schlechteres Ansprechen auf eine Therapie und eine kürzere Überlebenszeit als bei Nicht-HIV-Infizierten (Pelstring et al. 1991; Ree et al. 1991; Rubio 1994; Tirelli et al. 1995). Es ist immer noch weitgehend ungeklärt, wie es zu diesem Zusammenhang kommt.

Bei HIV-Patienten dominieren vor allem das MCCHL und das LDCHL, welche schon per se zu den cHL gehören, die häufig erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden, da sie ein sehr schnelles und aggressives Wachstum zeigen (Vaccher et al. 2001). Die HRS-Zellen im HIV-cHL weisen fast immer eine Infektion mit EBV auf (Audouin et al. 1992; Herndier et al. 1993).

1.2.3 Das noduläre lymphozyten-prädominante Hodgkin-Lymphom

Die Lymphknotenarchitektur ist fast vollkommen durch eine knotige oder knotig-diffuse Struktur ersetzt. Diese besteht aus einem Netzwerk von folliculären dendritischen Zellen, in welchem hauptsächlich kleinen Lymphozyten, Histiozyten und Epitheloidzellen liegen. Dazwischen befinden sich verteilt die eigentlichen Tumorzellen, genannt lymphozyten-prädominante Zellen (LP-Zellen) (Swerdlow 2008).

LP-Zellen stammen ebenso wie die HRS-Zellen von GC-B-Zellen ab (Braeuninger et al. 1997). Sie unterscheiden sich jedoch genetisch, morphologisch und phänotypisch/immunhistochemisch von diesen. LP-Zellen teilen mehr gemeinsame Merkmale mit normalen GC-B-Zellen, wohingegen HRS-Zellen B-Zell-spezifische Merkmale größtenteils verloren haben (Kuppers et al. 2002; Brune et al. 20). LP-Zellen

sind groß und besitzen gewöhnlich einen einzigen großen gefalteten oder mehrfach gelappten Kern und wenig Zytoplasma. Ihrem Aussehen nach erinnern sie an Popcorn, was ihnen den Namen „Popcorn“-Zellen einbrachte. Jedoch gibt es auch Ausnahmen, bei denen man die LP-Zellen morphologisch kaum von HRS-Zellen unterscheiden kann (Swerdlow 2008). Zur Differenzierung vom cHL setzt man immunhistochemische Färbungen ein, da die LP-Zellen im Gegensatz zu HRS-Zellen CD20-positiv und für gewöhnlich CD30 und CD15-negativ sind (Pinkus und Said 1988; Rüdiger et al. 1998). Das strukturelle Netzwerk der knotigen Areale im NLPHL bilden viele CD21+ folliculäre dendritische Zellen, in welchen hauptsächlich B-Zellen verteilt liegen. Die diffusen Areale setzen sich vor allem aus kleinen T-Lymphozyten, nur vereinzelt B-Lymphozyten und einzelnen oder in Clustern liegenden Histiozyten zusammen (Hansmann et al. 1991; Swerdlow 2008).

Das NLPHL kann assoziiert sein mit einer progressiven Transformation der Keimzentren (PTGC), dabei sieht man folliculäre Hyperplasien mit einer vergrößerten Mantelzone, die die Keimzentren zergliedert (Hansmann et al. 1990; King et al. 2014).

Bereits 1966 wurde das NLPHL in einen knotigen und einen diffusen Typ unterteilt (Lukes und Butler 1966). Diese histologischen Muster wurden im Laufe der Zeit weiter ausdifferenziert und näher charakterisiert.

Mittlerweile wird zwischen 6 morphologischen Varianten im NLPHL unterschieden (Abbildung 1):

- Klassischer, B-Zell-reicher, knotiger Typ = Typ A
- Serpiginös (bogenförmig)/konfluierender, knotiger Typ = Typ B
- Knotiger Typ mit vielen LP-Zellen außerhalb der knotigen Strukturen = Typ C
- Knotiger, T-Zell-reicher Typ = Typ D
- T-Zell/Histiozyten-reiches B-Zell-Lymphom (THRLBCL)-ähnlicher Typ = Typ E
- Diffuser, B-Zell-reicher Typ mit mottenfraßähnlichem Muster = Typ F

In einer Lymphknotenbiopsie können diese Muster alleine auftreten. Häufiger kommt jedoch eine Kombination aus zwei oder mehreren Mustern nebeneinander vor (Fan et al. 2003).

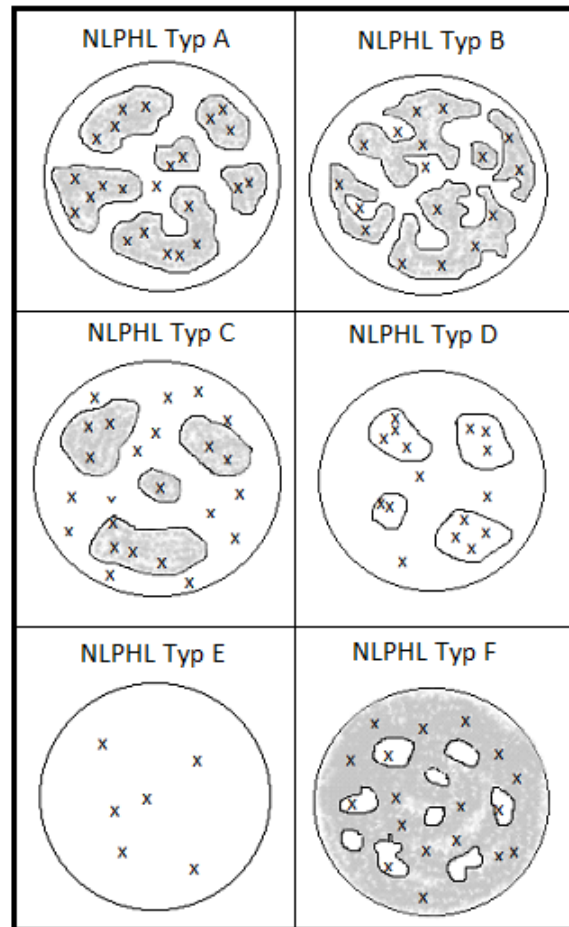


Abbildung 1: Schematische Skizzierung der verschiedenen Muster im NLPHL, modifiziert nach Fan *et al.* (Fan et al. 2003). NLPHL Typ A = klassischer knotiger Typ (B-Zell reich); NLPHL Typ B = serpiginös (bogenförmig) knotiger Typ; NLPHL Typ C = knotiger Typ mit vielen LP-Zellen außerhalb der knotigen Strukturen; NLPHL Typ D = knotiger, T-Zell reicher Typ; NLPHL Typ E = THRLBCL-ähnlicher Typ; NLPHL Typ F = diffuser, B-Zell-reicher Typ mit mottenfraßähnlichem Muster. (x: LP-Zellen; grauer Hintergrund: B-Zell-reicher Hintergrund; weißer Hintergrund: T-Zell-reicher Hintergrund).

Das NLPHL kommt häufiger beim männlichen Geschlecht (m:w = 3:1) vor und tritt insbesondere im Alter zwischen 30 und 40 Jahren auf (Lee und LaCasce 2009; Al-Mansour et al. 2010). Bei Diagnosestellung sind B-Symptome und extranodaler Befall selten. Wegen des meist lokal begrenzten Lymphknotenbefalls (Stadium I und II) sind die Heilungschancen für gewöhnlich sehr gut (Lee und LaCasce 2009). Es kann jedoch zu einer Progression in ein diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL) kommen (Hansmann et al. 1989) oder es können beide Entitäten simultan im selben Lymphknoten vorliegen (Grossman et al. 1991; Hartmann et al. 2014).

Es bestand lange Zeit Konsens, dass es keinen Zusammenhang zwischen EBV-Infektion und NLPHL gibt, jedoch wurden einzelne Fälle von NLPHL mit EBV-Infektion beschrieben (King et al. 2014; Anagnostopoulos et al. 2000; Huppmann et al. 2014).

1.3 Das T-Zell/Histiozyten-reiche großzellige B-Zell-Lymphom

Ursprünglich wurde das T-Zell/Histiozyten-reiche großzellige B-Zell-Lymphom (THRLBCL) als ungewöhnliche Variante eines diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) gesehen. Seit 2008 wird das THRLBCL von der WHO jedoch als eigenständige Entität klassifiziert (Swerdlow 2008). Das THRLBCL zeigt eine diffuse Tumordinfiltration, wobei einige Knoten noch vorhanden sein können (Achten et al. 2002). Histologisch weist es weniger als 10% neoplastische B-Zellen auf (Swerdlow 2008). Wie der Name schon sagt, besteht das zelluläre Begleitinfiltrat aus reichlich CD3+/CD5+ T-Zellen und vielen CD68+ Histiozyten (Achten et al. 2002). T-Zell-Rosetten um die Tumorzellen fehlen überwiegend (Boudova et al. 2003; Churchill, Hywyn R O et al. 2010).

Die Krankheit betrifft vor allem Männer mittleren Alters, die sich im fortgeschrittenen Stadium vorstellen und häufig einen Befall der Leber, der Milz oder des Knochenmarkes aufweisen (Boudova et al. 2003). Der klinische Verlauf des THRLBCL ist aggressiver (Achten et al. 2002; Delabie et al. 1992) als beim NLPHL, wohingegen dieses (wie zuvor beschrieben) eine sehr gute Prognose aufweist (Diehl et al. 1999).

Sehr häufig ähneln die neoplastischen B-Zellen im THRLBCL Immunoblasten des DLBCL, HRS-Zellen des cHL oder LP-Zellen des NLPHL (Lim et al. 2002).

Eine Assoziation zwischen EBV-Infektion und THRLBCL ist umstritten und vermutlich nur in den Fällen nachweisbar, die eine Ähnlichkeit zum cHL aufweisen (Lim et al. 2002; Tousseyn und Wolf-Peeters 2011).

1.4 Klinische, morphologische und immunhistochemie Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen NLPHL und THRLBCL

Vor allem das THRLBCL-ähnliche („THRLBCL-like“) NLPHL (NLPHL Typ E) weist sehr große Ähnlichkeiten zum THRLBCL auf und ist daher die größte Herausforderung in der histologischen Differenzierung. Dieser Subtyp kommt signifikant häufiger bei Rezidivpatienten vor (Fan et al. 2003). Morphologische Varianten des NLPHL, die ein T-Zell- und Histiozyten-reiches Begleitinfiltrat aufweisen, präsentieren sich, wie das THRLBCL, mit B-Symptomatik und in einem klinisch fortgeschrittenen Stadium (Stadium III/IV) (Boudova et al. 2003, Hartmann et al. 2013a).

Die neoplastischen B-Zellen beider Entitäten weisen Merkmale von Keimzentrumzellen

auf und ähneln sich in ihrem Genexpressionsprofil (Brune et al. 2008), ihrer Morphologie (Fraga et al. 2002) und Immunphänotypisierung. Beide können anhand von Pan-B-Zellmarkern charakterisiert werden und zeigen im Gegensatz zum cHL keine CD15- und CD30-Expression (Abramson 2006).

Das NLPHL weist viele CD3+ T-Zellen und CD4+/CD57+ T-Zellen (Leu7-positiv, NK-Zellen) im Begleitinfiltrat auf (Poppema 1989; Kamel et al. 1993), die häufig Rosetten um die Tumorzellen bilden (Fraga et al. 2002; Anagnostopoulos et al. 2000). Diese T-Zell-Rosetten lassen sich mit PD-1 färben, einem Marker für folliculäre T-Helferzellen (Nam-Cha et al. 2008). PD-1+ T-Zellen sind jedoch auch in THRLBCL-Fällen vorhanden. Das Vorkommen von PD-1+ T-Zellen ist somit kein ausreichendes Kriterium zur Unterscheidung beider Entitäten (Churchill, Hywyn R O et al. 2010; Chetaille et al. 2009).

Das THRLBCL besitzt nur wenige CD4+/CD57+ T-Zellen und weist im Gegensatz zum NLPHL kaum B-Zellen auf (Rüdiger et al. 1998; Kamel et al. 1993). Das Begleitinfiltrat besteht hauptsächlich aus CD68+ Histozyten und CD3+/CD5+ Lymphozyten, welche zu einem kleinen Teil CD4+ sind und zu einem deutlich größeren Teil TIA1+/CD8+ (Fraga et al. 2002; Tousseyn und Wolf-Peeters 2011). Ein Netzwerk aus CD21+ folliculären dendritischen Zellen ist im NLPHL vorhanden, im THRLBCL nicht (Boudova et al. 2003; Tousseyn und Wolf-Peeters 2011).

Nach der aktuellen Klassifikation der WHO reicht ein einziges knotiges Areal (mit unter Kapitel 1.2.3 genannten Merkmalen) in einem ansonsten diffusen Wachstumsmuster aus, um die Diagnose NLPHL mit THRLBCL-ähnlichen Arealen statt THRLBCL zu stellen (Swerdlow 2008).

1.5 Epstein-Barr-Virus (EBV): Epidemiologie und Zusammenhang mit cHL

HIV-cHL-Patienten weisen zu 80-100% eine EBV-Infektion der HRS-Zellen auf (Audouin et al. 1992; Herndier et al. 1993; Guidoboni et al. 2005). Hingegen wird nur bei 38% der HIV-negativen cHL eine EBV-Infektion der Tumorzellen nachgewiesen (Herbst et al. 1991).

Das EBV ist ein Virus aus der Familie der Herpesviridae. Einmal infiziert persistiert das Virus lebenslang in den Gedächtnis-B-Lymphozyten seines humanen Wirtes (Thorley-Lawson 2001). Weltweit sind über 95% der Menschen latent infiziert (International

Agency for Research on Cancer). Meist zeigt sich eine Primärinfektion im Kindesalter asymptomatisch. Im Erwachsenenalter verläuft die Infektion jedoch häufig symptomatisch. Dann spricht man vom Krankheitsbild der infektiösen Mononukleose (syn. Pfeiffer'sches Drüsenfieber). Ein Zusammenhang zwischen Mononukleose und einer erhöhten Inzidenz von cHL wurde bereits bestätigt (Hjalgrim 2000).

Studien zeigten, dass die Prävalenz von EBV-assoziierten cHL-Fällen bei Kindern, beim männlichen Geschlecht sowie bei den histologischen Subtypen MCCHL und LDCHL am höchsten ist. EBV-positive cHL zeigten zudem häufiger ein fortgeschrittenes klinisches Stadium. Weiterhin war die Häufigkeit EBV-assoziiierter cHL auch von der geographischen Herkunft abhängig (Lee et al. 2014; Reeves und Doms 2002).

Das EBV hat in einigen Tumoren transformierende Wirkung, wie dem endemischen Burkitt-Lymphom, dem Nasopharyngealen Karzinom und auch dem cHL.

Die Wachstumsförderung EBV-infizierter Zellen wird durch folgende Proteine des Virus reguliert:

- EBNA1: Essentiell für Genregulation, DNA-Replikation und Erhalt des viralen Genoms (Duellman et al. 2009)
- LMP1: Ähnelt dem aktivierten CD40-Rezeptor und verursacht konstitutive NF- κ B, JAK/STAT-Aktivierung, verhindert die Apoptose und sichert das Überleben der B-Zelle (Rastelli et al. 2008) (Abbildung 2).
- LMP2a: Ähnelt dem B-Zell-Rezeptor (BCR), führt zu konstitutiven B-Zell-Aktivierung oder ersetzt den BCR bei Nicht-Vorhandensein, was die B-Zelle ansonsten in die Apoptose führen würde (Mancao und Hammerschmidt 2007; Bräuninger et al. 2006) (Abbildung 2).

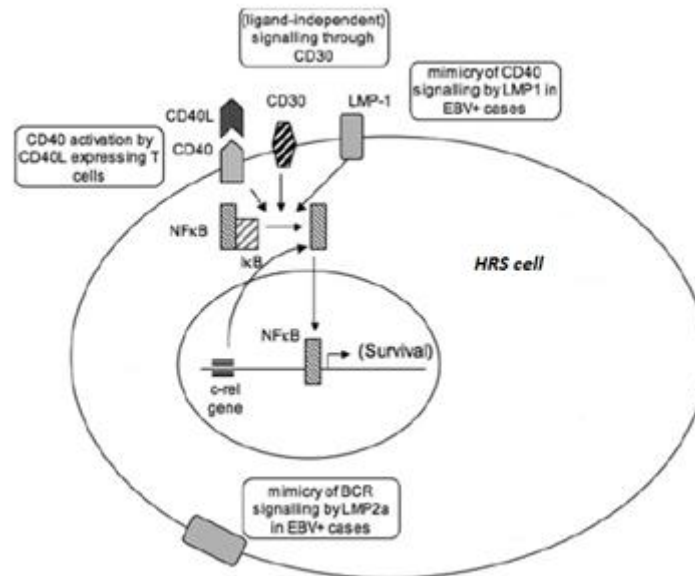


Abbildung 2: Antiapoptotischer Mechanismus von EBV in HRS-Zellen, modifiziert nach Bräuninger *et al.* (Bräuninger *et al.* 2006).

1.6 CD4+ T-Zell-Subtypen und ihre Funktionen im Hodgkin-Lymphom

Da die Tumorzellen im cHL und NLPHL einen sehr geringen Teil im befallenen Lymphknoten ausmachen, spielt für die Pathophysiologie der Krankheit das zelluläre Infiltrat eine essentielle Rolle.

Einen Großteil des zellulären Begleitinfiltrats machen CD4-Zellen (T-Helferzellen) aus. Diese Zellen haben eine wichtige Rolle sowohl bei der humoralen als auch bei der zellulären Immunantwort. Sie wurden lange Zeit in zwei verschiedene Gruppen unterteilt, die jeweils unterschiedliche Immunantworten hervorrufen: Th1- und Th2-Zellen. Th1-Zellen verursachen eine proinflammatorische Reaktion und aktivieren Makrophagen zur bakteriellen Beseitigung von eindringenden (intrazellulären) Erregern, vermittelt durch Zytokine wie u. a. INF- γ , IL-2, IL-12 und der Hochregulation spezifischer Oberflächenmoleküle auf Makrophagen. Th2-Zellen aktivieren B-Zellen und regen diese zum Isotopenswitch an. Durch die Sekretion bestimmter Zytokine, wie IL-10, IL-4 und TGF- β , besitzen sie eine antiinflammatorische Wirkung und helfen bei der Beseitigung extrazellulärer Bakterien (Skinnider 2002).

Diese Klassifikation ist mittlerweile aufgrund intensiver Forschung in diesem Bereich veraltet. Zwei weitere T-Helferzell-Gruppen stellen Th17-Zellen und T_{FH}-Zellen dar. Th17-Zellen exprimieren IL-17, TNF- α , IL-6, GM-CSF. Ein wichtiger Überlebensfaktor

für die Th17-Zellen ist IL-23. Ihre Funktion besitzen Th17-Zellen in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen (z. B. Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose, Psoriasis, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen) (Weaver et al. 2007).

T_{FH}-Zellen (follikuläre T-Helferzellen) findet man in der Peripherie von Keimzentren in reaktiven Lymphknoten. Sie kommunizieren mit GC-B-Zellen und unterstützen diese in ihrer Funktion. Wie B-Zellen exprimieren sie den Oberflächenrezeptor CXCR5 (Chtanova et al. 2004). Als Wachstumsfaktoren benötigen sie die Zytokine IL-2 und IL-6 (Nurieva et al. 2008). Diese aktivierten T-Zellen besitzen unterschiedliche Oberflächenmarker, wie PD-1, CXCL13 und ICOS (Akiba et al. 2005; Atayar et al. 2006; Nam-Cha et al. 2008; Leval et al. 2007; Marafioti et al. 2010), die als T-Zell-Rosettenmarker im NLPHL und THRLBCL verwendet werden können (Nam-Cha et al. 2008).

Weitere Studien entdeckten einen weiteren CD4⁺ T-Helferzell-Typen, welcher sich wiederum in mindestens drei Subgruppen (CD4⁺CD25⁺ T-reg-Zellen, T_{R1}-Zellen, T_{H3}-Zellen) unterteilen lässt (Thompson und Powrie 2004; Corthay 2009). Die genaue Erforschung dieser so genannten regulatorische CD4⁺ T-Zellen (CD4⁺ Treg, veraltet: Suppressor-T-Zellen) ist im Gange. Bekannt ist eine entscheidende Rolle regulatorischer T-Zellen in der Pathogenese von Tumorentstehungen (Knutson et al. 2007; Marshall et al. 2004).

In frühen Jahren ging man davon aus, dass die T-Zellen im cHL aktivierte T-Helfer/Gedächtniszellen sind (Poppema 1989), diese eine Th2-Subpopulation darstellen und somit antiinflammatorische Wirkung besitzen (Skinnider 2002; Poppema und van den Berg 2000). Grund dafür war der Nachweis des Zytokins IL-10 im reaktiven Begleitinfiltat von cHL. Jedoch ist mittlerweile bekannt, dass IL-10 in Abwesenheit von IL-4 ein Charakteristikum von regulatorischen T-1-Zellen (T_{R1}-Zellen) ist. In neueren Untersuchungen konnte bewiesen werden, dass CD4⁺ Treg den überwiegenden Anteil im cHL ausmachen (Marshall et al. 2004; Ishida et al. 2006; Tanijiri et al. 2007). Sehr wahrscheinlich unterdrücken die CD4⁺ Treg die T-Helferzell-Immunantwort und liefern somit eine mögliche Erklärung, warum das Immunsystem eines cHL-Patienten nicht in der Lage ist, die HRS-Zellen zu beseitigen (Marshall et al. 2004; Ishida et al. 2006).

1.7 Humanes Immundefizienz Virus (HIV)

1.7.1 Epidemiologie, Typen und Aufbau des HIV

Im Jahre 2011 infizierten sich weltweit 2,5 Mio. Menschen neu mit HIV (UNAIDS). 34 Mio. Menschen weltweit leben bereits mit HIV, davon die meisten in den Subsaharagebieten in Afrika. Dort ist jeder 20. Erwachsene HIV-positiv (UNAIDS). 2011 starben jährlich 1,7 Mio. Menschen an AIDS-definierenden Krankheiten wie z. B. Non-Hodgkin-Lymphomen oder Kaposi-Sarkomen. 2005 waren 2,3 Mio. Todesfälle zu verzeichnen. Dieser deutliche Rückgang von 2,3 auf 1,7 Mio. Todesfälle innerhalb von 6 Jahren ist auf einen weltweit verbesserten Zugang auf die cART zurückzuführen (UNAIDS).

Es gibt zwei Typen des HI-Virus: HIV-1 und HIV-2. Sie unterscheiden sich kaum elektronenmikroskopisch, jedoch in ihrer Molekularstruktur. Aufgrund der höheren Pathogenität und deutlich häufigeren Infektionen des Menschen durch HIV-1 (Reeves und Doms 2002) wird im Folgenden nur auf das HIV-1 eingegangen.

Das HIV-1 ist ein Retrovirus und gehört zur Familie der Lentiviren. Es ist lymphozytotrop und neurotrop. Die Zielzellen der HIV-Infektion sind Zellen mit dem Glykoprotein und Oberflächen-Antigen CD4. Dazu gehören CD4+ T-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten, Langerhans-Zellen der Epidermis und Teile der Mikroglia (Dalglish et al. 1984).

Die Produkte der HIV-1-Gene *pol* und *gag* formieren den Kern der reifenden HIV-Partikel. Durch proteolytische Spaltung des vom *gag*-Gen kodierten Vorläuferprotein p55 entstehen die inneren Strukturproteine p24, p7, p6, p19. Das *pol*-Gen kodiert die enzymatischen Proteine: die virale Protease, die reverse Transkriptase (RT) und die Integrase. Die *env*-Genprodukte bilden die Virushülle mit den Glykoproteinen gp41 und gp120. Diese werden durch eine zelluläre Protease aus dem *env*-Vorläuferprotein gp160 freigesetzt (Suerbaum et al. 2012) (Abbildung 3).

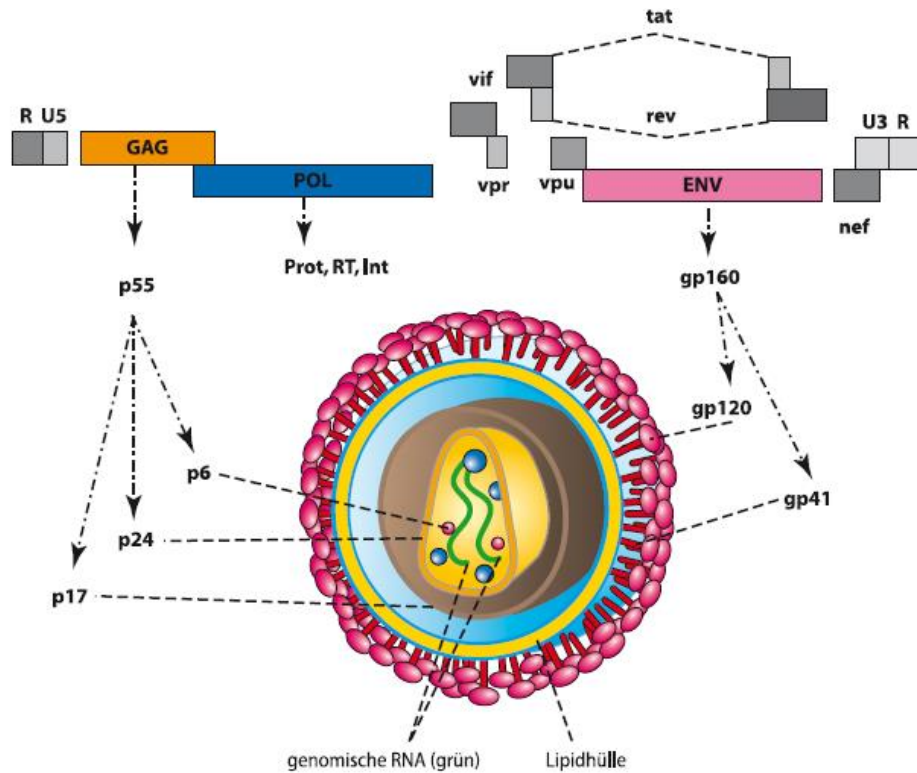


Abbildung 3: Aufbau eines HIV-Virions und Lokalisation der von verschiedenen HIV-Genen kodierten Proteine. Quelle: (Suerbaum et al. 2012)

1.7.2 Pathophysiologie der HIV-Infektion

Um in die Zielzelle einzutreten, muss das HIV-1-Oberflächenglied gp120 an zwei Rezeptoren binden: CD4 und Chemokinrezeptoren. Der CD4-Rezeptor gehört zum T-Zell-Rezeptor(TCR)/CD3-Komplex und kann an HLA-Klasse-II-Moleküle von antigenpräsentierenden Zellen (APC) binden (Hoffmann). Die Bindung von gp120 hat zusätzlich zum Eintrittsmechanismus einen apoptosefördernden Effekt auf die T-Zellen (Banda et al. 1992, Suerbaum et al. 2012). Jedoch kann das HIV-1 nicht ohne einen zum CD4-Rezeptor zusätzlichen Chemokinrezeptor in die Zielzelle eintreten. Makrophagentrope HIV-1 binden an den Korezeptor CCR5 (Deng et al. 1996), T-Zell-trope HIV-1 an CXCR4 (Feng et al. 1996). Damit eine Fusion zwischen dem Virus und der Wirtshülle stattfinden kann, wird die transmembranäre Domäne gp41 des Virushüllproteins benötigt.

Nach der Verschmelzung zwischen Virus und Wirt, entleert sich der Viruskern in das Zytoplasma (engl. uncoating) oder wird endozytotisch ins Wirtsinere aufgenommen. Dann beginnt die RT, die virale RNA in provirale, nicht-integrierte zirkuläre HIV-DNA

umzuschreiben. Diese doppelstrang (ds)-DNA wird in den Zellkern importiert (Miyachi et al. 2009). Damit das HIV-Genom mithilfe des Enzyms Integrase in die Wirts-DNA eingebaut werden kann, muss die ruhende CD4+ T-Zelle erst aktiviert werden. Zu einer Aktivierung der HIV-1-infizierten Immunzelle kommt es nach Antigenkontakt, z. B. im Rahmen einer gewöhnlichen oder opportunistischen Infektion. Latent infizierte, ruhende CD4+ T-Zellen stellen neben Monozyten, Makrophagen und Gliazellen des ZNS ein langlebiges Virusreservoir dar, da sich das Virus dem Angriff durch virale Medikamente bzw. dem Immunsystem entziehen kann (Chun et al. 1997, Suerbaum et al. 2012).

Fällt die Zahl der CD4+ T-Zellen unter einen bestimmten Schwellenwert (meist $< 200/\mu\text{l}$) kommt es zu opportunistischen Infektionen und Malignomen (Hanson et al. 1995). Nach der Transkription von HIV-1-Genen lagern sich diese zu einem infektiösen Viruspartikel zusammen. Als letzter Schritt der Virus-Replikation findet die Ausknospung (engl. budding) des Viruspartikels statt. Aufgrund der sehr fehlerträchtigen Replikation des HIV-1 entsteht eine Vielzahl von Virusmutanten (Suerbaum et al. 2012).

1.7.3 Reaktion des Immunsystems auf die HIV-Infektion

Das HIV-1 infiziert ca. 10^8 - 10^9 CD4+ T-Zellen pro Tag und reduziert deren Lebensdauer auf ca. 1,1 Tage. Da T-Helferzellen eine zentrale Rolle in der Auslösung einer B- als auch T-Zell-Antwort spielen, führt die Zerstörung der CD4+ T-Zellen zu einer gestörten spezifischen Immunantwort. Die CD4-Depletion kann zwar durch Neubildung von unreifen T-Zellen aus dem Knochenmark zunächst kompensiert werden, führt aber über die Jahre und vor allem ohne cART zu einem peripheren Lymphozytenabfall, einem Versagen des Immunsystems und zu klinischen Symptomen (Suerbaum et al. 2012).

Bei einer HIV-1-Infektion sind sowohl das adaptive Immunsystem als auch das zelluläre und humorale Immunsystem beteiligt. Die Präsentation von Viruspartikeln auf dem Oberflächenmolekül MHC-I von APC locken zytotoxische CD8+ T-Zellen (CTL) an. Diese sind in den ersten 1-3 Wochen für die frühe Eindämmung der Virusreplikation verantwortlich (Suerbaum et al. 2012), können diese jedoch nicht auf Dauer effizient verhindern (Benito et al. 2004; Lieberman et al. 2001). Im weiteren Verlauf der Infektion werden Antikörper gegen virale Proteine (p24, p19, gp41, gp120) gebildet, die zu einer Neutralisation des Virus führen (Chung et al. 2011). Sowohl CTL als auch neutralisierende Antikörper üben einen Selektionsdruck auf die Viren aus und bewirken

dadurch Fluchtmutationen des HIV (Wei et al. 2003). Zusammen mit der fehlerträchtigen Replikation des HIV-1 durch die RT entstehen eine Vielzahl von Virusmutanten (ca. 10^9 - 10^{11} neue Virusmutanten pro Tag) (Suerbaum et al. 2012).

1.7.4 Natürlicher Verlauf der HIV-Infektion

Der Verlauf einer HIV-Infektion wird in 3 Phasen eingeteilt: Akute Phase, Latenzphase und AIDS. Die akute HIV-Infektion ist durch eine hohe Virusreplikationsrate, ein Abfallen der CD4+ T-Zellen und eine Expansion der Virus-spezifischen Immunantwort geprägt. Innerhalb von 4 Wochen nach einer HIV-Infektion können grippeartige Symptome auftreten, welche jedoch auch ganz fehlen können (Suerbaum et al. 2012).

Nach der Serokonversion (dem Zeitpunkt des ersten Auftretens HIV-spezifischer Antikörper) geht die Viruslast stark zurück und die CD4+ T-Zellzahl steigt wieder an. Die Ausgangswerte können normalerweise aber nur durch eine cART wieder hergestellt werden. Es folgt die Latenzphase, auch chronische Phase genannt, in der die Patienten meist über mehrere Jahre klinisch asymptomatisch sind (Suerbaum et al. 2012). In dieser Zeit steigt bei untherapierten Patienten die Viruslast langsam an, während die CD4+ T-Zellzahl bis zu einem kritischen Punkt abfällt (ca. < 200 CD4+ T-Zellen/ μ l), ab dem eine ausreichende Immunantwort nicht mehr möglich ist (Mellors et al. 1996). In der folgenden Phase (AIDS), die im Durchschnitt 8-10 Jahre nach Erstinfektion eintritt, treten sogenannte opportunistische Infektionen sowie daraus resultierende maligne Erkrankungen (z. B. Kaposi-Sarkom, Non-Hodgkin-Lymphom, Zervixkarzinom) auf. Ohne Therapie sterben AIDS-Patienten nach einer individuell unterschiedlich langen Zeit (Kaufmann et al. 2011, Suerbaum et al. 2012) (Abbildung 4).

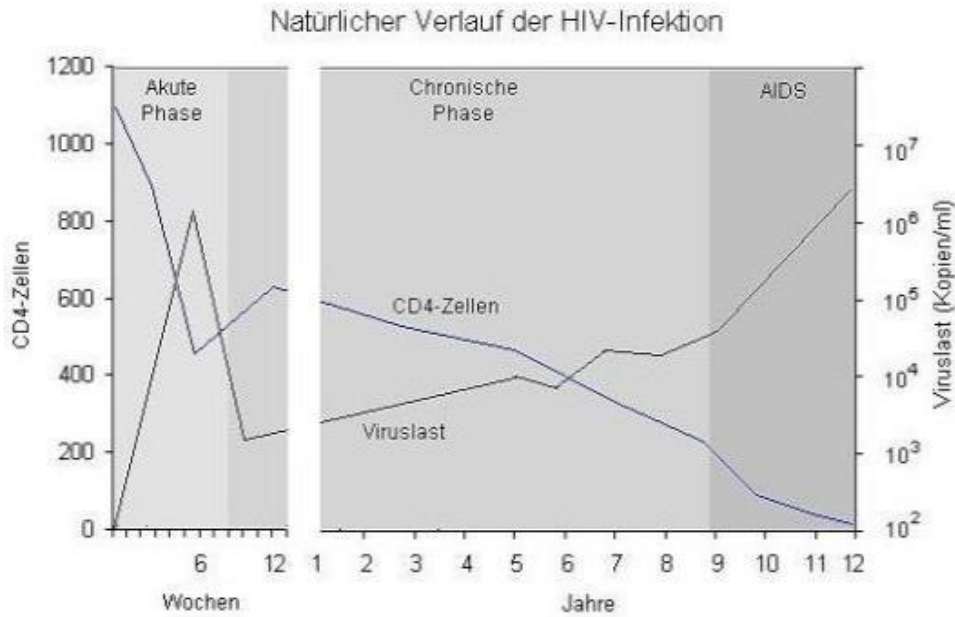


Abbildung 4: Der natürliche Verlauf der HIV-Infektion, Quelle: (Hoffmann 2013)

1.7.5 Antiretrovirale Therapie und Verlauf der HIV-Infektion unter Therapie

Eine cART besteht aus mindestens 3 Medikamenten: Einer Kombination aus 2 nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren plus einem Nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitor, einem Proteaseinhibitor oder einem Integraseinhibitor (Suerbaum et al. 2012).

Der grundlegende Effekt einer cART-Therapie ist, die Virusreplikation zu verhindern. Das Therapieziel ist dabei die Viren auf einen Wert < 50 Kopien/ml zu supprimieren. Die CD4-Zellzahl steigt an und der Immunstatus der HIV-Patienten wird deutlich verbessert (Stellbrink 2012). Mit lebenslanger und regelmäßiger cART kann die Virusreplikation reduziert werden und ein längeres symptomfreies Überleben gesichert werden (Suerbaum et al. 2012).

Der Zeitpunkt einer cART hängt wesentlich von der CD4-Blutzellzahl/ μ l ab und berücksichtigt zusätzliche Kriterien (z. B. HIV-Kopien/ml, Lebensalter, Koinfektionen) (Sterne et al. 2009; Rodríguez et al. 2006; Qurishi et al. 2003; Pezzotti et al. 1996).

Fällt die CD4-Zellzahl unter einen kritischen Wert, sollte der behandelnde Arzt mit einer cART beginnen (Sterne et al. 2005). Unabhängig davon wird eine cART auch beim „Vollbild AIDS“ und milden opportunistischen Folgeerkrankungen empfohlen (Stellbrink 2012).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Bei HIV-infizierten Patienten ist die Inzidenz von cHL größer als in der „gesunden“ Bevölkerung (Biggar et al. 2006; Clifford et al. 2009). Aufgrund der Heterogenität des Begleitinfiltrats ist es nach wie vor eine Herausforderung ein Hodgkin Lymphom histologisch zu diagnostizieren und zu charakterisieren. Beide Tatsachen waren Motivation für das Ziel dieser Arbeit: Die nähere Charakterisierung des reaktiven Begleitinfiltrats im HIV-assoziierten cHL. Dazu sollte das reaktive Begleitinfiltrat im cHL von HIV-Patienten mit dem von immunkompetenten Patienten morphologisch und immunhistochemisch quantitativ verglichen werden. Da im Uniklinikum Frankfurt eine große HIV-Patientengruppe behandelt und betreut wird, lagen genug Daten und Gewebematerial vor, um einen Vergleich mit dem von Nicht-HIV-Patienten vorzunehmen. Besonderes Interesse lag daran, wie das Begleitinfiltrat im cHL zusammengesetzt ist, wenn aufgrund von einer HIV-Erkrankung die CD4-Zellzahl rapide abnimmt, da die HRS-Zellen durch die sie umgebenden Zellen „am Leben“ erhalten werden und vor allem CD4+ T-Zellen einen großen Teil dieses Begleitinfiltrats ausmachen (Poppema et al. 1982; Skinnider 2002). Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war, ob sich im HIV-assoziierten cHL der Makrophagengehalt anders verhält als bei HIV-negativen Patienten. Anhand klinischer Daten (Erhalt einer cART, CD4-Blutzellzahl bei Diagnose, Viruslast im Blut) sollte überprüft werden, ob es eine Korrelation zwischen diesen Werten und der Anzahl der Zellen im Begleitinfiltrat gibt. Im zweiten Teil der Arbeit war die Zielsetzung die nähere Charakterisierung des Begleitinfiltrats von NLPHL und THRLBCL. Es fällt den Pathologen teilweise schwer, beide Entitäten histologisch eindeutig voneinander zu unterscheiden (Rüdiger et al. 2002). Da auch hier das umgebende Mikromilieu eine große Rolle in der Differentialdiagnose spielt, wurde mithilfe immunhistochemischer Färbung das zelluläre Begleitinfiltrat genau quantifiziert. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf einen bestimmten Subtypen des NLPHL, das THRLBCL-like NLPHL, gelegt. Dieser Typ mit seinem diffusen Muster ähnelt dem THRLBCL morphologisch am meisten. Es galt herauszufinden, ob das THRLBCL-like NLPHL, bezogen auf das zelluläre Infiltrat, mehr Ähnlichkeiten zu den NLPHL-Typen der eigenen Entität oder eher zum THRLBCL aufweist. Es wurde zusätzlich auf T-Zell-Rosettenbildung geachtet, da verschiedene Studien zeigen, dass T-Zell-Rosetten ein Charakteristikum beim NLPHL darstellen, beim THRLBCL jedoch fehlen (Nam-Cha et al. 2008; Churchill, Hywyn R O et al. 2010).

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Geräte	Hersteller
Sterile Werkbank	Thermo Scientific, HERAsafe KS
Absaugsystem	Integra, Vacusafe
Lasermikroskop Microdissection Axiovert 200M microscope	Palm, Bernried, Deutschland
Pipetten 10, 20, 100, 100 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe	Accu-Jet
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0
CO2-Brutschrank	Heracell 150i
Durchflusszytometer	Miltenyi Biotec, MACS Quant
AutoMACS	Miltenyi Biotec
Multipipetten 2, 5, 10, 25 ml	Costar Stripette, Corning
Labormikroskop	Olympus IX70
Labormikroskop Nikon Eclipse E1000 mit digitaler Kamera Nikon Digital Camera DXM1200	Nikon, Japan

Tabelle 1: Geräte

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
CD3	1:200	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK
CD4	1:50	Dako, Glostrup, Dänemark
CD8	1:100	Dako, Glostrup, Dänemark
CD163	1:100	Cell Marque, Rocklin, Californien
S100	1:1000	Dako, Glostrup, Dänemark
CD30	1:100	Dako, Glostrup, Dänemark
CD20	1:1000	Dako, Glostrup, Dänemark
LMP1	1:200	Dako, Glostrup, Dänemark
CD15	1:1000	Dako, Glostrup, Dänemark
PAX5	1:200	Dako, Glostrup, Dänemark
MUM1	1:100	Dako, Glostrup, Dänemark
CXCL13	1:200	R&D Systems, Minneapolis, USA
PD1	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
ICOS	1:250	R&D Systems, Minneapolis, USA

Tabelle 2: Antikörper für die Immunfärbung

Antikörper	Hersteller	Bestellnummer
Human-CD20-APC	Invitrogen	MHCD2005
Human-CD3-FITC	Miltenyi Biotec	130-080-401
Human-CD8-VioBlue	Miltenyi Biotec	130-094-152
Human-CD4-PE-Vio770	Miltenyi Biotec	130-096-552
Human-CD14-PerCP-Cy5.5	BD-Pharmingen	550-787

Tabelle 3: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
CD4+ T-Cell Isolation KitII	Miltenyi Biotec	130-091-155
Trypanblau 0,05% in PBS	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
Bovine Serum Albumin (BSA)	Serva	47321
CD14 Micro Beads	Miltenyi Biotec	130-050-201
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Lösungsmittellabor, PEI	
Xylol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	

Tabelle 4: Chemikalien und Lösungen

Kit	Zweck	Hersteller
Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase RED, K5005	Reagenz zur Detektion immunhistochemischer Färbungen	Dako, Glostrup, Dänemark
DAKO FLEX-Envision	Reagenz zur Detektion immunhistochemischer Färbung (LMP1-Färbung)	Dako, Glostrup Dänemark

Tabelle 5: Kits

Medien und Puffer	Zusammensetzung
Antikörperverdünnungspuffer TBS (Tris-gepufferte Salzlösung)	84g NaCl 12g Tris Ad 10l H ₂ O +42 ml 2M HCl pH 7.4
Antikörperverdünnungspuffer PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM KH ₂ PO ₄ 1,8 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
MACS-Puffer	0,5% BSA in PBS 2 mM EDTA
TRIS-EDTA	pH 8.0
FACS-Puffer	2% BSA in PBS 20 mM EDTA

	0,2% Natriumazid
Vollmedium für cHL-Zelllinien	RPMI 1640 (1x 90% + GlutaMAX-I) 1% Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin 10% FCS deaktiviert
Vollmedium für Burkitt-Zelllinie	RPMI 1640 (1x 80% + GlutaMAX-1) 1% Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin 20% FCS deaktiviert

Tabelle 6: Medien und Puffer

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
6-well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Cellstar
24-well-Zellkulturplatten	Becton-Dickson
Einwegpipetten 20, 100, 200, 1000 E	ART, Molecular Bio Products
Einweghandschuhe	Braun, vasco nitril white
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Zählkammer	Digital Bio, C-Chip DHC-NO1, Neubauer Improved
Zentrifugenröhrchen 15,50 ml	Greiner Bio-One
T-75 Zellkulturflaschen	Greiner
MACS Separation column	Miltenyi Biotec
Objektträger	Zeiss, Jena

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Zelllinie	Zelltyp	Ursprung
L-428	Humanes cHL	Hergestellt aus dem Pleuraerguss einer 37-jährigen Frau mit Hodgkin-Lymphom (Stadium IVB, noduläre Sklerose, refraktär, letal) im Jahre 1978
KM-H2	Humanes cHL	Hergestellt aus dem Pleuraerguss eines 37-jährigen Mannes mit Hodgkin-Lymphom (Mischtyp mit Progression zum lymphozytenarmen Typ; Stadium IV mit Rezidiv) im Jahre 1974
L-1236	Humanes cHL	Hergestellt aus dem peripheren Blut eines 34-jährigen Mannes mit Hodgkin-Lymphom (Mischtyp, Stadium IV, refraktär, letal, 3. Rezidiv) im Jahre 1994
RAMOS	Humanes Burkitt-Lymphom	Hergestellt aus der Aszitesflüssigkeit eines 3-jährigen Jungen mit Burkitt-Lymphom im Jahre 1972

Tabelle 8: Zelllinien

Verwendete Software	Zweck
ImageJ	Bildverarbeitungsprogramm zum Ausmessen der Cluster der Kokulturen

PALM RoboSoftware	Bildverarbeitungsprogramm für Zellzählungen der auf Objektträgern fixierten Gewebeschnitte unter dem Lasermikroskop
Graph Pad Prism	Graphikprogramm für das Erstellen von Abbildungen und Statistiken

Tabelle 9: Verwendete Software

2.2 Methoden

2.2.1 Patientenkollektiv der HIV-assoziierten cHL-Fälle

In die Studie wurden alle HL-Fälle aufgenommen, bei denen eine HIV-1 Infektion diagnostiziert worden war und die am Dr. Senckenbergschen Institut für Pathologie zwischen 1986 und 2012 eingegangen waren (n=54). Von diesen ursprünglich 54 Patienten lagen Paraffinblöcke von 25 Patienten mit repräsentativen Hodgkin-Infiltraten zur weiteren Untersuchung vor (24 Lymphknotenbiopsien, eine Knochenmarksbiopsie). Einbezogen wurden die 24 Lymphknotenbiopsien. Als Kontrollgruppe wurden cHL-Paraffinblöcke von 15 nicht HIV-infizierten Patienten genommen. Alle Fälle waren mit den für die Lymphomdiagnostik wichtigen Standard-Übersichtsfärbungen CD30, CD15, PAX5, LMP1, CD20 und CD3 bereits gefärbt und histologisch analysiert worden.

Zwecks besserer Vergleichbarkeit wurden in der Kontrollgruppe nur EBV-positiv Fälle vom klassischen Mischtyp ausgewählt, da die HIV-Fälle fast alle vom klassischen Mischtyp und EBV-positiv waren. Der positive EBV-Status wurde mit dem EBV-kodierten Membranprotein LMP1 auf HRS-Zellen nachgewiesen.

Zusätzlich wurden 15 Fälle von unspezifischen Lymphadenitiden für CD8 immungefärbt, um den Basiswert für CD8-Zellen im Lymphknoten zu bestimmen.

2.2.2 Patientenkollektiv der NLPHL- und THRLBCL-Fälle

Die Fälle stammten aus den Sammlungen des Dr. Senckenbergschen Instituts für Pathologie Frankfurt am Main, Deutschland und dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums der K.U. Leuven, Belgien.

Es wurden insgesamt 68 Fälle in die Studie aufgenommen, die nach den Mustern von Fan *et al.* eingeteilt worden waren (Fan *et al.* 2003). Davon waren 14 Fälle vom NLPHL Typ A, 15 Fälle vom NLPHL Typ C, weitere 14 Fälle vom diffusen THRLBCL-like NLPHL

und 25 Fälle vom THRLBCL vertreten (Abbildung 5).

In allen Fällen waren die Tumorzellen CD20-positiv und CD30-, CD15- und EBV (EBER)-negativ.

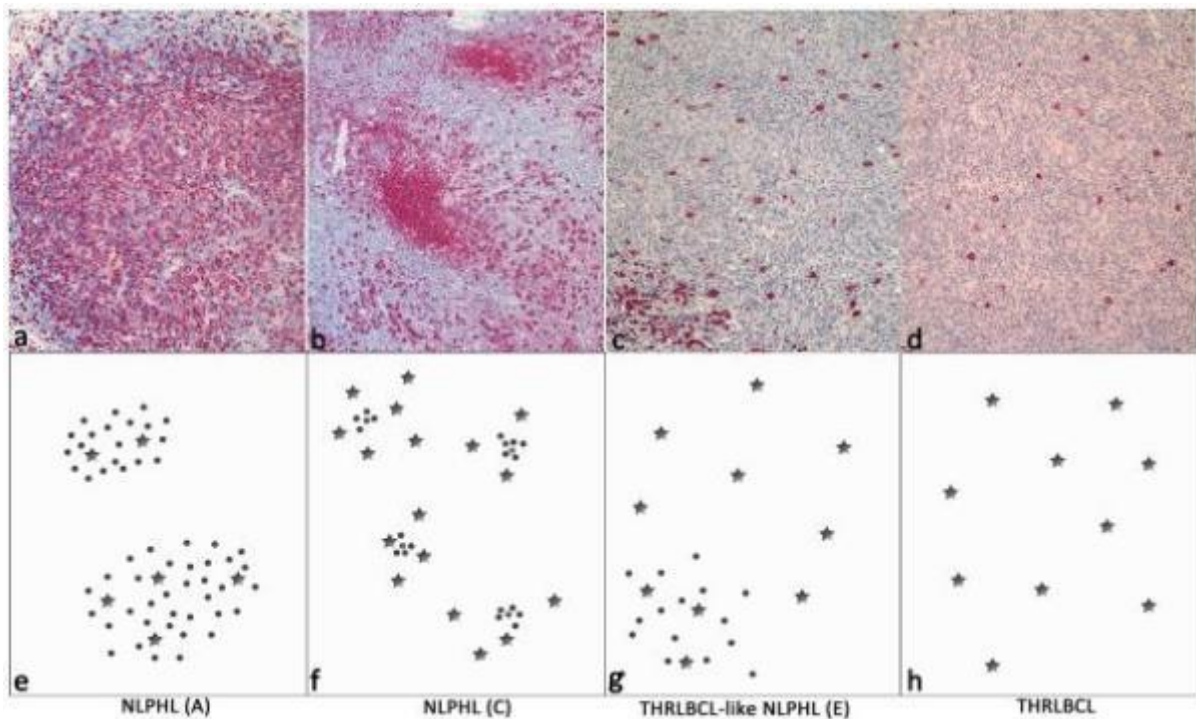


Abbildung 5: Wachstumsmuster von NLPHL, THRLBCL-like NLPHL und THRLBCL, modifiziert nach Fan *et al.* (Fan *et al.* 2003): (a)-(d) CD20-Immunfärbung (Vergrößerung 100x) von NLPHL Typ A, NLPHL Typ C, THRLBCL-like NLPHL und THRLBCL. (e)-(h) Schematische Darstellung der Muster. Sterne: Tumorzellen, Punkte: reaktive B-Zellen. (a)/(e) Typisches NLPHL Typ A; (b)/(f) NLPHL Typ C; (c)/(g) THRLBCL-like NLPHL; (d)/(h) THRLBCL; Quelle: (Hartmann *et al.* 2013)

2.2.3 Herstellung von Paraffinschnitten

Die in Formalin fixierten und Paraffin eingebetteten Lymphknoten-Blöcke waren im Archiv des Dr. Senckenbergischen Instituts für Pathologie aufbewahrt worden. Um Schnitte für die Spezialfärbungen (siehe Kapitel 2.2.4) herzustellen, wurden die Blöcke zunächst mithilfe eines Mikrotoms in ca. 4 µm dicke Gewebeschnitte geschnitten und auf einen sauberen und fettfreien membranbeschichteten Objektträger aufgezogen. Pro Objektträger wurde jeweils ein Schnitt aufgebracht. Es wurden von jedem Fall so viele Objektträger angefertigt, wie Spezialfärbungen benötigt wurden. Danach wurden die Schnitte auf einer Heizplatte bei 37 °C zum Trocknen ausgelegt.

2.2.4 Immunhistochemische Färbung

Die Antikörper, Verdünnungen und Hersteller der Antikörper sind unter Kapitel 2.1 in Tabelle 2 aufgelistet.

Als erstes wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert, dann über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert und in Aqua dest. gewaschen. Das in Paraffin eingebettete Gewebe wird im Rahmen des Einbettungsprozesses in Formalin getränkt, um Proteine miteinander zu vernetzen. Diese Vernetzung führt aber auch zur Maskierung von antigener Struktur, die dadurch für diagnostische Antikörper unzugänglich wird. Um diese wieder zu demaskieren, wurden alle Schnitte in TRIS-EDTA pH 8.0 in einem Dampfkochtopf 2 min lang gekocht.

Jeder der HIV-cHL-Fälle und die Kontrollfälle wurden für CD30 (HRS-Zellen), CD4 (T-Helferzellen), CD8 (Zytotoxische T-Zellen), CD163 (Makrophagen) und S100 (Dendritische Zellen) spezialgefärbt.

Die Gewebeschnitte der NPLHL und THRLBCL-Fälle wurden ebenfalls mit den Spezialfärbungen CD4, CD8 und CD163 gefärbt. Zusätzlich wurden die Schnitte mit MUM1, einem Marker für Post-GC-B-Zellen und aktivierte T-Zellen (Carbone et al. 2002), sowie PD1, CXCL13 und ICOS (alle 3 sind Marker für T_{FH}-Zellen (Marafioti et al. 2010) immungefärbt.

Für die Detektion der immunhistochemischen Färbung wurde das Alkaline Phosphatase-Real Detection Kit K5005 (Dako, Glostrup, Dänemark) verwendet. Zunächst wurde der Primärantikörper aufgebracht, der zuvor in 3%igem BSA-Puffer TBS verdünnt wurde. Nach dreimaligem Waschen in frischem TBS für 10 sec erfolgte das Aufbringen des Reagenz A (biotinmarkierter Sekundärantikörper). Nach 30-minütiger Einwirkzeit wurde durch wiederholtes dreimaliges Waschen das nicht gebundene Reagenz entfernt. Als nächstes wurde für 30 min Reagenz B aufgebracht und die Schnitte abermals gewaschen. Danach wurde das Substrat Dako Fast Red (Glostrup, Dänemark) aufgetragen und die Reaktion unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Nach ca. 10 min wurde die Rotfärbung in Aqua dest. gestoppt. Die Gegenfärbung des Zellkerns erfolgte mit Hämalaun und 5 min Bläuen unter fließendem Wasser.

2.2.5 Quantifizierung

Für die Auszählung wurde ein mit einem Kamerasystem ausgestattetes Lasermikroskop

verwendet (Microdissection Axiovert 200M microscope, PALM, Bernried, Deutschland). Für jeden Schnitt wurden drei repräsentative Zählfenster mit eine Größe von $122\,842\ \mu\text{m}^2$ ausgewählt und die Anzahl der positiv gefärbten Zellen mit Punktzählung gezählt, ohne dass jeweils bekannt war, welcher Fall HIV-positiv bzw. -negativ ist. Dabei wurde die PALM Software benutzt. Es wurden sowohl die HIV-positiven Lymphom-Fälle als auch die Nicht-HIV-Lymphom-Fälle für CD30, CD4, CD8, CD163 und S100 gezählt (Abbildung 6, Abbildung 7). Dabei wurde darauf geachtet, dass das Zählfenster in den Bereichen lag, in denen der Gehalt an Tumorzellen hoch war. Bereiche mit Nekrosen, Hyalinisierung, großen Blutgefäßen, reaktiven Lymphknotenanteilen und Artefakten wurden ausgespart. Bei den NLPHL- und THRLBCL-Fällen wurden jeweils die Färbungen für CD4, CD163 und CD8 gezählt. Die Zählfenster befanden sich bei den Lymphomtypen mit knotiger Infiltration innerhalb der Knoten, bei eher diffuser Infiltration in den diffusen Bereichen.

In den HIV-cHL und Nicht-HIV-cHL-Fällen wurden bei der CD4-Färbung auf T-Zell-Rosetten und bei der CD163-Färbung auf Makrophagen-Rosetten geachtet. Dabei wurde eine Rosette definiert als direkter zirkumferenter Kontakt von T-Zellen oder Makrophagen zur HRS-Zelle.

Bei NLPHL- und THRLBCL-Fällen wurde in jeweils 10 Fällen mithilfe der aktivierten T-Zell- und T_{FH} -Marker MUM1, PD1, CXCL13 und ICOS überprüft, ob T-Zell-Rosetten um Tumorzellen vorhanden waren.

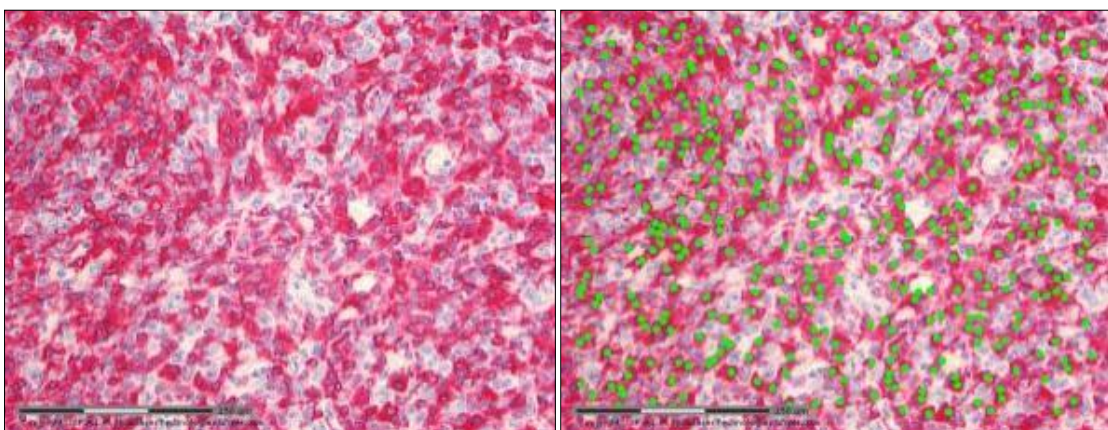


Abbildung 6: CD163+ Makrophagen im HIV-cHL. Das linke Bild zeigt das Zählfenster ($122\,842\ \mu\text{m}^2$) vor der Punktemarkierung, das rechte Bild zeigt das gleiche Zählfenster nach der Punktemarkierung mit der PALM-Software. Vergrößerung: 200x.

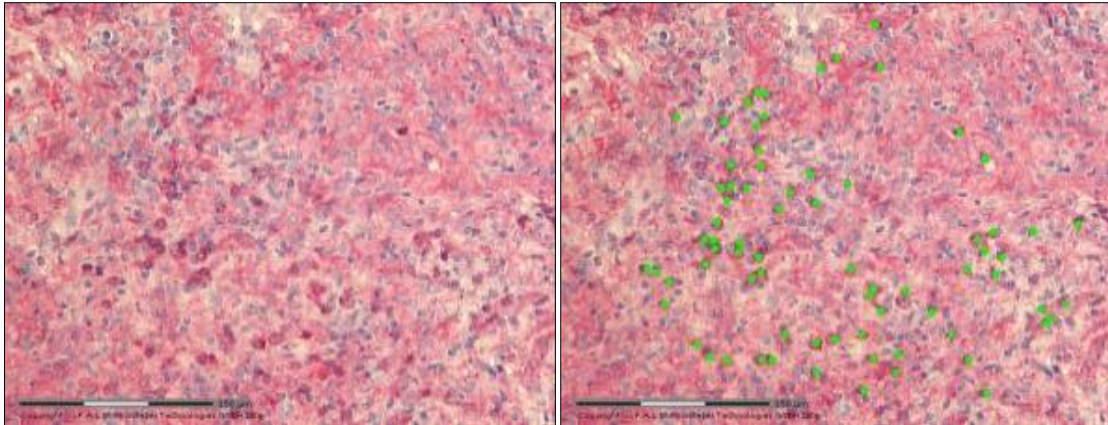


Abbildung 7: CD4+ T-Zellen im HIV-cHL. Das linke Bild zeigt das Zählfenster (122 842 μm^2) vor der Punktmarkierung, das rechte Bild zeigt das gleiche Zählfenster *nach* der Punktmarkierung mit der PALM-Software. Vergrößerung: 200x.

2.2.6 Kokulturen

Um nicht nur histologisch sondern auch *in vitro* nachzuweisen, dass neben CD4+ T-Zellen auch Monozyten fähig sind, sich um HRS-Zellen anzulagern und sogenannte Rosetten zu bilden, wurden Kokultur-Versuche durchgeführt.

2.2.6.1 Ficoll-Gradienten-Zentrifugation

Mit der Ficoll-Gradienten-Zentrifugation wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) isoliert. Diese Methode beruht darauf, dass kleinere Zellen wie Erythrozyten und Granulozyten sowie Zelltrümmer im Zentrifugalfeld frei sedimentieren, während Lymphozyten und Monozyten aufgrund ihrer Größe von dem Trennmedium zurückgehalten werden, wodurch sich der so genannte „buffy coat“ bildet. Demnach entstehen durch Zentrifugation drei Schichten (kleine Zellen, Trennmedium und buffy coat) über denen sich noch eine Schicht aus reinem Blutplasma befindet.

Wir bekamen von zwei gesunden Spendern 50 ml von Thrombozyten gereinigtes Vollblut aus dem Blutspendedienst. Der Beutel wurde von außen gründlich desinfiziert und das Blut in T-75 Zellkulturflaschen überführt. Diese Flaschen wurden mit warmem PBS auf 150 ml aufgefüllt (Verdünnung 1:3). Dann wurden 6 Falcons mit 15 ml Lymphozytentrennmedium Ficoll (Synthetische Polymere aus Saccharose) gefüllt und darauf als oberste Schicht vorsichtig jeweils 25 ml PBS-Blutgemisch pipettiert. Im Anschluss wurden die Falcons ohne Bremse 20 min bei 2100 rpm zentrifugiert. Nach

Zentrifugation wurde die obere Plasmaschicht verworfen und die Interphase (buffy coat, mittlere weiße Schicht) über dem Ficoll in ein neues Falcon überführt. Danach erfolgte zweimaliges Waschen in frischem PBS und darauf folgendes Zentrifugieren (jeweils 5 min bei 2000 rpm und 1600 rpm) und Absaugen des Überstandes. Die Pellets aus konzentrierten Lymphozyten wurden vereinigt und in einem neuen Gefäß in 20 ml PBS Puffer gelöst. Die Auszählung erfolgte mithilfe einer Zählkammer. Mit der Dichtegradientenmethode lassen sich durchschnittlich zwischen 5×10^8 und 1×10^9 mononukleäre Zellen isolieren.

Zellzahlbestimmung mit Trypanblau-Lösung

Um herauszufinden, ob ausreichend mononukleäre Zellen isoliert werden konnten, wurde die Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde die Zellsuspension in PBS verdünnt (1:40), mit 0,05% Trypanblau im Verhältnis 1:1 inkubiert, vorsichtig resuspendiert und in eine Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen innerhalb von vier Quadranten mithilfe eines Klickzählers gezählt und der Mittelwert genommen. Es wurden nur die vitalen, ungefärbten Zellen gezählt. Da die Membran von toten bzw. sterbenden Zellen durchlässig wird und den Trypanblau-Farbstoff aufnimmt, konnten blau gefärbte Zellen vom Zählen ausgeschlossen werden. Mit einem Kammerfaktor **k** von 10^4 und dem gezählten Mittelwert von **n** Zellen kann unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors **v** über folgende Formel die Zellzahl **c** bestimmt werden:

$$c \text{ (Zellen/ml)} = n \text{ (Zellen)} \times k \times v \text{ (l/ml)}$$

Die totale Zellzahl bestimmt man durch Multiplikation der Zellzahl pro ml mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension.

2.2.6.2 Anreicherung von Monozyten und CD4+ T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation (MACS)

Mit dieser Methode können aus einer heterogenen Zellsuspension homogene Zellsuspensionen separiert werden. Dazu mischt man die Zellsuspension mit kleinen magnetischen Partikeln (Beads), welche an monoklonale Antikörper gebunden sind und

an Oberflächenproteine der Zielzellen nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip binden (magnetische Markierung). Des Weiteren wird eine magnetische Säule benötigt. Über diese wird die mit Beads markierte Zellsuspension gegeben. Da sich die Säule in einem Magnetfeld befindet, bleiben die markierten Zielzellen in der Säule zurück, während die übrigen Zellen aus der Säule gewaschen werden. Außerhalb des Magnetfeldes können nun die Zielzellen ausgespült werden.

Dieses Verfahren bezeichnet man als Positivselektion. Wenn die markierten Zellen, die in der Säule verbleiben, verworfen werden, wird von Negativselektion (Depletion) gesprochen.

Für die Isolierung von Monozyten und T-Zellen aus dem mit der Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Lymphozytenkonzentrat wurden die von Milteny Biotec spezifischen Marker CD14 bzw. CD4 MicroBeads verwendet. Für beide Separationen wurde gleich vorgegangen. Zuerst wurden alle Monozyten aus der Suspension isoliert, da diese sowohl den spezifischen Oberflächenmarker CD14 als auch zum geringen Teil den T-Zell-Marker CD4 tragen. Anschließend wurden CD4⁺ T-Zellen aufgereinigt. Somit konnte eine Verunreinigung der T-Zellen mit Monozyten ausgeschlossen werden.

Im Detail wurde die Zellsuspension bei 1200 rpm 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Bei einer Zellzahl von 2×10^8 Zellen wurde das Pellet in 1600 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Dann wurden 400 μ l CD14 bzw. CD4 MicroBeads hinzugefügt, gut gemischt und bei 4 °C im Kühlschrank für 15 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 20 ml MACS-Puffer gewaschen und bei 1200 rpm weitere 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1000 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Für die vorhandene Zellzahl von 2×10^8 Zellen wurde eine Säule der Größe MS benötigt. Diese wurde in einem Magnetfeld befestigt und zunächst mit MACS-Puffer gereinigt. Danach wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und dreimal mit 500 μ l Puffer gewaschen. Der Durchfluss mit den unmarkierten Zellen wurde unter der Säule in einem Gefäß aufgefangen. Nach dem Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld wurden die CD14 bzw. CD4 markierten Zellen zügig mit 1 ml MACS Puffer aus der Säule eluiert und mithilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

2.2.6.3 Antikörperfärbung und Reinheitsbestimmung mittels Durchflusszytometrie (FACS)

„Fluorescence-activated cell sorting“ (FACS) wird häufig eingesetzt, um einzelne Populationen einer Zellsuspension hinsichtlich der Expression von Oberflächenmarkern genauer zu analysieren. Dazu werden im Flüssigkeitsstrom vereinzelte Zellen an mehreren Lasern vorbeigeführt, worauf noch eine Detektionseinheit folgt, welche Fluoreszenzsignale misst. Zum einen werden Eigenschaften der Zellen (Größe und Granularität) bestimmt und zum anderen werden Fluorochrom-markierte Antikörper verwendet, welche spezifisch an Oberflächenmoleküle (meist Proteine der CD-Klassifizierung) der Zellen binden und durch den Laser angeregt werden, Fluoreszenz zu emittieren. Letzteres gibt Aufschluss über die Expression der Marker auf den Zellen und dient der Einteilung in homogene Populationen.

Die Zellen werden durch eine dünne Nadel eingesogen und fließen nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung einzeln nacheinander durch eine dünne Messkammer. Wenn eine Zelle die Laser passiert, verursacht sie abhängig von Größe und Granularität Schatten oder Streulicht. Vorwärts gestreutes Licht (FSC) des Laserstrahls gibt Auskunft über die Größe der Zelle, während Seitwärtsstreulicht (SSC) etwas über die Granularität im Inneren der Zelle aussagt.

In einer Dot Plot Darstellung (SSC/FSC) wird jede Zelle durch einen Punkt repräsentiert und diese reicht anfänglich aus, um Zellpopulationen voneinander abzugrenzen und Zelltrümmer bzw. tote Zellen auszuschließen.

Eine noch genauere Auskunft über die Zelle gibt die Detektion des emittierten Fluoreszenzlicht. Dafür besitzen Durchflusszytometer Laser verschiedener Wellenlängen, um die Antikörper-spezifischen Fluorochrome anzuregen, und verschiedene Filter, um das Licht zu detektieren. Somit können in einer Suspension mehrere Fluorochrome und somit spezifische Oberflächenmarker gleichzeitig gemessen werden. Es ist jedoch darauf zu achten, dass es bei der Mehrfachfärbung nicht zur Überlappung im Emissionsspektrum der Fluorochrome kommt.

Um die Reinheit der durch MACS erhaltenen Zellsuspensionen auf CD4⁺ T-Zellen und CD14⁺ Monozyten zu bestimmen, wurden die Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern inkubiert. Zusätzlich konnte der Prozentanteil der verschiedenen mononukleären Zellen an der Gesamtheit der PBMC festgestellt werden. Dazu wurde eine Antikörperfärbung gegen CD3, CD4, CD8 (alle 3 sind Marker für T-Zellen), CD14

(Marker für Monozyten) und CD20 (Marker für B-Zellen) durchgeführt. Die Antikörper wurden über die unter Kapitel 2.1, Tabelle 3 aufgeführten Hersteller bezogen, bei 4°C gelagert und vor Licht geschützt. In einem FACS-Röhrchen wurden $1-2 \times 10^5$ Zellen der jeweiligen Suspension mit 100 µl PBS und 0,5-1 µl Antikörper versehen. Die Inkubation erfolgt im Dunkeln für 15 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen zweimal in jeweils 2 ml PBS gewaschen und bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die inkubierten Zellen sowie eine ungefärbte Kontrollprobe durchflusszytometrisch gemessen.

2.2.6.4 Kultivierung

Nachdem die Reinheit der MACS Isolation durch das FACS bestätigt worden war, konnte mit der Kultivierung der Zellen fortgefahren werden.

Hierfür wurden die cHL-Zelllinien KM-H2, L-428, L-1236 und die Burkitt-Zelllinie Ramos (Kapitel 2.1, Tabelle 8) vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen bezogen. Mithilfe der Neubauer-Zählkammer konnten für die Zelllinien jeweils 5×10^4 Zellen pro ml gezählt werden. Die Zellzahl der CD14⁺ Monozyten und CD4⁺ T-Zellen betrug jeweils 1×10^6 pro ml. Das Mischungsverhältnis von Zelllinie zu Primärzellen betrug 1:20 auf einem Gesamtvolumen von 3 ml/Well. Die cHL-Zelllinien KM-H2, L-428, L-1236 und die Burkitt-Zelllinie Ramos wurden jeweils in eine 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Zu den Zelllinien kamen jeweils CD4⁺ T-Zellen, CD14⁺ Monozyten oder einer 1:1 Mischung aus beiden Zellen (CD4/CD14). Als Negativkontrolle wurden CD4⁺ T-Zellen, CD14⁺ Monozyten und die Zelllinien alleine ausgesät (Abbildung 8). Die Zellkulturplatten wurden im Brutschrank bei 37 °C für 5 Tage kultiviert.

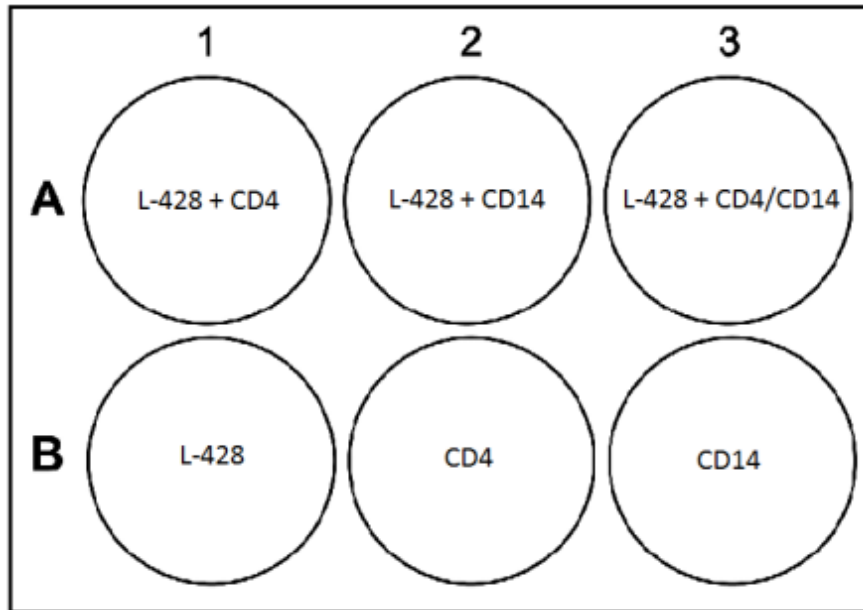


Abbildung 8: Skizzierung der 6-Well-Zellkulturplatte. A1-3: Kokulturen aus jeweils 3 ml Zelllinie mit CD4⁺ T-Zellen, CD14⁺ Monozyten oder CD4/CD14-Gemisch im Verhältnis 1:20. B1-3: Negativkontrollen aus jeweils 3 ml Zellsuspension der Zelllinie, CD4⁺ T-Zellen und CD14⁺ Monozyten alleine. A1: Kokultur aus Zelllinie mit CD4⁺ T-Zellen, A2: Kokultur aus Zelllinie und CD14⁺ Monozyten, A3: Kokultur aus Zelllinie und Gemisch der CD4⁺ T-Zellen und CD14⁺ Monozyten, B1: Zellsuspension aus Zelllinie alleine, B2: Zellsuspension aus CD4⁺ T-Zellen alleine, B3: Zellsuspension aus CD14⁺ Monozyten allein.

2.2.6.5 Fotografie und Größenbestimmung der Cluster

Um in den Kokulturen von Zelllinien und PBMCs entstandene Cluster auszuwerten, wurden mit einer Nikon ECLIPSE TE 300 im Georg-Speyer-Haus Fotografien der einzelnen Wells gemacht. Auf jedes Bild wurde ein Maßstab von 1000 µm eingezeichnet, um später die Clustergrößen zu bestimmen.

Mithilfe der Software ImageJ 1.46 wurden die Flächen und die Durchmesser der Cluster quantitativ ausgemessen. Um jedes Cluster wurde manuell eine Linie gezogen und zwar in genau der Größe des Clusters. Die umschriebenen Flächen wurden von ImageJ errechnet und in einer Tabelle angezeigt. Ebenso konnte der maximale Durchmesser eines jeden Clusters errechnet werden, indem zwischen den am weitesten voneinander entferntesten Punkten eines Clusters eine Linie gezogen wurde. Somit konnte von jeder Zelllinie mit CD4, CD14 und CD4/CD14-Gemisch bestimmt werden, wie viele Cluster gebildet worden waren und in welchem Größenverhältnis sie sich zueinander verhielten.

2.2.6.6 Ausstriche der Kokulturen und Immunfärbungen

Um nachzuweisen, dass sich die CD4+ T-Zellen und CD14+ Monozyten nicht nur als Cluster sondern auch als Rosetten um die HRS Zellen herum angelagert hatten, wurden Ausstriche der cHL-Zelllinien mit CD4, CD14 und CD4/CD14-Gemisch angefertigt. Mit einer Eppendorf-Pipette wurde die Zellsuspension vorsichtig im Well resuspendiert und davon 100 µl in ein Tube überführt. So wurde mit jeder Kokultur vorgegangen und danach die Tubes beschriftet.

Der Ausstrich wurde wie ein Blutausstrich angefertigt. Dazu wurden zwei Objektträger bereitgelegt. Mit einer Eppendorf-Pipette wurde ein Tropfen (ca. 50 µl) auf das äußere Drittel eines Objektträgers getropft. Die schmale Kante des anderen Objektträgers wurde langsam in einem Winkel von 30° über den Zelltropfen gezogen, damit er sich auf dem Objektträger verteilt. Die Objektträger wurden beschriftet und zum Trocknen ausgelegt. Als nächstes folgte die Färbung aller getrockneten Ausstriche mit der Standard-Pappenheim-Färbung und den Immunfärbungen CD4 und CD14. Von jeder Färbung entstanden je 15 Objektträger. Die Ausstriche wurden unter einem Nikon Eclipse E1000 Mikroskop bei 400x Vergrößerung angeschaut und mit einer eingebauten Nikon Digital Camera DXM1200 fotografiert.

2.2.7 Statistik

Zusammen mit der Statistikerin des Dr. Senckenbergischen Institut für Pathologie wurden alle Daten mit dem Shapiro-Wilk-Test auf ihre Normalverteilung (syn. Gauß-Verteilung) getestet. Lag eine Normalverteilung vor, wurde die Signifikanz der Mittelwerte beider Stichproben mit dem Zweistichproben-t-Test getestet und ermittelt.

Lag keine Normalverteilung vor wurde der Mann-Whitney-Test angewandt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der HIV- und Nicht-HIV-cHL-Fälle

3.1.1 Klinische Daten der Patienten

Im Archiv des Dr. Senckenbergischen Instituts für Pathologie konnten gut erhaltene Hodgkin-Lymphom-Blöcke von 24 Patienten mit bekanntem HIV-positivem Status für diese Studie einbezogen werden. Das Alter der Patienten lag im Schnitt bei 47 Jahre (jüngster Patient: 28 Jahre; ältester Patient: 73 Jahre). Davon waren 19 Patienten männlichen und 5 Patienten weiblichen Geschlechts. Von 15 Patienten waren klinische Daten bekannt. Diese lagen uns z.T. nur unvollständig vor und gaben Auskunft über Hodgkin-Stadium, HIV-Stadium, CD4-Zellzahl bei Erstdiagnose Hodgkin-Lymphom, Viruslast, Erhalt einer cART, Follow-up und eventuelles Sterbedatum.

3 Patienten waren im Stadium IIA/B erkrankt, 3 Patienten im Stadium IIIB und 9 Patienten im Stadium IVA/B.

10 Patienten hatten vor der Hodgkin-Lymphom-Therapie cART erhalten, 6 Patienten hatten keine cART erhalten.

5 Patienten wiesen eine Viruslast < 20 Kopien/ml (d.h. unter der Nachweisgrenze) auf, 7 Patienten wiesen eine Viruslast zwischen 340-367000 Kopien/ml (Mittelwert: 46180/ml). Die CD4+ T-Zellzahl bei der Diagnose Hodgkin-Lymphom reichte von 27–526/ μ l (Mittelwert: 152/ μ l).

Alle HIV-Fälle waren aus der klassischen Hodgkin-Lymphom-Gruppe, davon 18 Fälle vom Mischtyp, 3 Fälle waren nicht näher spezifiziert, 2 Fälle vom nodulär-sklerosierenden Typ und 1 Fall vom lymphozytenarmen Typ (Abbildung 9). In allen 24 Fällen waren die HRS-Zellen positiv auf das EBV-kodierte latente Membranprotein1 (LMP1) getestet.

In die Kontrollgruppe, welche aus HIV-negativen klassischen Hodgkin-Lymphom-Patienten bestand, wurden 15 Fälle aufgenommen. Hier betrug das durchschnittliche Alter 39 Jahre (jüngster Patient: 6 Jahre, ältester Patient: 76 Jahre). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden hier nur Mischtypen und ebenso wie in der HIV-cHL-Gruppe alle Fälle EBV-positiv ausgewählt.

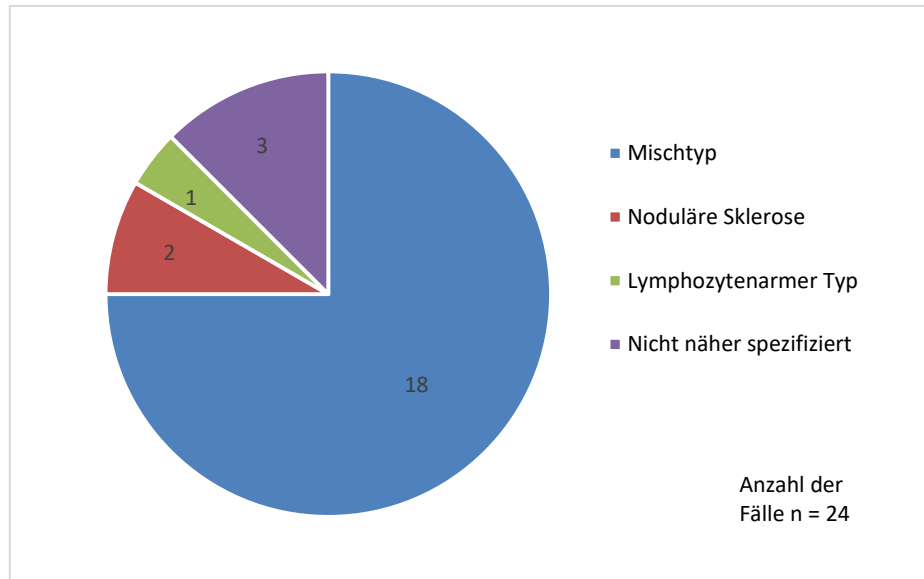


Abbildung 9: Verteilung der HIV-cHL-Fälle (n = 24).

3.1.2 Zusammensetzung des Begleitinfiltrats

Nach der Auszählung mithilfe des Lasermikroskops und des dazugehörigen Kamerasystems wurden die Mittelwerte der CD4-, CD8-, CD163-, S100- und CD30+ Zellen für HIV-cHL-Fälle und Nicht-HIV-cHL-Fälle berechnet. Alle Zahlenwertergebnisse sind somit im Folgenden als Mittelwerte angegeben.

CD4+ T-Zellen: Der Mittelwert der CD4+ T-Zellen lag bei den HIV-cHL-Fällen bei 876 und den Nicht-HIV-cHL-Fällen bei 3465 Zellen/mm² und war damit in den HIV-cHL-Fällen **signifikant niedriger** ($p < 0.001$, t-Test).

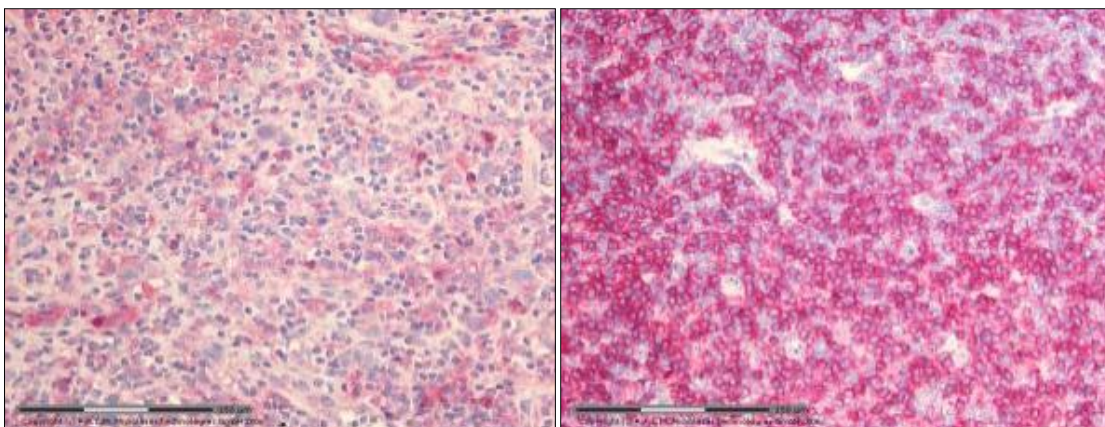


Abbildung 10: CD4-Immunfärbung im HIV-cHL (linkes Bild) und im Nicht-HIV-cHL (rechtes Bild), Vergrößerung 200x.

CD8+ T-Zellen: Im Mittel wurden in den HIV-cHL-Fällen 2699 Zellen/mm² und in den Nicht-HIV-cHL-Fällen 2835 Zellen/mm² gezählt. Diese Zahlenwerte unterschieden sich kaum von unspezifischen Lymphadenitiden, bei denen 2947 Zellen/mm² gemessen wurden. Hier unterschied sich die Lymphozytenzahl **nicht signifikant** zwischen HIV-cHL-Fällen und Nicht-HIV-cHL-Fällen.

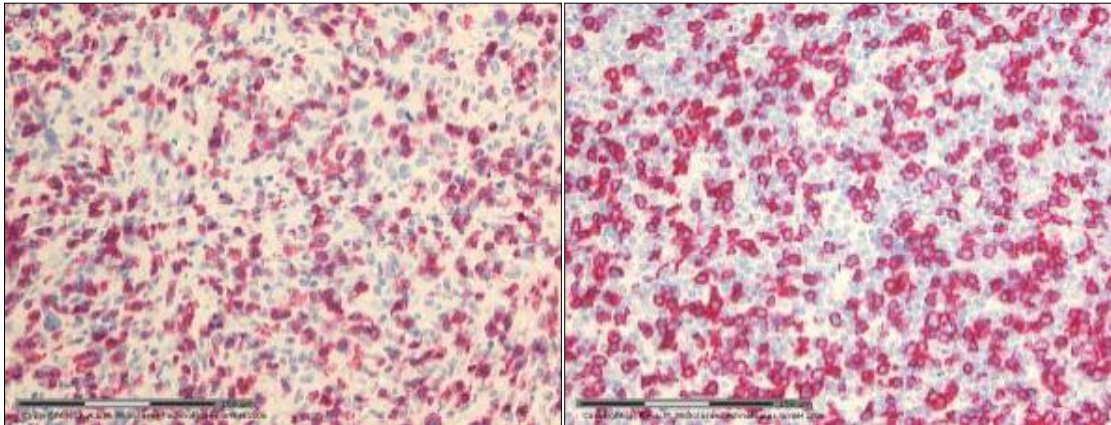


Abbildung 11: CD8-Immunfärbung im HIV-cHL (linkes Bild) und im Nicht-HIV-cHL (rechtes Bild), Vergrößerung 200x.

CD163+ Makrophagen: Wie bereits bei der CD4-Zellzählung konnte auch hier ein **signifikanter Unterschied** zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. Der Mittelwert der CD163+ Zellen in den HIV-cHL-Fällen lag bei 2836 Zellen/mm² im Vergleich zu 1430 Zellen/mm² in den Nicht-HIV-cHL-Fällen ($p = 0.0025$, t-Test).

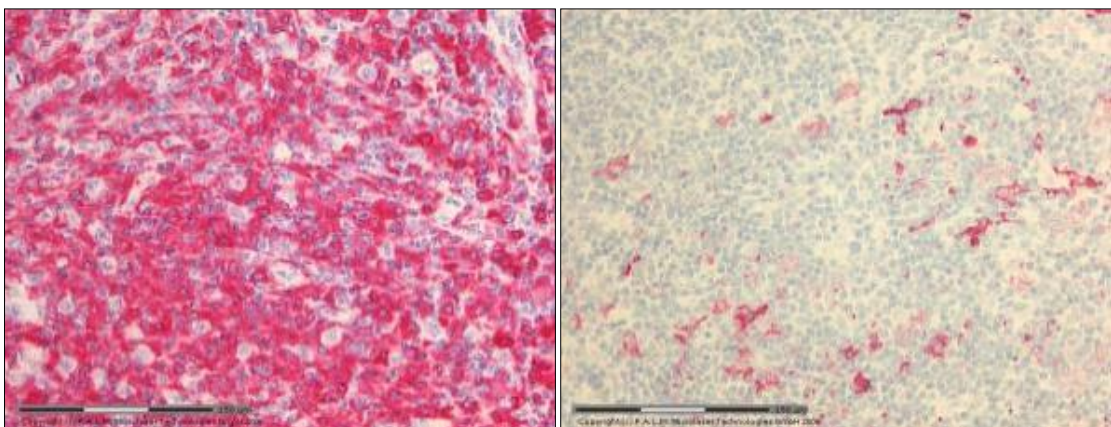


Abbildung 12: CD163-Immunfärbung im HIV-cHL (linkes Bild) und im Nicht-HIV-cHL (rechtes Bild), Vergrößerung 200x.

S100+ dendritische Zellen: Bei der Zählung konnte **kein signifikanter Unterschied** in der Anzahl der Zellen zwischen HIV-cHL-Fällen und Nicht-HIV-cHL-Fällen festgestellt werden. Der Mittelwert der dendritischen Zellen lag bei 284 Zellen/mm² in den HIV-cHL-Fällen und bei 331 Zellen/mm² in den Nicht-HIV-cHL-Fällen.

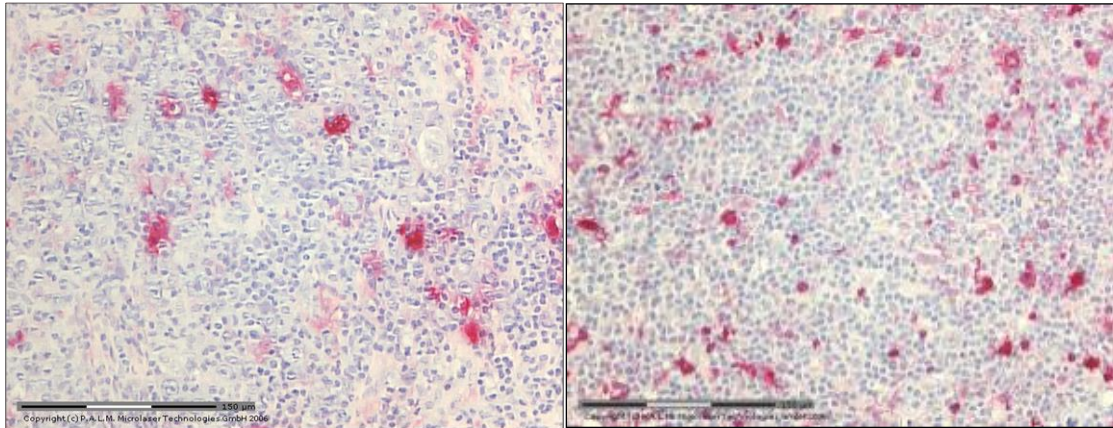


Abbildung 13: S100-Immunfärbung im HIV-cHL (linkes Bild) und im Nicht-HIV-cHL (rechtes Bild), Vergrößerung 200x.

CD30+ HRS-Zellen: Auch bei der HRS-Zellzahl konnte kein deutlicher und somit **kein signifikanter Unterschied** festgestellt werden. Hier lagen im Mittel die Zellzahlen der HIV-cHL-Fälle bei 267 Zellen/mm² und die Zellzahlen der Nicht-HIV-cHL-Fälle bei 285 Zellen/mm².

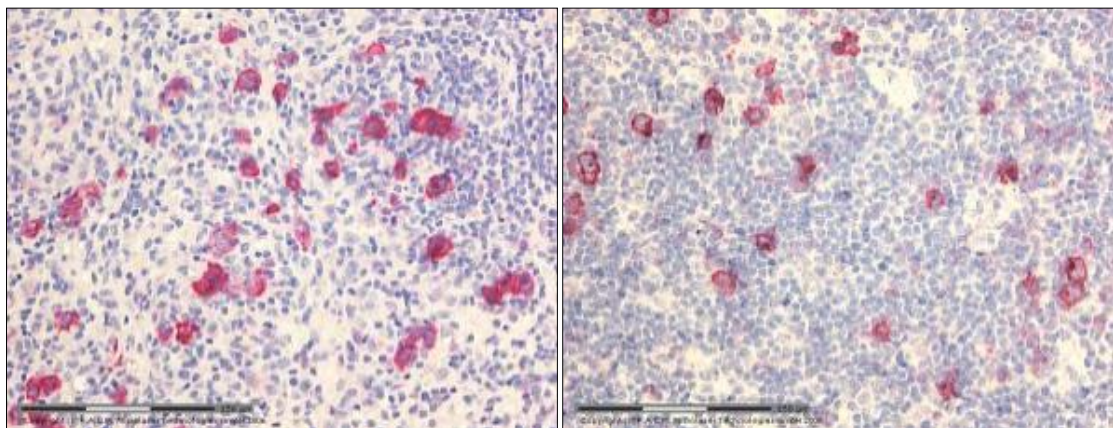


Abbildung 14: CD30-Immunfärbung im HIV-cHL (linkes Bild) und im Nicht-HIV-cHL (rechtes Bild), Vergrößerung 200x.

Abbildung 15 zeigt eine Zusammenfassung der Quantifizierung des Begleitinfiltrats. Für die untersuchten Zellarten werden jeweils die HIV-positiven Fälle den HIV-negativen

Fällen gegenübergestellt und deren Häufigkeit auf der y-Achse abgebildet. Zudem werden die Mediane angezeigt.

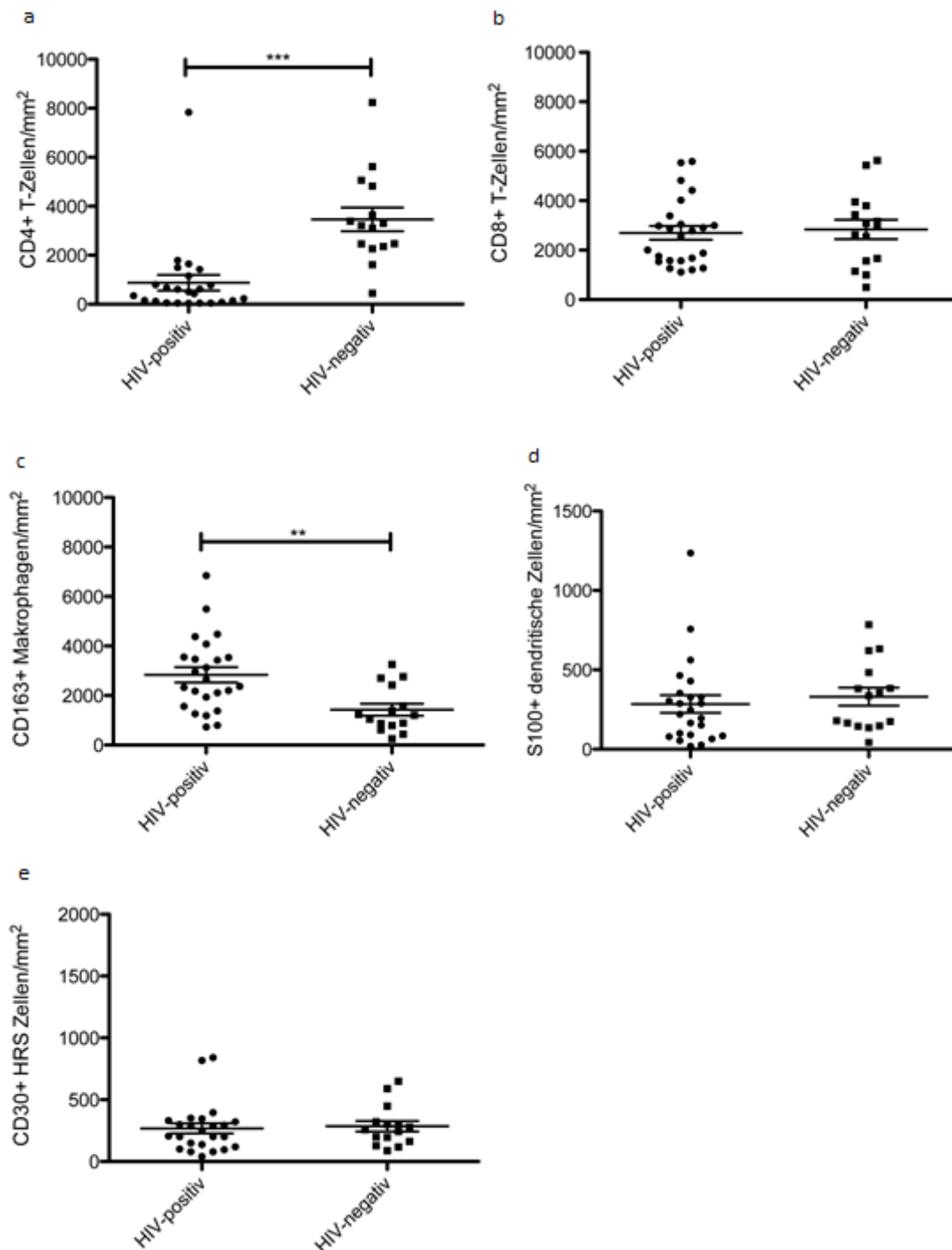


Abbildung 15: Quantifizierung des Begleitinfiltrats im HIV-assoziierten cHL und HIV-negativen cHL (a) Signifikant weniger CD4+ T-Zellen/mm² im Lymphknoten von HIV-cHL (n = 24) im Vergleich zum Nicht-HIV-cHL (n = 15) (**p < 0.001, t-Test). (b) Kein Unterschied bei der Anzahl der CD8+ T-Zellen/mm² in den Lymphknoten von HIV-cHL (n = 24) im Vergleich zum Nicht-HIV-cHL (n = 15). (c) Signifikant mehr CD163+ Makrophagen/mm² im Lymphknoten von HIV-cHL (n = 24) im Vergleich zum Nicht-HIV-cHL (n = 15) (**p = 0.0025, t-Test). (d) Kein Unterschied in der Anzahl der S100+ dendritischen Zellen/mm²

von HIV-cHL (n = 24) im Vergleich zum Nicht-HIV-cHL (n = 15). (e) Kein Unterschied zwischen der Anzahl der CD30+ HRS-Zellen/mm² im Lymphknoten von HIV-cHL (n = 24) im Vergleich zum Nicht-HIV-cHL (n = 15).

3.1.3 Rosetten um Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen

Bei der histologischen Untersuchung der CD4- und CD163-Spezialfärbung konnten in deutlich mehr Nicht-HIV-cHL-Fällen CD4+ T-Zell-Rosetten festgestellt werden (10/15 Fälle), als in HIV-cHL-Fällen (3/24 Fälle, Tabelle 10, Abbildung 16).

Es fanden sich mehr HIV-cHL-Fälle (14/24), welche CD163+ Makrophagen-Rosetten aufwiesen, als Nicht-HIV-cHL-Fälle (3/15, Tabelle 10, Abbildung 17). Die Makrophagen-Rosetten um die HRS-Zellen zeigten eine Ausstülpung ihres Zytoplasmas (Abbildung 18).

Alle 3 Nicht-HIV-cHL-Fälle mit Makrophagen-Rosetten zeigten auch T-Zell-Rosetten. Dem gegenüber gestellt zeigte nur einer der 14 HIV-cHL-Fälle mit Makrophagen-Rosetten zusätzlich T-Zell-Rosetten.

	HIV-cHL	Nicht-HIV-cHL
CD4+ T-Zell-Rosetten	3/24	10/15
CD163+ Makrophagen-Rosetten	14/24	3/15

Tabelle 10: CD4+ T-Zell-Rosetten und CD163+ Makrophagen-Rosetten im Vergleich bei HIV-cHL-Fällen und bei Nicht-HIV-cHL-Fällen, Angaben in absoluten Zahlenwerten.

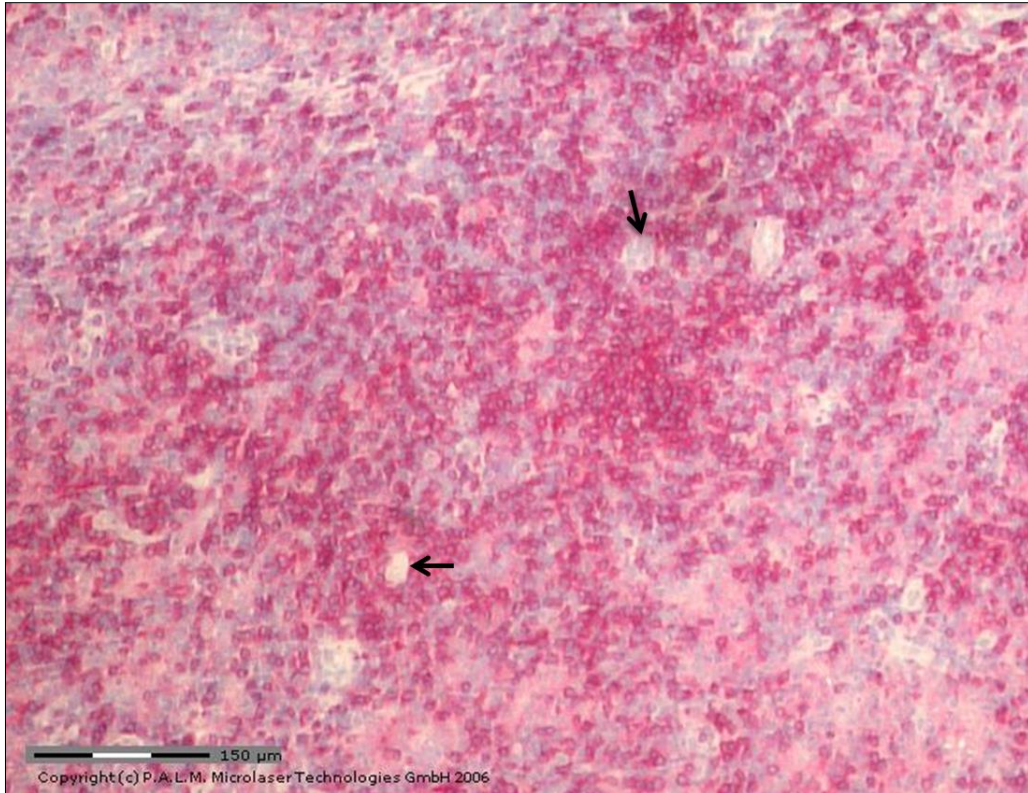


Abbildung 16: CD4-Immunfärbung im Nicht-HIV-cHL zeigt eine große Anzahl an CD4+ T-Zellen, die sich als Rosetten um die HRS-Zellen anlagern (hervorgehoben durch Pfeile, Vergrößerung 100x).

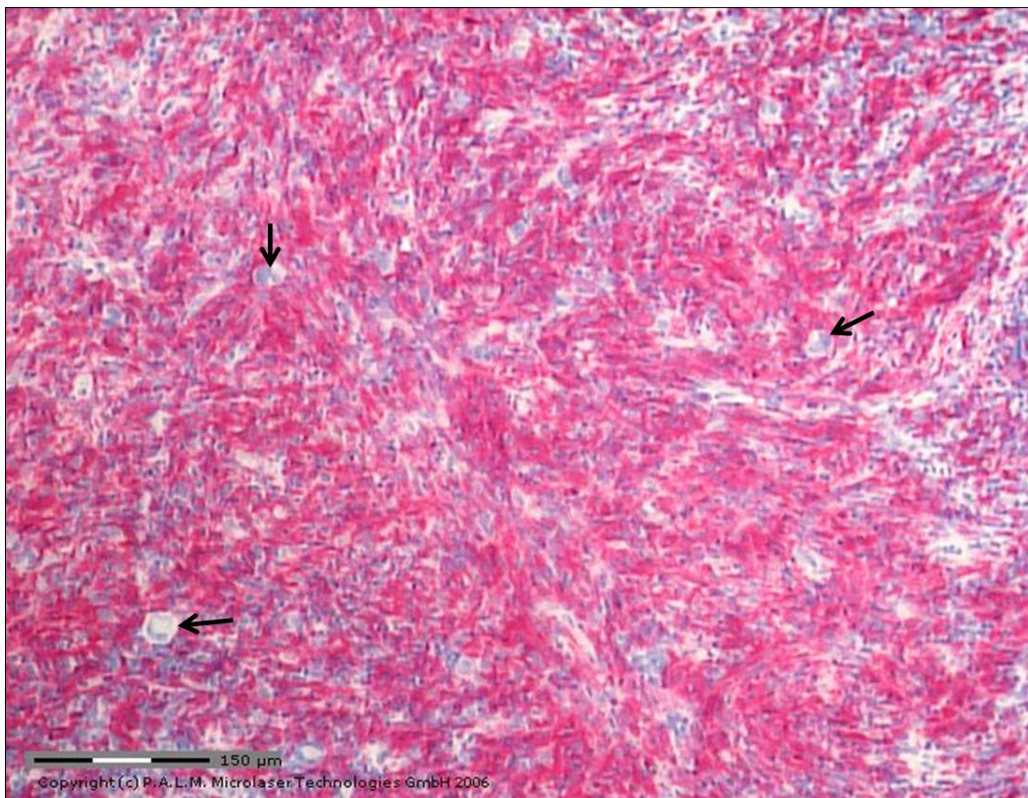


Abbildung 17: CD163-Immunfärbung im HIV-cHL zeigt eine große Anzahl an CD163+ Makrophagen, die sich als Rosetten um die HRS-Zellen anlagern (hervorgehoben durch Pfeile, Vergrößerung 100x).

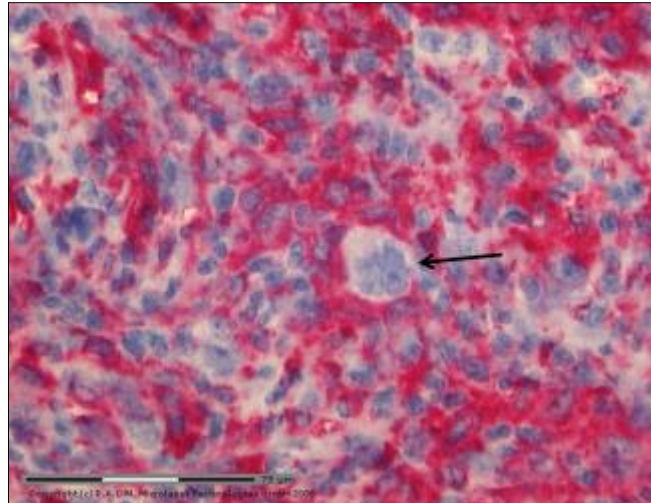


Abbildung 18: CD163+ Makrophagen-Rosette im HIV-cHL um eine HRS-Zelle (Pfeil) mit zytoplasmatischen Ausstülpungen in höherer Vergrößerung (400x).

3.1.4 Kokulturen

3.1.4.1 Reinheitsbestimmung mittels FACS

Mithilfe der Durchflusszytometrie konnte die Reinheit der durch das MACS aufgereinigten CD4+ T-Zellen und CD14+ Monozyten bestätigt werden. Nach dem MACS lag der Anteil der CD4+ T-Zellen in der CD4-Zellsuspension bei 98,8% und der Anteil der CD14+ Monozyten in der Monozyten-Zellsuspension bei 72,4% (Abbildung 19, Abbildung 20).

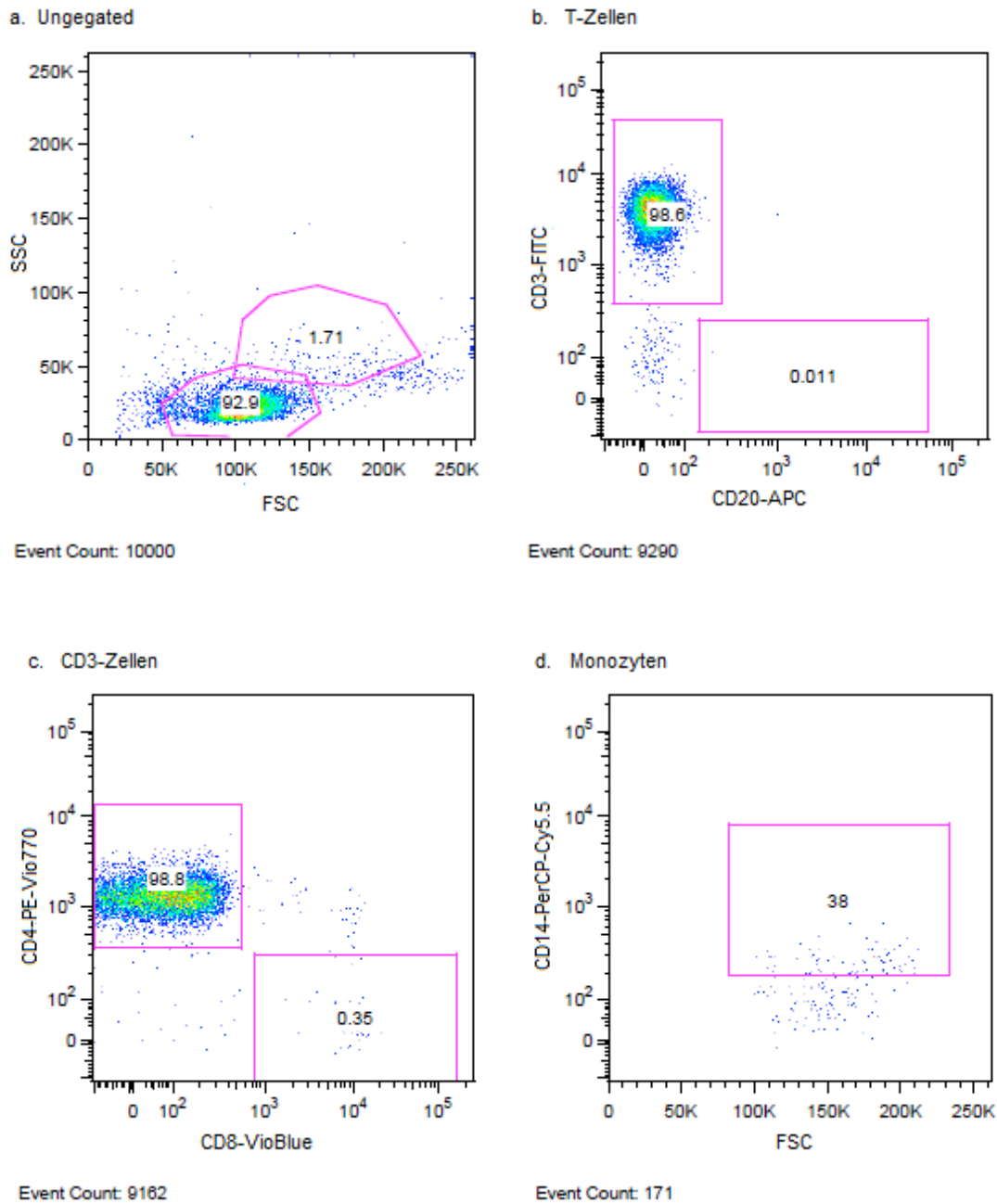


Abbildung 19: FACS-Reinheitsbestimmung der durch MACS erhaltenen CD4-T-Zellsuspension. Jeder Punkt entspricht einer gemessenen Zelle. a. Der FSC/SSC-Dotplot ohne „Gate“ zeigt, dass über 90% der gemessenen Zellen im Bereich der Lymphozyten und ein verschwindend geringer Teil der Zellen (< 2%) im Bereich der Monozyten liegt. b.-d. Dotplot-Grafiken der Ergebnisse der Fluoreszenzmessung: b. Die gatede Lymphozytendarstellung mit CD3- und CD20- gekoppelten Antikörpern zeigt, dass 98,6% der Lymphozyten T-Zellen sind. c. Die gatede Lymphozytendarstellung mit CD4- und CD8-gekoppelten Antikörpern zeigt, dass 98,8% der T-Zellen das Oberflächenantigen CD4 tragen. d. Die gatede Monozytendarstellung mit CD14-gekoppelten Antikörpern zeigt, dass kaum Monozyten (event count: 171) in der CD4-Zellsuspension vorhanden sind.

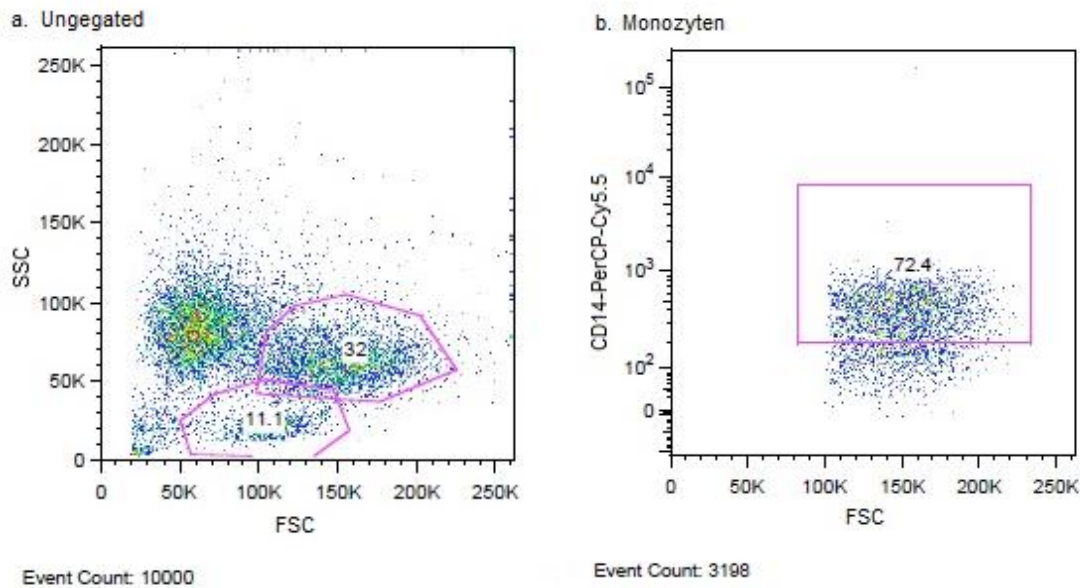


Abbildung 20: FACS-Reinheitsbestimmung: der durch MACS erhaltenen CD14-Monozytensuspension. Jeder Punkt entspricht einer gemessenen Zelle. a. Der ungegatede FSC/SSC-Dotplot zeigt, dass 32% der gemessenen Zellen im Bereich der Monozyten und ca. 11% der Zellen im Bereich der Lymphozyten liegen. b. Dotplot-Grafik der Fluoreszenzmessung. Die gatede Monozytendarstellung mit CD14-gekoppelten Antikörpern zeigt, dass 72,4% tatsächlich das CD14-Oberflächenantigen tragen.

3.1.4.2 Cluster

Nach einer 5-tägigen Kultivierung der 6-Well-Platten im Brutschrank bei 37°C konnten bei jeder der 3 cHL-Zelllinien (L-428, KM-H2 und L-1236), sowohl mit CD4+ T-Zellen als auch mit CD14+ Monozyten und dem CD4/CD14-Gemisch Clusterbildungen um die HRS-Zellen nachgewiesen werden. Die Burkitt-Zelllinie Ramos zeigte keine Clusterbildung. Auch die Negativkontrollen bestehend aus CD4+ T-Zellen, CD14+ Monozyten und Zelllinien alleine zeigten, wie erwartet, keine Clusterbildung.

Um die Clustergröße und Anzahl zu quantifizieren, wurden die 6-Well-Platten fotografiert und die Cluster mithilfe des Programms ImageJ ausgemessen (Abbildung 21, Abbildung 22, Abbildung 23).

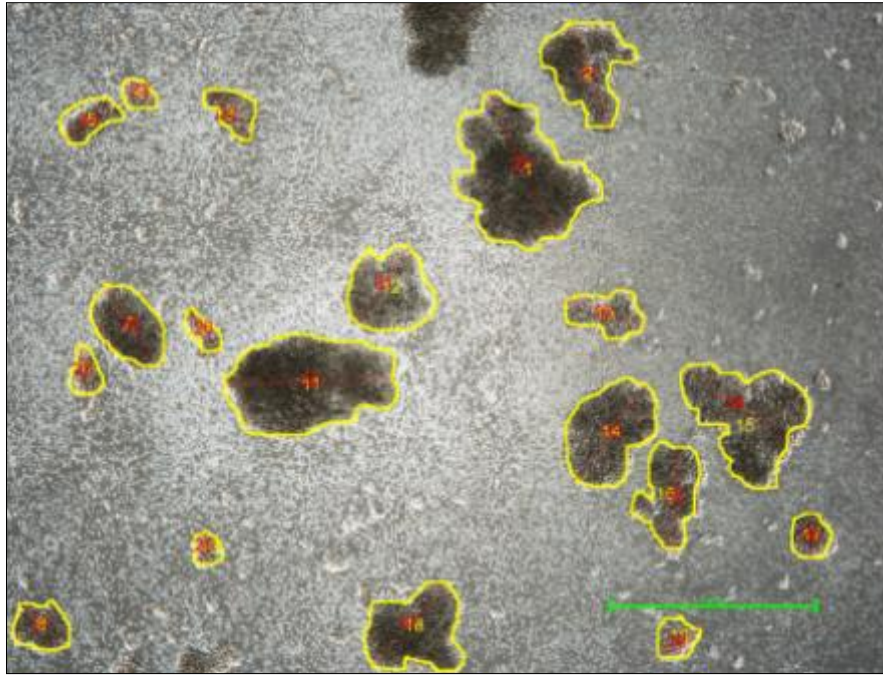


Abbildung 21: Ausmessung der Cluster in der Kokultur von Zelllinie L-428 mit CD4+ T-Zellen mithilfe der Software ImageJ. (gelb: Umfang der Cluster; rot: Durchmesser der Cluster).

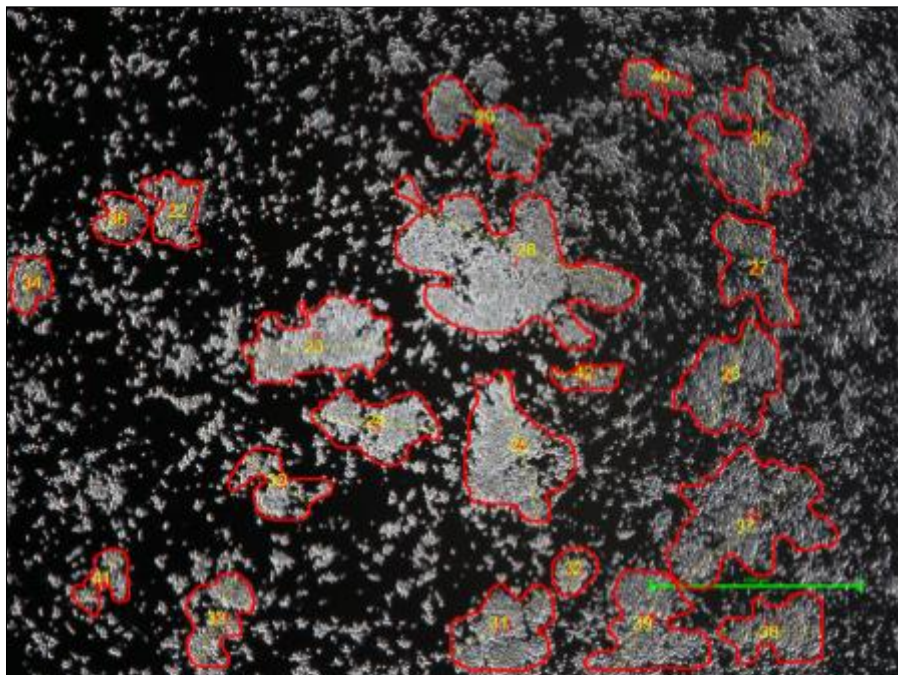


Abbildung 22: Ausmessung der Cluster in der Kokultur von Zelllinie L-428 mit CD14+ Monozyten mithilfe der Software ImageJ. (rot: Umfang der Cluster; gelb: Durchmesser der Cluster).

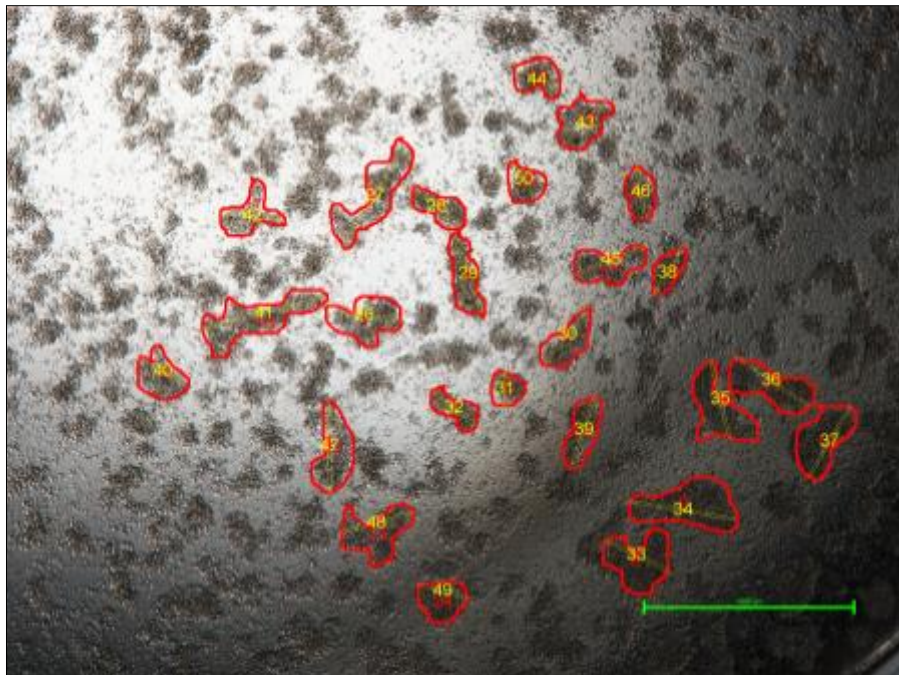


Abbildung 23: Ausmessung der Cluster in der Kokultur von Zelllinie L-428 mit CD4/CD14-Gemisch mithilfe der Software ImageJ. (rot: Umfang der Cluster; gelb: Durchmesser der Cluster).

Kokulturen mit CD4+ T-Zellen

In den Kokulturen der Zelllinien mit CD4+ T-Zellen wurden große nicht-adhäsive Cluster mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 378,9 μm ausgemessen (Abbildung 21).

Kokulturen mit CD14+ Monozyten

In den Kokulturen der Zelllinien mit CD14+ Monozyten konnten kleinere Cluster als in den Kokulturen mit CD4+ T-Zellen ausgemessen werden. Diese waren jedoch adhäsiv und wiesen mehr Cluster pro Well auf mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 300,3 μm (Abbildung 22).

Kokulturen mit CD4+ T-Zellen und CD14+ Monozyten im Verhältnis 1:1

In den Kokulturen der Zelllinien mit CD4/CD14-Gemisch wurden, ähnlich wie in den Kokulturen mit Monozyten, kleinere und adhäsive Cluster mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 335,1 μm gemessen (Abbildung 23).

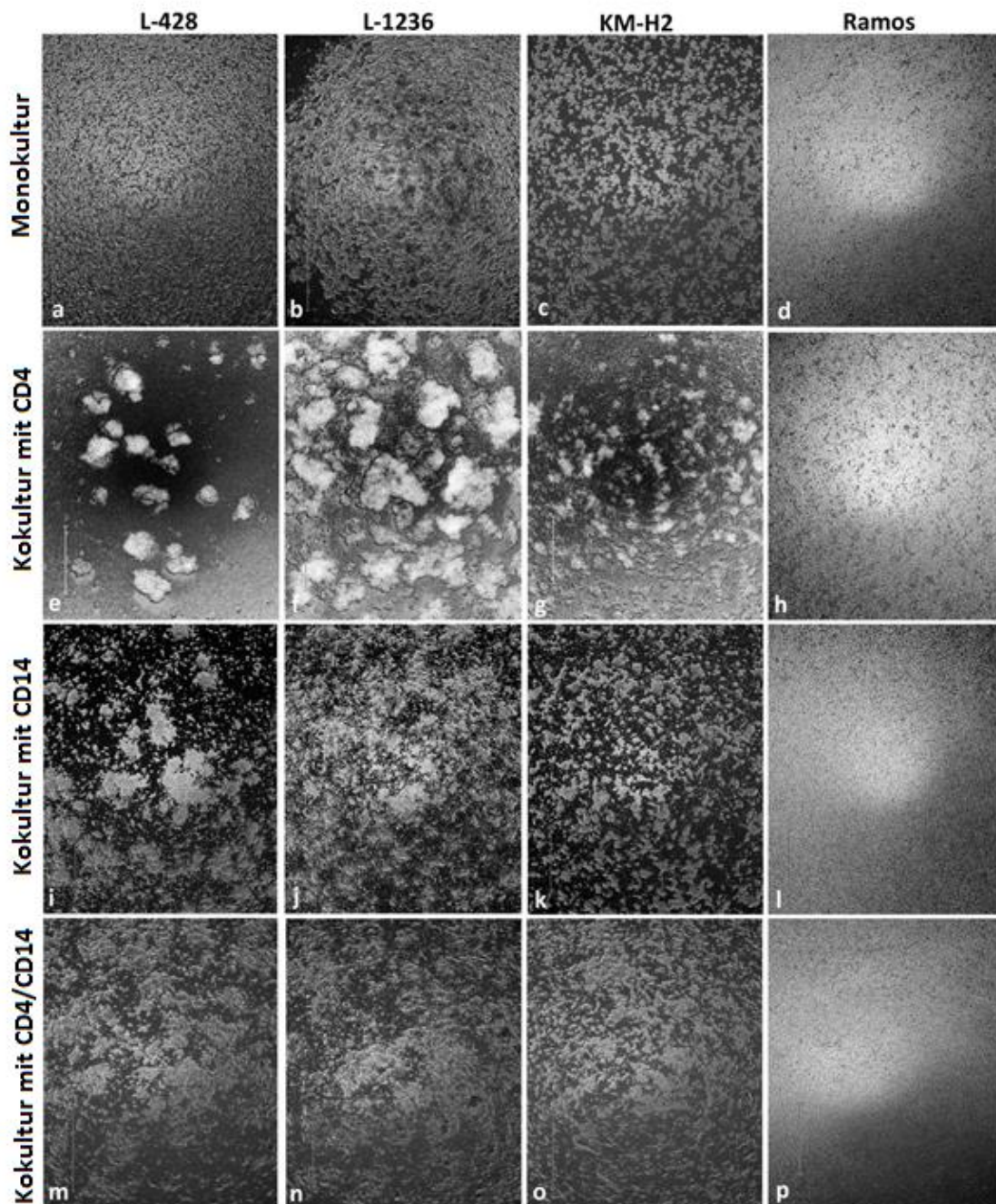


Abbildung 24: Fotografien der Wells mit einer Nikon ECLIPSE TE 300 von den Zelllinien L-428, L-1236, KM-H2 und Ramos als Monokultur und mit CD4+ T-Zellen, CD14+ Monozyten und CD4/CD14-Gemisch. (a)-(d) Die Monokulturen der Zelllinien L-248, L-1236, KM-H2 und Ramos zeigen keine Clusterbildung. (e)-(h) Die Kokulturen der Zelllinien L-248, L-1236, KM-H2 mit CD4+ T-Zellen zeigen große, nicht-adhäsive Cluster. Die Zelllinie Ramos mit CD4+ T-Zellen zeigt keine Clusterbildung. (i)-(l) Die Kokulturen der Zelllinien L-248, L-1236, KM-H2 mit CD14+ Monozyten zeigen kleine, adhäsive Cluster. Die Zelllinie Ramos mit CD14+ Monozyten zeigt keine Clusterbildung. (m)-(p) Die Kokulturen der Zelllinien L-248, L-1236, KM-H2 mit CD4/CD14-Gemisch zeigen kleine, adhäsive Cluster. Die Zelllinie Ramos mit CD4/CD14-Gemisch zeigt keine Clusterbildung. Modifiziert nach Hartmann *et al.* (Hartmann *et al.* 2013b).

Abbildung 25 zeigt die Durchmesser der Cluster in μm in den Kokulturen von cHL-Zelllinie KM-H2, L-428 und L-1236 jeweils mit CD4⁺ T-Zellen, CD14⁺ Monozyten und CD4/CD14-Gemisch. Die Kokulturen werden gegenübergestellt und deren Durchmesser auf der y-Achse abgebildet. Zudem werden die Mediane angezeigt.

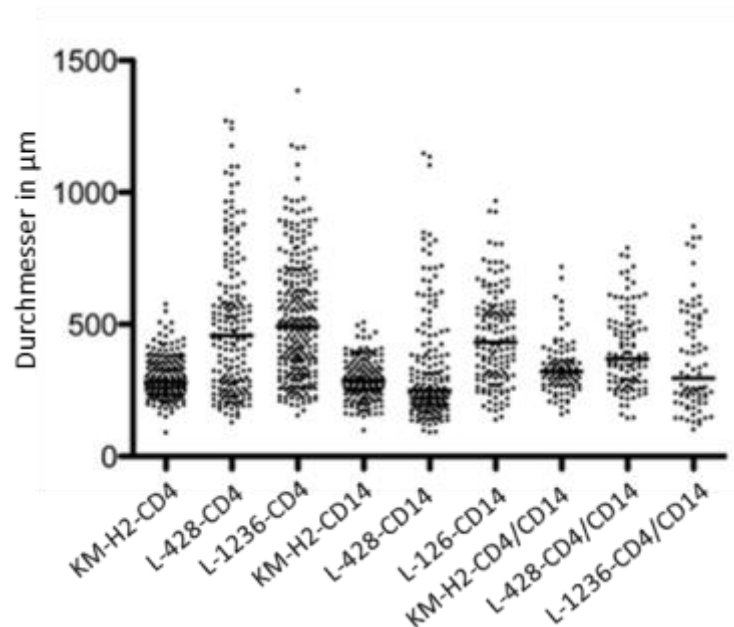


Abbildung 25: Durchmesser der Cluster in μm in den Kokulturen von cHL-Zelllinie KM-H2, L-428 und L-1236 mit CD4⁺ T-Zellen, CD14⁺ Monozyten und CD4/CD14-Gemisch.

3.1.4.3 Ausstriche der Kokulturen

In den Ausstrichen der Kokulturen konnten nach der Immunfärbung der Zellen mit Pappenheim auf den Objektträgern deutliche Rosettenbildungen nachgewiesen werden (Abbildung 26). Nach der Immunfärbung mit CD4 und CD14 wurde eindeutig dargestellt, welcher Zelltyp sich um die HRS-Zellen herum angelagert hatte. Dies war von besonderem Interesse bei den Ausstrichen der Kokulturen mit dem Gemisch aus CD4⁺ T-Zellen und CD14⁺ Monozyten. Hier zeigte sich, dass sowohl CD4⁺ T-Zellen als auch CD14⁺ Monozyten um die gleiche Tumorzelle gemeinsam Rosetten gebildet hatten. Bei den Kokulturen mit jeweils nur einem Zelltyp (CD4 oder CD14) konnten in gleichem Maße Rosettenformationen nachgewiesen werden.

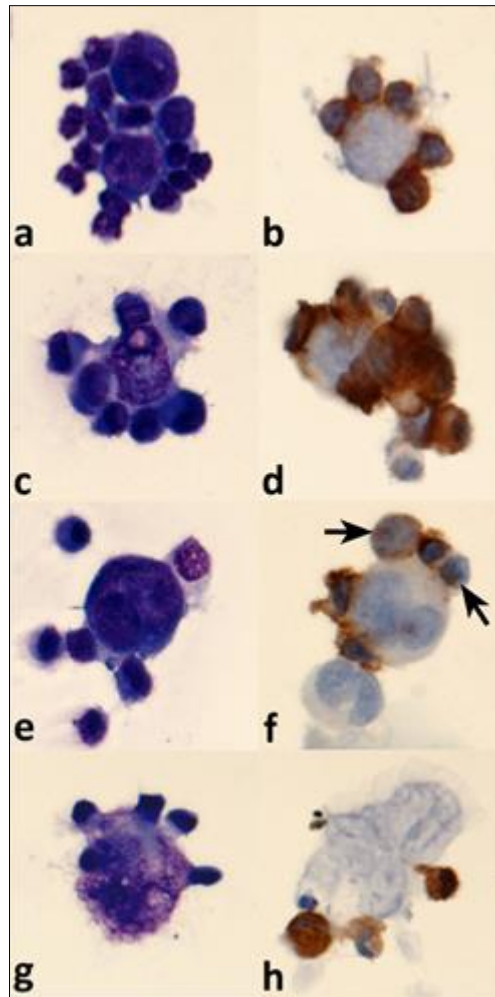


Abbildung 26: Ausstriche der Kokultur L-428 mit adhärennten Zellen: (a) L-428 mit T-Zell-Rosetten in der Kokultur mit CD4+ T-Zellen (Pappenheim). (b) L-428 mit T-Zell-Rosetten in der Kokultur mit CD4+ T-Zellen (CD4-Immunfärbung). (c) L-428 mit Monozyten-Rosetten in der Kokultur mit CD14+ Monozyten (Pappenheim). (d) L-428 mit Monozyten-Rosetten in der Kokultur mit CD14+ Monozyten (CD14-Immunfärbung). (e) L-428 mit rosettierenden T-Zellen und Monozyten in der Kokultur mit CD4+ T-Zellen und CD14+ Monozyten (Pappenheim). (f) L-428 mit rosettierenden T-Zellen und Monozyten in der Kokultur mit CD4+ T-Zellen und CD4-negativen/schwach positiven Monozyten (Pfeile, CD4-Immunfärbung). (g) L-428 mit rosettierenden T-Zellen und Monozyten in der Kokultur mit CD4+ T-Zellen und CD14+ Monozyten (Pappenheim). (h) L-428 mit rosettierenden T-Zellen und Monozyten in der Kokultur mit CD4+ T-Zellen (CD14-negativ) und CD14+ Monozyten (CD14-Immunfärbung). Modifiziert nach Hartmann *et al.* (Hartmann *et al.* 2013b).

3.1.5 Klinische Daten und Gewebepathologie

Da nicht nur das histologische Gewebe der HIV-cHL-Patienten vorlag, sondern z.T. auch klinische Daten über den Erhalt einer cART, der Viruslast oder der CD4-Blutzellzahl bei Erstdiagnose HL, sollte festgestellt werden, ob es signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Parametern und dem Makrophagen- bzw. CD4+ T-Zell-Gehalt im histologischen Gewebeschnitt gab.

Leider waren nicht von allen HIV-cHL-Patienten klinische Daten bekannt. Somit sind im Folgenden nicht alle 24 HIV-cHL-Fälle aufgelistet.

Anzahl der Makrophagen und Anzahl der T-Zellen im Gewebeschnitt in Bezug auf die cART Therapie

Von 16 der 24 HIV-cHL-Patienten war bekannt, ob sie vor der cHL-Diagnose eine cART erhalten hatten oder nicht. 6 Patienten hatten eine cART erhalten, 10 Patienten hatten keine cART erhalten.

Die Anzahl der CD163+ Makrophagen lag bei den Patienten, die eine cART erhalten hatten, bei 2943 Zellen/mm² und bei Patienten ohne cART bei 2905 Zellen/mm².

Die Anzahl der CD4+ T-Zellen lag bei den Patienten, die eine cART erhalten hatten, bei 1327 Zellen/mm² und bei Patienten ohne cART bei 554 Zellen/mm².

Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war **nicht signifikant**.

Anzahl der Makrophagen und Anzahl der T-Zellen im Gewebeschnitt in Bezug auf die Viruslast im Blut

Von 12 der 24 HIV-cHL-Patienten waren klinische Daten über die Viruslast bei der Diagnosestellung bekannt. Dabei wurde eine hohe Viruslast definiert als ≥ 340 Kopien/ml und eine niedrige Viruslast als < 20 Kopien/ml. 7 Patienten wiesen bei der Diagnose eine hohe Viruslast, 5 Patienten eine niedrige Viruslast auf.

Bei den Patienten mit hoher Viruslast (≥ 340 Kopien/ml) lag die Zellzahl der CD163+ Makrophagen bei 3757 Zellen/mm² und die CD4+ T-Zellzahl bei 698 Zellen/mm².

Bei den Patienten mit niedriger Viruslast (< 20 Kopien/ml) lag die Zellzahl der CD163+ Makrophagen bei 2028 Zellen/mm² und die CD4+ T-Zellzahl bei 2238 Zellen/mm².

Auch hier waren die Unterschiede zwischen der Makrophagen- bzw. CD4-Zellzahl bei Patienten mit hoher Viruslast und niedriger Viruslast **nicht signifikant**.

Anzahl der Makrophagen und Anzahl der T-Zellen im Gewebeschnitt in Bezug auf CD4-Blutzellzahl

3 von 24 HIV-Patienten hatten bei der Diagnose cHL eine CD4-Blutzellzahl $> 250/\mu\text{l}$.

Bei 11 Patienten lag die CD4-Blutzellzahl $< 250/\mu\text{l}$.

Der CD4+ T-Zellgehalt im Gewebe lag in den Fällen mit Blutwerten $> 250/\mu\text{l}$ bei 3756 Zellen/mm² und war **signifikant höher** als in der Gruppe mit Blutwerten $< 250/\mu\text{l}$ mit

464 Zellen/mm² (p = 0.0127, Mann-Whitney-Test).

Der CD163+ Makrophagengehalt im Gewebe lag in den Fällen mit Blutwerten > 250/μl bei 1389 Zellen/mm² und war **signifikant niedriger** als in der Gruppe mit Blutwerten < 250/μl mit 3458 Zellen/mm², (p = 0.0293, Mann-Whitney-Test). Einschränkend ist hier festzustellen, dass die Gruppe mit Blutwerten > 250/μl mit nur drei Patienten sehr klein ist.

3.2 Ergebnisse der NPLHL- und THRLBCL-Fälle

3.2.1 Klinische Daten der Patienten

Es wurden 14 Fälle vom typisch knotigen NPLHL Typ A und 15 Fälle vom NPLHL Typ C, sowie 14 Fälle vom diffusen THRLBCL-like NPLHL und 25 Fälle vom THRLBCL ausgewertet (Abbildung 27). Alle Fälle waren genauso wie die 15 Kontrollfälle der unspezifischen Lymphadenitiden EBV-negativ.

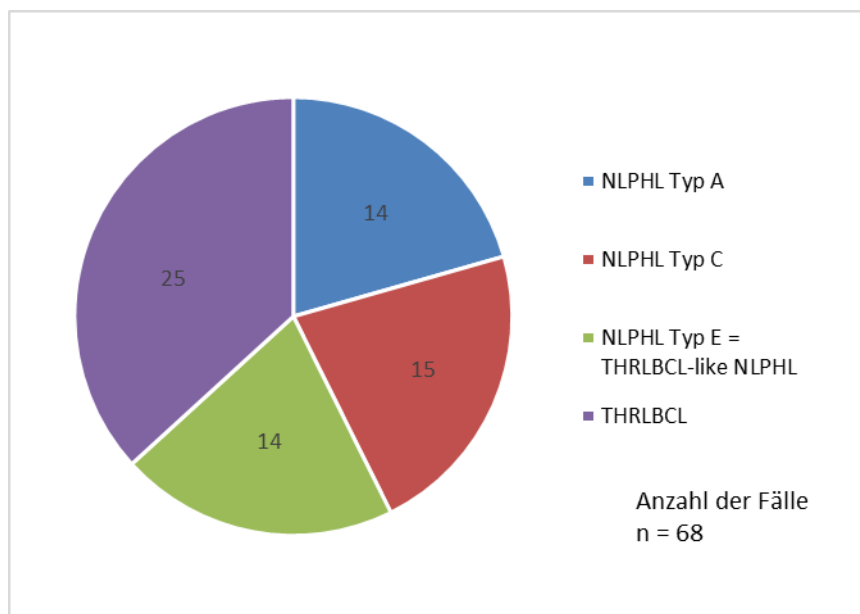


Abbildung 27: Verteilung der NPLHL- und THRLBCL-Fälle (n = 68) nach Anzahl und Entität.

3.2.2 Zusammensetzung des Begleitinfiltrats

Nach der Auszählung mithilfe des Lasermikroskops und des dazugehörigen Kamerasystems wurden die Mediane der CD4-, CD8-, CD163+ Zellen für NPLHL Typ A-, NPLHL Typ C-, THRLBCL-like NPLHL- und THRLBCL-Fälle berechnet. Alle

Zahlenwertergebnisse sind somit im Folgenden als Mediane angegeben.

CD4+ T-Zellen:

Die CD4+ T-Zellzahl in den THRLBCL-Fällen lag bei 3091 Zellen/mm² und war **signifikant niedriger** als in den Fällen des typischen NLP HL Typ A mit 6433 Zellen/mm² (p = 0.002, t-test) und NLP HL Typ C mit 5966 Zellen/mm² (p = 0.011, t-test). Zwischen den THRLBCL-Fällen mit 3091 CD4+ Zellen/mm² und THRLBCL-like NLP HL-Fällen mit 4374 Zellen/mm² konnte **kein signifikanter** Unterschied festgestellt werden.

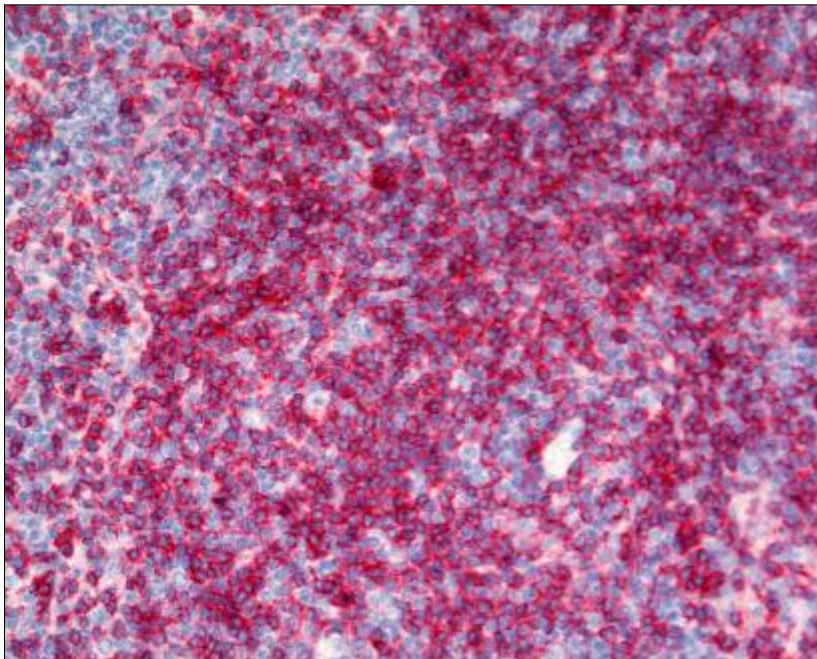


Abbildung 28: CD4-Immunfärbung im typisch knotigen NLP HL Typ A zeigt eine große Anzahl an CD4+ T-Zellen. Vergrößerung 200x.

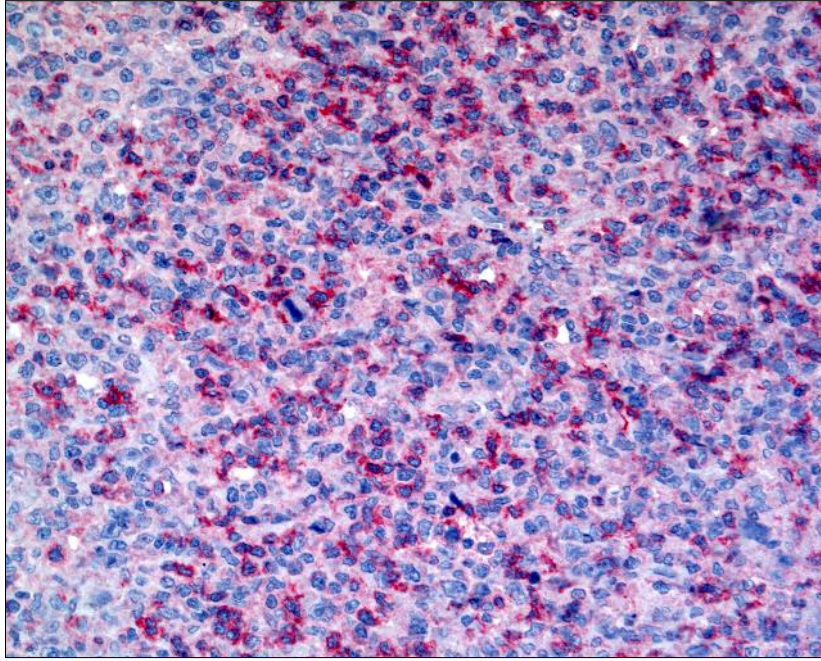


Abbildung 29: CD4-Immunfärbung im THRLBCL-like NLP HL zeigt eine geringe Anzahl an CD4+ T-Zellen. Vergrößerung 200x.

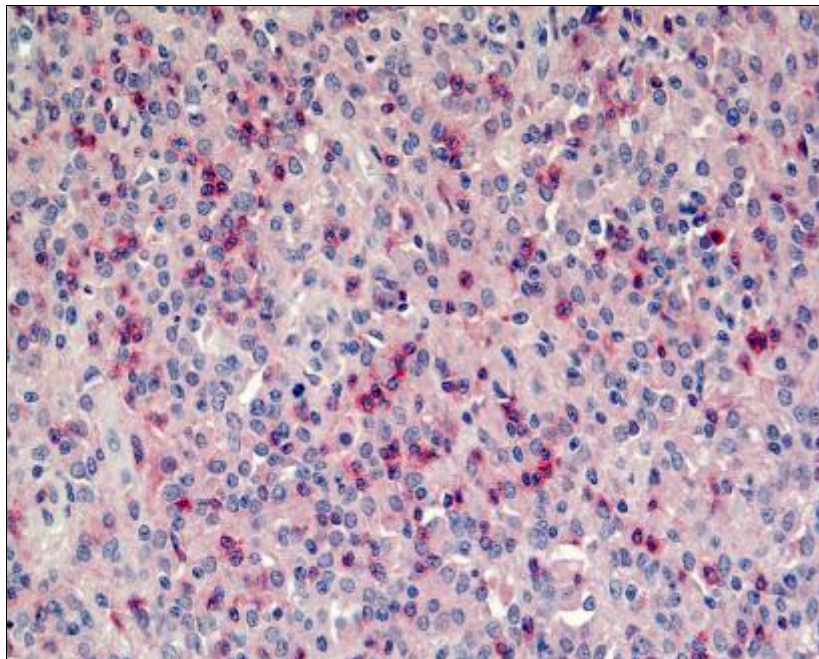


Abbildung 30: CD4-Immunfärbung im THRLBCL zeigt eine geringe Anzahl an CD4+ T-Zellen. Vergrößerung 200x.

CD8+ T-Zellen:

Die CD8+ T-Zellzahlen unterschieden sich mit 2421 Zellen/mm² in den THRLBCL-Fällen, 2770 Zellen/mm² in den THRLBCL-like NLP HL-Fällen und jeweils 1707

Zellen/mm² und 2057 Zellen/mm² in den Fällen der NLPHL Typen A und C **nicht signifikant** voneinander.

CD163+ Makrophagen:

Die Anzahl der CD163+ Makrophagen lag in den THRLBCL-Fällen bei 2743 Zellen/mm² und in den THRLBCL-like NLPHL-Fällen bei 2957 Zellen/mm². Die durchschnittliche CD163+ Makrophagenzahl war in diesen beiden Gruppen **signifikant höher** als in den Fällen des typischen NLPHL Typ A mit 85 Zellen/mm² und NLPHL Typ C mit 689 Zellen/mm² (p = 0.001, Mann-Whitney-test)

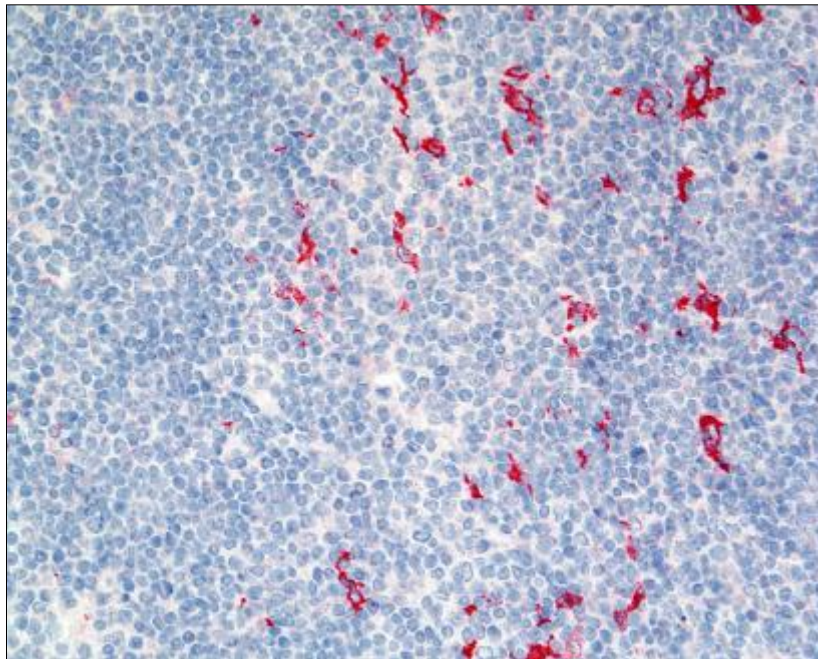


Abbildung 31: CD163-Immunfärbung im typisch knotigen NLPHL Typ A zeigt eine geringe Anzahl an CD163+ Makrophagen. Vergrößerung 200x.

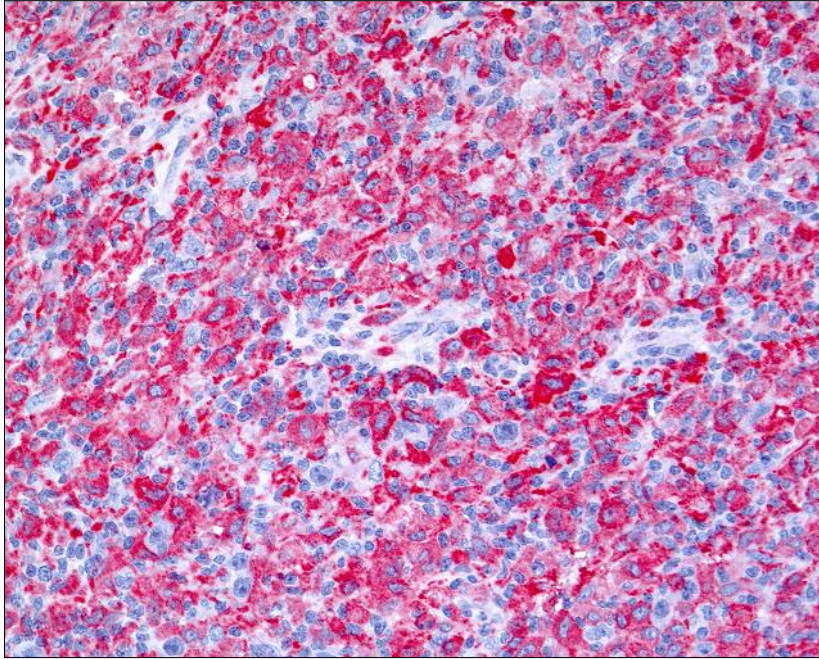


Abbildung 32: CD163-Immunfärbung im THRLBCL-like NLP HL zeigt eine große Anzahl an CD163+ Makrophagen. Vergrößerung 200x.

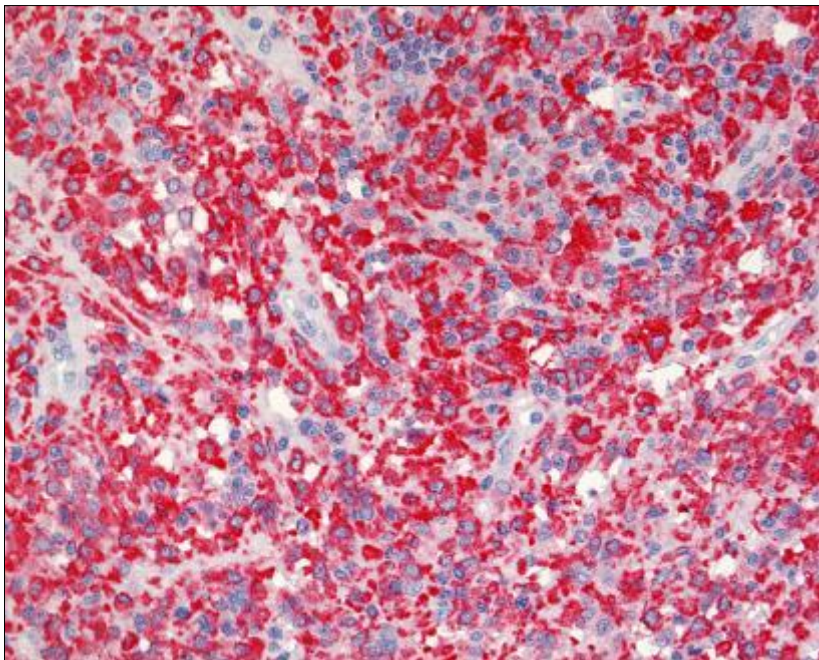


Abbildung 33: CD163-Immunfärbung im THRLBCL zeigt eine große Anzahl an CD163+ Makrophagen. Vergrößerung 200x.

Abbildung 34 zeigt eine Zusammenfassung der Quantifizierung des Begleitinfiltrats. Für die untersuchten Zellarten werden das NLP HL Typ A, NLP HL Typ C, THRLBCL-like NLP HL und das THRLBCL gegenübergestellt und deren Häufigkeit auf der y-Achse abgebildet. Zudem werden die Mediane angezeigt.

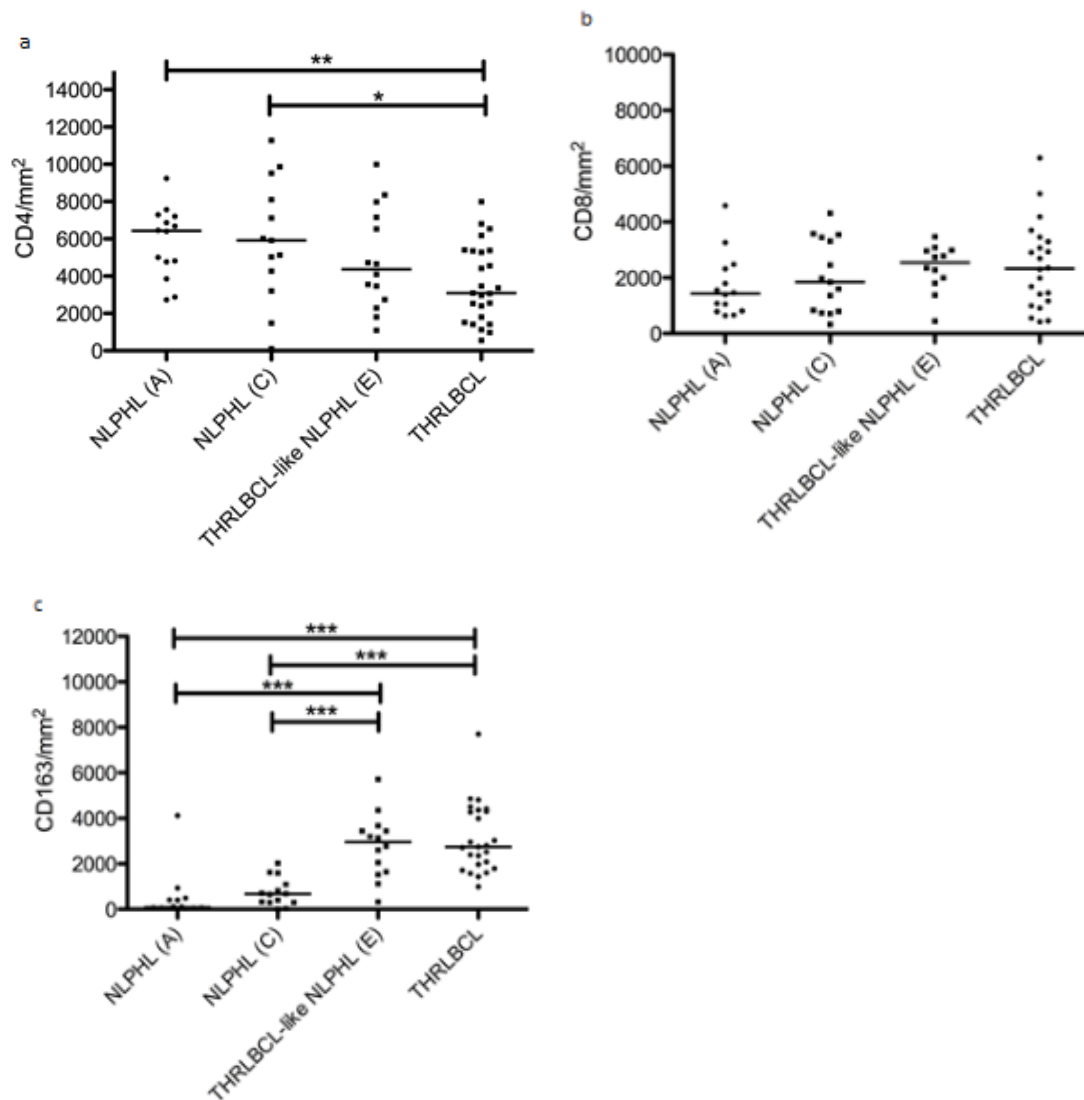


Abbildung 34: Quantifizierung des Begleitinfiltrats im typischen NLPHL Typ A und NLPHL Typ C, THRLBCL-like NLPHL und THRLBCL. (a) Anzahl der CD4+ T-Zellen/mm² im typischen NLPHL (Typ A: n = 14 und Typ C: n = 13), THRLBCL-like NLPHL (n = 14) und THRLBCL (n = 25). (*p, 0.05, **p, 0.01, t-Test). (b) Anzahl der CD8+ T-Zellen/mm² im typischen NLPHL (Typ A: n = 14 und Typ C: n = 15) und THRLBCL-like NLPHL (n = 12) und THRLBCL (n = 22). (c) Anzahl der CD163+ Makrophagen/mm² im NLPHL Typ A, Typ B und THRLBCL-like NLPHL (jeweils n = 14) und THRLBCL (n = 25). (**p, 0.01, ***p, 0.001, Mann-Whitney-test); Quelle: (Hartmann et al. 2013)

3.2.3 T-Zell-Rosetten um Tumorzellen

Es wurden jeweils 10 Fälle des NLPHL Typ A, NLPHL Typ C, THRLBCL-like NLPHL und THRLBCL auf T-Zell-Rosetten mithilfe der Expression der folliculären T-Helferzell-Marker PD1, CXCL13 und ICOS und dem aktivierten T-Zell-Marker MUM1 untersucht.

Im Folgenden steht in Klammern wie viele der 10 untersuchten Fälle T-Zell-Rosetten aufwiesen. Dabei wurde ein Fall als positiv für T-Zell-Rosetten gewertet, wenn um mindestens 5% der Tumorzellen Rosetten nachgewiesen werden konnten.

- MUM1+ T-Zell-Rosetten kamen zwar häufiger beim NLPHL Typ A (6/10) und NLPHL Typ C (6/10) vor, jedoch zeigten auch das THRLBCL-like NLPHL (2/10) und das THRLBCL (2/10) MUM1+ T-Zell-Rosetten.
- Es wurden PD1+ T-Zell-Rosetten bei den typisch knotigen NLPHL Typen A (8/10) und C (6/10) festgestellt. Es wurden keine T-Zell-Rosetten beim diffusen THRLBCL-like NLPHL (0/10) und beim THRLBCL (0/10) gefunden.
- CXCL13+ T-Zell Rosetten konnten nur beim typisch knotigen NLPHL Typ A (3/10) festgestellt werden. Das NLPHL Typ C (0/10), das THRLBCL-like NLPHL (0/10) und das THRLBCL (0/10) wiesen keine CXCL13+ T-Zell-Rosetten auf.
- ICOS+ T-Zell-Rosetten konnten jeweils nur bei einem Fall der knotigen NLPHL Typen A (1/10) und C (1/10) festgestellt werden. Das THRLBCL-like NLPHL (0/10) und das THRLBCL (0/10) zeigten keine ICOS+ T-Zell-Rosetten.

3.3 Vergleich der Ergebnisse der HIV/Nicht-HIV-Fälle und der NLPHL/THRLBCL-Fälle

CD4+ T-Zellen. Wenn auch lange nicht in so starkem Ausmaß wie bei den HIV-assoziierten cHL-Fällen (876 Zellen/mm²), war die CD4+ T-Zellzahl sowohl in den THRLBCL-Fällen (3091 Zellen/mm²) als auch in den THRLBCL-like NLPHL-Fällen (4374 Zellen/mm²) im Vergleich zu den NLPHL Typen A und C (6433 und 5966 Zellen/mm²) erniedrigt (Abbildung 35).

CD163+ Makrophagen: Die Anzahl der CD163+ Makrophagen lag in den THRLBCL-Fällen (2743 Zellen/mm²) und THRLBCL-like NLPHL-Fällen (2957 Zellen/mm²) gleichauf mit der CD163+ Makrophagenanzahl in den HIV-assoziierten cHL-Fällen (2836 Zellen/mm²) (Abbildung 35).

Abbildung 35 zeigt eine Zusammenfassung der Quantifizierung des Begleitinfiltrats. Für die untersuchten Zellarten werden das NLPHL Typ A, NLPHL Typ C, THRLBCL-like

NLPHL und das THRLBCL, sowie die HIV-positiven Fälle und die HIV-negativen Fällen gegenübergestellt und deren Häufigkeit auf der y-Achse abgebildet. Zudem werden Mediane angezeigt.

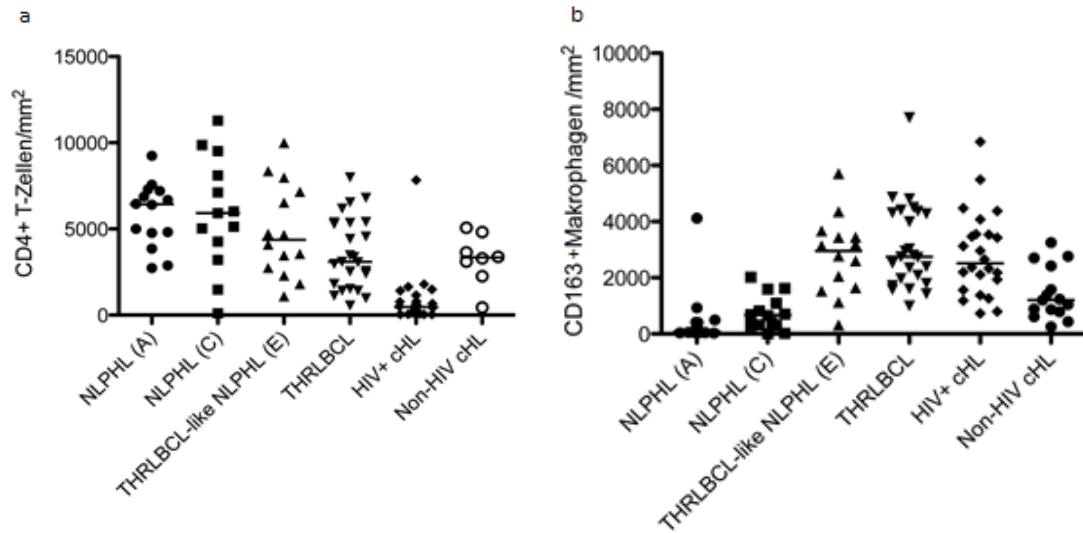


Abbildung 35: Quantifizierung des Begleitinfiltrats im NLPHL Typ A, NLPHL Typ B, THRLBCL-like NLPHL und THRLBCL, HIV-assoziierten cHL und HIV-negativen cHL. (a) Anzahl der CD4+ T-Zellen/mm² im typischen NLPHL Typ A (n = 14), NLPHL Typ C (n = 13), THRLBCL-like NLPHL (n = 14) und THRLBCL (n = 25), HIV-cHL (n = 24) und Nicht-HIV-cHL (n = 15). (b) Anzahl der CD163+ Makrophagen/mm² im NLPHL Typ A, NLPHL Typ C und THRLBCL-like NLPHL (jeweils n = 14) und THRLBCL (n = 25), HIV-cHL (n = 24) und Nicht-HIV-cHL (n = 15); Quelle: (Hartmann et al. 2013)

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse der HIV- und Nicht-HIV-cHL-Fälle

Mit Beginn der cART Therapie im Jahre 1996 ist die Inzidenz von AIDS-definierenden Erkrankungen (z. B. KS und NHL) deutlich gefallen (Appleby et al. 2000) wohingegen einige Studien zeigen, dass die Inzidenz der Nicht-AIDS-definierenden Erkrankung cHL seit Beginn der cART zugenommen hat (Biggar et al. 2006; Herida et al. 2003; Engels et al. 2008; Powles et al. 2009).

HIV-Infizierte haben je nach Literatur ein 5-15-fach höheres Risiko an einem cHL zu erkranken als Nicht-HIV-Infizierte (Biggar et al. 2006; Lanoy et al. 2011; Herida et al. 2003; Powles et al. 2009; Clifford et al. 2005).

Da das HIV vor allem CD4-Zellen befällt und dezimiert und dieser Zelltyp den größten Teil im reaktiven Infiltrat von cHL ausmacht, wurde bereits in einigen Studien der Zusammenhang zwischen der CD4-Zellzahl bei HIV-Patienten und dem Risiko an cHL zu erkranken untersucht.

Diese Studien zeigen, dass der Zusammenhang zwischen der CD4-Zellzahl bei HIV-Patienten und dem Risiko an cHL zu erkranken komplex ist und dass hier kein linearer Zusammenhang besteht. Bei Biggar *et al.* birgt eine eher moderate Immunsuppression (CD4-Zellzahl zwischen 225-249 Zellen/ μ l) ein deutlich höheres Risiko (15-fach höher) an cHL zu erkranken als eine schwere Immunsuppression (CD4-Zellen $<25/\mu$ l), wobei hier immer noch ein 5-fach höheres Risiko besteht als in der allgemeinen Bevölkerung. Auch Bohlius *et al.* konnten bei noch moderater Immunsuppression (CD4-Zellzahl 100-199 Zellen/ μ l) ein höheres Risiko für die Entwicklung eines cHL feststellen. Bei Powles *et al.* sind CD4-Zellzahlen $< 200/\mu$ l mit einer höheren Inzidenz für cHL assoziiert. Bei Clifford *et al.* konnte kein Zusammenhang zwischen absoluten CD4-Zellzahlen und cHL-Inzidenz herausgefunden werden, jedoch schien es eine Tendenz für ein höheres cHL-Risiko bei fallenden CD4-Zellen zu geben. Eine steigende Inzidenz von cHL bei HIV-Patienten unter cART-Behandlung konnte bei Clifford *et al.* wiederum nicht bestätigt werden. Zusammenfassend zeigen jedoch alle, dass eine moderate Immunsuppression anstatt einer schweren Immunsuppression das Risiko erhöht, an einem cHL zu erkranken. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass CD4⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des cHL spielen. Daher lag das Interesse im ersten Teil der hier vorliegenden Studie darin, wie sich das Begleitinfiltrat im HIV-assoziertem cHL, d. h. bei Patienten

die einen periphere CD4⁺ T-Zell-Verlust aufweisen, vom HIV-negativen cHL unterscheidet. Eine weitere Fragestellung war, ob andere Zellen diesen Platz einnehmen und falls ja, ob sie sich in gleicher Weise, als Rosetten, um die Tumorzellen anlagern. Zudem wurde der Zusammenhang der klinischen Daten, wie Therapie mit cART, Viruslast im Blut und CD4-Blutzellzahl bei cHL-Diagnose, mit der Zusammensetzung des reaktiven Begleitinfiltrats untersucht.

4.1.1 Zusammensetzung des Begleitinfiltrats

In der hier vorliegenden Studie wiesen HIV-Patienten bei der Erstdiagnose cHL häufiger eine niedrige CD4-Blutzellzahl (11 Patienten mit CD4-Blutzellzahl < 250/μl gegenüber 3 Patienten mit CD4-Blutzellzahl > 250/μl) auf. Die Schlussfolgerung, dass eine niedrige CD4-Blutzellzahl das Risiko an cHL zu erkranken erhöht, wäre bei den über einen langen Zeitraum gesammelten, unvollständigen Daten und heterogenen Behandlungsprotokollen, zu spekulativ. Gezeigt werden konnte jedoch, dass in den cHL-Fällen bei HIV-Patienten mit niedrigen CD4-Blutwerten der CD163⁺ Makrophagengehalt im Tumorgewebe signifikant höher ist.

In mehreren Studien wurde herausgefunden, dass das CD4/CD8-Verhältnis im zellulären Begleitinfiltrat bei HIV-cHL-Fällen im Gegensatz zu Nicht-HIV-cHL-Fällen reduziert ist, wobei in verschiedenen Studien dieses Verhältnis zwischen 1:23 (Bosch Princep et al. 2005), 1:20 (Thompson et al. 2004), 1:7 (Kiyasu et al. 2012) und 1:5 (Carbone et al. 1999) lag.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen im cHL-Begleitinfiltrat deutlich niedriger in HIV-cHL- als in Nicht-HIV-cHL-Fällen war, wohingegen sich die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen in beiden Gruppen ähnlich verhalten hatte. Somit kann das reduzierte CD4/CD8-Verhältnis bei HIV-cHL durch die erniedrigte CD4⁺ T-Zellzahl erklärt werden.

In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Anzahl der CD30⁺ HRS-Zellen in beiden Vergleichsgruppen gleich groß war. Dies überraschte, da man vermuten könnte, dass im HIV-cHL die Tumorzellen aufgrund des geschwächten Immunsystems unkontrolliert wachsen könnten.

Zudem wurde eine signifikant höhere Anzahl an CD163⁺ Makrophagen im HIV-cHL gegenüber dem Nicht-HIV-cHL festgestellt.

4.1.2 Makrophagen im HIV-assoziierten cHL

Makrophagengehalt und klinischer Verlauf im cHL

Es ist schon länger bekannt, dass Tumorstadium durch entzündliches Zellinfiltrat und darunter insbesondere durch tumorassoziierte Makrophagen (TAM) gefördert wird (Pollard 2004; Dave et al. 2004; Farinha et al. 2005). TAM-Infiltration ist u. a. assoziiert mit der Angiogenese und der Produktion von Wachstumsfaktoren wie VEGF (engl. Vascular endothelial growth factor) und PDGF (engl. Platelet-derived growth factor) (Coussens und Werb 2002).

Die Zahl der Makrophagen in den verschiedenen cHL-Entitäten schwankt beträchtlich (Ree und Kadin 1985) und ein hoher Anteil an CD163+ Makrophagen ist mit einem höherem Lebensalter, einem positiven EBV-Status und dem klassischen Mischtyp assoziiert (Tan et al. 2012).

In kürzlich erschienenen Studien wurde gezeigt, dass eine vermehrte Anzahl von Makrophagen im Begleitinfiltrat von cHL mit einer schlechteren Prognose einhergeht und zwar in Bezug auf klinische Endpunkte wie das Gesamtüberleben, das ereignisfreie Überleben, das progressionsfreie Überleben und die 10-Jahres Überlebensrate (Kamper et al. 2011; Steidl et al. 2010; Tzankov et al. 2010). Ein höherer Makrophagengehalt konnte beim Versagen einer Erstlinientherapie nachgewiesen werden (Steidl et al. 2010). Auch eine Zweitlinientherapie spricht schlechter an, wenn der Makrophagengehalt höher ist (Kamper et al. 2011). Bei cHL im frühen Stadium unter Therapie konnte gezeigt werden, dass die krankheitsspezifische Langzeitüberlebensrate sogar 100% betragen kann, wenn der Makrophagengehalt sehr gering ist (Steidl et al. 2010).

Andere Studien wiederum haben gezeigt, dass es keinen Zusammenhang zwischen erhöhter Anzahl an TAM und klinischem Verlauf bei cHL-Patienten gibt, unabhängig davon, welcher Makrophagenmarker (CD163 oder CD68) benutzt wurde (Azambuja et al. 2012; Harris et al. 2012).

Erhöhter Makrophagengehalt im HIV-assoziierten cHL

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich der Makrophagengehalt bei HIV-cHL- und Nicht-HIV-cHL-Fällen deutlich unterscheidet. Die Anzahl an CD163+ Makrophagen war signifikant höher im Gewebe von HIV-cHL- als von Nicht-HIV-cHL-Fällen.

Für die immunhistochemische Färbung in unserer Arbeit wurde ein Antikörper verwendet, der gegen das Oberflächenantigen CD163 der Makrophagen gerichtet war.

Dieser ist in Studien als spezifischerer Makrophagenmarker als CD68 gewertet worden (Tan et al. 2012; Lau et al. 2004), da CD68 auch Monozyten und Epitheloidzellen erkennt. Bis dato wurde in der Literatur, die das Begleitinfiltrat von HIV-cHL- zu Nicht-HIV-cHL-Patienten vergleicht, auf T-Zellen, im Besonderen auf das CD4/CD8-Verhältnis, geachtet (Unger und Strauchen 1986; Carbone et al. 1999; Bosch Princep et al. 2005; Thompson et al. 2004; Kiyasu et al. 2012). Natürlich wird die obligate CD4+ T-Zell-Depletion bei HIV-Patienten ein Grund sein, möglicherweise aber auch die unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug auf T-Zell-Subtypen und den klinischen Verlauf im cHL (Oudejans et al. 1997; Liu et al. 2002; Camilleri-Broet et al. 2004; Alvaro et al. 2005; Kelley et al. 2007; Tzankov et al. 2008). Es gibt wenige Quellen, die Aussagen über den Makrophagengehalt im HIV-cHL machen. Als eine von diesen fanden Koulis *et al.* keinen Unterschied im Makrophagengehalt zwischen HIV-cHL- und Nicht-HIV-cHL-Patienten. Jedoch gab es zu der hier vorliegenden Arbeit Unterschiede in Bezug auf das Patientenkollektiv, welches hier durchweg EBV-positiv war, bei Koulis *et al.* jedoch auch EBV-negative Patienten in der Nicht-HIV-cHL-Gruppe beinhaltete. Des Weiteren wurde mit CD68 ein anderer Makrophagen-Marker verwendet (Koulis et al. 2014). Eine weitere Studie berichtete von einer vermehrten Anzahl an Fibrohistiozyten im Tumorgewebe von HIV-cHL-Patienten (Ree et al. 1991).

Interaktion zwischen HRS-Zellen und Begleitinfiltrat im cHL

Es ist in vielen Studien erforscht worden, dass im cHL die „Kommunikation“ zwischen HRS-Zellen und Begleitinfiltrat essenziell ist, um das Überleben, den Wachstum und die Proliferation der Tumorzellen zu unterstützen. Diese Wachstumsstimulation geschieht auf unterschiedlichen Wegen:

- Zell-Kontakt-vermittelte Stimulation intrazellulärer Rezeptor-Signalwege: Durch die Bindung zwischen CD40-Rezeptoren (auf den HRS-Zellen) und CD40-Liganden (auf CD4-Zellen und anderen Zellen, welche die Tumorzellen umgeben) wird der NF- κ B-Signalweg aktiviert (Carbone et al. 1995).
- Mutationen: Genetische Mutationen im NF- κ B (engl. nuclear factor κ B)- und JAK/STAT-Signalweg führen zur konstitutiven Aktivierung von Proteinen, die das Zellwachstum fördern, sowie zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Emmerich et al. 1999; Kuppers und Hansmann 2005).
- Chemokin/Zytokin-vermittelte Stimulation intrazellulärer Rezeptor-Signalwege:

Chemokine/Zytokine sind kleinmolekulare Proteine, die Chemotaxis bewirken und unzählige Funktionen wie Entzündung, Immunregulation, Zellausreifung und andere biologische Prozesse übernehmen. Sie können sowohl parakrin (umgebende Zellen als Effektorzellen) als auch autokrin (produzierende Zelle ist Effektorzelle) wirken (Skinnider 2002). Im cHL werden durch diese Proteine CD4+ T-Zellen und andere inflammatorische Zellen angelockt, die wiederum die HRS-Zellen in ihrer Proliferation positiv beeinflussen (Poppema und van den Berg 2000; Re et al. 2005; Küppers 2009). Die HRS-Zellen produzieren u.a das Chemokin CCL5/RANTES, welches CD4+ T-Zellen, Makrophagen und Eosinophile anlockt, die den CCR5-Rezeptor tragen (Aldinucci et al. 2008; Goodenow et al. 2003; Buri et al. 2001a). Die Tumorzellen locken nicht nur CCR5-tragende Zellen an, sie besitzen selbst den CCR5-Rezeptor auf ihrer Zellmembran und werden so von verschiedenen CCR5-Liganden in ihrem klonalen Wachstum unterstützt (Aldinucci et al. 2008).

Da beim immundefizienten HIV-Patienten nicht ausreichend CD4+ T-Zellen vorhanden sind, die sich normalerweise hauptsächlich als Rosetten um die HRS-Zellen anlagern, müssten andere Zellen diese Wachstumsfunktion übernehmen, die vermutlich durch den gleichen Mechanismus, wie oben beschrieben, von den HRS-Zellen „angelockt“ werden.

Makrophagen sind ebenso wie CD4+ T-Zellen zur Rosettenbildung um HRS-Zellen fähig

Durch die Charakterisierung des Begleitinfiltrats von HIV-assoziierten und Nicht-HIV-assoziierten cHL durch immunhistochemische Färbungen konnte in dieser Arbeit herausgefunden werden, dass CD163+ Makrophagen den Platz der CD4+ T-Zellen im HIV-cHL einzunehmen scheinen. Diese zeigten mikroskopisch in 14 von 24 HIV-cHL-Fällen eine Rosettenbildung um die HRS-Zellen.

Um dieses Ergebnis zu bekräftigen, wurden Kokultur-Versuche durchgeführt. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von CD4+ T-Zellen CD14+ Monozyten genauso gut fähig sind, Cluster um HRS-Zellen zu bilden. Diese Clusterbildung war auch in den CD4/CD14-Kokultur-Gemischen nachweisbar. Es wurden Ausstriche der Kokulturen angefertigt, die eine Rosettenbildung bestätigten. In den Ausstrichen der CD4/CD14-Kokultur-Gemischen zeigte sich eine heterogene Anlagerung beider Zelltypen um die HRS-Zellen.

Es kann folglich vermutet werden, dass Makrophagen genauso zur Rosettenbildung um

HRS-Zellen fähig sind und die Qualität der Rosettenbildung gleichwertig zu der der CD4+ T-Zellen ist. Beim gemeinsamen Auftreten von Makrophagen und CD4+ T-Zellen verhindern Makrophagen jedoch nicht die CD4+ T-Zell-Adhäsion um die Tumorzelle, sondern lagern sich gleich gut und in gleichem Verhältnis um diese an.

Mit diesem Ergebnis konnten wir Flavell *et al.* bestätigen, der zeigte, dass Monozyten in cHL-Zelllinien gleich gut zur Rosettenbildung befähigt sind wie CD4+ T-Zellen (Flavell und Wright 1989).

Makrophagen übernehmen die Rolle von CD4+ T-Zellen im HIV-cHL

Makrophagen stellen für das HIV ein lebenslanges Virusreservoir dar (Goodnow *et al.* 2003). Das Virus persistiert in den Makrophagen trotz cART (Crowe *et al.* 2003). Sie sind resistenter gegenüber dem zytopathischen Effekt des Virus und können sich dem Immunsystem der infizierten Person besser entziehen (Carter und Ehrlich 2008). Makrophagen unterstützen die HIV-Infektion der CD4+ T-Zellen (Swingler *et al.* 2003) und helfen bei der Zerstörung von CD4+ T-Zellen (Badley *et al.* 1997).

Da CD4+ T-Zellen in großer Anzahl durch das HIV zerstört werden, können die virusresistenten Makrophagen ihre Rolle und ihren Platz im Tumorgewebe übernehmen. Nicht nur Lymphozyten wie die CD4+ T-Zellen tragen die Oberflächenantigene CD4 und CCR5, auch Makrophagen exprimieren beide Proteine (Buri *et al.* 2001b; Skinnider 2002; Maggio *et al.* 2002). Der CCR5-Rezeptor dient nicht nur als Korezeptor für HIV (Deng *et al.* 1996), sondern auch als Ligand für CCL5/RANTES (Buri *et al.* 2001a). In Abwesenheit von CD4+ T-Zellen in immundefizienten HIV-Patienten werden statt den CD4+ Zellen höchstwahrscheinlich Makrophagen durch das Chemokin CCL5/RANTES zum betroffenen Lymphknoten rekrutiert, welches von HRS-Zellen ausgeschüttet wird (Skinnider 2002; Ma *et al.* 2008; Maggio *et al.* 2002).

Klinische/Therapeutische Signifikanz

Zytokin- bzw. Chemokinantagonisten finden mittlerweile nicht nur in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen (Blandizzi *et al.* 2014), sondern auch in der Krebsforschung, große Beachtung, da bekannt ist, dass derartige Zytokine, z. B. TNF α und CCL5, chronische Entzündungen fördern und Tumorprogression erleichtern (Yan *et al.* 2006; Aldinucci und Colombatti 2014). Das Chemokin CCL5 könnte daher auch in Zukunft ein mögliches therapeutisches Ziel in der Behandlung von cHL darstellen, wobei

diese Möglichkeit in weiteren Studien erforscht werden müsste (Aldinucci et al. 2008; Dotti und Savoldo 2010; Aldinucci und Colombatti 2014).

4.1.3 Immunstatus und Zusammenhang mit Prognose bei cHL-Patienten

Unabhängig davon, ob ein HIV-Patient eine cART erhalten hatte, wurde bei HIV-Patienten festgestellt, dass die CD4⁺ T-Zellzahl im peripheren Blut ein Jahr vor der Diagnosestellung cHL deutlich fällt (Bohlius et al. 2011; Guiguet et al. 2009). Dies konnte nicht mit einer höheren HIV-1 Replikationsrate erklärt werden. Bei HIV-Patienten, die erfolgreich mit einer cART behandelt werden, könnte dieser Abfall der CD4⁺ T-Zellen im Blut auf eine Erkrankung durch ein cHL hinweisen (Bohlius et al. 2011).

Auch bei Nicht-HIV-cHL-Patienten wird eine Lymphozytopenie gelegentlich diagnostiziert. In einer Studie von Ayoub *et al.* konnte eine inverse Korrelation von Ann Arbor Stadium und Lymphozytenwerten (sowohl für CD4⁺ T-Zellen als auch für andere Lymphozyten-Subgruppen) im peripheren Blut festgestellt werden (Ayoub et al. 1999). Eine niedrige Lymphozytenzahl bei der Diagnosestellung eines fortgeschrittenen cHL wurde als ungünstiger prognostischer Faktor festgestellt (Hasenclever und Diehl 1998). Ebenso stellte ein niedriges Lymphozyten/Monozyten-Verhältnis im peripheren Blut einen unabhängigen prognostischen Faktor für den klinischen Verlauf und progressionsfreies Überleben dar und konnte auf einen schlechteren klinischen Verlauf sowohl bei cHL- als auch bei NLPHL-Patienten hinweisen (Porrata et al. 2012a; Porrata et al. 2012b). Der Mechanismus, warum es zu dieser Lymphozytopenie kommt, ist noch nicht vollständig geklärt. Mögliche Ursachen könnten sein, dass das Immunsystem durch Zytokine unterdrückt wird und/oder die Lymphozyten in das Tumorgewebe rekrutiert werden (Bräuninger et al. 2006).

Auch bei Patienten im septischen Schock bedeutet eine Veränderung der CD4⁺ Lymphozytenzahl (geringere CD4⁺ T-Zellzahl und reduziertes CD4/CD8-Verhältnis, CD8⁺ T-Zellzahl hingegen nicht vermindert) eine Schwächung des Immunsystems und ist prognosebestimmend (Chen et al. 2011).

In dieser Studie konnte bei den HIV-cHL-Patienten, unabhängig davon, ob sie eine cART erhalten hatten oder nicht, kein Unterschied im Begleitinfiltat festgestellt werden. Auch die Höhe der Viruslast im Blut machte keinen signifikanten Unterschied im CD4⁺ T-Zell-

und CD163+ Makrophagengehalt im Tumorgewebe. Jedoch zeigten cHL-HIV-Patienten mit niedrigen CD4-Blutwerten bei der cHL-Diagnose auch einen signifikant niedrigeren CD4+ T-Zellgehalt und einen signifikant höheren CD163+ Makrophagengehalt im Tumorgewebe.

Der Immunstatus eines Patienten ist nachweisbar prognosebestimmend für den Verlauf einer Erkrankung (Ayoub et al. 1999; Hasenclever und Diehl 1998; Porrata et al. 2012a; Porrata et al. 2012b; Chen et al. 2011). In welchem Ausmaß der Immunstatus, hier quantifiziert durch den CD4+ T-Zellgehalt im Blut, eines Patienten mit cHL, sei er immunkomprimiert durch HIV oder durch andere Ursachen, das Begleitinfiltrat im Tumorgewebe bestimmt und dadurch ein prognosebestimmenden Effekt erzielt wird, müsste in weiteren Studien untersucht werden.

4.1.4 EBV: Assoziation mit Makrophagenmigration ins Tumorgewebe und mit klinischem Verlauf?

Im ersten Teil der Arbeit waren 100% der HIV-assoziierten cHL-Fälle EBV-positiv, wie es auch in anderen Studien der Fall ist (Audouin et al. 1992; Herndier et al. 1993; Guidoboni et al. 2005). Trotz einer durchschnittlichen EBV-Positivität von 38% im HIV-negativen cHL (Herbst et al. 1991) wurde in unserer Studie die HIV-negative Kontrollgruppe aus nur EBV-positiven Fällen zusammengestellt, um den Einfluss des EBV auf das Begleitinfiltrat zu vernachlässigen.

Im zweiten Teil der Arbeit waren alle Fälle EBV-negativ, da sowohl das NLPHL als auch das THRLBCL nahezu immer EBV-negativ sind (Rudiger et al. 1998; Anagnostopoulos et al. 2000; Abramson 2006; Lim et al. 2002; Huppmann et al. 2014).

Trotz unterschiedlicher Ergebnisse in Bezug auf Makrophagenzahl und klinischem Verlauf waren sich Kamper *et al.* und Azambuja *et al.* in dem Punkt einig, dass es eine Korrelation zwischen EBV-Infektion und einer vermehrtem Makrophagenzahl im Tumorgewebe gibt (Azambuja et al. 2012; Kamper et al. 2011).

Die Untersuchung einer Korrelation zwischen EBV+ Trägerstatus und Makrophagenzahl im Gewebe war zwar nicht der Fokus dieser Arbeit, jedoch konnte im Gegensatz zu Kamper *et al.* und Azambuja *et al.* kein Zusammenhang zwischen Makrophagengehalt im Tumorgewebe und EBV-Status bestätigt werden. Allerdings gilt einschränkend hinzuzufügen, dass in unserer Studie auch andere Entitäten wie NLPHL und THRLBCL

und den genannten Studien eben nur cHL untersucht wurden. Die Ursache liegt sehr wahrscheinlich in der Rekrutierung der Monozyten/Makrophagen durch die Tumorzellen ins Tumorgewebe mithilfe von Zytokinen/Chemokinen. Eine andere Studie konnte eine vermehrte CCL5- und CCL3-Expression in EBV-positiven-cHL nachweisen (Maggio et al. 2002). Hier wäre interessant, ob diese hohe CCL5/CCL3-Expression im EBV-positiven cHL auch mit einer hohen Makrophagenzahl im Gewebe korreliert, was Maggio *et al.* jedoch nicht überprüft haben.

In Anbetracht der Studienlagen ist eine EBV-Infektion tumorwachstumsfördernd (Rastelli et al. 2008; Bräuninger et al. 2006). Inwiefern eine EBV-Infektion auch den klinischen Verlauf bei cHL-Patienten beeinflusst, ist jedoch ebenso uneinheitlich (Lee et al. 2014; Keegan, Theresa H M et al. 2005; Kwon et al. 2006; Herling et al. 2006) wie die Rolle von Makrophagen und klinischem Verlauf (Kamper et al. 2011; Steidl et al. 2010; Tzankov et al. 2010; Azambuja et al. 2012; Harris et al. 2012). In dieser Studie konnte diese Frage nicht beantwortet werden, da eine höhere Makrophagenzahl bei Patienten entdeckt wurde, deren klinischer Verlauf gravierend durch HIV beeinflusst wurde und deren Behandlungsprotokolle uneinheitlich waren. Zudem waren klinische Daten unvollständig und es fehlten Langzeitdaten der Patienten.

4.2 Diskussion der Ergebnisse der NPLHL- und THRLBCL-Fälle

In einer Genexpressionsstudie wurde herausgefunden, dass das Begleitinfiltrat von THRLBCL und NPLHL große Unterschiede zeigt (van Loo et al. 2010). Durch diese Unterschiede werden verschiedene Immunreaktionen in Makrophagen, T-Zellen und dendritischen Zellen hervorgerufen, welche beim THRLBCL eine Immuntoleranz vermitteln, d. h. eine Immunreaktion gegen die Tumorzellen wird verhindert. Diese Immuntoleranz soll erklären, warum das THRLBCL gegenüber dem NPLHL eine weitaus aggressivere Klinik aufweist (van Loo et al. 2010). Jedoch gibt es auch beträchtliche Überschneidungen bei klinischen und pathologischen Merkmalen zwischen THRLBCL und NPLHL und dessen Subtypen (Rüdiger et al. 2002; Fan et al. 2003). Diese Überschneidungen morphologischer und immunphänotypischer Merkmale bereiten den Pathologen teilweise große Schwierigkeiten bei der Differentialdiagnose. Zudem ist immer noch nicht geklärt, ob das THRLBCL mehr als eine Krankheitsentität darstellt (Pittaluga und Jaffe 2010). Daher sollte in dieser Studie mithilfe immunhistochemischen

Analysen eine Charakterisierung des Begleitinfiltrats von NLPHL und THRLBCL vorgenommen werden.

4.2.1 Zusammensetzung des Begleitinfiltrats

Größere Übereinstimmung des Begleitinfiltrats von THRLBCL-like NLPHL und THRLBCL im Vergleich zum Begleitinfiltrat von NLPHL Typ A und NLPHL Typ C

Es konnte gezeigt werden, dass es deutliche Unterschiede zwischen dem Begleitinfiltrat von den typischen NLPHL Typen A und C und dem THRLBCL gibt. Diese Unterschiede zeigten sich sowohl im CD4+ T-Zell- und CD163+ Makrophagengehalt als auch in Bezug auf T_{FH}-Rosettenbildung um die Tumorzellen.

Es konnte kein Unterschied im CD4+ T-Zellgehalt, CD163+ Makrophagengehalt und in Bezug auf T_{FH}-Rosettenbildung um die Tumorzellen zwischen THRLBCL-like NLPHL und THRLBCL nachgewiesen werden.

Höhere Anzahl an Makrophagen und niedrigere Anzahl an T-Zellen im Tumorgewebe von THRLBCL-like NLPHL und THRLBCL

Auch im zweiten Teil dieser Arbeit konnte ein signifikant höherer Anteil an Makrophagen im Tumorgewebe von THRLBCL-like NLPHL- und THRLBCL-Fällen im Vergleich zu den „klassischen“ knotigen NLPHL Typen A und C festgestellt werden. Auch in der Anzahl der CD4+ T-Zellen war ein Unterschied zwischen den Entitäten zu sehen. Hier war mithilfe der Immunfärbung bei den THRLBCL-like NLPHL und den THRLBCL-Fällen ein niedriger CD4+ T-Zellgehalt im Vergleich zu den typischen NLPHL Typen A und C nachgewiesen worden.

Rosettenbildung im THRLBCL und THRLBCL-like NLPHL

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass sich die T_{FH}-Zellgehalte im Tumorgewebe von THRLBCL und THRLBCL-like NLPHL ähneln und sich von den T_{FH}-Zellgehalten in den NLPHL Typen A und C unterscheiden. Mit den T_{FH}-Markern PD1, CXCL13 und ICOS konnten keine T-Zell-Rosetten im THRLBCL und THRLBCL-like NLPHL nachgewiesen werden, wohingegen in den typisch knotigen NLPHL Typen A und C T-Zell-Rosetten dargestellt werden konnten. Eine geringere Anzahl an um die Tumorzellen rosettierenden T-Zellen im diffusen NLPHL wurde schon in den Studien von Nam-Cha

et al. und Churchill *et al.* beschrieben. In beiden Studien wurde die T_{FH}-Marker PD1 und CD57 benutzt und zeigten Übereinstimmung darin, dass die PD1-Färbung der CD57-Färbung im Nachweis von um Tumor rosettierende T-Zell-Rosetten im NLPHL überlegen ist. Nam-Cha *et al.* benutzte zusätzlich zur PD1- und CD57-Färbung die CXCL13-Färbung. Auch dieser Marker zeigte in der Studie, dass er signifikant weniger Fälle mit T-Zell-Rosetten entdeckt als der PD1-Marker. Churchill *et al.* konnte im Gegensatz zu Nam-Cha *et al.* in wenigen Fällen auch im THRLBCL PD1+ T-Zell-Rosetten nachweisen (Nam-Cha et al. 2008; Churchill, Hywyn R O et al. 2010).

Auch Chetaille *et al.* konnte im THRLBCL reaktive T-Zellen mit der PD1-Färbung nachweisen. Mit der CXCL13-Färbung ließen sich deutlich weniger T-Zellen färben. In der letzten genannten Studie wurde jedoch nicht auf die Rosettenbildung der T-Zellen um die Tumorzellen geachtet (Chetaille et al. 2009).

T_{FH}-Zellen zeigten unterschiedliche Expressionen ihrer Marker PD1 und CXCL13 (Chetaille et al. 2009; Churchill, Hywyn R O et al. 2010; Nam-Cha et al. 2008). Dieses Ergebnisse konnten durch diese Arbeit bestätigt werden.

In der hier vorliegenden Studie konnten zwar keine PD1+ T-Zell-Rosetten im THRLBCL nachgewiesen werden, jedoch zeigte der aktivierte T-Zell-Marker MUM1 in wenigen THRLBCL-Fällen T-Zell-Rosetten. In gleich vielen Fällen konnte mit MUM1 auch im THRLBCL-like NLPHL T-Zell-Rosetten nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis ist insofern interessant, da mehrere Studien Rosettenbildungen um Tumorzellen im THRLBCL nicht darstellen konnten (Fraga et al. 2002; Atayar et al. 2007; Nam-Cha et al. 2008; van Loo et al. 2010) und T-Zell-Rosetten bis jetzt kein Merkmal bei der Charakterisierung des THRLBCL darstellen. Mit dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass T-Zell-Rosetten im THRLBCL vorkommen und nicht zur Differenzierung von NLPHL und THRLBCL geeignet sind. Jedoch ist zu sagen, dass z. T. andere T-Zell-Marker für den Nachweis von Rosettenbildungen verwendet wurden. Die variable Expression der Marker auf den Oberflächen von T-Zellen könnte ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein.

4.2.2 THRLBCL-like NLPHL und THRLBCL: Eine Entität?

Schon länger wird über die Beziehung zwischen NLPHL und THRLBCL geforscht. Da erst seit 2008 das THRLBCL als eigenständige Entität klassifiziert wird und davor als

Variante des DLBCL gesehen wurde, sind frühere Studien nur auf das DLBCL bezogen. Ein Übergang vom NLPHL in ein DLBCL wurde bereits früh entdeckt (Miettinen et al. 1983; Hansmann et al. 1989). Weitere Studien konnten bestätigen, dass beide Entitäten sowohl simultan als auch metachron vorkommen (Huang et al. 2004; Jackson et al. 2010; Biasoli et al. 2010). Jedoch wurde schon lange Zeit vor der neuen WHO-Klassifikation 2008 darauf hingewiesen, dass man das THRLBCL vom DLBCL unterscheiden müsse und es möglicherweise eine eigene Entität darstellt (Achten et al. 2002). Es wurden Fälle von Patienten geschildert, bei denen sich im Laufe ihrer Erkrankung beide Entitäten im befallenen Lymphknoten nachweisen ließen, sowohl zum selben Zeitpunkt als auch in aufeinanderfolgenden Biopsien (Rüdiger et al. 2002). Es konnten sowohl Transformationen vom NLPHL in ein DLBCL als auch vom NLPHL in ein THRLBCL nachgewiesen werden (Al-Mansour et al. 2010).

Anhand genomischer Vergleiche konnten sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede nachgewiesen werden. In einer früheren Studie wurde mittels klassischer komparativer genomischer Hybridisierung im NLPHL mehr Chromosomenaberrationen als im THRLBCL nachgewiesen (Franke et al. 2001; Franke et al. 2002). Das Ergebnis könnte gegen einen direkten Übergang von NLPHL in THRLBCL sprechen. In einer jüngeren Forschungsarbeit zeigten beide Entitäten viele gleiche genetische Veränderungen mit einer etwas größeren Anzahl im THRLBCL im Vergleich zum NLPHL (Hartmann et al. 2015). Dies mag an der neueren und genaueren Methode mittels Microarray-basierter komparativer genomischer Hybridisierung liegen.

Aufgrund der Transformationen und genetischer Ähnlichkeiten scheint es sehr wahrscheinlich, dass beide Entitäten zumindest einen gemeinsamen Ursprung in einer Vorläuferzelle haben (Rüdiger et al. 2002; Al-Mansour et al. 2010; Hartmann et al. 2015; Franke et al. 2001; Franke et al. 2002).

Da die Studie von Fan *et al.* mit einer Charakterisierung von 6 unterschiedlichen morphologischen NLPHL-Typen erst im Jahre 2003 erschien, wurde in der Studie von Franke *et al.* keine Subtypisierung der NLPHL-Fälle durchgeführt und es ist möglich, dass hier nur typische noduläre Formen eingeschlossen wurden. Dies mag zu größeren Unterschieden im Vergleich beider Entitäten geführt haben (Franke et al. 2001; Franke et al. 2002; Fan et al. 2003). Boudova *et al.* studierte das Begleitinfiltrat von NLPHL und THRLBCL zur gleichen Zeit wie Fan *et al.*. Auch hier bezog man sich nicht auf 6 verschiedene Varianten des NLPHL. Die Arbeitsgruppe um Boudova *et al.* vermutete in

den Fällen, die nicht eindeutig dem NLPHL oder THRLBCL zugeordnet werden konnten, ein sekundäres THRLBCL, welches sich aus einem NLPHL entwickelt hatte. Zudem präsentierten sich die Fälle, mit der ihr vorgeschlagenen Bezeichnung „NLPHL mit T-Zell-reichen Knoten“, zu 60% im fortgeschrittenem Stadium III/IV und ähnelten somit auch klinisch dem THRLBCL deutlich (Boudova et al. 2003). Bei Atayar *et al.* wurden die dem NLPHL-ähnlichen THRLBCL-Fälle „paragranuloma-ähnlich“ genannt und es wurde keine Einteilung nach Fan *et al.* vorgenommen (Atayar et al. 2007).

Somit ist es schwierig unsere Ergebnisse mit denen der anderen Studien zu vergleichen, da das THRLBCL erst seit relativ kurzer Zeit als eigenständige Entität klassifiziert wird und in anderen Studien die NLPHL-Subtypen, insbesondere das THRLBCL-like NLPHL, eventuell anders betitelt und eingeteilt wurden.

Dennoch zeigt die Analyse des Begleitinfiltrats, dass dieses im THRLBCL und THRLBCL-like NLPHL sehr ähnlich ist. Da weiterhin in der Genexpression der mikrodisezierten Tumorzellen nur sehr wenige unterschiedlich exprimierte Gene neben großen Gemeinsamkeiten gefunden werden konnten (Brune et al. 2008, Hartmann et al. 2013), ist zu diskutieren, ob es sich hierbei um ein und dieselbe Krankheit handelt und das THRLBCL möglicherweise eine aggressivere Form des NLPHL darstellt.

4.3 Ähnlichkeiten des Begleitinfiltrats im THRLBCL-like NLPHL /THRLBCL und HIV-assoziierten cHL

Ebenso wie HIV-Patienten mit cHL präsentieren sich Patienten mit THRLBCL-like NLPHL und THRLBCL im fortgeschrittenen Stadium (Achten et al. 2002).

Wenn man die Ergebnisse im 2. Teil der Arbeit mit den Ergebnissen der HIV-cHL-Fälle im 1. Teil der Arbeit vergleicht, zeigen sich deutliche Parallelen im Begleitinfiltrat zwischen HIV-assoziierten cHL und THRLBCL-like NLPHL bzw. THRLBCL. Auch wenn der Makrophagengehalt in THRLBCL-like NLPHL und THRLBCL dem im HIV-cHL ähnlich war, war der CD4+ T-Zellgehalt in keiner Gruppe der NLPHL oder im THRLBCL so stark erniedrigt wie im HIV-cHL.

Es liegt nahe, dass auch im THRLBCL-like NLPHL und im THRLBCL Monozyten/Makrophagen in Abwesenheit von CD4+ T-Zellen im Blut durch CCL5/RANTES zum Lymphknoten mobilisiert werden. Es kann daher vermutet werden, dass auch beim NLPHL und THRLBCL der Immunstatus (Anzahl der CD4+ T-Zellen

bzw. Monozyten im Blut) oder aber die Funktion der CD4⁺ T Zellen bei Diagnosestellung der Patienten ausschlaggebend dafür ist, welche Tumorentität, NLPHL oder THRLBCL-like NLPHL/THRLBCL, sich entwickelt. Hierfür sprechen auch die Ergebnisse von Porrata *et al.* (Porrata et al. 2012a; Porrata et al. 2012b), die nachweisen konnten, dass ein erniedrigtes Verhältnis von Lymphozyten/Monozyten im peripheren Blut sowohl im cHL als auch im NLPHL mit einem schlechteren Gesamt- und progressionsfreien Überleben einhergeht.

5 Zusammenfassung

Da HRS-Zellen im cHL nur eine Minderheit und CD4⁺ T-Zellen die Mehrheit im Begleitinfiltat ausmachen, wurde innerhalb der vorliegenden Dissertation das Begleitinfiltat und der Tumorzellgehalt von 24 HIV-assozierten cHL-Fällen mit 15 HIV-negativen cHL-Fällen immunhistochemisch verglichen. Das reaktive Begleitinfiltat im HIV-assozierten cHL zeigte eine deutlich geringere Anzahl an CD4⁺ T-Zellen und einen höheren Gehalt an CD163⁺ Makrophagen als das HIV-negative cHL. Es konnte kein Unterschied in der Anzahl der CD30⁺ HRS-Zellen und S100⁺ dendritischen Zellen zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. Mit Kokultur-Versuchen im Labor und darauf folgenden Zellausstrichen dieser Kokulturen konnte bestätigt werden, dass sich CD14⁺ Monozyten ebenso gut wie CD4⁺ T-Zellen als Rosetten um HRS-Zellen anordnen können. Im immunkomprimierten HIV-Patienten ersetzen die langlebigen CD163⁺ Makrophagen die CD4⁺ T-Zellen. Die Makrophagen werden vermutlich ebenso wie CD4⁺ T-Zellen mittels Zytokine/Chemokine (z. B. CCL5) zum Tumorgewebe rekrutiert, bilden Rosetten um die Tumorzellen und unterstützen diese in ihrer Proliferation.

Aufgrund der besonderen Zusammensetzung des Begleitinfiltrats sollte das HIV-assozierte cHL von Pathologen als eigenständiger Subtyp des cHL betrachtet werden.

Des Weiteren wurde das Begleitinfiltat der typisch knotigen NLPHL Typen A und C mit dem des diffusen NLPHL Typen E (THRLBCL-like NLPHL) und dem THRLBCL immunhistochemisch verglichen. Aufgrund histologischer und klinischer Ähnlichkeiten zwischen dem diffusen NLPHL und dem THRLBCL fällt eine Differenzierung dieser Entitäten schwer. Es konnte festgestellt werden, dass das Begleitinfiltat im THRLBCL-like NLPHL dem Begleitinfiltat im THRLBCL mehr ähnelt als dem typischen NLPHL und zwar in Bezug auf Makrophagengehalt und Anzahl der folliculären T_{FH}-Zellen. Es konnten Rosetten im Begleitinfiltat von THRLBCL nachgewiesen werden, obwohl Rosettenformationen um Tumorzellen im THRLBCL in der Literatur kein charakteristisches Merkmal darstellen. Es ist naheliegend, dass das THRLBCL-like NLPHL und das THRLBCL ein und dieselbe Krankheit ist und möglicherweise eine aggressivere Variante des NLPHL darstellt.

Im Anbetracht aller Ergebnisse kommt dem Immunstatus eines Patienten eine ausschlaggebende Rolle auf das Begleitinfiltat im Tumorgewebe zu und dieser beeinflusst so auch den klinischen Verlauf der Lymphomkrankung.

6 Summary

As Hodgkin- and Reed–Sternberg cells represent in contrast to CD4⁺ T-cells only a minority in classical Hodgkin lymphoma (cHL) infiltrate, the aim of the present study was to characterize the microenvironment of HIV-related cHL and compare it to the cHL cases of immunocompetent individuals. The microenvironment of HIV-related cHL displayed a significantly decreased number of CD4⁺ T-cells and a significantly increased number of CD163⁺ macrophages in comparison to HIV negative cHL. There was neither a significant difference in the number of CD30⁺ Hodgkin-Reed-Sternberg cells nor in the number of S100⁺ dendritic cells between the two subgroups of HIV-positive and –negative cHL. In coculture experiments we could show that CD4⁺ T-cells and CD163⁺ macrophages built clusters around Hodgkin- and Reed-Sternberg cells. In smears of those clusters we confirmed that both CD4⁺ T-cells and monocytes have equal functions in rosetting around Hodgkin-Reed-Sternberg cells. CD163⁺ rosetting macrophages can therefore replace CD4⁺ T-cells in HIV-related cHL and support tumor cell proliferation. Attraction of rosetting bystander cells is most probably due to chemokines/cytokines released by Hodgkin-Reed-Sternberg cells.

HIV-related Hodgkin lymphoma is characterized by distinctive morphologic features which should be recognized by pathologists.

We also characterized the microenvironment of typical nodular NLPHL pattern A and C and compared it to the diffuse NLPHL pattern E and THRLBCL. A distinction between THRLBCL and NLPHL is difficult because of close resemblance in clinical behaviour and histologic features. We figured out that the microenvironment of THRLBCL-like NLPHL is more similar to the microenvironment of THRLBCL than to typical NLPHL. Numbers of macrophages and follicular T helper cells (T_{FH}) in the reactive bystander cells are comparable.

Our results suggest that THRLBCL-like NLPHL and THRLBCL represent a spectrum of one disease and both might be a more aggressive variant of NLPHL.

The results of the present work propose that the immune status of the patient essentially determines the composition of the microenvironment and the clinical course of the disease.

7 Literaturverzeichnis

Abramson, Jeremy S. (2006): T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma: biology, diagnosis, and management. In: *Oncologist* 11 (4), S. 384–392. DOI: 10.1634/theoncologist.11-4-384.

Achten, R.; Verhoef, G.; Vanuytsel, L.; Wolf-Peeters, C. de (2002): T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma: a distinct clinicopathologic entity. In: *J. Clin. Oncol.* 20 (5), S. 1269–1277.

Aisenberg, A. C.; Wilkes, B. M. (1982): Lymph node T cells in Hodgkin's disease: analysis of suspensions with monoclonal antibody and rosetting techniques. In: *Blood* 59 (3), S. 522–527.

Akiba, Hisaya; Takeda, Kazuyoshi; Kojima, Yuko; Usui, Yoshihiko; Harada, Norihiro; Yamazaki, Tomohide et al. (2005): The role of ICOS in the CXCR5+ follicular B helper T cell maintenance in vivo. In: *J Immunol* 175 (4), S. 2340–2348.

Aldinucci, Donatella; Colombatti, Alfonso (2014): The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression. In: *Mediators Inflamm* 2014, S. 292376. DOI: 10.1155/2014/292376.

Aldinucci, Donatella; Lorenzon, Debora; Cattaruzza, Lara; Pinto, Antonio; Gloghini, Annunziata; Carbone, Antonino; Colombatti, Alfonso (2008): Expression of CCR5 receptors on Reed-Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. In: *Int. J. Cancer* 122 (4), S. 769–776. DOI: 10.1002/ijc.23119.

Al-Mansour, Mubarak; Connors, Joseph M.; Gascoyne, Randy D.; Skinnider, Brian; Savage, Kerry J. (2010): Transformation to aggressive lymphoma in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma. In: *J Clin Oncol* 28 (5), S. 793–799. DOI: 10.1200/JCO.2009.24.9516.

Alvaro, Tomas; Lejeune, Marylene; Salvado, Ma Teresa; Bosch, Ramon; Garcia, Juan F.; Jaen, Joaquin et al. (2005): Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. In: *Clin Cancer Res* 11 (4), S. 1467–1473. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1869.

Anagnostopoulos, I.; Hansmann, M. L.; Franssila, K.; Harris, M.; Harris, N. L.; Jaffe, E. S. et al. (2000): 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. In: *Blood* 96 (5), S. 1889–1899.

Ansell, Stephen M. (2012): Hodgkin lymphoma: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management. In: *Am. J. Hematol.* 87 (12), S. 1096–1103. DOI: 10.1002/ajh.23348.

Appleby, P.; Beral, V.; Newton, R.; Reeves, G. (2000): Highly active antiretroviral therapy and incidence of cancer in human immunodeficiency virus-infected adults. In: *Journal of the National Cancer Institute* 92 (22), S. 1823–1830.

Atayar, Cigdem; Poppema, Sibbrand; Visser, Lydia; van den Berg, Anke (2006): Cytokine gene expression profile distinguishes CD4+/CD57+ T cells of the nodular lymphocyte

predominance type of Hodgkin's lymphoma from their tonsillar counterparts. In: *J Pathol* 208 (3), S. 423–430. DOI: 10.1002/path.1894.

Atayar, Cigdem; van den Berg, Anke; Blokzijl, Tjasso; Boot, Marcel; Gascoyne, Randy D.; Visser, Lydia; Poppema, Sibrand (2007): Hodgkin's lymphoma associated T-cells exhibit a transcription factor profile consistent with distinct lymphoid compartments. In: *J Clin Pathol* 60 (10), S. 1092–1097. DOI: 10.1136/jcp.2006.044222.

Audouin, J.; Diebold, J.; Pallesen, G. (1992): Frequent expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 in tumour cells of Hodgkin's disease in HIV-positive patients. In: *J Pathol* 167 (4), S. 381–384. DOI: 10.1002/path.1711670406.

Ayoub, J. P.; Palmer, J. L.; Huh, Y.; Cabanillas, F.; Younes, A. (1999): Therapeutic and prognostic implications of peripheral blood lymphopenia in patients with Hodgkin's disease. In: *Leuk. Lymphoma* 34 (5-6), S. 519–527. DOI: 10.3109/10428199909058479.

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: *Ann. Oncol.* 23 (3), S. 736–742. DOI: 10.1093/annonc/mdr157.

Badley, A. D.; Dockrell, D.; Simpson, M.; Schut, R.; Lynch, D. H.; Leibson, P.; Paya, C. V. (1997): Macrophage-dependent apoptosis of CD4+ T lymphocytes from HIV-infected individuals is mediated by FasL and tumor necrosis factor. In: *J Exp Med* 185 (1), S. 55–64.

Banda, N. K.; Bernier, J.; Kurahara, D. K.; Kurrle, R.; Haigwood, N.; Sekaly, R. P.; Finkel, T. H. (1992): Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. In: *The Journal of experimental medicine* 176 (4), S. 1099–1106.

Benito, Jose Miguel; Lopez, Mariola; Soriano, Vincent (2004): The role of CD8+ T-cell response in HIV infection. In: *AIDS Rev* 6 (2), S. 79–88.

Biasoli, Irene; Stamatoullas, Aspasia; Meignin, Véronique; Delmer, Alain; Reman, Oumedaly; Morschhauser, Franck et al. (2010): Nodular, lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma: a long-term study and analysis of transformation to diffuse large B-cell lymphoma in a cohort of 164 patients from the Adult Lymphoma Study Group. In: *Cancer* 116 (3), S. 631–639. DOI: 10.1002/cncr.24819.

Biggar, Robert J.; Jaffe, Elaine S.; Goedert, James J.; Chaturvedi, Anil; Pfeiffer, Ruth; Engels, Eric A. (2006): Hodgkin lymphoma and immunodeficiency in persons with HIV/AIDS. In: *Blood* 108 (12), S. 3786–3791. DOI: 10.1182/blood-2006-05-024109.

Blandizzi, C.; Gionchetti, P.; Armuzzi, A.; Caporali, R.; Chimenti, S.; Cimaz, R. et al. (2014): The role of tumour necrosis factor in the pathogenesis of immune-mediated diseases. In: *Int J Immunopathol Pharmacol* 27 (1 Suppl), S. 1–10.

Bohlius, Julia; Schmidlin, Kurt; Boué, François; Fätkenheuer, Gerd; May, Margaret; Caro-Murillo, Ana Maria et al. (2011): HIV-1-related Hodgkin lymphoma in the era of combination antiretroviral therapy: incidence and evolution of CD4⁺ T-cell lymphocytes. In: *Blood* 117 (23), S. 6100–6108. DOI: 10.1182/blood-2010-08-301531.

Bosch Príncipe, Ramón; Lejeune, Marylène; Salvadó Usach, Maria Teresa; Jaén Martínez, Joaquín; Pons Ferré, Lluís E.; Alvaro Naranjo, Tomás (2005): Decreased number of granzyme B+ activated CD8+ cytotoxic T lymphocytes in the inflammatory background

of HIV-associated Hodgkin's lymphoma. In: *Ann. Hematol.* 84 (10), S. 661–666. DOI: 10.1007/s00277-005-1051-3.

Boudova, Ludmila; Torlakovic, Emina; Delabie, Jan; Reimer, Peter; Pfistner, Beate; Wiedenmann, Sabine et al. (2003): 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. In: *Blood* 102 (10), S. 3753–3758. DOI: 10.1182/blood-2003-02-0626.

Braeuninger, A.; Küppers, R.; Strickler, J. G.; Wacker, H. H.; Rajewsky, K.; Hansmann, M. L. (1997): Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (17), S. 9337–9342.

Bräuninger, Andreas; Schmitz, Roland; Bechtel, Dörte; Renné, Christoph; Hansmann, Martin-Leo; Küppers, Ralf (2006): Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. In: *Int. J. Cancer* 118 (8), S. 1853–1861. DOI: 10.1002/ijc.21716.

Brune, Verena; Tiacci, Enrico; Pfeil, Ines; Döring, Claudia; Eckerle, Susan; van Noesel, Carel J M et al. (2008): Origin and pathogenesis of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma as revealed by global gene expression analysis. In: *The Journal of experimental medicine* 205 (10), S. 2251–2268. DOI: 10.1084/jem.20080809.

Buri, C.; Korner, M.; Scharli, P.; Cefai, D.; Ugucioni, M.; Mueller, C. et al. (2001a): CC chemokines and the receptors CCR3 and CCR5 are differentially expressed in the nonneoplastic leukocytic infiltrates of Hodgkin disease. In: *Blood* 97 (6), S. 1543–1548.

Buri, Caroline; Körner, Meike; Schärli, Patrik; Cefai, Daniel; Ugucioni, Mariagrazia; Mueller, Christoph et al. (2001b): CC chemokines and the receptors CCR3 and CCR5 are differentially expressed in the nonneoplastic leukocytic infiltrates of Hodgkin disease. In: *Blood* 97 (6), S. 1543–1548.

Camilleri-Broet, Sophie; Ferme, Christophe; Berger, Françoise; Lepage, Eric; Bain, Serge; Briere, Josette et al. (2004): TiA1 in advanced-stage classical Hodgkin's lymphoma: no prognostic impact for positive tumour cells or number of cytotoxic cells. In: *Virchows Arch* 445 (4), S. 344–346. DOI: 10.1007/s00428-004-1057-6.

Carbone, A.; Gloghini, A.; Gruss, H. J.; Pinto, A. (1995): CD40 ligand is constitutively expressed in a subset of T cell lymphomas and on the microenvironmental reactive T cells of follicular lymphomas and Hodgkin's disease. In: *Am. J. Pathol.* 147 (4), S. 912–922.

Carbone, A.; Gloghini, A.; Larocca, L. M.; Antinori, A.; Falini, B.; Tirelli, U. et al. (1999): Human immunodeficiency virus-associated Hodgkin's disease derives from post-germinal center B cells. In: *Blood* 93 (7), S. 2319–2326.

Carbone, Antonino; Gloghini, Annunziata; Aldinucci, Donatella; Gattei, Valter; Dalla-Favera, Riccardo; Gaidano, Gianluca (2002): Expression pattern of MUM1/IRF4 in the spectrum of pathology of Hodgkin's disease. In: *Br J Haematol* 117 (2), S. 366–372.

Carter, Carol A.; Ehrlich, Lorna S. (2008): Cell biology of HIV-1 infection of macrophages. In: *Annu. Rev. Microbiol.* 62, S. 425–443. DOI: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162758.

- Chen, Xiaofeng; Ye, Jilu; Ye, Jun (2011): Analysis of peripheral blood lymphocyte subsets and prognosis in patients with septic shock. In: *Microbiol. Immunol.* 55 (10), S. 736–742. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2011.00373.x.
- 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. DOI: 10.1182/blood-2008-07-168096.
- Chtanova, Tatyana; Tangye, Stuart G.; Newton, Rebecca; Frank, Nita; Hodge, Martin R.; Rolph, Michael S.; Mackay, Charles R. (2004): T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. In: *J Immunol* 173 (1), S. 68–78.
- Chun, T. W.; Carruth, L.; Finzi, D.; Shen, X.; DiGiuseppe, J. A.; Taylor, H. et al. (1997): Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. In: *Nature* 387 (6629), S. 183–188. DOI: 10.1038/387183a0.
- Chung, Amy W.; Navis, Marjon; Isitman, Gamze; Centre, Rob; Finlayson, Robert; Bloch, Mark et al. (2011): Activation of NK cells by ADCC responses during early HIV infection. In: *Viral immunology* 24 (2), S. 171–175. DOI: 10.1089/vim.2010.0108.
- Churchill, Hywyn R O; Roncador, Giovanna; Warnke, Roger A.; Natkunam, Yasodha (2010): Programmed death 1 expression in variant immunoarchitectural patterns of nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma: comparison with CD57 and lymphomas in the differential diagnosis. In: *Hum Pathol* 41 (12), S. 1726–1734. DOI: 10.1016/j.humpath.2010.05.010.
- Clifford, Gary M.; Polesel, Jerry; Rickenbach, Martin; Dal Maso, Luigino; Keiser, Olivia; Kofler, Andreas et al. (2005): Cancer risk in the Swiss HIV Cohort Study: associations with immunodeficiency, smoking, and highly active antiretroviral therapy. In: *J Natl Cancer Inst* 97 (6), S. 425–432. DOI: 10.1093/jnci/dji072.
- Clifford, Gary M.; Rickenbach, Martin; Lise, Mauro; Dal Maso, Luigino; Battegay, Manuel; Bohlius, Julia et al. (2009): Hodgkin lymphoma in the Swiss HIV Cohort Study. In: *Blood* 113 (23), S. 5737–5742. DOI: 10.1182/blood-2009-02-204172.
- Corthay, A. (2009): How do regulatory T cells work? In: *Scandinavian journal of immunology* 70 (4), S. 326–336. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x.
- Coussens, Lisa M.; Werb, Zena (2002): Inflammation and cancer. In: *Nature* 420 (6917), S. 860–867. DOI: 10.1038/nature01322.
- Crowe, Suzanne; Zhu, Tuofu; Muller, William A. (2003): The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection. In: *J Leukoc Biol* 74 (5), S. 635–641. DOI: 10.1189/jlb.0503204.
- Dagleish, A. G.; Beverley, P. C.; Clapham, P. R.; Crawford, D. H.; Greaves, M. F.; Weiss, R. A. (1984): The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. In: *Nature* 312 (5996), S. 763–767.
- Dave, Sandeep S.; Wright, George; Tan, Bruce; Rosenwald, Andreas; Gascoyne, Randy D.; Chan, Wing C. et al. (2004): Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. In: *N Engl J Med* 351 (21), S. 2159–2169. DOI: 10.1056/NEJMoa041869.

- Delabie, J.; Vandenberghe, E.; Kennes, C.; Verhoef, G.; Foschini, M. P.; Stul, M. et al. (1992): Histiocyte-rich B-cell lymphoma. A distinct clinicopathologic entity possibly related to lymphocyte predominant Hodgkin's disease, paragranuloma subtype. In: *Am. J. Surg. Pathol.*
- Deng, H.; Liu, R.; Ellmeier, W.; Choe, S.; Unutmaz, D.; Burkhart, M. et al. (1996): Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. In: *Nature* 381 (6584), S. 661–666. DOI: 10.1038/381661a0.
- Diehl, V.; Sextro, M.; Franklin, J.; Hansmann, M. L.; Harris, N.; Jaffe, E. et al. (1999): Clinical presentation, course, and prognostic factors in lymphocyte-predominant Hodgkin's disease and lymphocyte-rich classical Hodgkin's disease: report from the European Task Force on Lymphoma Project on Lymphocyte-Predominant Hodgkin's Disease. In: *J. Clin. Oncol.* 17 (3), S. 776–783.
- Dotti, Gianpietro; Savoldo, Barbara (2010): Response: To force the expression of CCR4 and/or of CCR5 chemokine receptor in T cells for immunotherapy of Hodgkin lymphoma: that is the question. In: *Blood* 115 (3), S. 748. DOI: 10.1182/blood-2009-11-248302.
- Duellman, Sarah J.; Thompson, Katie L.; Coon, Joshua J.; Burgess, Richard R. (2009): Phosphorylation sites of Epstein-Barr virus EBNA1 regulate its function. In: *J Gen Virol* 90 (Pt 9), S. 2251–2259. DOI: 10.1099/vir.0.012260-0.
- Eickernjäger, Maren (2010): Die Charakterisierung der Rolle B-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktoren und des ID2 in der Dedifferenzierung und Pathogenese der Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen im klassischen Hodgkin-Lymphom.
- Emmerich, F.; Meiser, M.; Hummel, M.; Demel, G.; Foss, H. D.; Jundt, F. et al. (1999): Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. In: *Blood* 94 (9), S. 3129–3134.
- Engels, Eric A.; Biggar, Robert J.; Hall, H. Irene; Cross, Helene; Crutchfield, Allison; Finch, Jack L. et al. (2008): Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States. In: *Int. J. Cancer* 123 (1), S. 187–194. DOI: 10.1002/ijc.23487.
- Fan, Zhen; Natkunam, Yasodha; Bair, Eric; Tibshirani, Robert; Warnke, Roger A. (2003): Characterization of variant patterns of nodular lymphocyte predominant hodgkin lymphoma with immunohistologic and clinical correlation. In: *Am. J. Surg. Pathol.* 27 (10), S. 1346–1356.
- Farinha, Pedro; Masoudi, Hamid; Skinnider, Brian F.; Shumansky, Karey; Spinelli, John J.; Gill, Karamjit et al. (2005): Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). In: *Blood* 106 (6), S. 2169–2174. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1565.
- Feng, Y.; Broder, C. C.; Kennedy, P. E.; Berger, E. A. (1996): HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. In: *Science* 272 (5263), S. 872–877.
- Flavell, D. J.; Wright, D. H. (1989): The Reed-Sternberg cell/lymphocyte rosette. I. Properties of rosettes formed between Hodgkin's cell lines and allogeneic lymphocytes. In: *Br. J. Cancer* 59 (2), S. 165–173.

- Fraga, M.; Sánchez-Verde, L.; Forteza, J.; García-Rivero, A.; Piris, M. A. (2002): T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma is a disseminated aggressive neoplasm: differential diagnosis from Hodgkin's lymphoma. In: *Histopathology* 41 (3), S. 216–229.
- Franke, S.; Wlodarska, I.; Maes, B.; Vandenberghe, P.; Delabie, J.; Hagemeyer, A.; Wolf-Peeters, C. de (2001): Lymphocyte predominance Hodgkin disease is characterized by recurrent genomic imbalances. In: *Blood* 97 (6), S. 1845–1853.
- Franke, Sabine; Wlodarska, Iwona; Maes, Brigitte; Vandenberghe, Peter; Achten, Ruth; Hagemeyer, Anne; Wolf-Peeters, Chris de (2002): Comparative genomic hybridization pattern distinguishes T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma from nodular lymphocyte predominance Hodgkin's lymphoma. In: *Am J Pathol* 161 (5), S. 1861–1867. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64462-8.
- Glaser, S. L.; Jarrett, R. F. (1996): The epidemiology of Hodgkin's disease. In: *Baillieres Clin Haematol* 9 (3), S. 401–416.
- Goodenow, Maureen M.; Rose, Stephanie L.; Tuttle, Daniel L.; Sleasman, John W. (2003): HIV-1 fitness and macrophages. In: *J Leukoc Biol* 74 (5), S. 657–666. DOI: 10.1189/jlb.0403186.
- Grossman, D. M.; Hanson, C. A.; Schnitzer, B. (1991): Simultaneous lymphocyte predominant Hodgkin's disease and large-cell lymphoma. In: *Am J Surg Pathol* 15 (7), S. 668–676.
- Guidoboni, Massimo; Ponzoni, Maurilio; Caggiari, Laura; Lettini, Antonia A.; Vago, Luca; Re, Valli de et al. (2005): Latent membrane protein 1 deletion mutants accumulate in reed-sternberg cells of human immunodeficiency virus-related Hodgkin's lymphoma. In: *J. Virol.* 79 (4), S. 2643–2649. DOI: 10.1128/JVI.79.4.2643-2649.2005.
- Guiguet, Marguerite; Boué, François; Cadranel, Jacques; Lang, Jean-Marie; Rosenthal, Eric; Costagliola, Dominique (2009): Effect of immunodeficiency, HIV viral load, and antiretroviral therapy on the risk of individual malignancies (FHDH-ANRS CO4): a prospective cohort study. In: *Lancet Oncol.* 10 (12), S. 1152–1159. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70282-7.
- Hansmann, M. L.; Fellbaum, C.; Hui, P. K.; Moubayed, P. (1990): Progressive transformation of germinal centers with and without association to Hodgkin's disease. In: *Am J Clin Pathol* 93 (2), S. 219–226.
- Hansmann, M. L.; Stein, H.; Dallenbach, F.; Fellbaum, C. (1991): Diffuse lymphocyte-predominant Hodgkin's disease (diffuse paraganuloma). A variant of the B-cell-derived nodular type. In: *Am. J. Pathol.* 138 (1), S. 29–36.
- Hansmann, M. L.; Stein, H.; Fellbaum, C.; Hui, P. K.; Parwaresch, M. R.; Lennert, K. (1989): Nodular paraganuloma can transform into high-grade malignant lymphoma of B type. In: *Hum. Pathol.* 20 (12), S. 1169–1175.
- Hanson, D. L.; Chu, S. Y.; Farizo, K. M.; Ward, J. W. (1995): Distribution of CD4+ T lymphocytes at diagnosis of acquired immunodeficiency syndrome-defining and other human immunodeficiency virus-related illnesses. The Adult and Adolescent Spectrum of HIV Disease Project Group. In: *Archives of internal medicine* 155 (14), S. 1537–1542.
- Harris, Jonathan A.; Jain, Salvia; Ren, Qinghu; Zarineh, Alirezah; Liu, Cynthia; Ibrahim, Sherif (2012): CD163 versus CD68 in tumor associated macrophages of classical hodgkin lymphoma. In: *Diagn Pathol* 7 (1), S. 12. DOI: 10.1186/1746-1596-7-12.

Hartmann, Sylvia; Doring, Claudia; Jakobus, Christina; Rengstl, Benjamin; Newrzela, Sebastian; Tousseyn, Thomas et al. (2013): Nodular lymphocyte predominant hodgkin lymphoma and T cell/histiocyte rich large B cell lymphoma--endpoints of a spectrum of one disease? In: *PLoS ONE* 8 (11), S. e78812. DOI: 10.1371/journal.pone.0078812.

Hartmann, Sylvia; Eray, Mine; Doring, Claudia; Lehtinen, Tuula; Brunnberg, Uta; Kujala, Paula et al. (2014): Diffuse large B cell lymphoma derived from nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma presents with variable histopathology. In: *BMC Cancer* 14, S. 332. DOI: 10.1186/1471-2407-14-332.

Hartmann, Sylvia; Döring, Claudia; Vucic, Emily; Chan, Fong Chun; Ennishi, Daisuke; Tousseyn, Thomas et al. (2015): Array comparative genomic hybridization reveals similarities between nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma and T cell/histiocyte rich large B cell lymphoma. In: *British journal of haematology* 169 (3), S. 415–422. DOI: 10.1111/bjh.13310.

Hartmann, Sylvia; Eichenauer, Dennis A.; Plütschow, Annette; Mottok, Anja; Bob, Roshanak; Koch, Karoline et al. (2013a): The prognostic impact of variant histology in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma: a report from the German Hodgkin Study Group (GHSG). In: *Blood* 122 (26), S. 4246-52; quiz 4292. DOI: 10.1182/blood-2013-07-515825.

Hartmann, Sylvia; Jakobus, Christina; Rengstl, Benjamin; Döring, Claudia; Newrzela, Sebastian; Brodt, Hans-Reinhard et al. (2013b): Spindle-shaped CD163+ rosetting macrophages replace CD4+ T-cells in HIV-related classical Hodgkin lymphoma. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 26 (5), S. 648–657. DOI: 10.1038/modpathol.2012.217.

Hasenclever, D.; Diehl, V. (1998): A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. In: *N. Engl. J. Med.* 339 (21), S. 1506–1514. DOI: 10.1056/NEJM199811193392104.

Herbst, H.; Dallenbach, F.; Hummel, M.; Niedobitek, G.; Pileri, S.; Muller-Lantzsch, N.; Stein, H. (1991): Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (11), S. 4766–4770.

Herida, Magid; Mary-Krause, Murielle; Kaphan, Régis; Cadranel, Jacques; Poizot-Martin, Isabelle; Rabaud, Christian et al. (2003): Incidence of non-AIDS-defining cancers before and during the highly active antiretroviral therapy era in a cohort of human immunodeficiency virus-infected patients. In: *J. Clin. Oncol.* 21 (18), S. 3447–3453. DOI: 10.1200/JCO.2003.01.096.

Herling, Marco; Rassidakis, George Z.; Vassilakopoulos, Theodoros P.; Medeiros, L. Jeffrey; Sarris, Andreas H. (2006): Impact of LMP-1 expression on clinical outcome in age-defined subgroups of patients with classical Hodgkin lymphoma. In: *Blood* 107 (3), S. 1240; author reply 1241.

Herndier, B. G.; Sanchez, H. C.; Chang, K. L.; Chen, Y. Y.; Weiss, L. M. (1993): High prevalence of Epstein-Barr virus in the Reed-Sternberg cells of HIV-associated Hodgkin's disease. In: *Am. J. Pathol.* 142 (4), S. 1073–1079.

Herold, Gerd (Hg.) (2014): *INNERE MEDIZIN 2015*. Köln: Herold, Gerd.

Hjalgrim, H. (2000): Risk of Hodgkin's Disease and Other Cancers After Infectious Mononucleosis. In: *Journal of the National Cancer Institute* 92 (18), S. 1522–1528. DOI: 10.1093/jnci/92.18.1522.

Hoffmann, C.: HIV 2013/2014. Hg. v. Medizin Fokus Verlag.

Huang, James Z.; Weisenburger, Dennis D.; Vose, Julie M.; Greiner, Timothy C.; Aoun, Patricia; Chan, Wing C. et al. (2004): Diffuse large B-cell lymphoma arising in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma: a report of 21 cases from the Nebraska Lymphoma Study Group. In: *Leuk Lymphoma* 45 (8), S. 1551–1557. DOI: 10.1080/1042819031000149421.

Huppmann, Alison R.; Nicolae, Alina; Slack, Graham W.; Pittaluga, Stefania; Davies-Hill, Theresa; Ferry, Judith A. et al. (2014): EBV may be expressed in the LP cells of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma (NLPHL) in both children and adults. In: *Am J Surg Pathol* 38 (3), S. 316–324. DOI: 10.1097/PAS.000000000000107.

Ishida, Takashi; Ishii, Toshihiko; Inagaki, Atsushi; Yano, Hiroki; Komatsu, Hirokazu; Iida, Shinsuke et al. (2006): Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. In: *Cancer research* 66 (11), S. 5716–5722. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0261.

Jackson, C.; Sirohi, B.; Cunningham, D.; Horwich, A.; Thomas, K.; Wotherspoon, A. (2010): Lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma—clinical features and treatment outcomes from a 30-year experience. In: *Ann Oncol* 21 (10), S. 2061–2068. DOI: 10.1093/annonc/mdq063.

Jaffe, Elaine S. (2009): The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. In: *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, S. 523–531. DOI: 10.1182/asheducation-2009.1.523.

Kamel, O. W.; Gelb, A. B.; Shibuya, R. B.; Warnke, R. A. (1993): Leu 7 (CD57) reactivity distinguishes nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease from nodular sclerosing Hodgkin's disease, T-cell-rich B-cell lymphoma and follicular lymphoma. In: *Am. J. Pathol.* 142 (2), S. 541–546.

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. DOI: 10.3324/haematol.2010.031542.

Kaufmann, Gilbert R.; Elzi, Luigia; Weber, Rainer; Furrer, Hansjakob; Giulieri, Stefano; Vernazza, Pietro et al. (2011): Interruptions of cART limits CD4 T-cell recovery and increases the risk for opportunistic complications and death. In: *AIDS (London, England)* 25 (4), S. 441–451. DOI: 10.1097/QAD.0b013e3283430013.

Keegan, Theresa H M; Glaser, Sally L.; Clarke, Christina A.; Gulley, Margaret L.; Craig, Fiona E.; Digiuseppe, Joseph A. et al. (2005): Epstein-Barr virus as a marker of survival after Hodgkin's lymphoma: a population-based study. In: *J Clin Oncol* 23 (30), S. 7604–7613. DOI: 10.1200/JCO.2005.02.6310.

Kelley, Todd W.; Pohlman, Brad; Elson, Paul; Hsi, Eric D. (2007): The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression. In: *Am J Clin Pathol* 128 (6), S. 958–965. DOI: 10.1309/NB3947K383DJOLQ2.

King, Rebecca L.; Howard, Matthew T.; Bagg, Adam (2014): Hodgkin lymphoma: pathology, pathogenesis, and a plethora of potential prognostic predictors. In: *Adv Anat Pathol* 21 (1), S. 12–25. DOI: 10.1097/PAP.0000000000000002.

- Kiyasu, Junichi; Aoki, Ryosuke; Tanaka, Paula Yurie; Pracchia, Luis Fernando; Calore, Edenilson Eduardo; Perez, Nilda Maria et al. (2012): FOXP3(+) regulatory and TIA-1(+) cytotoxic T lymphocytes in HIV-associated Hodgkin lymphoma. In: *Pathol. Int.* 62 (2), S. 77–83. DOI: 10.1111/j.1440-1827.2011.02754.x.
- Knutson, Keith L.; Disis, Mary L.; Salazar, Lupe G. (2007): CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis. In: *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 56 (3), S. 271–285. DOI: 10.1007/s00262-006-0194-y.
- Koulis A, Trivedi P, Ibrahim H, Bower M, Naresh KN. (2014): The role of the microenvironment in human immunodeficiency virus-associated classical Hodgkin lymphoma. In: *Histopathology*, 65(6), 749-756. DOI: 10.1111/his.12458.
- Kuppers, R.; Scherwing, I.; Brauninger, A.; Rajewsky, K.; Hansmann, M. L. (2002): Biology of Hodgkin's lymphoma. In: *Ann Oncol* 13 Suppl 1, S. 11–18.
- Kuppers, Ralf; Hansmann, Martin-Leo (2005): The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. In: *Int J Biochem Cell Biol* 37 (3), S. 511–517. DOI: 10.1016/j.biocel.2003.10.025.
- Küppers, R.; Rajewsky, K.; Zhao, M.; Simons, G.; Laumann, R.; Fischer, R.; Hansmann, M. L. (1994): Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (23), S. 10962–10966.
- Küppers, Ralf (2009): The biology of Hodgkin's lymphoma. In: *Nat. Rev. Cancer* 9 (1), S. 15–27. DOI: 10.1038/nrc2542.
- Kwon, J. M.; Park, Y. H.; Kang, J. H.; Kim, K.; Ko, Y. H.; Ryoo, B. Y. et al. (2006): The effect of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in Hodgkin's lymphoma. In: *Ann Hematol* 85 (7), S. 463–468. DOI: 10.1007/s00277-006-0081-9.
- Lanoy, Emilie; Rosenberg, Philip S.; Fily, Fabien; Lascaux, Anne-Sophie; Martinez, Valerie; Partisani, Maria et al. (2011): HIV-associated Hodgkin lymphoma during the first months on combination antiretroviral therapy. In: *Blood* 118 (1), S. 44–49. DOI: 10.1182/blood-2011-02-339275.
- Lau, Sean K.; Chu, Peiguo G.; Weiss, Lawrence M. (2004): CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. In: *Am J Clin Pathol* 122 (5), S. 794–801. DOI: 10.1309/QHD6-YFN8-1KQX-UUH6.
- Lee, Alfred Ian; LaCasce, Ann S. (2009): Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. In: *Oncologist* 14 (7), S. 739–751. DOI: 10.1634/theoncologist.2009-0099.
- Lee, Ju-Han; Kim, Younghye; Choi, Jung-Woo; Kim, Young-Sik (2014): Prevalence and prognostic significance of Epstein-Barr virus infection in classical Hodgkin's lymphoma: a meta-analysis. In: *Archives of medical research* 45 (5), S. 417–431. DOI: 10.1016/j.arcmed.2014.06.001.
- Leval, Laurence de; Rickman, David S.; Thielen, Caroline; Reynies, Aurelien de; Huang, Yen-Lin; Delsol, Georges et al. (2007): The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. In: *Blood* 109 (11), S. 4952–4963. DOI: 10.1182/blood-2006-10-055145.

- Lieberman, J.; Shankar, P.; Manjunath, N.; Andersson, J. (2001): Dressed to kill? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail to prevent progressive immunodeficiency in HIV-1 infection. In: *Blood* 98 (6), S. 1667–1677.
- Lim, Megan S.; Beaty, Michael; Sorbara, Lynn; Cheng, Richard Z.; Pittaluga, Stefania; Raffeld, Mark; Jaffe, Elaine S. (2002): T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma: a heterogeneous entity with derivation from germinal center B cells. In: *Am J Surg Pathol* 26 (11), S. 1458–1466.
- Liu, Yanhui; Zhuang, Hengguo; Liao, Xinbo; Luo, Xinlan; Luo, Donglan; Cai, Xiuling (2002): Immunophenotype and differential diagnosis of Hodgkin's lymphoma. In: *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 23 (10), S. 524–527.
- Lukes, R. J.; Butler, J. J. (1966): The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. In: *Cancer Res.* 26 (6), S. 1063–1083.
- Ma, Yue; Visser, Lydia; Roelofsen, Han; Vries, Marcel de; Diepstra, Arjan; van Imhoff, Gustaaf et al. (2008): Proteomics analysis of Hodgkin lymphoma: identification of new players involved in the cross-talk between HRS cells and infiltrating lymphocytes. In: *Blood* 111 (4), S. 2339–2346. DOI: 10.1182/blood-2007-09-112128.
- Maggio, Ewerton M.; van den Berg, Anke; Visser, Lydia; Diepstra, Arjan; Kluiver, Joust; Emmens, Roelke; Poppema, Sibrand (2002): Common and differential chemokine expression patterns in rs cells of NLP, EBV positive and negative classical Hodgkin lymphomas. In: *Int. J. Cancer* 99 (5), S. 665–672. DOI: 10.1002/ijc.10399.
- Mancao, Christoph; Hammerschmidt, Wolfgang (2007): Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. In: *Blood* 110 (10), S. 3715–3721. DOI: 10.1182/blood-2007-05-090142.
- Marafioti, Teresa; Paterson, Jennifer C.; Ballabio, Erica; Chott, Andreas; Natkunam, Yasodha; Rodriguez-Justo, Manuel et al. (2010): The inducible T-cell co-stimulator molecule is expressed on subsets of T cells and is a new marker of lymphomas of T follicular helper cell-derivation. In: *Haematologica* 95 (3), S. 432–439. DOI: 10.3324/haematol.2009.010991.
- Marshall, Neil A.; Christie, Linsey E.; Munro, Laura R.; Culligan, Dominic J.; Johnston, Peter W.; Barker, Robert N.; Vickers, Mark A. (2004): Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. In: *Blood* 103 (5), S. 1755–1762. DOI: 10.1182/blood-2003-07-2594.
- Mellors, J. W.; Rinaldo, C R Jr; Gupta, P.; White, R. M.; Todd, J. A.; Kingsley, L. A. (1996): Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. In: *Science* 272 (5265), S. 1167–1170.
- Miettinen, M.; Franssila, K. O.; Saxen, E. (1983): Hodgkin's disease, lymphocytic predominance nodular. Increased risk for subsequent non-Hodgkin's lymphomas. In: *Cancer* 51 (12), S. 2293–2300.
- Miyauchi, Kosuke; Kim, Yuri; Latinovic, Olga; Morozov, Vladimir; Melikyan, Gregory B. (2009): HIV Enters Cells via Endocytosis and Dynamin-Dependent Fusion with Endosomes. In: *Cell* 137 (3), S. 433–444. DOI: 10.1016/j.cell.2009.02.046.
- Morris, C. S.; Stuart, A. E. (1984): Reed-Sternberg/lymphocyte rosette: lymphocyte subpopulations as defined by monoclonal antibodies. In: *J. Clin. Pathol.* 37 (7), S. 767–771.

- Nam-Cha, Syong H.; Roncador, Giovanna; Sanchez-Verde, Lydia; Montes-Moreno, Santiago; Acevedo, Agustín; Domínguez-Franjo, Purificación; Piris, Miguel A. (2008): PD-1, a follicular T-cell marker useful for recognizing nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. In: *Am. J. Surg. Pathol.* 32 (8), S. 1252–1257. DOI: 10.1097/PAS.0b013e318165b0d6.
- Nurieva, Roza I.; Chung, Yeonseok; Hwang, Daehee; Yang, Xuexian O.; Kang, Hong Soon; Ma, Li et al. (2008): Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. In: *Immunity* 29 (1), S. 138–149. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.05.009.
- Oudejans, J. J.; Jiwa, N. M.; Kummer, J. A.; Ossenkoppele, G. J.; van Heerde, P.; Baars, J. W. et al. (1997): Activated cytotoxic T cells as prognostic marker in Hodgkin's disease. In: *Blood* 89 (4), S. 1376–1382.
- Pelstring, R. J.; Zellmer, R. B.; Sulak, L. E.; Banks, P. M.; Clare, N. (1991): Hodgkin's disease in association with human immunodeficiency virus infection. Pathologic and immunologic features. In: *Cancer* 67 (7), S. 1865–1873.
- Pezzotti, P.; Phillips, A. N.; Dorrucchi, M.; Lepri, A. C.; Galai, N.; Vlahov, D.; Rezza, G. (1996): Category of exposure to HIV and age in the progression to AIDS: longitudinal study of 1199 people with known dates of seroconversion. HIV Italian Seroconversion Study Group. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 313 (7057), S. 583–586.
- Pileri, S. A.; Ascani, S.; Leoncini, L.; Sabattini, E.; Zinzani, P. L.; Piccaluga, P. P. et al. (2002): Hodgkin's lymphoma: the pathologist's viewpoint. In: *J. Clin. Pathol.* 55 (3), S. 162–176.
- Pinkus, G. S.; Said, J. W. (1988): Hodgkin's disease, lymphocyte predominance type, nodular--further evidence for a B cell derivation. L & H variants of Reed-Sternberg cells express L26, a pan B cell marker. In: *Am. J. Pathol.* 133 (2), S. 211–217.
- Pittaluga, Stefania; Jaffe, Elaine S. (2010): T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma. In: *Haematologica* 95 (3), S. 352–356. DOI: 10.3324/haematol.2009.016931.
- Pollard, Jeffrey W. (2004): Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. In: *Nat Rev Cancer* 4 (1), S. 71–78. DOI: 10.1038/nrc1256.
- Poppema, S. (1989): The nature of the lymphocytes surrounding Reed-Sternberg cells in nodular lymphocyte predominance and in other types of Hodgkin's disease. In: *Am. J. Pathol.* 135 (2), S. 351–357.
- Poppema, S.; Bhan, A. K.; Reinherz, E. L.; Posner, M. R.; Schlossman, S. F. (1982): In situ immunologic characterization of cellular constituents in lymph nodes and spleens involved by Hodgkin's disease. In: *Blood* 59 (2), S. 226–232.
- Poppema, S.; van den Berg, A. (2000): Interaction between host T cells and Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphomas. In: *Semin. Cancer Biol.* 10 (5), S. 345–350. DOI: 10.1006/scbi.2000.0327.
- Porrata, Luis F.; Ristow, Kay; Colgan, Joseph P.; Habermann, Thomas M.; Witzig, Thomas E.; Inwards, David J. et al. (2012a): Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio at diagnosis and survival in classical Hodgkin's lymphoma. In: *Haematologica* 97 (2), S. 262–269. DOI: 10.3324/haematol.2011.050138.
- Porrata, Luis F.; Ristow, Kay; Habermann, Thomas M.; Witzig, Thomas E.; Colgan, Joseph P.; Inwards, David J. et al. (2012b): Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio

- at diagnosis and survival in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. In: *Br. J. Haematol.* 157 (3), S. 321–330. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2012.09067.x.
- Powles, Thomas; Robinson, David; Stebbing, Justin; Shamash, Jonathan; Nelson, Mark; Gazzard, Brian et al. (2009): Highly active antiretroviral therapy and the incidence of non-AIDS-defining cancers in people with HIV infection. In: *J. Clin. Oncol.* 27 (6), S. 884–890. DOI: 10.1200/JCO.2008.19.6626.
- Qurishi, Nazifa; Kreuzberg, Christina; Lüchters, Guido; Effenberger, Wolfgang; Kupfer, Bernd; Sauerbruch, Tilman et al. (2003): Effect of antiretroviral therapy on liver-related mortality in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. In: *Lancet (London, England)* 362 (9397), S. 1708–1713. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)14844-1.
- Rastelli, Julia; Homig-Holzel, Cornelia; Seagal, Jane; Muller, Werner; Hermann, Andrea C.; Rajewsky, Klaus; Zimber-Strobl, Ursula (2008): LMP1 signaling can replace CD40 signaling in B cells in vivo and has unique features of inducing class-switch recombination to IgG1. In: *Blood* 111 (3), S. 1448–1455. DOI: 10.1182/blood-2007-10-117655.
- Re, Daniel; Küppers, Ralf; Diehl, Volker (2005): Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. In: *J. Clin. Oncol.* 23 (26), S. 6379–6386. DOI: 10.1200/JCO.2005.55.013.
- Ree, H. J.; Kadin, M. E. (1985): Macrophage-histiocytes in Hodgkin's disease. The relation of peanut-agglutinin-binding macrophage-histiocytes to clinicopathologic presentation and course of disease. In: *Cancer* 56 (2), S. 333–338.
- Ree, H. J.; Strauchen, J. A.; Khan, A. A.; Gold, J. E.; Crowley, J. P.; Kahn, H.; Zalusky, R. (1991): Human immunodeficiency virus-associated Hodgkin's disease. Clinicopathologic studies of 24 cases and preponderance of mixed cellularity type characterized by the occurrence of fibrohistiocytoid stromal cells. In: *Cancer* 67 (6), S. 1614–1621.
- Reeves, Jacqueline D.; Doms, Robert W. (2002): Human immunodeficiency virus type 2. In: *J Gen Virol* 83 (Pt 6), S. 1253–1265.
- Rubio, R. (1994): Hodgkin's disease associated with human immunodeficiency virus infection. A clinical study of 46 cases. Cooperative Study Group of Malignancies Associated with HIV Infection of Madrid. In: *Cancer* 73 (9), S. 2400–2407.
- Rudiger, T.; Ott, G.; Ott, M. M.; Muller-Deubert, S. M.; Muller-Hermelink, H. K. (1998): Differential diagnosis between classic Hodgkin's lymphoma, T-cell-rich B-cell lymphoma, and paragranuloma by paraffin immunohistochemistry. In: *Am J Surg Pathol* 22 (10), S. 1184–1191.
- Rüdiger, T.; Gascoyne, R. D.; Jaffe, E. S.; Jong, D. de; Delabie, J.; Wolf-Peeters, C. de et al. (2002): Workshop on the relationship between nodular lymphocyte predominant Hodgkin's lymphoma and T cell/histiocyte-rich B cell lymphoma. In: *Ann. Oncol.* 13 Suppl 1, S. 44–51.
- Rüdiger, T.; Jaffe, E. S.; Delsol, G.; deWolf-Peeters, C.; Gascoyne, R. D.; Georgii, A. et al. (1998): Workshop report on Hodgkin's disease and related diseases ('grey zone' lymphoma). In: *Ann. Oncol.* 9 Suppl 5, S. S31-8.
- Rodríguez, Benigno; Sethi, Ajay K.; Cheruvu, Vinay K.; Mackay, Wilma; Bosch, Ronald J.; Kitahata, Mari et al. (2006): Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection. In: *JAMA* 296 (12), S. 1498–1506. DOI: 10.1001/jama.296.12.1498

Sanders, M. E.; Makgoba, M. W.; Sussman, E. H.; Luce, G. E.; Cossman, J.; Shaw, S. (1988): Molecular pathways of adhesion in spontaneous rosetting of T-lymphocytes to the Hodgkin's cell line L428. In: *Cancer Res.* 48 (1), S. 37–40.

Skinnider, B. F. (2002): The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. In: *Blood* 99 (12), S. 4283–4297. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0099.

Steidl, Christian; Connors, Joseph M.; Gascoyne, Randy D. (2011): Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment. In: *J. Clin. Oncol.* 29 (14), S. 1812–1826. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.8401.

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: *N. Engl. J. Med.* 362 (10), S. 875–885. DOI: 10.1056/NEJMoa0905680.

Stellbrink, H-J (2012): Antiretrovirale Therapie der HIV-1-Infektion. In: *Der Internist* 53 (10), S. 1157–1168. DOI: 10.1007/s00108-011-2974-5.

Sterne, Jonathan A. C.; Hernán, Miguel A.; Ledergerber, Bruno; Tilling, Kate; Weber, Rainer; Sendi, Pedram et al. (2005): Long-term effectiveness of potent antiretroviral therapy in preventing AIDS and death: a prospective cohort study. In: *The Lancet* 366 (9483), S. 378–384. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67022-5.

Sterne, Jonathan A. C.; May, Margaret; Costagliola, Dominique; Wolf, Frank de; Phillips, Andrew N.; Harris, Ross et al. (2009): Timing of initiation of antiretroviral therapy in AIDS-free HIV-1-infected patients: a collaborative analysis of 18 HIV cohort studies. In: *Lancet (London, England)* 373 (9672), S. 1352–1363. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60612-7.

Suerbaum, Sebastian; Hahn, Helmut; Burchard, Gerd-Dieter; Kaufmann, Stefan H. E.; Schulz, Thomas F. (2012): *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 7., überarbeitete Auflage.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch).

Swerdlow, Steven H. (2008): WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4. Aufl. Lyon: International Agency for Research on Cancer.

Swingler, Simon; Brichacek, Beda; Jacque, Jean-Marc; Ulich, Catherine; Zhou, Jin; Stevenson, Mario (2003): HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection. In: *Nature* 424 (6945), S. 213–219. DOI: 10.1038/nature01749.

Tan, King L.; Scott, David W.; Hong, Fangxin; Kahl, Brad S.; Fisher, Richard I.; Bartlett, Nancy L. et al. (2012): Tumor-associated macrophages predict inferior outcomes in classical Hodgkin lymphoma: a correlative study from the E2496 Intergroup trial. In: *Blood.* DOI: 10.1182/blood-2012-04-421057.

Tanijiri, Tsutomu; Shimizu, Toshiaki; Uehira, Kazutaka; Yokoi, Takashi; Amuro, Hideki; Sugimoto, Hiroyuki et al. (2007): Hodgkin's reed-sternberg cell line (KM-H2) promotes a bidirectional differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ T cells and CD4+ cytotoxic T lymphocytes from CD4+ naive T cells. In: *J Leukoc Biol* 82 (3), S. 576–584. DOI: 10.1189/jlb.0906565.

Thompson, Claire; Powrie, Fiona (2004): Regulatory T cells. In: *Current opinion in pharmacology* 4 (4), S. 408–414. DOI: 10.1016/j.coph.2004.05.001.

Thompson, Lester D. R.; Fisher, Stephen I.; Chu, Wei Sing; Nelson, Ann; Abbondanzo, Susan L. (2004): HIV-associated Hodgkin lymphoma: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 45 cases. In: *Am. J. Clin. Pathol.* 121 (5), S. 727–738. DOI: 10.1309/PNVQ-0PQG-XHVY-6L7G.

Thorley-Lawson, D. A. (2001): Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. In: *Nat Rev Immunol* 1 (1), S. 75–82. DOI: 10.1038/35095584.

Tirelli, U.; Errante, D.; Dolcetti, R.; Gloghini, A.; Serraino, D.; Vaccher, E. et al. (1995): Hodgkin's disease and human immunodeficiency virus infection: clinicopathologic and virologic features of 114 patients from the Italian Cooperative Group on AIDS and Tumors. In: *J Clin Oncol* 13 (7), S. 1758–1767.

Tousseyn, Thomas; Wolf-Peters, Christiane de (2011): T cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma: an update on its biology and classification. In: *Virchows Arch.* 459 (6), S. 557–563. DOI: 10.1007/s00428-011-1165-z.

Trümper, L.; Jung, W.; Daus, H.; Mechttersheimer, G.; Bonin, F. von; Pfreundschuh, M. (2001): Assessment of clonality of rosetting T lymphocytes in Hodgkin's disease by single-cell polymerase chain reaction: detection of clonality in a polyclonal background in a case of lymphocyte predominance Hodgkin's disease. In: *Ann. Hematol.* 80 (11), S. 653–661.

Tzankov, Alexandar; Matter, Matthias S.; Dirnhofer, Stephan (2010): Refined prognostic role of CD68-positive tumor macrophages in the context of the cellular microenvironment of classical Hodgkin lymphoma. In: *Pathobiology* 77 (6), S. 301–308. DOI: 10.1159/000321567.

Tzankov, Alexandar; Meier, Cecile; Hirschmann, Petra; Went, Philip; Pileri, Stefano A.; Dirnhofer, Stephan (2008): Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. In: *Haematologica* 93 (2), S. 193–200. DOI: 10.3324/haematol.11702.

UNAIDS: FACT SHEET HIV 2012.

Unger, P. D.; Strauchen, J. A. (1986): Hodgkin's disease in AIDS complex patients. Report of four cases and tissue immunologic marker studies. In: *Cancer* 58 (4), S. 821–825.

Vaccher, E.; Spina, M.; Tirelli, U. (2001): Clinical aspects and management of Hodgkin's disease and other tumours in HIV-infected individuals. In: *European Journal of Cancer* 37 (10), S. 1306–1315. DOI: 10.1016/S0959-8049(01)00122-8.

van Loo, Peter; Tousseyn, Thomas; Vanhentenrijk, Vera; Dierickx, Daan; Malecka, Agnieszka; Vanden Bempt, Isabelle et al. (2010): T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma shows transcriptional features suggestive of a tolerogenic host immune response. In: *Haematologica* 95 (3), S. 440–448. DOI: 10.3324/haematol.2009.009647.

Weaver, Casey T.; Hatton, Robin D.; Mangan, Paul R.; Harrington, Laurie E. (2007): IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. In: *Annu Rev Immunol* 25, S. 821–852. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141557.

Wei, Xiping; Decker, Julie M.; Wang, Shuyi; Hui, Huxiong; Kappes, John C.; Wu, Xiaoyun et al. (2003): Antibody neutralization and escape by HIV-1. In: *Nature* 422 (6929), S. 307–312. DOI: 10.1038/nature01470.

Yan, Li; Anderson, G. Mark; DeWitte, Mark; Nakada, Marian T. (2006): Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. In: *Eur J Cancer* 42 (6), S. 793–802. DOI: 10.1016/j.ejca.2006.01.013.

8 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

Charakterisierung des reaktiven Begleitinfiltrats im HIV-assoziierten klassischen Hodgkin-Lymphom, nodulären lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphom und T-Zell/Histiozyten-reichen großzelligen B-Zell-Lymphom

im Dr. Senckenbergischen Institut für Pathologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Martin-Leo Hansmann und Prof. Dr. Sylvia Hartmann mit Unterstützung durch Dr. Benjamin Rengstl 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 in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

- [1] Sylvia Hartmann, Christina Jakobus, Benjamin Rengstl, Claudia Döring, Sebastian Newrzela, Hans-Reinhard Brodt, Timo Wolf, Martin-Leo Hansmann, Spindle-shaped CD163+ rosetting macrophages replace CD4+ T-cells in HIV-related classical Hodgkin lymphoma, *Modern Pathology*, 26, 648–657, 2013
- [2] Sylvia Hartmann, Claudia Döring, Christina Jakobus, Benjamin Rengstl, Sebastian Newrzela, Thomas Tousseyn, Xavier Sagaert, Maurilio Ponzoni, Fabio Facchetti, Chris de Wolf-Peeters, Christian Steidl, Randy Gascoyne,

Ralf Küppers, Martin-Leo Hansmann, Nodular Lymphocyte Predominant Hodgkin Lymphoma and T cell/Histiocyte Rich Large B cell Lymphoma - Endpoint of a Spectrum of One Disease?, PLOS one, 2013

(Ort, Datum)

(Unterschrift)