

Aus der Hautklinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Sergij Goerd)

Immunhistochemische Untersuchung kutaner T- und B-Zell-Lymphome
unter Verwendung eines Tissue-Microarrays

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Eva Maria Guth

aus
Troisdorf
2022

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Jan P. Nicolay

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	3
1 EINLEITUNG	5
1.1 Kutane Lymphome	6
1.1.1 Klassifikation.....	6
1.1.2 Stadieneinteilung	11
1.2 Pathophysiologie	13
1.2.1 JAK-STAT-Signalweg.....	14
1.2.2 T-Zell-Rezeptorsignalweg.....	15
1.2.3 MAP-Kinase-Signalweg	16
1.2.4 NF- κ B-Signalweg.....	17
1.2.5 B-Zell-Rezeptorsignalweg.....	18
1.3 Therapie	18
1.4 Theoretischer Hintergrund zur Auswahl der Marker	19
1.4.1 CD4	21
1.4.2 CD8	21
1.4.3 CD30	22
1.4.4 CD20	22
1.4.5 CD79a	23
1.4.6 PD-1 und PD-L1	23
1.4.7 p-STAT3	24
1.4.8 BCL-2	24
1.4.9 p-MEK und p-ERK	25
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	26

2 MATERIAL UND METHODEN.....	27
2.1 Verwendete Proben.....	27
2.2 Erstellen des Tissue-Microarrays	27
2.2.1 Material.....	27
2.2.2 Erstellen der Schnitte.....	28
2.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	28
2.2.4 Markieren der Schnitte.....	29
2.2.5 Übertragen der Proben auf das Tissue-Microarray.....	29
2.3 Immunhistochemie	30
2.3.1 Material.....	30
2.3.2 Färbung	32
2.4 Auswertung der Immunhistochemie	34
2.4.1 Digitalisierung und Nachbearbeitung	34
2.4.2 Digitale Auswertung.....	34
2.5 Angaben zur Statistik.....	35
2.5.1 Deskriptive Statistik	35
2.5.2 Unterschiede im Expressionsmuster nach Entitäten	36
2.5.3 Korrelation zwischen Tumorstadium und Expressionsmuster	36
2.5.4 Korrelation der untersuchten Marker	37
3 ERGEBNISSE	38
3.1 Übersicht über das Patientenkollektiv.....	38
3.2 Unterschiede im Expressionsmuster nach Lymphomentität	40
3.2.1 Kutane T-Zell-Lymphome	40
3.2.2 Kutane B-Zell-Lymphome.....	42
3.3 Stadienabhängige Veränderung des Expressionsmusters der Mycosis fungoides.....	44
3.4 Korrelationen zwischen den untersuchten Marker.....	46
3.4.1 Mycosis fungoides	46
3.4.2 Sézary Syndrom	47
3.4.3 Primär kutanes anaplastisch großzelliges Lymphom.....	48
3.4.4 Primär kutanes diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	49
3.4.5 Primär kutanes Follikelzentrumslymphom	50
3.4.6 Primär kutanes Marginalzonen-Lymphom	51

4 DISKUSSION	53
4.1 Das Tissue-Microarray als Analysemethode	53
4.2 Diagnostische und therapeutische Relevanz der Unterschiede zwischen den Entitäten	54
4.2.1 Unterschiede zwischen Mycosis fungoides und Sézary Syndrom	54
4.2.2 Unterschiede zwischen kutanen B-Zell-Lymphomen	57
4.2.3 Stadienabhängige Veränderungen der Mycosis fungoides.....	60
4.3 Relevante Signalketten kutaner Lymphome	62
4.3.1 Mycosis fungoides	62
4.3.2 Sézary Syndrom	64
4.3.3 Primär kutanes anaplastisch großzelliges Lymphom.....	66
4.3.4 Primär kutanes diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom	67
4.3.5 Primär kutanes Follikelzentrumslymphom	70
4.3.6 Primär kutanes Marginalzonen-Lymphom	72
4.4 Konklusion und Ausblick.....	73
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	75
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	77
7 TABELLARISCHER ANHANG.....	92
8 LEBENSLAUF	96
9 DANKSAGUNG	97

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
ALK	anaplastische Lymphomkinase
CBCL	cutaneous B-cell lymphoma = kutanes B-Zell-Lymphom
CTCL	cutaneous T-cell lymphoma = kutanes T-Zell-Lymphom
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer = Europäische Organisation für Krebsforschung und -behandlung
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
MALT	Mukosaassoziiertes lymphatisches Gewebe
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MF	Mycosis fungoides
MHC	Major Histocompatibility Complex = Haupthistokompatibilitätskomplex
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline = phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBST	Phosphate Buffered Saline with Tween® = phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween® (Polyethylenglykol-Sorbitan-Fettsäureester)
PCALCL	Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma = primär kutanes anaplastisch großzelliges Lymphom
PCBLT	Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type = primär kutanes diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom, leg type
PCFCL	Primary cutaneous follicle center lymphoma = primär kutanes Follikelzentrumslymphom
PCMZL	Primary cutaneous marginal zone lymphoma = primär kutanes Marginalzonenlymphom
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
SS	Sézary Syndrom

Abkürzungsverzeichnis

STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription = Signalwandler und Aktivator der Transkription
TMA	Tissue-Microarray
UMM	Universitätsmedizin Mannheim
WHO	World Health Organisation = Weltgesundheitsorganisation

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Stadien der Mycosis fungoides	7
Abbildung 2: Primär kutanes Follikelzentrumslymphom des Kopfes (A) und des Rückens (B)	9
Abbildung 3: Vereinfachte Übersicht der für die Pathophysiologie der kutanen T-Zell-Lymphome besonders relevanten Signalwege.....	14
Abbildung 4: Einordnung der untersuchten Marker in die bei kutanen Lymphomen häufig veränderten Signalwege	20
Abbildung 5: links: Erstellen eines Tissue-Microarrays, rechts: Tissue-Microarray der Lymphomproben	30
Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der Bildverarbeitung: (1) Originalbild (2) Bild in Graustufen (3) immunhistochemisch gefärbte Zellen werden weiß dargestellt	35
Abbildung 7: Verteilung der Patienten auf die verschiedenen Lymphomtypen	38
Abbildung 8: Verteilung der Patienten auf die verschiedenen Tumorstadien.....	39
Abbildung 9: Übersichtsaufnahme der CD30 Färbung kutaner T-Zell-Lymphome ...	39
Abbildung 10: Ergebnisse der p-STAT3 Färbung nach Diagnose	40
Abbildung 11: Ergebnisse der p-MEK Färbung nach Diagnose.....	41
Abbildung 12: Ergebnisse der CD30 Färbung nach Diagnose	42
Abbildung 13: Ergebnisse der CD4 Färbung nach Diagnose	43
Abbildung 14: Ergebnisse der CD20 Färbung	43
Abbildung 15: Ergebnisse der CD79a Färbung	44

Abbildung 16: BCL-2 Expression in Abhängigkeit vom Tumorstadium der Mycosis fungoides	45
Abbildung 17: CD4 Expression in Abhängigkeit vom Tumorstadium der Mycosis fungoides	45
Abbildung 18: CD20 Expression in Abhängigkeit vom Tumorstadium der Mycosis fungoides	46
Abbildung 19: Autokrine p-STAT3 Aktivierung in Sézary Zellen	56
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Beziehung zwischen regulatorischen T-Zellen und malignen Zellen in primär kutanen diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen.....	59
Abbildung 21: Korrelationen in Proben primär kutan diffus-großzelliger B-Zell-Lymphome, die auf Wechselwirkungen der malignen Zelle mit tumorinfiltrierenden Zellen hindeuten	69

1 EINLEITUNG

Mit einer Inzidenz von ca. 1 pro 100.000 Einwohner zählen kutane Lymphome zu den seltenen malignen Erkrankungen ¹. Die Patienten leiden neben der krankheitsspezifischen Symptomatik zusätzlich unter der Ungewissheit des Krankheitsverlaufs und dem Fehlen kurativer Therapieoptionen ². Somatisch belasten hauptsächlich Müdigkeit, Schlafstörungen und Pruritus ³. Hinzu kommen psychische Faktoren wie Angst und Depressivität ³. Unter einer kutanen Lymphomerkrankung leiden neben den Patienten selbst auch Familie und Freunde im sozialen Umfeld ³.

Vom Auftreten erster Symptome bis zur korrekten Diagnose der Erkrankung vergehen meist mehrere Jahre, in einigen Fällen sogar Jahrzehnte ⁴. Dies liegt jedoch nicht allein in der Seltenheit der Erkrankung begründet. Die klinische und histologische Unterscheidung kutaner Lymphome von benignen inflammatorischen Hauterkrankungen stellt insbesondere in frühen Stadien eine Herausforderung dar ^{4,5}. Die korrekte Zuordnung zu den einzelnen Entitäten wird durch Überschneidungen in der Histologie und variable Ausprägungen erschwert ^{4,6}. Die Unterscheidung der beiden häufigsten Vertreter kutaner T-Zell-Lymphome (CTCL) - der Mycosis fungoides (MF) und des Sézary Syndroms (SS) - ist allein auf Basis von Hautproben nicht möglich ^{7,8}. Die Identifikation neuer diagnostischer Marker, welche die korrekte Diagnosestellung erleichtern, ist entscheidend, um frühzeitig mit wirksamen Therapien beginnen zu können.

Die Entwicklung von gezielteren und individuell abgestimmten Therapien maligner Erkrankungen ist ein großer Fortschritt der modernen Medizin, der sich in innovativen Therapieansätzen kutaner Lymphome widerspiegelt ⁶. Umso relevanter ist ein tieferes Verständnis der Veränderungen auf Proteinebene. Schließlich bilden Erkenntnisse über dysregulierte Signalwege und die gesteigerte Expression verschiedener Proteine Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapien. Die Identifikation von Veränderungen in der Proteinexpression mit therapeutischer und diagnostischer Relevanz, der sich diese Arbeit widmet, bildet einen weiteren Baustein für eine frühzeitige Diagnose und eine individuelle und erfolgreiche Behandlung kutaner Lymphome.

1.1 Kutane Lymphome

Nach dem Mucosa Associated Lymphoid Tissue (MALT) Lymphom des Magens bilden kutane Lymphome die zweitgrößte Gruppe der extranodalen Non-Hodgkin-Lymphome⁹. Zu unterscheiden sind primär kutane Lymphome, die bei Diagnosestellung ausschließlich auf die Haut begrenzt sind, von sekundären kutanen Lymphomen, welche die kutane Manifestation eines nodalen oder systemischen Lymphoms oder einer Leukämie sind⁹. Kutane Lymphome stellen eine heterogene Erkrankungsgruppe dar¹⁰⁻¹². Klassifiziert wird nach histopathologischen und klinischen Aspekten^{11, 12}. Neben dem Lymphomtyp richtet sich die Prognose ebenso wie die Therapie nach dem Krankheitsstadium, wodurch ein exaktes Staging besonders entscheidend ist^{11, 12}.

1.1.1 Klassifikation

2005 erfolgte erstmals eine gemeinsame Klassifikation der kutanen Lymphome durch die World Health Organisation (WHO) und die European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC), welche zuletzt 2018 überarbeitet wurde^{11, 13}. Im Allgemeinen unterscheidet man die häufigeren CTCL, welche etwa 65-75 % der kutanen Lymphome ausmachen, von den mit 25-35 % selteneren kutanen B-Zell-Lymphomen (CBCL)^{13, 14}. Einige wenige seltene Entitäten lassen sich nicht klar einer Zellreihe zuordnen und werden teilweise ebenfalls zu den CTCL gezählt¹³. Die weitere Einteilung basiert vor allem auf dem klinischen Bild sowie der Unterteilung nach Zellart in Vorläufer- und reife T-Zell-Lymphome, natürliche Killerzell-Lymphome (NK-Zell-Lymphome) und B-Zell-Lymphome (Tabelle 1)^{14, 15}. Neben Klinik und Histologie kommen den immunhistochemischen Untersuchungen sowie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eine entscheidende Rolle in der korrekten Zuordnung zu, weshalb sie einen festen Bestandteil der Diagnostik bilden¹⁶. Nachfolgend findet sich eine kurze Übersicht über die für diese Arbeit besonders relevanten Lymphome, beginnend mit den CTCL.

Die MF ist mit einer Inzidenz von 0,5 pro 100.000 Einwohnern das häufigste kutane Lymphom¹³. Es handelt sich um eine Neoplasie reifer bzw. peripherer CD4+ T-Helferzellen⁵. Klinisch manifestiert sie sich in 3 Stadien¹⁵. Auf das Patch-Stadium, welches durch juckende unspezifische Hautausschläge auffällt, folgt das durch ringförmige Effloreszenzen gekennzeichnete Plaque-Stadium und das Tumorstadium

mit multiplen, teils ulzerierenden Tumorknoten (Abbildung 1) ¹⁵. Die Histologie variiert je nach Stadium ¹⁷. Zu Beginn findet sich ein epidermotropes, lymphozytäres Infiltrat mit herdartig zusammengelagerten aus der Dermis aufsteigenden Lymphozyten, den Pautrier-Mikroabszessen ¹⁷. Später vergrößern sich die Lymphozyten zunehmend ¹⁷. Dabei handelt es sich zumeist um CD3+, CD4+ und CD8- T-Zellen, die einen Verlust der Antigene CD2, CD5 und CD7 zeigen ⁴. Zusätzlich lässt sich ein klonales Rearrangement des T-Zell-Rezeptorgens nachweisen ⁴. Diese Veränderung ist nicht spezifisch für die MF, sondern findet sich ebenso bei weiteren Lymphomen, bei anderen Erkrankungen sowie physiologisch bei älteren Menschen ⁴. Die Prognose hängt vor allem davon ab, inwieweit es im späteren Verlauf zu einer extrakutanen Beteiligung etwa der Lymphknoten, des Blutes oder der viszeralen Organe kommt ⁵. Die MF ist entsprechend Tabelle 1 in weitere klinische und histologische Varianten unterteilbar, diese bilden jedoch keine eigene Entität ¹⁵.



Abbildung 1: Stadien der Mycosis fungoides

- a)** Patchstadium: multiple erythematöse Makulae am Stamm
- b)** Plaquestadium: erythematöse Plaque mit Schuppung am dorsalen Oberschenkel
- c)** Tumorstadium: Tumorknoten im Schulterbereich (mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags) ¹⁵

Charakteristisch, jedoch nicht spezifisch, für das SS ist der Nachweis einer neoplastischen T-Zellpopulation im Blut, weshalb es häufig als leukämische Form der MF bezeichnet wird ^{16, 18}. Es bildet jedoch eine eigene Entität ⁴. Wie die MF geht das deutlich seltenere SS von CD4+ T-Helferzellen aus ⁵. Trotz typischer Präsentation de novo ist ein Übergang einer MF in ein sogenanntes sekundäres SS möglich ¹⁹. Klinisch präsentiert sich das SS mit Erythrodermie, generalisierter Lymphadenopathie und starkem Pruritus ¹⁸. Histologisch unterscheiden sich die epidermalen Infiltrate kaum von denen der MF und immunhistochemisch bestehen Ähnlichkeiten ¹⁶. Es finden sich ebenfalls CD3+, CD4+ und CD8- T-Zellen mit Verlust bestimmter

Oberflächenantigene, wobei für das SS zusätzlich zu CD2, CD5 und CD7 insbesondere der Verlust von CD26 einen relevanten Marker mit hoher Spezifität darstellt^{4, 16, 20}. Weiterhin findet sich häufig eine aberrante Expression von CD185k, welches gewöhnlich auf NK-Zellen zu finden ist^{16, 21}. Ein klonales T-Zell-Rezeptor-Rearrangement kann ebenfalls für das SS nachgewiesen werden¹⁶. Auf Grund der Aggressivität und eingeschränkten Therapierbarkeit liegt die 5-Jahres-Überlebensrate lediglich bei 24 %, die mittlere Überlebensdauer bei 48 Monaten^{13, 22}.

Eine deutlich bessere Prognose weist das primär kutane anaplastische großzellige Lymphom (PCALCL) mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 76-96 % auf²³. Teilweise kommt es sogar zu Spontanremissionen²³. Es handelt sich hierbei um eine CD30+ lymphoproliferative Erkrankung, deren korrekte Diagnose zur Abgrenzung gegenüber anderen CD30+ Lymphomen eine Kombination aus Klinik und Histologie erfordert²³. Klinisch zeigen sich isolierte oder wenige lokalisierte Tumorknoten, welche häufig ulzerieren²⁴. Histologisch finden sich große, irregulär polygonale Zellen, die sich von der Dermis teilweise bis in die Subcutis ausbreiten²³. Definierend für die Erkrankung ist der immunhistochemische Nachweis von CD30 auf mindestens 75 % der Tumorzellen^{13, 23}. Auch für das PCALCL stellt der Nachweis klonaler T-Zell-Rezeptor-Rearrangements eine diagnostische Hilfe dar^{23, 25}.

Der häufigste Vertreter der CBCL ist das primär kutane Follikelzentrumslymphom (PCFCL), welches dem Namen entsprechend aus follikulären B-Zellen hervorgeht^{13, 26}. Es handelt sich um ein niedrigmalignes Lymphom mit sehr guter Prognose, jedoch ist teilweise eine Transformation in ein diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom möglich^{13, 27}. Klinisch zeigen sich eine oder mehrere lokalisierte erythematöse Papeln oder Plaques (Abbildung 2)²⁸. Histologisch findet sich ein dichtes lymphozytäres Infiltrat aus Zentrozyten, Zentroblasten und T-Zellen²⁹. Neoplastische Lymphozyten exprimieren B-Zell-Marker wie CD19, CD20, CD22, CD79a und PAX5 sowie BCL-6 oder CD10 als Marker für Neoplasien follikulärer B-Zellen^{29, 30}. Der Nutzen der PCR zum Nachweis von Klonalität der Zellen anhand der Immunglobulin-Ketten ist auf Grund der geringen Spezifität und Sensitivität begrenzt^{29, 31}.



Abbildung 2: Primär kutanes Follikelzentrumslymphom des Kopfes (A) und des Rückens (B) (mit freundlicher Genehmigung des College of American Pathologists) ²⁹

Der zweithäufigste Vertreter der CBCL ist das primär kutane Marginalzonen-Lymphom (PCMZL), welches mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 99 % eine äußerst gute Prognose aufweist ³². Klinisch manifestiert es sich häufig im Bereich des Körperstamms oder der Arme in Form von erythematösen bis violetten Papeln, Plaques oder Noduli ³². Bei etwa der Hälfte der Patienten bleibt es auf die Haut begrenzt ³². Histologisch zeigt sich ein noduläres oder diffuses pleomorphes Infiltrat vor allem kleiner bis mittelgroßer Marginalzonen-B-Zellen mit unregelmäßigem Zellkern sowie Lymphozyten, Lymphoplasmozyten, Plasmazellen, T-Zellen, zentroblasten- und immunoblastenartiger Zellen ^{33, 34}. Anders als das PCFCL ist das PCMZL CD10-, BCL-6- und BCL-2+, zeigt jedoch ebenfalls eine Expression klassischer B-Zell-Marker wie CD20 und CD79a ^{34, 35}. Bei 25 % der PCMZL findet sich die Translokation t(14;18) ^{34, 36}.

Eine seltenere Variante der CBCL ist das primär kutane diffus-großzellige B-Zell-Lymphom, leg-type (PCBLT), welches seinen Namen dem häufigen Befall meist beider Beine verdankt ³⁷. Dort bilden sich schnell wachsende rötliche bis lilafarbene Knoten aus ³⁷. Eine extrakutane Ausbreitung ist häufig ³⁷. Histologisch zeigt sich ein homogenes diffuses dermales Infiltrat vergrößerter B-Zellen, deren Nuklei häufig im Vergleich zu normalen B-Zellen auf das doppelte vergrößert sind ³⁸. Immunhistochemisch lassen sich typische B-Zellmarker (CD19, CD20, CD22, CD79a, PAX-5) sowie BCL-2, BCL-6, IRF4/MUM-1 und FOXP1 nachweisen ^{38, 39}. CD10 kann meist nicht nachgewiesen werden ^{38, 39}. Dieses Expressionsmuster ist jedoch nicht spezifisch für das PCBLT ^{39, 40}. Bisher konnten kaum Verbindungen zwischen dem Expressionsmuster und der Prognose hergestellt werden ^{37, 39}. Insgesamt ist die

Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 50 % eher schlecht ³⁷. Relevante Prognosefaktoren scheinen die Morphologie und das Markerexpressionsprofil der B-Zellen zu sein ⁴¹.

Tabelle 1: Kutane Lymphome nach WHO-EORTC-Klassifikation, vorläufige Bezeichnungen sind kursiv geschrieben ^{11, 12}

WHO-EORTC-Klassifikation	Häufigkeit
Kutane T-Zell-Lymphome	
Mycosis fungoides (MF)	39 %
Mycosis fungoides Varianten und Subtypen <ul style="list-style-type: none"> • Follikulotrope MF • Pagetoide Retikulose • Granulomatous slack skin 	5 %
Sézary Syndrom (SS)	2 %
Adulte T-Zell Leukämie/Lymphom	<1 %
Primär kutane CD30+ lymphoproliferative Erkrankung <ul style="list-style-type: none"> • Primär kutanes anaplastisch großzelliges Lymphom (PCALCL) • Lymphomatoide Papulose (LyP) 	20 %
Subkutanes Pannikulitis-artiges T-Zell-Lymphom (SPTCL)	1 %
Extranodales NK/T-Zell-Lymphom, nasaler Typ	<1 %
Primär kutanes peripheres T-Zell-Lymphom, seltene Subtypen <ul style="list-style-type: none"> • Primär kutanes γ/δ-T-Zell-Lymphom • Primär kutanes CD8+ aggressives epidermotropes zytotoxisches T-Zell-Lymphom • Primär kutane CD4+ klein-mittelgroßzellige T-Zell-lymphoproliferative Erkrankung • Primär kutanes akrales CD8+-T-Zell-Lymphom 	6 %
Primär kutanes peripheres T-Zell-Lymphom, nicht weiter spezifiziert (NOS)	2 %
Kutane B-Zell-Lymphome	
Primär kutanes Marginalzonen B-Zell-Lymphom (PCMZL)	9 %
Primär kutanes Follikelzentrumslymphom (PCFCL)	12 %
Primär kutanes diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom, leg type (PCBLT)	4 %
EBV-positives mukokutanes Ulkus	-
<i>EBV-positives diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom, nicht weiter spezifiziert</i>	<1 %
Primär kutanes intravaskuläres großzelliges B-Zell-Lymphom	<1 %
Hämatologische Vorläuferneoplasien	
Blastisch plasmazytoide dendritische Zellneoplasie (BPDCN)	-

1.1.2 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung der kutanen Lymphome erfolgt nach TNM-Klassifikation. Dabei ist zwischen der Einteilung der MF und SS (Tabelle 2 und Tabelle 3), welche prognostisch relevant ist, und der Einteilung der übrigen CTCL und CBCL (Tabelle 4) mit primär deskriptivem Anspruch zu unterscheiden. ¹²

Tabelle 2: ISCL / EORTC Revision der Klassifikation und Stadieneinteilung der Mycosis fungoides und des Sézary Syndroms ¹²

Kategorie	Definition
T: Haut	
T1	Makulae, Papulae und Plaques ≤ 10 % der Hautoberfläche a) Makulae b) Plaques ± Makulae
T2	Makulae, Papulae und Plaques ≥ 10 % der Hautoberfläche a) Makulae, b) Plaques ± Makulae
T3	Ein oder mehrere Tumore (> 1 cm)
T4	Erythrodermie (> 80 % Körperoberfläche)
N: Lymphknoten	
N0	Keine Lymphknoten palpabel
N1	Palpable Lymphknoten; histologisch kein Anhalt für CTCL (NCILN ₀₋₂) a) Klon negativ b) Klon positiv
N2	Palpable Lymphknoten; histologisch geringe Infiltrate eines T-Zell-Lymphoms (NCILN ₃) a) Klon negativ b) Klon positiv
N3	Palpable Lymphknoten; histologisch ausgedehnte Infiltrate eines T-Zell-Lymphoms (NCILN ₄), Klon positiv oder negativ
Nx	Klinisch abnormale Lymphknoten, keine histologische Bestätigung
B: Peripheres Blut	
B0	< 250 CD4+CD7- oder CD4+CD26- T-Lymphozyten/µl
B1	250 bis < 1000 CD4+CD7- oder CD4+CD26- T-Lymphozyten/µl
B2	≥ 1000 CD4+CD7- oder CD4+CD26- T-Lymphozyten/µl mit identer klonaler T-Zellrezeptor-Genumlagerung des Hautklons

M: Viszerale Organe	
M0	Keine Beteiligung viszeraler Organe
M1	Histologisch gesicherte viszerale Beteiligung mit Organspezifizierung

Tabelle 3: Klinische Stadieneinteilung der MF und des SS ¹²

ISCL / EORTC 2007				
	T	N	M	B
IA	1	0	0	0, 1
IB	2	0	0	0, 1
IIA	1-2	1-2	0	0, 1
IIB	3	0-2	0	0, 1
IIIA	4	0-2	0	0
IIIB	4	0-2	0	1
IVA₁	1-4	0-2	0	2
IVA₂	1-4	3	0	0-2
IVB	1-4	0-3	1	0-2

Tabelle 4: ISCL/EORTC Vorschlag zur TNM-Klassifikation anderer kutaner Lymphome als MF und SS ¹²

Kategorie	Definition
T: Haut	
T1	Solitäre Hautbeteiligung a) solitäre Läsion < 5 cm Durchmesser b) solitäre Läsion > 5 cm Durchmesser
T2	Regionäre Hautbeteiligung multipler Hautläsionen begrenzt auf eine Körperregion oder zwei zusammenhängende Körperregionen a) Befall begrenzt auf < 15 cm Durchmesser b) Befall zwischen 15-30 cm Durchmesser c) Befall > 30 cm Durchmesser
T3	Generalisierte Hautbeteiligung a) multiple Hautläsionen verteilt auf 2 nicht zusammenhängende Körperregionen b) multiple Hautläsionen ≥ 3 Körperregionen

N: Lymphknoten	
N0	Keine klinische und pathologische LK-Beteiligung
N1	Beteiligung einer peripheren LK-Region, die zum Abflussgebiet der laufenden und/oder früheren Hautbeteiligung zählt
N2	Beteiligung von 2 oder mehr peripheren LK-Regionen oder Beteiligung anderer LK-Regionen, die nicht im Abflussgebiet der Hautbeteiligung liegen
N3	Beteiligung zentraler Lymphknoten
M: Viszerale Organe	
M0	Keine Evidenz für extrakutane Beteiligung
M1	Extrakutane Organbeteiligung, außer Lymphknoten

1.2 Pathophysiologie

Ein umfassendes Verständnis der Pathophysiologie kutaner Lymphome ist sowohl für die Etablierung diagnostischer Marker als auch für die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien von essentieller Bedeutung. Momentan liegen vor allem Erkenntnisse zu pathophysiologischen Veränderungen der MF und des SS vor. Zusammenfassend betreffen diese neben Kontrollmechanismen des Zellzyklus, DNA-Reparaturmechanismen und Mechanismen der Chromatinmodifikation vor allem vier Signalwege: Den JAK-STAT-Signalweg, den T-Zell-Rezeptorsignalweg, den MAP-Kinase-Signalweg (MAPK-Signalweg) und den NF- κ B-Signalweg.⁴²⁻⁴⁸

Die Erkenntnisse zur Pathophysiologie beruhen momentan in großen Teilen auf der Analyse genetischer Veränderungen und sind in vielen Fällen noch nicht ausreichend auf der Ebene der Proteinexpression überprüft worden. Untersuchungen zu pathophysiologischen Veränderungen des PCALCL und der CBCL sind zudem deutlich weniger weit fortgeschritten, weshalb die Relevanz der vier Signalwege für diese Entitäten möglicherweise anders gewichtet werden muss. Allen kutanen Lymphomentitäten gemeinsam sind jedoch Veränderungen, die in unterschiedlicher Ausprägung und teils über Wechselwirkungen mit der Tumormikroumgebung zur Apoptosevermeidung und gesteigerten Zellteilung führen. Abbildung 3 gibt einen vereinfachten Überblick darüber, wie die verschiedenen Signalwege, die zum einen für die Regulation der Immunantwort und zum anderen für die Regulation von Apoptose

und Proliferation verantwortlich sind, miteinander interagieren und sich gegenseitig beeinflussen. Zu beachten ist dabei besonders, dass bereits physiologisch die Immunantwort selbstverstärkenden Effekten unterliegt, welche Lymphomzellen direkt oder indirekt in Interaktion mit der Tumormikroumgebung nutzen können. Abbildung 3 zeigt die Interaktionen der Signalwege in T-Zellen. Grundsätzlich verhalten sich diese Interaktionen jedoch in B-Zellen ähnlich, wobei der B-Zell-Rezeptorsignalweg vereinfacht analog zum T-Zell-Rezeptorsignalweg gesehen werden kann. ^{42-44, 49, 50}

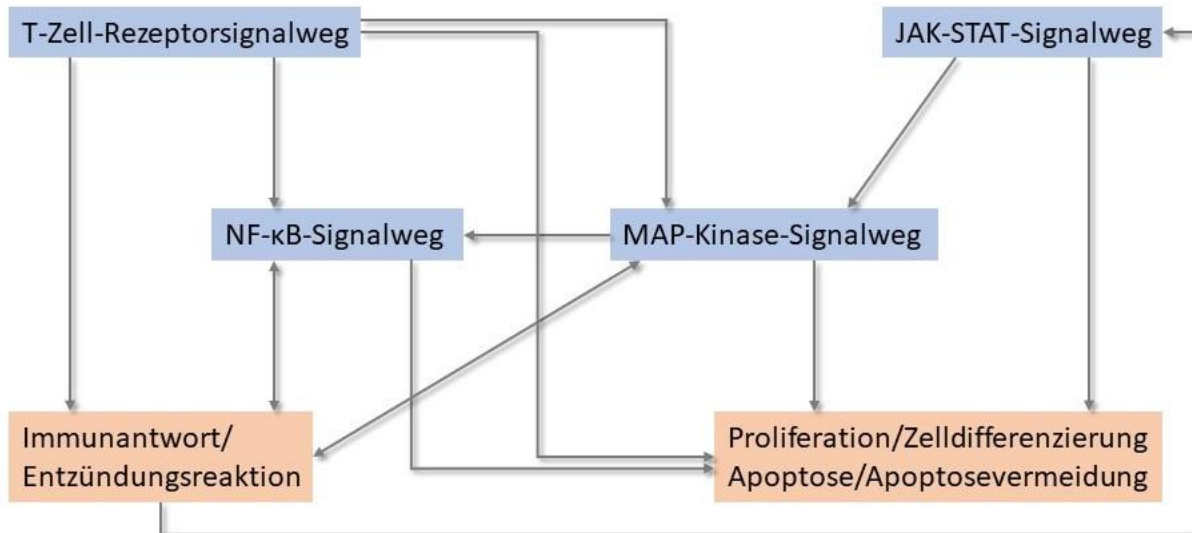


Abbildung 3: Vereinfachte Übersicht der für die Pathophysiologie der kutanen T-Zell-Lymphome besonders relevanten Signalwege (die Pfeile veranschaulichen gegenseitige Beeinflussungen) ^{42-44, 49}

1.2.1 JAK-STAT-Signalweg

Der JAK-STAT-Signalweg ist an der Regulation einer Vielzahl von Prozessen wie zum Beispiel der Hämatopoese, der Immunantwort, dem Ersatz beschädigten Gewebes und der Apoptose beteiligt. Isoliert betrachtet führt die Bindung von Zytokinen und anderen Liganden zur Aktivierung rezeptorgebundener Janus-Kinasen (JAK), wodurch die Phosphorylierung von Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) im Zytoplasma getriggert wird. Diese dimerisieren und treten in den Zellkern ein, um dort die Transkription zum Beispiel von Chemokinen, cyclin-abhängigen Kinasen und Wachstumsfaktoren zu induzieren. ⁵¹

Physiologisch spielt der JAK-STAT-Signalweg eine wichtige Rolle für die Stimulation von T-Zellen durch Zytokine. Für MF, SS und PCALCL zeigen sich Hinweise auf Dysregulationen des Signalwegs. So scheint es in einigen Fällen zu einer konstitutiven

Phosphorylierung von JAK2, STAT3 und STAT5B zu kommen, ebenso werden aktivierende Mutationen von JAK1, JAK2, JAK3, STAT3, STAT5B und STAT6 beschrieben. Es ist naheliegend, dass diese Veränderungen einen relevanten Mechanismus für den Erhalt und die Proliferation der malignen CTCL-Zellen darstellen. Ebenso könnte so die weitere Differenzierung der Tumorzellen beeinflusst werden, da der Signalweg physiologisch unter anderem für die Differenzierung zu T-Helferzellen mitverantwortlich ist. ^{42, 44, 52, 53}

Für CBCL fehlen zum aktuellen Zeitpunkt Untersuchungen des JAK-STAT-Signalwegs. Mutationen des Signalwegs konnten jedoch bei nicht kutanen B-Zell-Lymphomen nachgewiesen werden ⁵⁴.

Die Veränderungen des Signalwegs sind als therapeutischer Angriffspunkt unter anderem für JAK-Inhibitoren wie Tofacitinib und Ruxolitinib relevant, die *in vitro* bei CTCL-Zellen mit entsprechenden Mutationen bereits effektiv eingesetzt wurden ^{44, 55}.

1.2.2 T-Zell-Rezeptorsignalweg

Physiologisch dient der T-Zell-Rezeptor zum Aufbau der Verbindung zwischen antigenpräsentierender Zelle und T-Zelle. Über den T-Zell-Rezeptorsignalweg werden eine Vielzahl von weiteren Signalwegen wie zum Beispiel der NF- κ B-Signalweg und der MAPK-Signalweg aktiviert. Diese führen zur Proliferation und Differenzierung der T-Zelle, sichern ihr Überleben und steuern unter anderem die für die Immunantwort relevante Transkription von Zytokinen. ^{56, 57}

Der Nachweis von T-Zell-Klonalität ist ein entscheidendes Indiz für das Vorliegen eines CTCL und insofern ein wichtiger diagnostischer Marker ⁸. Über den T-Zell-Rezeptorsignalweg können kaskadenartig eine Vielzahl von für die Apoptosevermeidung und Zellproliferation relevanten Mechanismen aktiviert werden. Es ist somit naheliegend, dass die maligne T-Zelle sich eben jener Mechanismen bedient und der T-Zell-Rezeptorsignalweg von Bedeutung für die Pathophysiologie der CTCL ist. Genetische Veränderungen, die den Signalweg betreffen, zeigen sich für kostimulierende Moleküle wie CD28 und CTLA4 sowie mit dem Rezeptor assoziierte Enzyme wie PLC γ . Zusätzlich ist eine Aktivierung des Signalweges über dendritische Zellen und Makrophagen in der Tumormikroumgebung möglich. Die damit verbundene

konstitutive Aktivierung der abhängigen Signalwege sichert das Überleben der malignen Zelle und fördert ihre Apoptoseresistenz. ^{43, 44, 53, 57, 58}

Denkbar wäre eine therapeutische Nutzung dieser Veränderungen über Checkpoint-Inhibitoren, welche sich jedoch bislang bei kutanen Lymphomen als wenig aussichtsreich zeigten. Darüber hinaus bieten die nachgeschalteten Signalwege ebenfalls therapeutische Ansatzpunkte. ⁵⁹

1.2.3 MAP-Kinase-Signalweg

Im MAPK-Signalweg werden zur Regulation der Zellproliferation, des Zelltodes und der Differenzierung von Zellen über eine Kaskade mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) aktiviert. MAPK können in drei Gruppen unterteilt werden: ERKs, JNKs und p38/SAPKs. Je nach MAPK erfolgt die Aktivierung unter anderem über Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Umwelteinflüsse wie oxidativen Stress und Strahlung. ⁶⁰

Bei MF und SS Patienten zeigen sich in einigen Fällen aktivierende Mutationen in den für den Signalweg relevanten Genen KRAS, NRAS, BRAF, NF1, MAP2K1 und MAPK1 sowie Deletionen des Transkriptionsfaktors E2A, die zu einer gesteigerten Aktivierung des Signalwegs führen ^{44, 53, 61}. Neben der damit einhergehenden Steigerung der Zellproliferation und der Vermeidung des Zelltods, konnte bei Sézary Zellen eine Rolle des Signalwegs bei der Induktion von Fut7, welches für die Migration der malignen Zellen in die Haut benötigt wird, nachgewiesen werden ^{44, 53, 61}. Auch in PCALCL Zellen konnte eine gesteigerte Aktivierung des Signalwegs beobachtet werden, die sich potentiell als therapeutischer Angriffspunkt eignet ⁶². Inwieweit eine gesteigerte Aktivierung des Signalwegs eine Rolle bei der Pathophysiologie der CBCL spielt, lässt sich aktuell nicht sagen.

Die therapeutische Relevanz des Signalwegs ist jedoch offenkundig, da eine Vielzahl von Inhibitoren des MAPK-Signalwegs bereits bei anderen Tumoren wie Melanomen erfolgreich eingesetzt werden ^{53, 63}. Kiessling et al. setzten den Multikinase-Inhibitor Sorafenib *in vitro* erfolgreich bei NRAS-mutierten CTCL Zelllinien ein ⁶⁴.

1.2.4 NF- κ B-Signalweg

NF- κ B bezeichnet eine Familie aus dimeren Transkriptionsfaktoren, die zentral an der Koordination von Entzündungsprozessen, der Immunabwehr, der Zelldifferenzierung und -proliferation sowie dem Überleben von Zellen beteiligt sind. Diese Transkriptionsfaktoren werden über den kanonischen und nicht-kanonischen NF- κ B-Signalweg reguliert, der wiederum durch zahlreiche weitere Signalwege wie zum Beispiel den T-Zell-Rezeptorsignalweg, den TNF-Rezeptorsignalweg, den Toll-like-Rezeptorsignalweg und den Interleukin-Rezeptorsignalweg (IL-Rezeptorsignalweg) beeinflusst wird.⁶⁵

Eine gesteigerte Aktivierung des Signalwegs, welche zentral für die Proliferation und das Überleben der Lymphomzellen ist, konnte sowohl in CTCL als auch CBCL beobachtet werden, wobei neben Mutationen im Signalweg selbst die Tumormikroumgebung und die Aktivierung durch vorgeschaltete Signalwege wie den T- und B-Zell-Rezeptorsignalweg eine Rolle spielen^{66, 67}. Zur gesteigerten Aktivierung kommt es in PCBLT unter anderem auf Grund von Mutationen von TBL1XR1, MYD88, A20, CD79B und CARD11^{66, 68}. Auch bei MF und SS Patienten zeigten sich aktivierende Mutationen in CARD11, dem Bindeglied zwischen dem T- bzw. B-Zell-Rezeptorsignalweg und dem NF- κ B-Signalweg⁶⁷⁻⁶⁹. Zusätzlich sind bei MF und SS relevante Veränderungen von TNFR2 und A20 sowie eine Deletion des C-Terminus von NFKB2, die zu einem Verlust der inhibitorischen Domäne führt, beschrieben⁶⁷⁻⁶⁹. Eine vermehrte Aktivierung des NF- κ B Signalwegs liegt ebenso bei PCALCL vor, welche unter anderem durch die gesteigerte Expression von CD30 über TRAFs vermittelt wird⁷⁰. PCMZL und PCFCL sind bezogen auf ihre Pathophysiologie deutlich schlechter untersucht. Bei PCMZL wäre jedoch eine Beeinflussung des Signalwegs auf Grund der Überexpression von MALT1 denkbar^{50, 53}.

Als zentraler Signalweg in zahlreichen malignen Erkrankungen und auf Grund der Häufigkeit von Mutationen des Signalwegs in kutanen Lymphomen eignet sich der NF- κ B Signalweg besonders als Ziel für targeted therapies. Für Bortezomib, das den Abbau von I κ B α verhindert, konnten bereits deutliche Erfolge für CTCL Patienten verzeichnet werden. Ebenso wiesen Nicolay et al. für Dimethylfumarat, das NF- κ B hemmt, ein hohes therapeutisches Potential in CTCL *in vitro* und *in vivo* nach.^{50, 67, 71}

1.2.5 B-Zell-Rezeptorsignalweg

Wie der T-Zell-Rezeptor beeinflusst der B-Zell-Rezeptor nach Bindung an ein spezifisches Antigen über den B-Zell-Rezeptorsignalweg eine Vielzahl weiterer Signalwege. In malignen Zellen fungiert der B-Zell-Rezeptor ähnlich wie in gesunden Zellen und fördert dadurch das Überleben und die Proliferation der Zelle.⁷²

Ebenso wie bei CTCL ist es bei CBCL naheliegend, dass die Interaktion des Rezeptors mit der Tumormikroumgebung das Überleben der malignen Zellen fördert. Diese Mechanismen sind allerdings - ebenso wie Veränderungen im Signalweg selbst - bei CBCL bisher nur lückenhaft untersucht. In PCFCL kommt es beispielsweise in einigen Fällen zu einer Glykosylierung des B-Zell-Rezeptors, welche vermutlich über eine Aktivierung durch Lektine in der Tumormikroumgebung die Zellproliferation anregt⁷³. Zudem zeigen sich in PCMZL und PCFCL somatische Hypermutationen, die die Affinität von Antigenen zum B-Zell-Rezeptor beeinflussen⁵⁰. Dadurch könnte vergleichbar mit anderen B-Zell-Lymphomentitäten eine chronische Stimulation des Rezeptors ermöglicht werden⁷⁴. In PCBLT Proben konnten für den B-Zell-Rezeptorsignalweg relevante Mutationen unter anderem in CD79A/B und CARD11, worüber der NF- κ B Signalweg aktiviert wird, nachgewiesen werden⁷⁴.

Die therapeutische Relevanz des Signalwegs zeigt sich beispielhaft in ersten Erfolgen bei Behandlung von PCBLT Patienten mit dem Brutontyrosinkinaseinhibitor Ibrutinib, der die Aktivierung des B-Zell-Rezeptorsignalwegs bei Patienten mit CD79B und MYD88 Mutationen unterbrechen kann⁷⁵. Neben direkter therapeutischer Beeinflussung des Signalwegs wären zudem Ansätze denkbar, die die Tumormikroumgebung verändern und so die Aktivierung des B-Zell-Rezeptors verhindern⁷⁴.

1.3 Therapie

Grundsätzlich erfolgt die bisherige Therapie kutaner Lymphome basierend auf Diagnose und Stadium unter Berücksichtigung von Prognose und Vorbehandlung¹². CTCL wie die MF werden in frühen Stadien mit topischen Steroiden, Phototherapie und lokal applizierten Zytostatika oder Immuntherapeutika behandelt^{5,12}. Systemische Therapieverfahren wie Retinoide, Interferon- α , Bexaroten, Histondeacetylase-Inhibitoren oder Chemotherapeutika wie Gemcitabin kommen vor allem in späteren

Stadien und bei SS häufig in Kombination mit lokalen Therapien zum Einsatz ^{5, 12}. Exzision (zum Beispiel bei PCALCL) und Radiotherapie können Teil der Therapie sein ¹².

Bei indolenten CBCL ist watchful waiting möglich ^{12, 76}. Weitere Therapieoptionen sind Exzision, Radiotherapie und die Behandlung mittels intraläsionaler Applikation von Rituximab, Interferon- α oder Steroiden ^{12, 76}. Die Therapie des PCBLT orientiert sich an der des systemischen diffus-großzelligen Lymphoms und beinhaltet dementsprechend modifizierte Polychemotherapieschemata wie R-CHOP (R=Rituximab, C=Cyclophosphamid, H=Doxorubicin, O=Vincristin, P=Prednison) mit oder ohne Bestrahlung ⁷⁶.

Weiterhin steht die stetige Weiterentwicklung individueller, zielgerichteter und nebenwirkungsarmer Therapien im Fokus aktueller Forschung. Erkenntnisse über die Pathophysiologie und Veränderungen in den verschiedenen Signalwegen ermöglichen wie bereits beschrieben ein gezielteres und individuelleres therapeutisches Eingreifen.

1.4 Theoretischer Hintergrund zur Auswahl der Marker

Zum verbesserten Verständnis der Pathophysiologie und zur Identifikation diagnostischer Marker und therapeutischer Angriffspunkte wurden elf Marker ausgewählt, die im Folgenden vorgestellt werden. Die Marker CD4, CD8, CD30, CD20 und CD79a dienen vor allem zu der Unterscheidung verschiedener Zelltypen. PD-L1 und PD-1 sind für den T-Zell-Rezeptorsignalweg und die Interaktion mit der Tumormikroumgebung bedeutsam. P-STAT3 und indirekt auch BCL-2 können dem JAK-STAT-Signalweg zugeordnet werden, während p-MEK und p-ERK den MAPK-Signalweg abbilden. Abbildung 4 zeigt die Einordnung der Marker in die Signalwege.

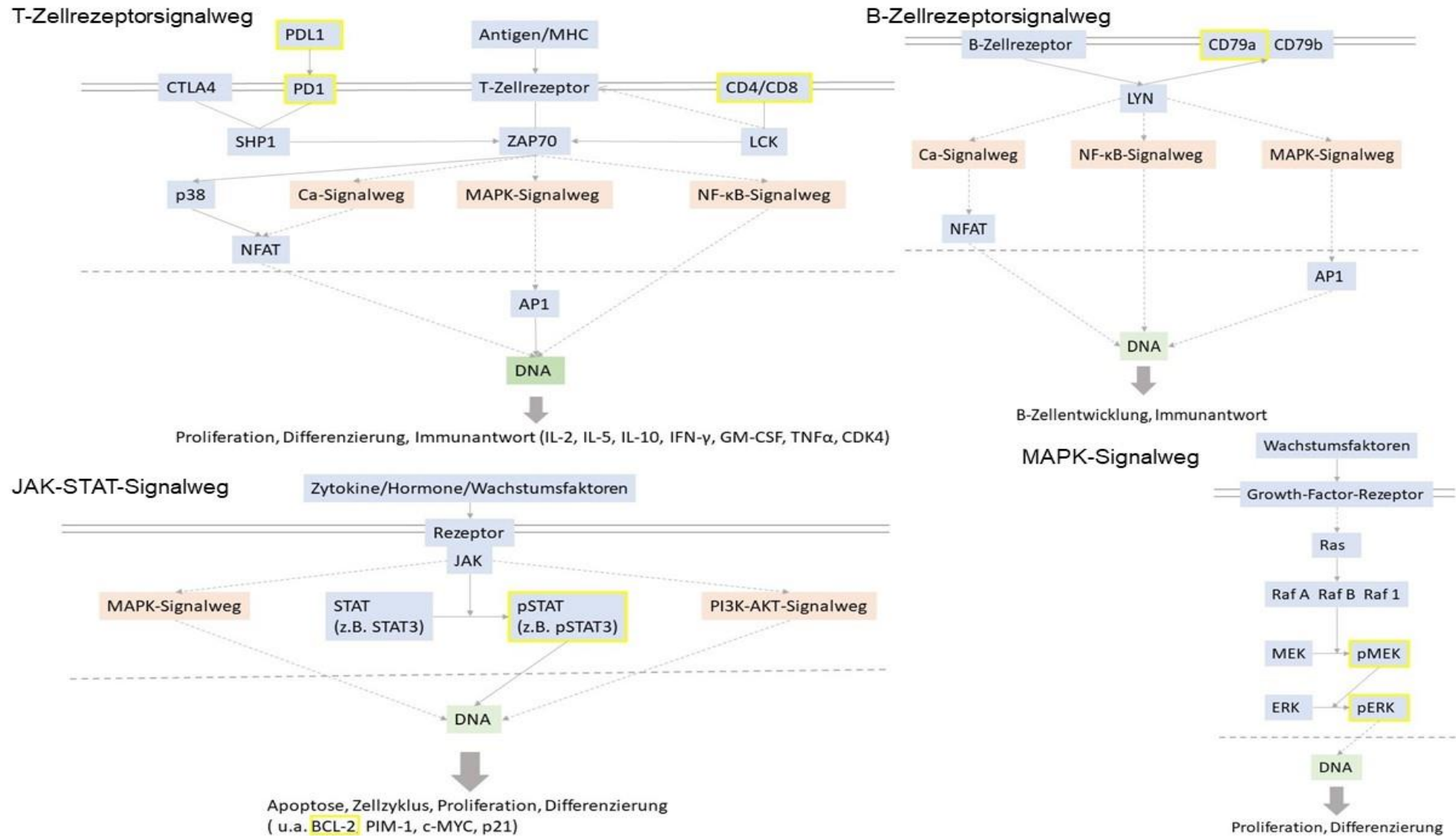


Abbildung 4: Einordnung der untersuchten Marker in die bei kutanen Lymphomen häufig veränderten Signalwege ⁴⁹ (MHC=major histocompatibility complex, Ca-Signalweg=Calciumsignalweg, MAPK-Signalweg=MAP-Kinase-Signalweg, JAK=Januskinase, STAT=Signal Transducers and Activators of Transcription, PI3K-AKT-Signalweg=Phosphoinositid-3-Kinase-Akt-Signalweg)

1.4.1 CD4

Als Korezeptor zum T-Zell-Rezeptor bindet CD4 an Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) und ermöglicht die Rekrutierung von Lck in den T-Zell-Rezeptorkomplex (Abbildung 4). Zudem ist CD4 Oberflächenmarker der T-Helferzellen, weshalb seine Färbung im Rahmen dieser Arbeit zu deren Identifikation dient.⁵⁶

Als Oberflächenmarker der T-Helferzelle findet sich CD4 typischerweise auf malignen Zellen der MF, des SS und des PCALCL, jedoch nicht auf malignen Zellen der CBCL. Bedeutsam ist CD4 unter anderem in der Diagnostik des SS als Teil des bei diesen Patienten im Blut gesteigerten CD4/CD8-Quotienten. In Hautbiopsien von MF Patienten sieht man häufig ebenfalls eine Verschiebung des Verhältnisses CD4+ zu CD8+ Zellen zugunsten der CD4+ Zellen. Interessant ist die Betrachtung von CD4 in CBCL Proben insofern, da sie Aussagen über das Vorkommen von T-Helferzellen in der Tumormikroumgebung ermöglicht. Denkbar wäre eine Interaktion dieser T-Zellen, welche potentiell einer therapeutischen Beeinflussung zugänglich wäre, mit den malignen B-Zellen der CBCL.^{8, 11, 77}

1.4.2 CD8

Analog zu CD4 auf T-Helferzellen bindet CD8 bei der Antigenpräsentation an MHC und ermöglicht die Relokalisation von Lck in den T-Zell-Rezeptorkomplex. Der Vollständigkeit halber und da CD8 bei einigen seltenen Formen der CTCL tatsächlich auf malignen Zellen exprimiert wird, ist dies in Abbildung 4 dargestellt. In der Mehrheit der Fälle zeigen jedoch weder maligne Zellen der CTCL noch maligne Zellen der CBCL eine CD8 Expression. CD8 ist Marker zytotoxischer T-Zellen und insofern zur Identifikation dieser Zellen in der Tumormikroumgebung relevant. Denkbar wäre eine Immunantwort zytotoxischer T-Zellen gegen Tumorzellen oder eine anderweitig geartete Interaktion mit den malignen Zellen. Dies kann als therapeutischer Angriffspunkt dienen zum Beispiel über den Einsatz von Immune-Checkpoint-Inhibitoren.^{11, 56, 78}

1.4.3 CD30

CD30 wurde vor allem als Oberflächenmarker der malignen Zellen des PCALC angefärbt. Physiologisch wird CD30 auf verschiedenen Immunzellen vor allem aber auf aktivierten B- und T-Lymphozyten exprimiert⁷⁹. Die Funktion des Rezeptors, welcher durch die Bindung von CD30L aktiviert wird, ist nicht vollständig geklärt und variiert nach Zelltyp und nach Umständen der Aktivierung⁷⁹. Dabei kommt es sowohl zu Signalen, die das Überleben der Zelle fördern, als auch zur Einleitung von Apoptose⁷⁹. Neben der typischen Expression auf malignen Zellen des PCALCL konnte CD30 in einigen Fällen auf malignen Zellen der übrigen kutanen Lymphome nachgewiesen werden^{23, 80, 81}. Angaben zur Häufigkeit solcher CD30+ Subtypen variieren jedoch und insbesondere bei CBCL beschränkt sich die aktuelle Literatur auf Einzelfallbeschreibungen⁸⁰⁻⁸². Neben der diagnostischen Relevanz für PCALCL ist CD30 als Angriffspunkt von Brentuximab Vedotin therapeutisch relevant⁸³. Brentuximab Vedotin wird bereits zur Therapie des PCALCL eingesetzt. Darüber hinaus zeigten sich in klinischen Studien Erfolge in der Therapie von MF und SS Patienten⁸³.

1.4.4 CD20

Physiologisch wird das Oberflächenprotein CD20 auf B-Zellen exprimiert und wird dementsprechend zur Unterscheidung zwischen B- und T-Zell-Lymphomen genutzt⁵⁰. Sehr vereinzelt sind Fälle von CD20+ T-Zellen in MF Läsionen beschrieben worden^{84, 85}. In CTCL können über die Färbung von CD20 jedoch vor allem B-Lymphozyten als Teil der Tumormikroumgebung identifiziert werden⁸⁴. Die therapeutische und pathophysiologische Relevanz dieser B-Lymphozyten wurde bislang nicht untersucht. Bei Melanomen und Sarkomen ergeben sich zunehmend Hinweise darauf, dass die Dichte und Art der umgebenden B-Zellen sowohl therapeutischen Einflüssen zugänglich als auch prognostisch relevant ist^{86, 87}. Da CD20 regelhaft auf Zellen der CBCL exprimiert wird, stehen Rituximab und weitere klonale Antikörper zur gezielten Therapie zur Verfügung^{50, 88}. Darüber hinaus ist CD20 ein mögliches Target für CAR-T-Zellen⁸⁹.

1.4.5 CD79a

CD79a bildet gemeinsam mit CD79b ein Heterodimer auf der Oberfläche von B-Lymphozyten. Der Komplex ist am B-Zell-Rezeptorsignalweg beteiligt, indem er bei Aktivierung des B-Zell-Rezeptors weitere Signalkaskaden im Zytoplasma anstößt (Abbildung 4)⁹⁰. Als B-Zell-Marker findet sich CD79a auf malignen Zellen der CBCL wie PCFCL, PCMZL und PCBLT und ist für deren Unterscheidung von CTCL diagnostisch relevant^{11, 50}. Interessant ist die Expression von CD79a als B-Zell-Marker zudem in Läsionen der CTCL, da sie wie CD20 Auskunft über das Vorkommen von B-Lymphozyten in der Tumormikroumgebung gibt.

1.4.6 PD-1 und PD-L1

PD-1 wirkt physiologisch bei Bindung von PD-L1 hemmend auf die Immunantwort, indem beispielsweise über Beeinflussung des T-Zell-Rezeptorsignalwegs die Proliferation ebenso wie die Aktivierung und Zytokinausschüttung der T-Zellen gehemmt wird (Abbildung 4)^{91, 92}. Dies führt schließlich zum Zelltod⁹². PD-1 wird auf aktivierten T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und Monozyten exprimiert. PD-L1 findet sich überwiegend auf Makrophagen sowie teilweise auf aktivierten T- und B-Zellen⁹¹. Maligne Zellen hemmen durch die Expression von PD-L1 in vielen Fällen die gegen sie gerichtete Immunantwort⁹¹.

Da kutane Lymphome auf T- und B-Lymphozyten zurückgehen, exprimieren sowohl maligne Zellen als auch Zellen der Tumormikroumgebung teilweise PD-1 und PD-L1^{8, 93-97}. PD-1 konnte bisher auf malignen Zellen der MF, des SS, jedoch nicht auf Zellen des PCALCL und der CBCL nachgewiesen werden^{8, 93, 94}. MF, SS und PCALCL zeigten ebenso wie PCBLT in einigen Fällen PD-L1 auf malignen Zellen; zu PCFCL und PCMZL fehlen bislang entsprechende Untersuchungen⁹⁵⁻⁹⁷. Die Expression von PD-1 und PD-L1 ist diagnostisch, therapeutisch und pathophysiologisch interessant. PD-1 kommt als diagnostischer Marker zur Unterscheidung von MF, SS und PCALCL in Frage, da sich Hinweise auf eine unterschiedliche Ausprägung der Expression ergeben⁹³. Zudem ist die Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 therapeutisch durch Immuncheckpoint-Inhibitoren wie Pembrolizumab nutzbar⁹⁸. Die pathophysiologische Einordnung von PD-1 und PD-L1 gestaltet sich bei kutanen Lymphomen insbesondere deshalb schwierig, da die malignen Zellen aus Immunzellen hervorgehen und somit neben PD-L1 teilweise auch

PD-1 exprimieren. Die Rolle von PD-1 für die maligne Zelle und für ihre Interaktion mit der Tumormikroumgebung ist jedoch bislang unklar.

1.4.7 p-STAT3

Über verschiedene Rezeptoren, die vor allem durch Zytokine aktiviert werden, kommt es über JAK zur Phosphorylierung von STAT3 und dessen Eintritt in den Zellkern (Abbildung 4)⁹⁹. Dort wirkt p-STAT3 als Transkriptionsfaktor zahlreicher Gene, welche die Proliferation und das Überleben der Zelle fördern sowie verschiedene Zytokine exprimieren⁹⁹.

Für MF und SS konnte mehrfach eine gesteigerte Aktivierung von STAT3 nachgewiesen werden, während sich für PCALCL nur vereinzelt Untersuchungen finden, die auf eine gesteigerte Expression in malignen Zellen hindeuten^{53, 100}. Keinerlei Untersuchungen finden sich zur Aktivität von STAT3 in CBCL. Die Aktivität von STAT3 ist sowohl diagnostisch als auch therapeutisch interessant. Da insbesondere für Sézary Patienten die konstitutive Aktivierung mehrfach nachgewiesen wurde, während die gesteigerte Aktivität bei MF sich eher auf fortgeschrittene Stadien beschränkte, könnte es sich um einen potentiellen Marker zur Unterscheidung der beiden Erkrankungen in frühen Stadien handeln^{53, 100}. Gleichzeitig existieren mit JAK- und STAT-Inhibitoren therapeutische Ansätze zur Hemmung des Signalwegs¹⁰¹. Da p-STAT3 bisher in CBCL kaum untersucht wurde, ist es zudem von Interesse, inwieweit sich hier Unterschiede mit diagnostischer Relevanz ergeben oder neue Hinweise auf die pathophysiologische Bedeutung des JAK-STAT-Signalwegs in CBCL gewonnen werden können, da dieser in zahlreichen malignen Erkrankungen das Überleben der Tumorzelle fördert⁹⁹.

1.4.8 BCL-2

BCL-2 wurde initial in B-Zell-Lymphomen nachgewiesen¹⁰². Dort geht seine Expression auf die Translokation zwischen Chromosom 14 und 18 zurück¹⁰². Während vor allem in PCBLT ebenfalls t(14;18) Translokationen nachgewiesen wurden, scheint die gesteigerte Expression in CTCL unter anderem auf eine vermehrte Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs zurückzugehen (Abbildung 4)^{103, 104}. BCL-2 wirkt anti-apoptotisch und sichert so das Überleben der malignen Zelle¹⁰².

Die gesteigerte Expression von BCL-2 ist für PCBLT und PCMZL mehrfach nachgewiesen worden ^{104, 105}. Unter PCFCL kommen sowohl BCL-2+ als auch BCL-2- Fälle vor, wobei die BCL-2- Fälle eher überwiegen ^{104, 105}. Die Aussagen zur Expression in CTCL sind heterogen. Einerseits konnten zahlreiche Fälle von gesteigerter Expression in CTCL nachgewiesen werden und entsprechende Zellreihen sprechen auf Therapien mit BCL-2 Inhibitoren an; andererseits zeigten sich Fälle mit fehlender oder reduzierter Expression von BCL-2 ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Die Möglichkeit des gezielten Angriffs maligner Zellen durch BCL-2 Inhibitoren wie zum Beispiel Venetoclax zeigt den therapeutischen Nutzen eines besseren Verständnisses der BCL-2 Expression und der pathophysiologischen Bedeutung des Proteins für kutane Lymphome ^{106, 109, 110}.

1.4.9 p-MEK und p-ERK

Im MAPK-Signalweg interagiert bei Aktivierung Raf mit MEK, sodass MEK zu p-MEK phosphoryliert wird und wiederum ERK zu p-ERK phosphoryliert, woraufhin p-ERK aus dem Zytoplasma in den Zellkern übergeht (Abbildung 4) ¹¹¹. Der MAPK-Signalweg spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zelle ¹¹¹. In zahlreichen malignen Erkrankungen kommt es zu einer Dysregulation und gesteigerten Aktivierung des Signalwegs ¹¹¹.

Die zentralen Marker des Signalwegs p-MEK und p-ERK wurden bislang nur vereinzelt im Zusammenhang mit kutanen Lymphomen betrachtet. In CTCL konnten teilweise Mutationen des Signalwegs nachgewiesen werden, die zu einer gesteigerten Aktivität beitragen können ¹¹²⁻¹¹⁵. Zudem wird eine gesteigerte Aktivierung des MAPK-Signalwegs hinter Resistenzen gegen Histondeacetylaseinhibitoren in CTCL vermutet ⁶³. Die Hemmung des Signalwegs durch verschiedene Therapien, welche mit einer messbaren Reduktion der Aktivierung von ERK einhergeht, führt zur Apoptose maligner MF- und SS-Zellen ^{116, 117}. Für MF, SS und PCALCL ergeben sich somit Hinweise auf eine vermehrte Aktivierung von MEK und ERK ¹¹²⁻¹¹⁹. Ein tatsächlicher immunhistochemischer Nachweis der gesteigerten Expression von p-ERK im Nukleus erfolgte bisher jedoch nur für SS ¹¹⁸. Für die hier untersuchten CBCL fehlen Aussagen, inwieweit MEK und ERK verstärkt aktiviert werden.

Die Färbung von MEK und ERK erfolgt in dieser Arbeit dementsprechend einerseits, um zu prüfen inwieweit sich einer oder beide Marker diagnostisch zur Unterscheidung der verschiedenen Entitäten heranziehen lassen. Andererseits, um Hinweise auf die pathophysiologische Relevanz des MAPK-Signalwegs in kutanen Lymphomen zu gewinnen. Erste therapeutische Erfolge, die für die Anwendbarkeit solcher Erkenntnisse sprechen, konnten durch Hemmung des Signalwegs in Sézary Zelllinien beispielsweise mit dem Multikinase-Inhibitor Sorafenib bereits erzielt werden ⁶⁴.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Insgesamt ist davon auszugehen, dass momentan nur ein kleiner Anteil der diagnostisch und therapeutisch relevanten Veränderungen der Proteinexpression in kutanen Lymphomen identifiziert werden konnte. Da die Untersuchung großer Probenzahlen mittels Immunhistochemie mit hohem Zeitaufwand verbunden ist, beschränken sich viele Aussagen auf genetische Veränderungen. Der Schlüssel zu innovativen, zielgerichteten und nebenwirkungsarmen Therapieansätzen liegt jedoch in einem möglichst genauen Verständnis der Veränderungen auf Proteinebene. Tissue-Microarrays (TMAs) ermöglichen die effiziente immunhistochemische Analyse großer Probenzahlen. Sie werden momentan zur Analyse kutaner Lymphome kaum genutzt. Ziel der Arbeit ist die Generierung eines TMA sowie die Evaluierung dessen diagnostischer Relevanz und Validität. Unter Verwendung des TMA wird folgenden Fragen nachgegangen:

- 1) Können weitere diagnostisch und therapeutisch relevante Marker identifiziert werden?
- 2) Lassen sich neue Erkenntnisse zu relevanten Signalketten und somit zur Pathophysiologie kutaner Lymphome gewinnen?
- 3) Lassen sich Erkenntnisse, die durch Untersuchungen von Zelllinien gewonnen wurden, in Patientenproben bestätigen?
- 4) Lassen sich die durch genetische Analysen auf DNA- und RNA-Ebene gewonnenen Erkenntnisse auch auf Proteinebene bestätigen?
(Vergleich unserer Ergebnisse mit der Literatur)

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Verwendete Proben

Zur Untersuchung wurden 121 Patientenproben aus dem pathologischen Archiv der Universitätsmedizin Mannheim verwendet. Hierbei handelte es sich um in Paraffin eingelagerte Hautproben von 57 Patienten aus den Jahren 2000 bis 2016. Entsprechend der WHO-EORTC-Klassifikation waren darunter 30 Patienten mit CTCL und 27 Patienten mit CBCL ¹². Eine detaillierte Aufstellung des Patientenkollektivs findet sich im Ergebnisteil (3.1). Die entsprechenden Patienten wurden anhand der Patientendatenbank der Dermatologie identifiziert. Das Einverständnis der Patienten wurde im Vorfeld routinemäßig bei Tumorexzisionen und -biopsien eingeholt und lag dementsprechend schriftlich vor. Zudem wurde aus den Angaben in den Patientenakten das Tumorstadium gemäß der Klassifikation der ISCL/EORTC (Tabelle 3, Tabelle 4) ermittelt ¹².

2.2 Erstellen des Tissue-Microarrays

2.2.1 Material

Die zum Erstellen des TMAs nötigen Verbrauchsmaterialien, Geräte und Chemikalien werden in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Material zum Erstellen des Tissue-Microarrays

Verbrauchsmaterialien	
Mikrotom-Klinge	Microtome Blade, Feather S35, pmf medical, Köln, Feather Safety Razor Co. LTD, Osaka, Japan
Objektträger	Super Frost Plus Objektträger, Art.-Nr.: 03-0060, R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
Deckgläser	Menzel-Gläser 24 x 60 mm, Thermo-Scientific, Waltham, USA
Geräte	
Kühlplatte	Thermo Shandon Histrocentre 2, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikrotom	Leica RM2065, Leica, Nussloch
Paraffinstreckbad	Leica HI1210, Leica, Nussloch
Wärmeschrank	Heraeus Instruments T6060, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Färbeautomat	Leica Autostainer XL ST5010, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Mikroskop	Nikon Model Eclipse Ci-L 701042, Nikon Corporation Tokyo, Japan
Paraffin	Merck
Probenkapseln	Sanowa
Rotationsmikrotom	Microm
Klingen (Mikrotom)	Feather
Gewebe - Array - Stanzgerät, MTA-2	AlphaMetrix Biotech
Chemikalien	
Xylol 99 %	SAR PLUS Dr. Artur Bettinger e. K., Bexbach
Ethanol 99,9 %, 90 %, 80 %, 70 %	Ethanol (Ethylalkohol), MEK-vergällt, SAR PLUS Dr. Artur Bettinger e. K., Bexbach
Hämalaunlösung	1:1 Mischung aus: - Mayer's Hämalaunlösung (109249), Merck KGaA, Darmstadt - Hämalaun sauer nach Mayer (3718Q), Dr. K Hollborn & Söhne GmbH und CoKG, Leipzig
Eosinlösung	Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig (X883, Charge: 103197944), Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Aqua destillata	aufbereitet mittels: MELAdem®40, MELAG Medizintechnik oHG, Berlin
Decklösung	Eukitt® Quick-hardening mounting medium (BCBX3811), SIGMA-ALDRICH (Merck KGaA), Darmstadt

2.2.2 Erstellen der Schnitte

Zum Erstellen der Schnitte wurden die Blöcke zunächst auf einer Kühlplatte auf -10 °C gekühlt und anschließend mittels eines Mikrotoms auf 0,1 mm Dicke geschnitten. Mit Hilfe eines Objektträgers wurden die Schnitte in ein Paraffinstreckbad übertragen und konnten anschließend in gestrecktem Zustand erneut mit einem Objektträger aufgenommen werden. Nach dem Trocknen bei 60 °C über mindestens 24 Stunden, wurden die Schnitte bis zum Färben bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) der Schnitte wurde entsprechend des Färbeprotokolls in Tabelle 6 durchgeführt. Die gefärbten Schnitte wurden unter Verwendung von Eukitt® Decklösung eingedeckt und nach dem Trocknen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Tabelle 6: Protokoll Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Schritt	Behälter	Medium	Dauer
1	1	Xylol	01:00 min
2	2	Xylol	01:00 min
3	3	Xylol	01:00 min
4	4	Xylol	01:00 min
5	5	Ethanol 99 %	01:00 min
6	6	Ethanol 96 %	01:00 min
7	7	Ethanol 80 %	01:00 min
8	Wash 1	Ethanol 70 %	01:00 min
9	Wash 4	Aqua destillata	01:00 min
10	9	Hämalaunlösung	04:00 min
11	Wash 3	Aqua destillata	10:00 min
12	8	Eosinlösung	02:00 min
13	Wash 5	Aqua destillata	00:30 min
14	12	Ethanol 80 %	00:30 min
15	13	Ethanol 96 %	00:30 min
16	14	Ethanol 96 %	00:30 min
17	15	Ethanol 99 %	01:00 min
18	16	Ethanol 99 %	01:00 min
19	17	Ethanol 99 %	01:00 min
20	18	Xylol	01:00 min
21	Exit	Xylol	-

2.2.4 Markieren der Schnitte

Zwei etwa 1mm durchmessende Stellen mit möglichst dichtem Tumorinfiltrat wurden unter Zuhilfenahme eines Mikroskops durch zwei unabhängige Befunder markiert. Proben, denen solche charakteristisch lymphozytenreiche Infiltrate fehlten, da sie nur sehr vereinzelt maligne Lymphozyten enthielten, wurden in diesem Schritt von der Untersuchung ausgeschlossen, um unspezifische Ergebnisse oder Fehler durch Begleitinfiltrate zu vermeiden.

2.2.5 Übertragen der Proben auf das Tissue-Microarray

Im zweiten Schritt wurden aus den zuvor markierten Stellen durch das pathologische Institut der Universität Heidelberg zwei TMAs erstellt - eines für die CTCL und eines für die CBCL (Abbildung 5). Hierzu wurden die Markierungen von den HE-Schnitten auf die Paraffinblöcke übertragen. Da es sich bei Haut um relativ derbes Gewebe handelt, wurden die TMAs von Hand gestanzt und ein Durchmesser von 0,6 mm gewählt. Zunächst wurde ein Zylinder entsprechenden Durchmessers aus einem

frischen Paraffinblock mit Hilfe einer Nadel entfernt. Dann wurde die markierte Stelle aus dem Gewebeblock entnommen und in das zuvor geschaffene Loch eingefügt. Aus jeder Probe wurden hierbei zwei Stenzen auf den Block übertragen, um eventuellen Verlusten im späteren Schneideprozess vorzubeugen. Zur Orientierung wurden vor der ersten Hautprobe zwei Muskelstanzen aufgetragen. Die Anordnung der weiteren Stenzen richtete sich nach dem zuvor erstellten Schema, welches die Proben nach Entität und Stadium aufteilt. Nachdem alle Stenzen auf den Block übertragen waren, wurde er, um eine stabile Verbindung zwischen Proben und Paraffin zu gewährleisten und die Oberfläche zu glätten, für 2 h bei 60 °C gelagert und anschließend mit einem Objektträger leicht komprimiert. Der so erstellte Paraffinblock der CTCL beinhaltet zweimal 60 Proben, der der CBCL zweimal 63 Proben (Abbildung 5).

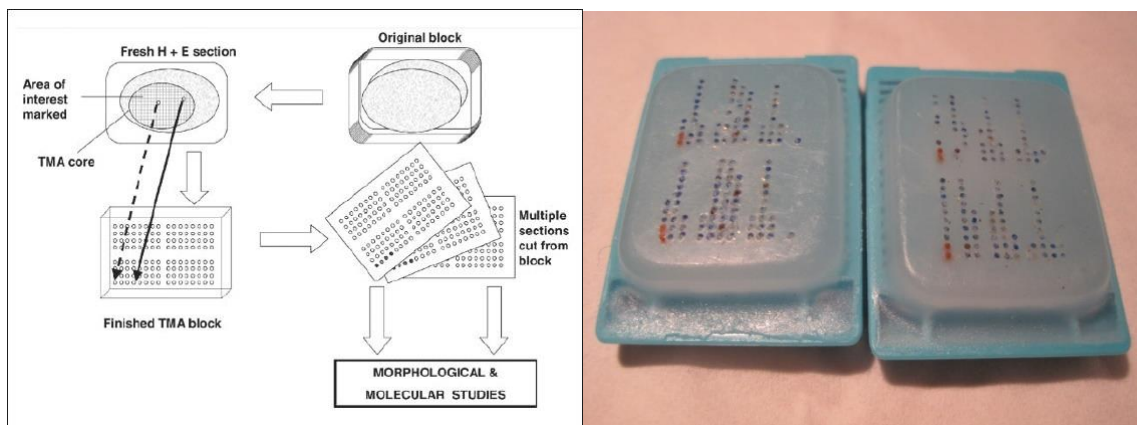


Abbildung 5: links: Erstellen eines Tissue-Microarrays ¹²⁰ (open access), rechts: Tissue-Microarray der Lymphomproben

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Material

Die Materialien für die anschließende immunhistochemische Färbung sind in Tabelle 7 dargestellt. Des Weiteren wurden die in Tabelle 8 beschriebenen Antikörper verwendet.

Tabelle 7: Materialien Immunhistochemie

Verbrauchsmaterialien	
Deckgläser	Deckgläser 24 x 32 mm, Art.-Nr.: H877, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DakoPen	S2002, Agilent, Santa Clara, USA
Geräte	
Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach
Humidity Box	Simport, QC, Kanada
Ventana BenchMark Ultra	Roche, Basel, Schweiz
Dako Autostainer	Agilent, Santa Clara, USA
Chemikalien	
Xylol 99 %	9713.5, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol 99,9 %, 90 %, 80 %, 70 %	K9284, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline (PBS)	S3024, Agilent, Santa Clara, USA
Pufferlösung pH 9	HIER T-EDTA Buffer pH 9.0, Ref.: ZUC029-500, Zytomed Systems GmbH, Berlin
Pufferlösung pH 6	HIER Citrate Buffer pH 6.0, Ref.: ZUC029-500, Zytomed Systems GmbH, Berlin
Phosphate Buffered Saline with Tween 20 (PBST) – 0,1 %	Tween® 20, #SLBX6047, SIGMA-ALDRICH (Merck KGaA), Darmstadt
Peroxidase-Block	Dako, K4009, Agilent, Santa Clara, USA
Lösung zur Antikörperverdünnung	Dako Antibody Diluent, Ref.: S0809, Agilent, Santa Clara, USA
Sekundärer Antikörper Kaninchen	Labelled Polymer-HRP – Anti-Rabbit, Ref.: K4009, Agilent, Santa Clara, USA
Sekundärer Antikörper Maus	Labelled Polymer-HRP – Anti-Mouse, Ref.: K4005, Agilent, Santa Clara, USA
Chromogen	Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System K3467, Dako, Californien, USA
Mayers Hämalaunlösung	HX87717149, Merck, Darmstadt
Decklösung	Dako Faramount Aqueous Mounting Medium, Dako, Ref.: S3025, Agilent, Santa Clara, USA
OptiView DAB ICH Detection Kit	Kat.No.: 760-700, Roche, Basel, Schweiz
EnVision Detection Systems Peroxidase/DAB	K5007, Dako/Agilent, Santa Clara, USA

Tabelle 8: Primäre Antikörper

Antigen	Nummer	Klonalität	Spezie	Hersteller
p-ERK	4376	monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling, Cambridge, UK
p-MEK	4338	monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling, Cambridge, UK
p-STAT3	4113	monoklonal	Maus	Cell Signaling, Cambridge, UK
CD4	SP35	monoklonal	Kaninchen	Roche, Basel, Schweiz
CD8	ab4055	polyklonal	Kaninchen	ABCAM, Cambridge, UK
CD30	Ber-H2	monoklonal	Maus	Agilent, Santa Clara, USA
CD79a	JCB 117	monoklonal	Maus	R&D Systems, Minneapolis, USA
PD-1	NAT105	monoklonal	Maus	Medac, Wedel, Deutschland
PD-L1	CAL10	monoklonal	Kaninchen	Zyted, Berlin, Deutschland
BCL-2	124	monoklonal	Maus	Agilent, Santa Clara, USA
CD20	L26	monoklonal	Maus	DCS, Hamburg, Deutschland

2.3.2 Färbung

Zur immunhistochemischen Färbung wurden die TMAs zunächst wie bereits beschrieben auf 0,1 mm geschnitten und getrocknet. Die Färbungen für p-STAT3, p-MEK, p-ERK und CD8 wurden im Labor der Dermatologie der Universitätsmedizin Mannheim (UMM) weitgehend eigenständig durchgeführt. Die im Folgenden beschriebene Vorgehensweise bezieht sich auf diese Färbungen. Die Färbungen für CD4 wurden im Nationalen Zentrum für Tumorerkrankungen Heidelberg angefertigt. Die Färbungen für CD30, CD79a, PD1, PD-L1, BCL-2 und CD20 wurden in der Pathologie der UMM angefertigt. Die in der Pathologie der UMM angefertigten Färbungen wurden automatisiert mit dem AutoStainer von Dako unter Verwendung des EnVision Kits von Dako durchgeführt. Die Schritte stimmen im Wesentlichen mit den hier beschriebenen überein. Die im Nationalen Zentrum für Tumorerkrankungen Heidelberg durchgeführten Färbungen wurden mit dem Ventana Bench Mark Ultra der Firma Roche unter Verwendung des OptiView DAB ICH Detection Kits durchgeführt. Das verwendete Färbeprotokoll ist in Tabelle A1 im Anhang zu finden.

Im ersten Schritt wurden die Schnitte entsprechend des Ablaufs in Tabelle 9 rehydriert. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte anschließend bei 95 °C für 20 min (pH 9) oder 40 min (pH 6) in der entsprechenden Pufferlösung im Wasserbad gekocht. Die Pufferlösung wurde antigenspezifisch gewählt (Tabelle 10). Die Auswahl richtete sich nach den Empfehlungen der Hersteller sowie teils den Ergebnissen vorher angefertigter Probefärbungen.

Tabelle 9: Rehydrierung der Schnitte

Schritt	Medium	Dauer
1	Xylol	5 min
2	Xylol	5 min
3	Xylol	5 min
4	Ethanol abs.	3 min
5	Ethanol abs.	3 min
6	Ethanol 90 %	3 min
7	Ethanol 80 %	3 min
8	Ethanol 70 %	3 min
9	Aqua destillata	15 sec
10	PBS	10 min

Tabelle 10: Antigenspezifische Parameter

Antigen	Pufferlösung	Inkubationszeit	Verdünnung der Antikörper
p-ERK	HIER T-EDTA Buffer pH 9 (1:10)	über Nacht	1:800
p-MEK	HIER T-EDTA Buffer pH 9 (1:10)	über Nacht	1:400
p-STAT3	HIER T-EDTA Buffer pH 9 (1:10)	über Nacht	1:100
CD8	HIER Citrate Buffer pH 6 (1:10)	über Nacht	1:2000
CD4	Siehe Protokoll Tabelle A1 im Anhang		
CD30	HIER T-EDTA Buffer pH 9 (1:10)	30 min	1:200
CD79a	HIER T-EDTA Buffer pH 9 (1:10)	30 min	1:50
PD-1	HIER Citrate Buffer pH 6 (1:10)	30 min	1:50
PD-L1	HIER T-EDTA Buffer pH 9 (1:10)	30 min	1:40
BCL-2	HIER T-EDTA Buffer pH 9 (1:10)	30 min	1:500
CD20	HIER T-EDTA Buffer pH 9 (1:10)	30 min	1:500

Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte 2 x 5 min in PBS und 1 x 5 min in PBST 0,1 % gewaschen. Anschließend wurden sie für 10 min bei Raumtemperatur mit Peroxidaseblocker inkubiert. Nach erneutem Waschen (2 x 5 min PBS, 1 x 5 min PBST) wurden die primären Antikörper aufgetragen, deren Konzentration sich ebenfalls nach vorher angefertigten Probefärbungen und den Herstellerempfehlungen richtete (Tabelle 10). Zur Verbesserung der Antigenbindung wurden einige Schnitte (p-ERK, p-MEK, p-STAT3, CD8) bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer gelagert. Vor dem Auftragen der sekundären Antikörper wurden die Schnitte erneut gewaschen (2 x 5 min PBS, 1 x 5 min PBST). Die sekundären Antikörper wurden für 60 min bei Raumtemperatur auf den Schnitten belassen. Nach erneutem Waschen wurden auf jeden Schnitt 1-2 Tropfen Chromogen DAB+ aufgetragen. Je nach Intensität wurde die Färbung nach 5 bis 30 min mit Aqua destillata gestoppt. Die

Schnitte wurden abschließend 7 min in Hämalunlösung gegengefärbt und nach erneutem Waschen in Leitungswasser (2 x 5 min) und Aqua destillata (2 x 5 min) eingedeckt.

2.4 Auswertung der Immunhistochemie

2.4.1 Digitalisierung und Nachbearbeitung

Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte digitalisiert. Auf Grund der Größe jeder einzelnen Bilddatei war mit dem Arbeitsspeicher eines handelsüblichen Computers eine digitale Auswertung der eingescannten Schnitte nicht als Ganzes möglich. Zudem war eine weitere Unterteilung aus Gründen der Übersichtlichkeit vorteilhaft. Dementsprechend wurde das Bild jeder Gewebeprobe als einzelne JPG-Datei gespeichert. Trotz der sorgfältigen Auswahl von Tumordinfiltraten vor Erstellen des TMAs bestanden einige Gewebeproben ganz oder teilweise aus anderen Gewebearten wie etwa Fettzellen. Dies war vermutlich durch minimale Verschiebungen während des Stanzens bedingt. Zudem war bei zunehmender Tiefe nicht mehr gewährleistet, dass der Stanzzyylinder in allen Schichten aus der gleichen Gewebeart besteht wie der initial zur Markierung betrachtete oberflächliche Schnitt. Diejenigen Bilder, die nahezu kein Tumorgewebe zeigten wurden aussortiert; diejenigen, die teilweise andere Gewebearten enthielten entsprechend zugeschnitten.

2.4.2 Digitale Auswertung

Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde die Open-Source Software Fiji (Fiji Is Just ImageJ) verwendet. Das Vorgehen basierte dabei auf der von Labno beschriebenen Methode ¹²¹. Die folgenden Schritte wurden automatisiert unter Verwendung der in A2 im Anhang beigefügten Macros durchgeführt:

Im ersten Schritt wurde jedes Bild in die RGB-Farbkanäle zerlegt und nur der blaue Farbkanal gespeichert, um den Hintergrund minimieren zu können. Hierdurch konnte im zweiten Schritt bei der Überführung in Graustufen ein höherer Kontrast zwischen den immunhistochemisch gefärbten Zellen und den HE-gefärbten Zellen erzielt werden. Im dritten Schritt wurde für jede Bildergruppe, die aus demselben TMA-Schnitt stammte, ein Cut-Off-Wert innerhalb der Graustufen festgelegt (siehe Tabelle A3 im Anhang). Anhand dessen wurde das Bild in schwarze und weiße Anteile unterteilt.

Schließlich wurde die Größe der weißen Fläche - d. h. die immunhistochemisch gefärbte Fläche - in Pixel ermittelt. Zusätzlich wurde die Anzahl der immunhistochemisch gefärbten Zellen bestimmt. Dazu wurde das Watershed-Tool von Fiji genutzt, welches größere zusammenhängende Flächen je nach ihrer Form durch eine dünne Linie trennt, sodass nebeneinanderliegende gefärbte Zellen nicht als eine Zelle gezählt wurden. Um bei unterschiedlichen Größen der Proben die Zellzahl und gefärbte Fläche vergleichen zu können, wurde in einem zusätzlichen Schritt die Fläche bei einem so niedrig angesiedelten Cut-Off-Wert bestimmt, dass jegliches Gewebe weiß dargestellt wurde und somit dessen Fläche in Pixeln bestimmt werden konnte. Abbildung 6 zeigt die relevanten Schritte anhand eines Beispielbildes.

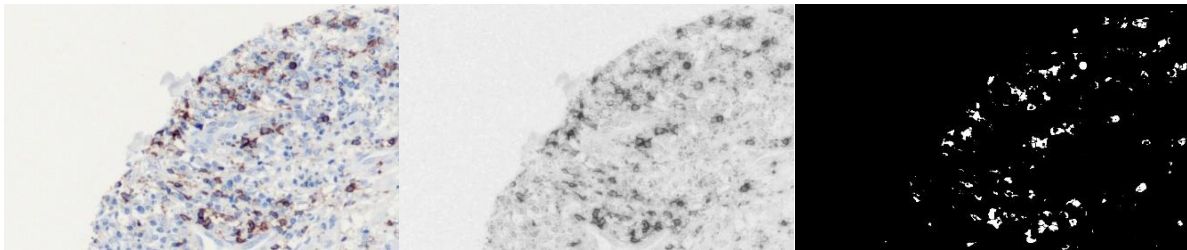


Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der Bildverarbeitung: (1) Originalbild (2) Bild in Graustufen (3) immunhistochemisch gefärbte Zellen werden weiß dargestellt

2.5 Angaben zur Statistik

Vor Beginn der statistischen Auswertung wurde der Anteil der immunhistochemisch gefärbten Fläche an der Fläche der jeweiligen Probe in Prozent errechnet. Ebenso wurde für jede Probe errechnet, wie viele gefärbte Zellen auf einer Fläche von 1000 Pixeln lagen. So war ein Vergleich zwischen verschiedenen großen Proben möglich. Die Pixelzahl eignete sich gut als Flächenmaß, da die Auflösung der Bilder nahezu identisch war. Bei denjenigen Proben, für die zwei erfolgreiche Färbungen vorlagen, wurde der Mittelwert gebildet. Für die gesamte statistische Auswertung wurde die Software SAS[®] verwendet. Die Berechnungen wurden freundlicherweise durch Frau Professorin Christel Weiß der Abteilung für Medizinische Statistik der UMM durchgeführt.

2.5.1 Deskriptive Statistik

Um einen Überblick über die erhobenen Daten zu erhalten wurden zunächst die Häufigkeiten der verschiedenen Lymphomentitäten, der Stadien, die

Geschlechterverteilung sowie die Mittelwerte der immunhistochemisch gefärbten Zellen pro 1000 Pixel und des Anteils der gefärbten Zellen an der Gesamtfläche für jeden Marker berechnet.

Da die Proben des systemischen T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphoms und des γ/δ -Lymphoms von je nur einem Patienten stammten, wurden diese von der weiteren statistischen Auswertung ausgeschlossen.

2.5.2 Unterschiede im Expressionsmuster nach Entitäten

Um die Frage zu beantworten, inwieweit sich die verschiedenen Lymphomtypen bezogen auf die untersuchten Marker unterscheiden, wurde eine mehrfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen durchgeführt.

Die mehrfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen wurde mit dem SAS-Procedure PROC MIXED durchgeführt. Sie berücksichtigt die Abhängigkeit der Messungen, die von einem Patienten stammen. So ist es möglich zu prüfen, ob signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Lymphomtypen bestehen, welche nicht durch die Messwiederholungen bedingt sind. Dabei wurden im ersten Schritt alle untersuchten Lymphomtypen getrennt nach CTCL und CBCL verglichen. Nur wenn der globale p-Wert dieses Vergleichs signifikant (d. h. unter 0,05) war, wurden im zweiten Schritt die einzelnen Gruppen direkt miteinander verglichen und für jedes Paar ein spezifischer p-Wert errechnet. Da die Unterscheidung von MF und SS von besonderem diagnostischem Interesse ist, wurde der Vergleich für diese Entitäten noch einmal gesondert durchgeführt, um eine höhere Sensitivität für potentielle Unterschiede zu ermöglichen. ¹²²

Um zu überprüfen, inwieweit durch eine Kombination der untersuchten Marker eine höhere diagnostische Trennschärfe zwischen SS und MF erreicht werden kann, wurde diese mittels einer multiplen logistischen Regression modelliert.

2.5.3 Korrelation zwischen Tumorstadium und Expressionsmuster

Um eine Aussage darüber zu treffen, inwieweit sich die Expression der verschiedenen Marker mit zunehmendem Tumorstadium der MF verändert, wurden Korrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. Dabei wurde jeweils nur die

zeitlich erste Probe eines jeden Patienten berücksichtigt. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman wurde verwendet, da eine Ordinalskalierung der Daten, wie sie bei den Tumorstadien vorliegt, für dessen Bestimmung ausreichend ist und er auch nicht-lineare Zusammenhänge abbildet. ¹²³

2.5.4 Korrelation der untersuchten Marker

Zum besseren Verständnis der Pathophysiologie wurde die Korrelation der untersuchten Marker untereinander mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Pearson betrachtet. Durch entsprechende Gewichtung wurde die unterschiedliche Anzahl von Proben, die von einem Patienten vorlagen, so ausgeglichen, dass jeder Patient gleichermaßen berücksichtigt wurde. Der Korrelationskoeffizienten nach Pearson ist besonders zur Betrachtung von Zusammenhängen zwischen quantitativen Merkmalen geeignet und detektiert lineare Zusammenhänge, die hier angenommen wurden. ¹²³

3 ERGEBNISSE

3.1 Übersicht über das Patientenkollektiv

Die Analysen umfassten insgesamt 121 Proben von 57 Patienten. Auf CTCL entfielen 59 Proben von 30 Patienten. Demgegenüber standen die CBCL mit 62 Proben von 27 Patienten. Die Geschlechterverteilung war ausgewogen (60 % weibliche Patientinnen). Das Durchschnittsalter betrug 63 Jahren. Abbildung 7 zeigt die Verteilung der Patienten bezogen auf die verschiedenen Lymphomtypen.

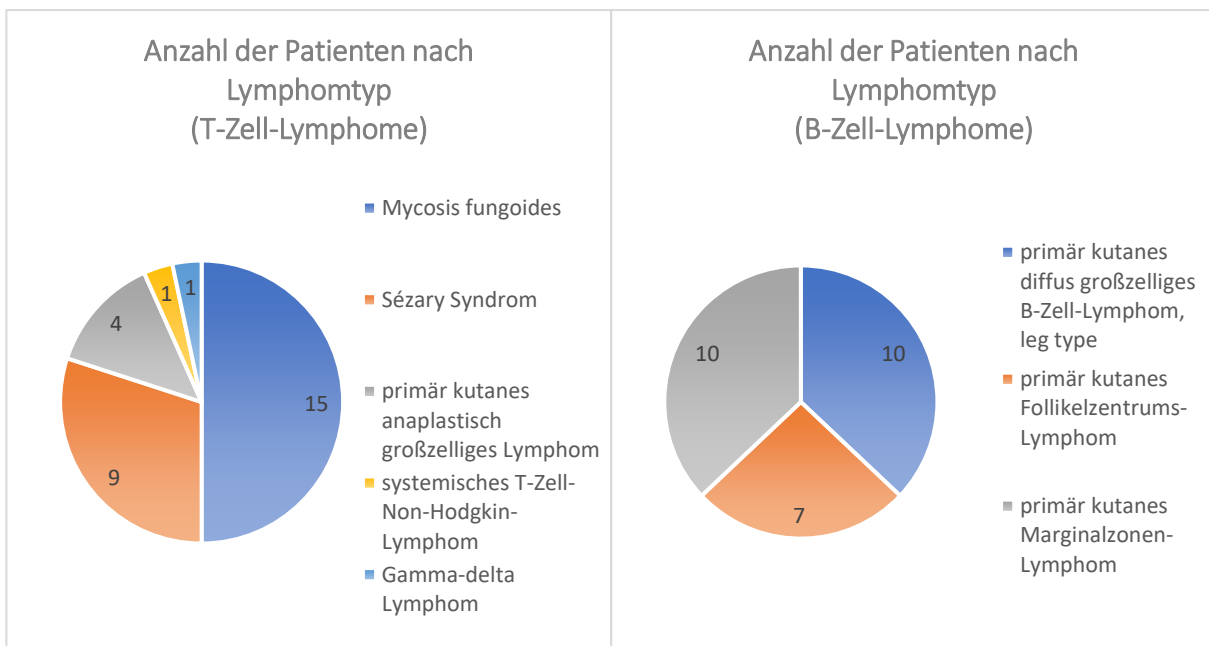


Abbildung 7: Verteilung der Patienten auf die verschiedenen Lymphomtypen

Da nur jeweils eine Probe eines systemischen T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphoms und eines γ/δ -Lymphoms enthalten war, wurden diese für die weitere statistische Auswertung nicht berücksichtigt.

Die Stadienverteilung ist in Abbildung 8 zusammengefasst. Bei insgesamt 15 Patienten (6 CTCL, 9 CBCL) konnte keine Aussage über das Erkrankungsstadium getroffen werden, da diese Angabe aus der Dokumentation nicht eindeutig hervorging^{12, 124}.

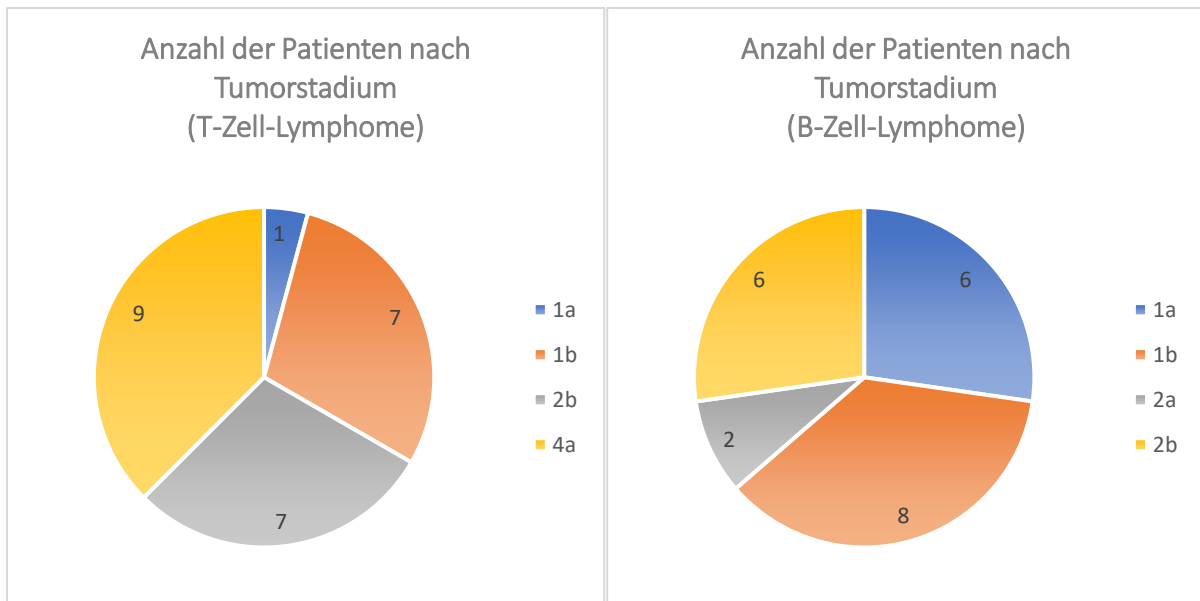


Abbildung 8: Verteilung der Patienten auf die verschiedenen Tumorstadien

Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 9 beispielhaft eine Übersichtsaufnahme der CD30 Färbung der CTCL. Die rechte und linke Seite des TMA enthalten jeweils Proben desselben Patienten. Teilweise fehlen rechts Stanzen, da keine zweite Stanze gewonnen werden konnte. In der oberen linken Ecke finden sich auf beiden Seiten die zwei zur Orientierung aufgetragenen Muskelstanzen. Darauf folgen zunächst die MF, dann die SS und schließlich die PCALCL Proben, welche auf Grund der verstärkten CD30 Expression gut zu erkennen sind. Die drei unteren Stanzen stammen von einem γ/δ -Lymphom.

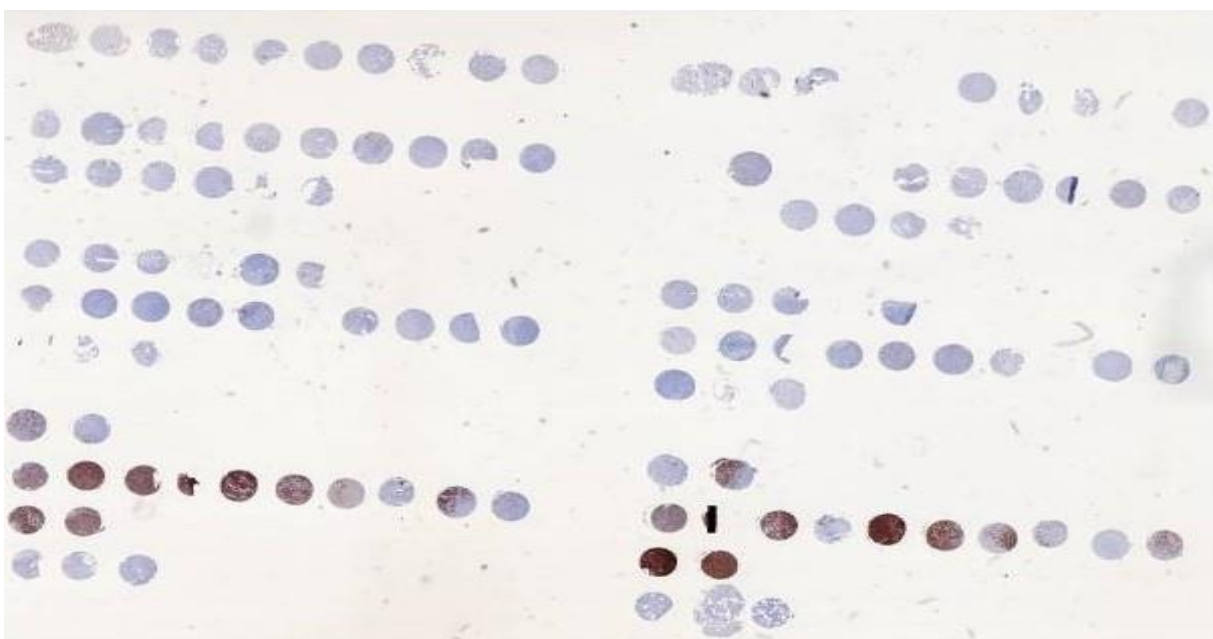


Abbildung 9: Übersichtsaufnahme der CD30 Färbung kutaner T-Zell-Lymphome

3.2 Unterschiede im Expressionsmuster nach Lymphomentität

3.2.1 Kutane T-Zell-Lymphome

Bei Vergleich der verschiedenen Lymphomentitäten ergaben sich bei den CTCL für die Marker p-STAT3, p-MEK und CD30 signifikante Unterschiede. p-STAT3 und p-MEK zeigten auf SS Proben verglichen mit MF Proben eine signifikant stärkere Expression. CD30 wurde signifikant häufiger auf Proben des PCALCL exprimiert.

In MF Proben zeigten sich nach Korrektur der Gewichtung jedes Patienten 0,186 p-STAT3 positive Zellen pro 1.000 Pixel gegenüber 0,304 (p-Wert 0,029) positiven Zellen in SS Proben. Die Betrachtung der Flächenanteile ergab 1,47 % vs. 2,81 % (p-Wert 0,011) (Abbildung 10).

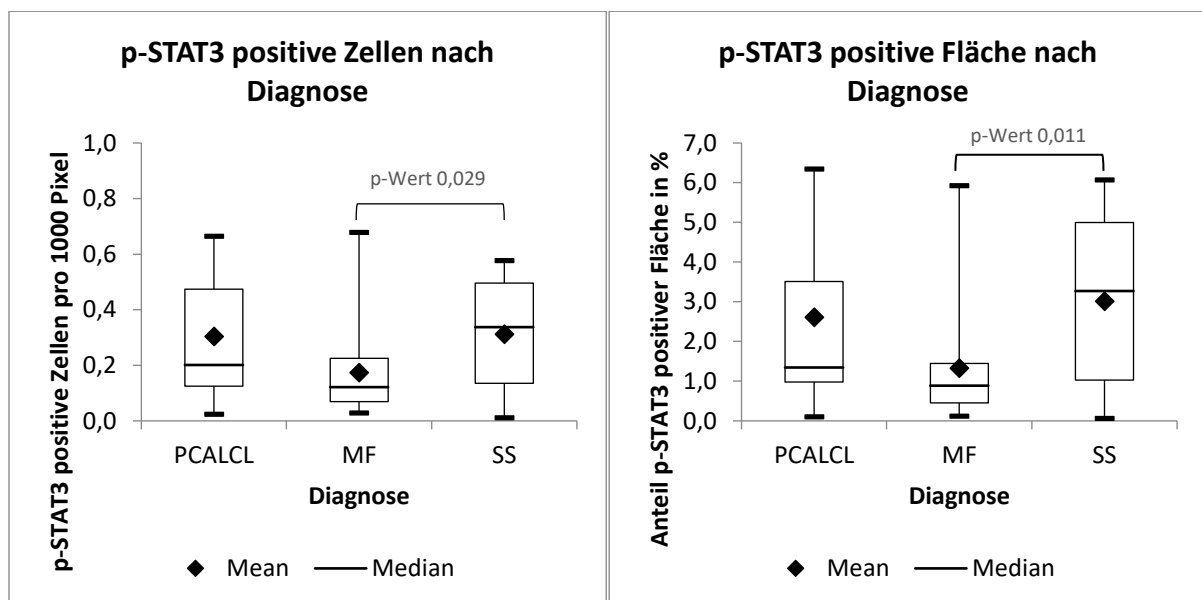


Abbildung 10: Ergebnisse der p-STAT3 Färbung nach Diagnose, PCALCL=primär kutanes anaplastisch großzelliges Lymphom, MF=Mycosis fungoides, SS=Sézary Syndrom

Ähnlich verhielt es sich mit der Expression von p-MEK. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich der Zellzahl (p-Wert 0,035) und grenzwertig nicht signifikante Unterschiede bezüglich der gefärbten Fläche (p-Wert 0,059) zugunsten der SS Proben. Der patientenkorrigierte Durchschnittswert lag bei 0,23 p-MEK positiven Zellen pro 1000 Pixel bei einem Flächenanteil von 1,07 % für MF Proben, während sich in SS Proben durchschnittlich 0,488 positive Zellen bei einem Flächenanteil von 3,31 % zeigten (Abbildung 11).

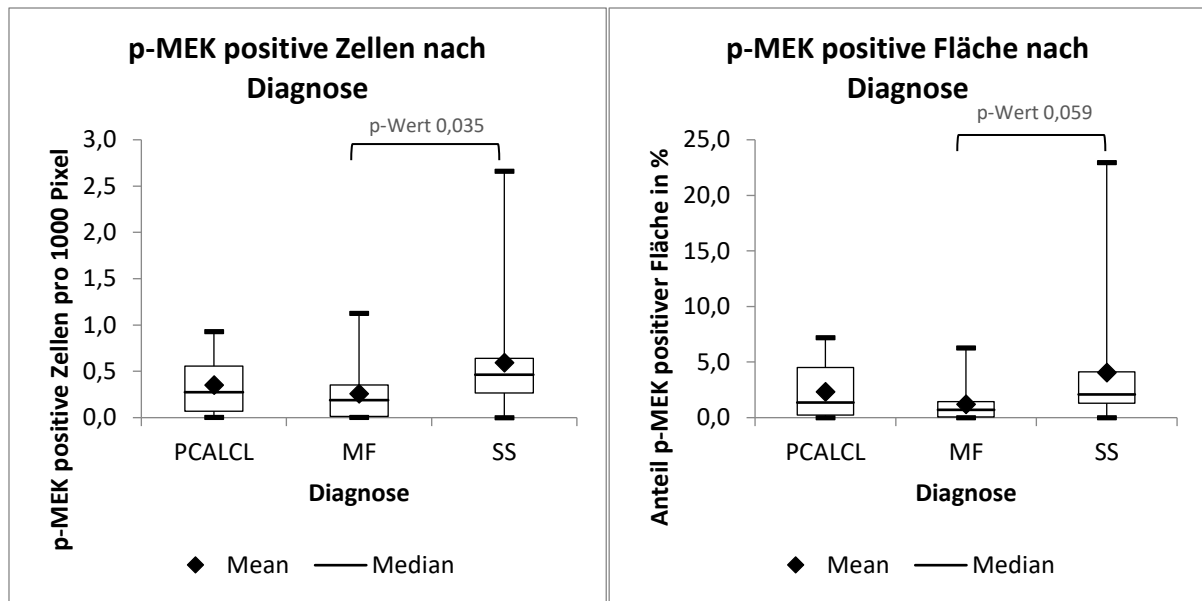


Abbildung 11: Ergebnisse der p-MEK Färbung nach Diagnose, PCALCL=primär kutanes anaplastisch großzelliges Lymphom, MF=Mycosis fungoides, SS=Sézary Syndrom

Bezogen auf die Unterschiede zwischen MF und SS zeigte die logistische Regression unter Einbezug aller untersuchten Marker kein Modell, welches durch eine Kombination der Marker eine bessere Trennschärfe als die isolierte Betrachtung von p-MEK oder p-STAT3 ermöglichte.

Die CD30 Expression war in PCALCL Proben sowohl verglichen mit MF Proben als auch im Vergleich mit SS Proben signifikant gesteigert (p-Werte jeweils <0,001). Während die Zahl der CD30 positiven Zellen pro 1000 Pixel bei MF und SS Proben durchschnittlich unter 0,02 lag, lag sie bei PCALCL Proben bei 0,74. Ebenso zeigten MF und SS Proben durchschnittlich einen gefärbten Flächenanteil von unter 0,30 %, während bei PCALCL Proben durchschnittlich 26,81 % der Fläche CD30 positiv war (Abbildung 12).

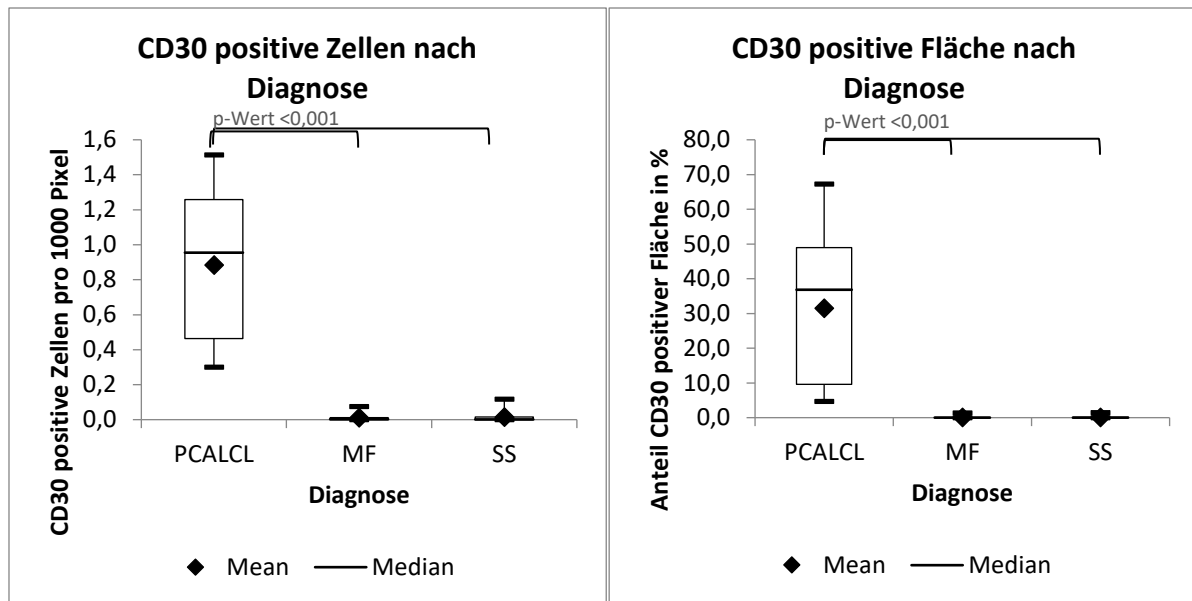


Abbildung 12: Ergebnisse der CD30 Färbung nach Diagnose, PCALCL=primär kutanes anaplastisch großzelliges Lymphom, MF=Mycosis fungoides, SS=Sézary Syndrom

3.2.2 Kutane B-Zell-Lymphome

Vergleiche der verschiedenen Entitäten der CBCL ergaben signifikante Unterschiede für die Expression von CD4, CD20 und CD79a.

In PCBLT Proben zeigte sich im Vergleich zu PCMZL Proben sowohl eine signifikant geringere Zahl CD4 positiver Zellen (p-Wert 0,011) als auch ein geringerer Anteil der CD4 positiven Fläche (p-Wert 0,014). Konkret zeigten sich in PCBLT Proben durchschnittlich lediglich 0,309 Zellen pro 1000 Pixel bei einer CD4 positiven Fläche von 3,83 %, während es bei PCMZL Proben 0,739 Zellen bei einer Fläche von 10,52 % waren (Abbildung 13). Auch zwischen PCBLT und PCFCL zeigten sich Unterschiede in der Zahl CD4 positiver Zellen, diese waren jedoch grenzwertig nicht signifikant (p-Wert 0,054). Der Vergleich der CD4 Färbung mit der CD20 Färbung legt nahe, dass es sich bei den CD4 positiven Zellen um CD20 negative Zellen handelt (siehe dazu Abbildung A4 im Anhang).

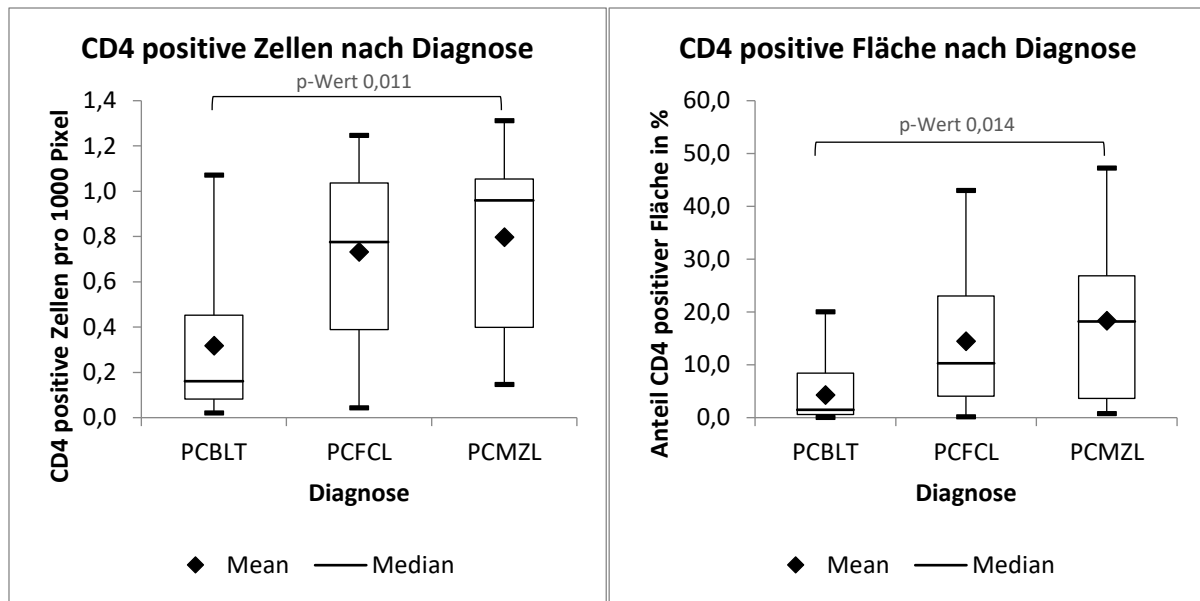


Abbildung 13: Ergebnisse der CD4 Färbung nach Diagnose, PCBLT=primär kutanes diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom, leg type, PCFCL=primär kutanes Follikelzentrumslymphom, PCMZL=primär kutanes Marginalzonen-Lymphom

Bei Vergleich der CD20 Expression zeigte sich in PCFCL Proben eine signifikant stärkere Expression als in PCMZL (p-Wert Zellzahl 0,005, p-Wert Fläche <0,001) und PCBLT Proben (p-Wert Zellzahl 0,034, p-Wert Fläche 0,003). Die Zahl CD20 positiver Zellen lag für PCFCL Proben bei 1,409 mit einem Flächenanteil von 31,26 %, während sie für PCMZL und PCBLT Proben bei weniger als 0,8 Zellen mit einem Flächenanteil von unter 13 % lag (Abbildung 14).

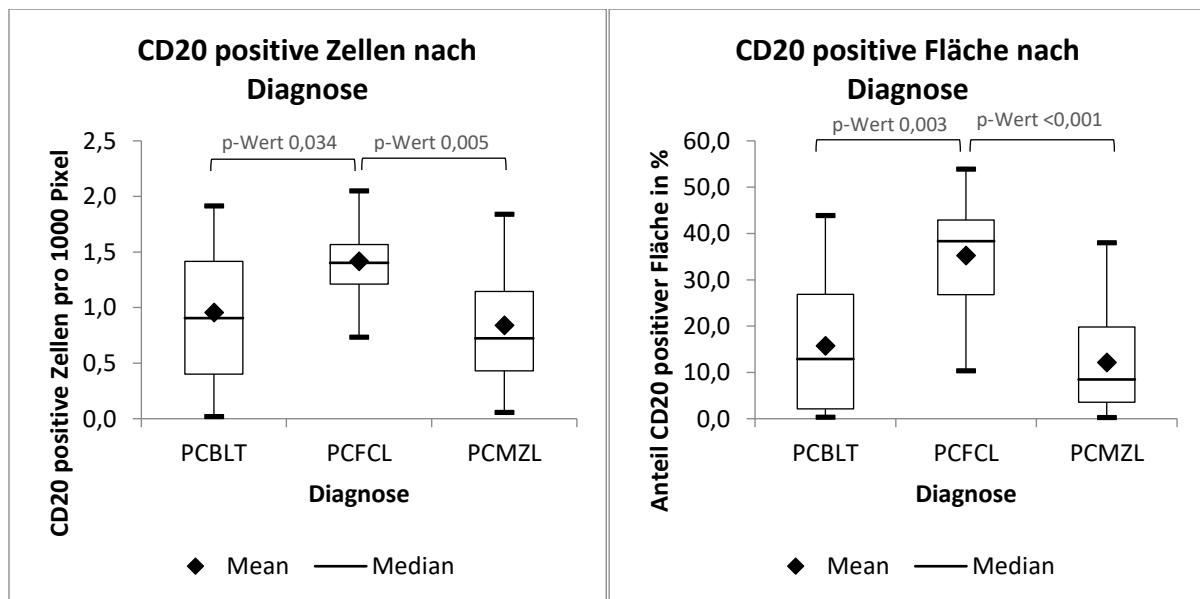


Abbildung 14: Ergebnisse der CD20 Färbung, PCBLT=primär kutanes diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom, leg type, PCFCL=primär kutanes Follikelzentrumslymphom, PCMZL=primär kutanes Marginalzonen-Lymphom

Verglichen mit PCBLT (p-Wert 0,010) und PCFCL (p-Wert 0,048) Proben zeigten PCMZL Proben einen signifikant geringeren Anteil CD79a positiver Fläche. Während dieser Anteil für PCMZL Proben bei durchschnittlich lediglich 8,70 % lag, war er bei PCBLT (26,68 %) und PCFCL (20,07 %) Proben etwa zwei- bis dreimal höher. Auch die Zahl CD79a positiver Zellen war im Vergleich zu PCBLT Proben mit 0,991 gegenüber 0,558 positiven Zellen pro 1000 Pixel in PCMZL Proben signifikant geringer (p-Wert 0,026) geringer (Abbildung 15).

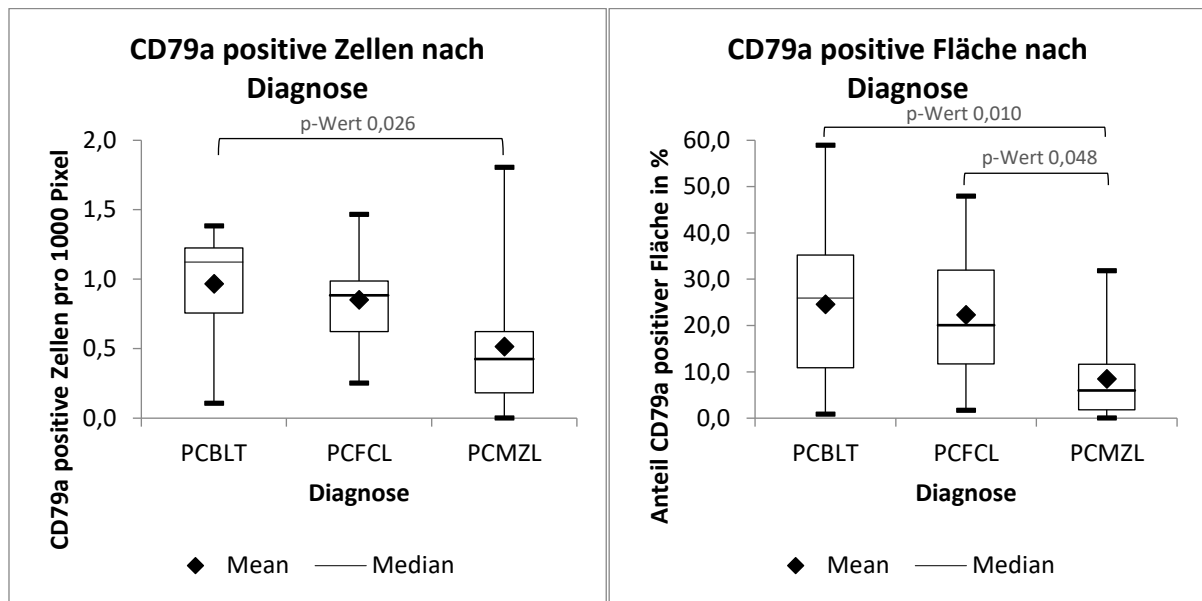


Abbildung 15: Ergebnisse der CD79a Färbung, PCBLT=primär kutanes diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom, leg type, PCFCL=primär kutanes Follikelzentrumslymphom, PCMZL=primär kutanes Marginalzonen-Lymphom

3.3 Stadienabhängige Veränderung des Expressionsmusters der Mycosis fungoides

Betrachtete man die Veränderung der Expression der untersuchten Marker in Abhängigkeit vom Tumorstadium der MF, zeigte sich eine signifikante Korrelation der Expression von BCL-2, CD4 und CD20 mit dem Tumorstadium.

Mit zunehmendem Tumorstadium reduzierte sich die Zahl BCL-2 positiver Zellen in den untersuchten Proben (Korrelationskoeffizient: -0,75, p-Wert 0,008) ebenso wie der Anteil der BCL-2 positiven Fläche (Korrelationskoeffizient: -0,69, p-Wert 0,018). Abbildung 16 stellt die jeweils zeitlich erste Probe eines Patienten als einen Punkt im Raster Tumorstadium und Zahl BCL-2 positiver Zellen dar.

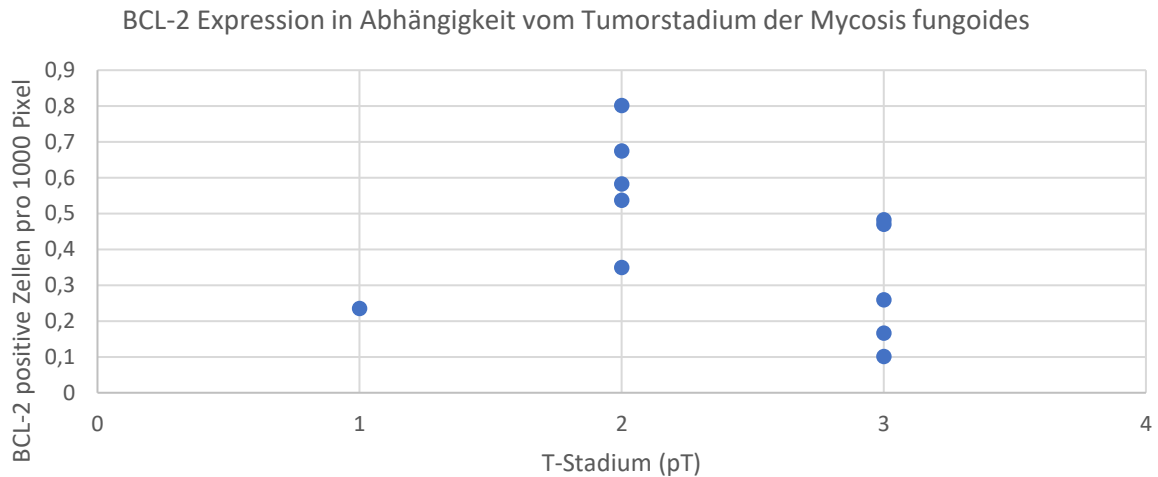


Abbildung 16: BCL-2 Expression in Abhängigkeit vom Tumorstadium der Mycosis fungoides (für die untersuchten Proben gilt pT1=Stadium 1a, pT2=Stadium 1b, pT3=Stadium 2b, pT4=Stadium 4a)

Ähnlich verhielt es sich mit der Expression von CD4. Diese nahm mit dem Tumorstadium sowohl bei Betrachtung der Zellzahl (Korrelationskoeffizient: -0,84, p-Wert <0,001) als auch bei Betrachtung der CD4 positiven Fläche ab (Korrelationskoeffizient: -0,69, p-Wert 0,009). Abbildung 17 veranschaulicht dies.

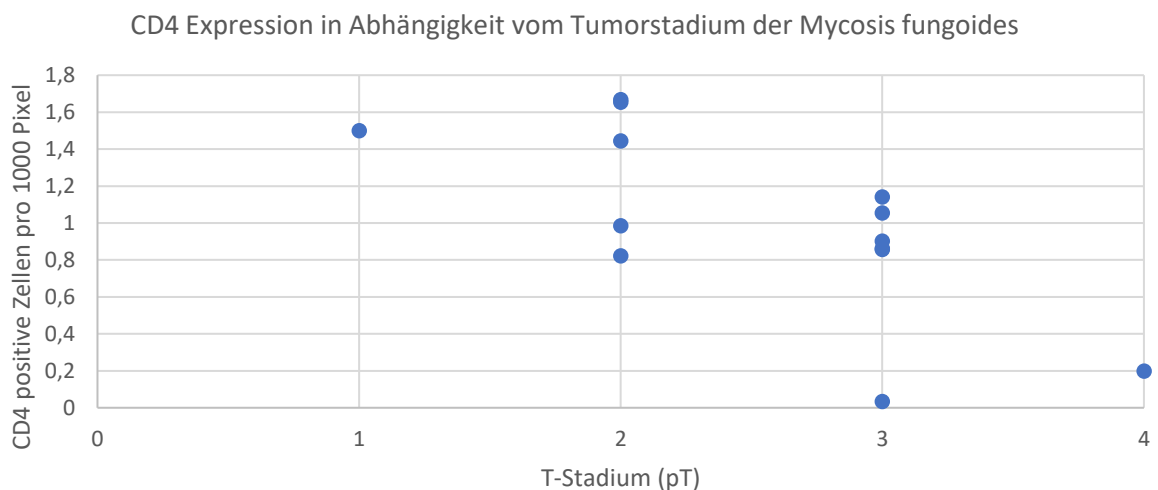


Abbildung 17: CD4 Expression in Abhängigkeit vom Tumorstadium der Mycosis fungoides (für die untersuchten Proben gilt pT1=Stadium 1a, pT2=Stadium 1b, pT3=Stadium 2b, pT4=Stadium 4a)

Ein signifikanter Zusammenhang zeigte sich bei der Expression von CD20 lediglich bei Betrachtung der CD20 positiven Fläche, die in Abhängigkeit vom Tumorstadium zunahm (Korrelationskoeffizient: 0,58, p-Wert 0,048). Bezogen auf die Zellzahl deutete

sich ein ähnlich gerichteter Zusammenhang an (p-Wert 0,112). Abbildung 18 visualisiert den Anteil der CD20 positiven Fläche in Abhängigkeit vom Tumorstadium.

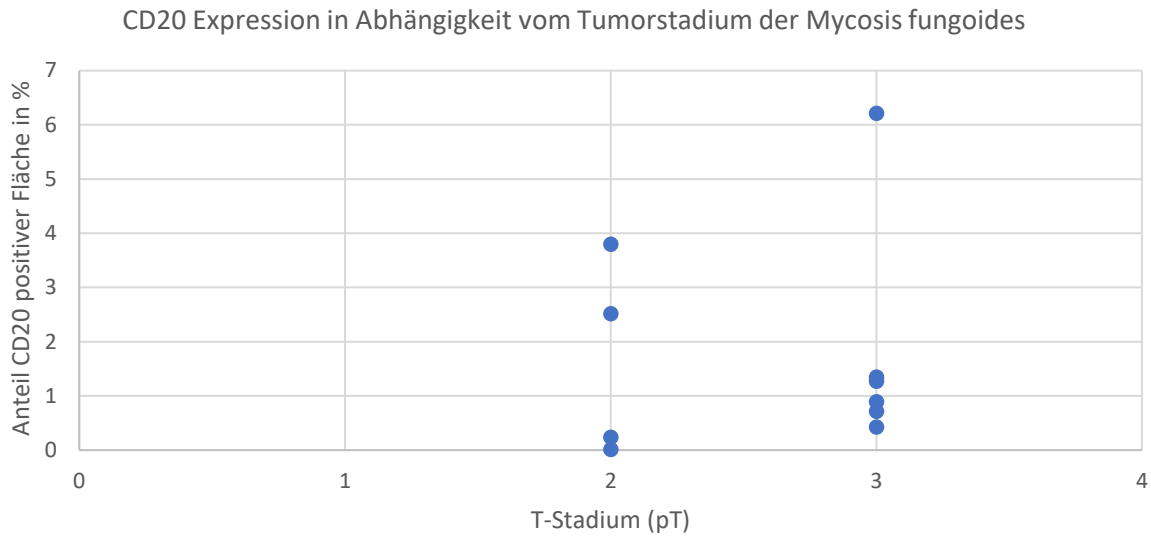


Abbildung 18: CD20 Expression in Abhängigkeit vom Tumorstadium der Mycosis fungoides (für die untersuchten Proben gilt pT1=Stadium 1a, pT2=Stadium 1b, pT3=Stadium 2b, pT4=Stadium 4a)

3.4 Korrelationen zwischen den untersuchten Markern

3.4.1 Mycosis fungoides

Tabelle 11 zeigt eine Auswahl der Korrelationskoeffizienten nach Pearson bei Betrachtung der Korrelationen zwischen den untersuchten Markern in MF Proben. Sie zeigt nur diejenigen Korrelationen, die einen eindeutigen Hinweis auf einen Zusammenhang aufwiesen. Als eindeutig galt ein Hinweis auf einen Zusammenhang, wenn folgende Punkte erfüllt waren:

- (1) mindestens eine signifikante Korrelation (p-Wert <0,05) zwischen der Zellzahl oder der Fläche eines Markers mit der Zellzahl oder der Fläche eines anderen Markers
- (2) mindestens zwei weitere dazu passende Korrelationen derselben Marker mit einem p-Wert unter 0,1 (im Fall des CD4/CD8-Quotienten war eine weitere solche Korrelation ausreichend).

Ein eindeutiger Hinweis auf einen Zusammenhang zeigte sich nach dieser Vorauswahl zwischen der Expression von CD4 und CD30, der Expression von CD4 und p-MEK, der Expression von CD20 und CD79a und der Expression von CD30 und PD-1. In allen

Fällen handelte es sich um eine positive Korrelation. Eine höhere Expression des einen Markers ging mit einer höheren Expression des anderen einher.

Darüber hinaus konnte ein weiterer ebenfalls positiver Zusammenhang zwischen den Markern p-STAT3 und p-ERK gesehen werden. Dieser war jedoch vergleichsweise weniger eindeutig, da sich zwar für eine Kombination aus der Zahl p-ERK positiver Zellen und der p-STAT3 positiven Fläche ein signifikanter Zusammenhang ergab (p-Wert 0,034), jedoch dieser Zusammenhang nicht ausreichend durch die übrigen Kombinationen aus Zellzahl und Fläche unterstützt wurde.

Tabelle 11: Auswahl der Korrelationen zwischen den untersuchten Markern der Mycosis fungoides (die obere Zeile gibt den Korrelationskoeffizienten an, die untere Zeile den p-Wert, signifikante Werte sind rot markiert)

	CD4 (Zellzahl)	CD4 (Fläche)		CD4 (Zellzahl)	CD4 (Fläche)
CD30 (Zellzahl)	0,364	0,378	p-MEK (Zellzahl)	0,380	0,488
p-Wert	0,095	0,083	p-Wert	0,081	0,021
CD30 (Fläche)	0,405	0,428	p-MEK (Fläche)	0,385	0,509
p-Wert	0,062	0,047	p-Wert	0,077	0,016
	CD20 (Zellzahl)	CD20 (Fläche)		CD30 (Zellzahl)	CD30 (Fläche)
CD79a (Zellzahl)	0,722	0,567	PD-1 (Zellzahl)	0,785	0,912
p-Wert	<0,001	0,007	p-Wert	<0,001	<0,001
CD79a (Fläche)	0,629	0,519	PD-1 (Fläche)	0,785	0,924
p-Wert	0,002	0,016	p-Wert	<0,001	<0,001

3.4.2 Sézary Syndrom

Bei Betrachtung der Korrelationen zwischen den untersuchten Markern des SS ergaben sich eindeutige Hinweise auf Zusammenhänge zwischen der Expression von CD8 und CD79a, der Expression von CD20 und CD79a, der Expression von PD-L1 und p-STAT3 und der Expression von PD-L1 und dem Quotienten aus der Zahl CD4 und CD8 positiver Zellen (Tabelle 12). Ein eindeutiger Hinweis auf einen Zusammenhang wurde dabei, wie im letzten Absatz bereits beschrieben, definiert. Es handelte sich in allen Fällen um positive Korrelationen.

Darüber hinaus ergaben sich weniger eindeutige positive Korrelationen zwischen der Expression von BCL-2 und PD-L1, von BCL-2 und dem CD4/CD8-Quotienten, von

CD8 und p-ERK, von CD8 und CD20 sowie von CD79a und PD-1. Zwischen BCL-2 und CD30 ergaben sich Hinweise auf eine negative Korrelation.

Tabelle 12: Auswahl der Korrelationen zwischen den untersuchten Markern des Sézary Syndroms (die obere Zeile gibt den Korrelationskoeffizienten an, die untere Zeile den p-Wert, signifikante Werte sind rot markiert)

	CD8 (Zellzahl)	CD8 (Fläche)		PD-L1 (Zellzahl)	PD-L1 (Fläche)
CD79a (Zellzahl)	0,432	0,559	p-STAT3 (Zellzahl)	0,463	0,375
p-Wert	0,108	0,030	p-Wert	0,071	0,153
CD79a (Fläche)	0,543	0,786	p-STAT3 (Fläche)	0,574	0,518
p-Wert	0,036	<0,001	p-Wert	0,020	0,040

	CD20 (Zellzahl)	CD20 (Fläche)		PD-L1 (Zellzahl)	PD-L1 (Fläche)
CD79a (Zellzahl)	0,909	0,750	CD4/CD8 Quotient	0,615	0,794
p-Wert	<0,001	<0,001	p-Wert	0,019	<0,001
CD79a (Fläche)	0,750	0,914			
p-Wert	<0,001	<0,001			

3.4.3 Primär kutanes anaplastisch großzelliges Lymphom

Lediglich zwischen den Markern CD8 und p-STAT3 sowie zwischen CD20 und CD79a zeigten sich in den Proben des PCALCL eindeutige Hinweise auf einen positiven Zusammenhang (Tabelle 13). Weniger eindeutige ebenfalls positive Korrelationen konnten zwischen BCL-2 und PD-1 sowie CD8 und CD20 beobachtet werden; während sich zwischen p-MEK und CD30 Hinweise auf eine negative Korrelation ergaben.

Tabelle 13: Auswahl der Korrelationen zwischen den untersuchten Markern des primär kutanen anaplastisch großzelligen Lymphoms (die obere Zeile gibt den Korrelationskoeffizienten an, die untere Zeile den p-Wert, signifikante Werte sind rot markiert)

	CD8 (Zellzahl)	CD8 (Fläche)		CD20 (Zellzahl)	CD20 (Fläche)
p-STAT3 (Zellzahl)	0,738	0,623	CD79a (Zellzahl)	0,867	0,913
p-Wert	0,004	0,023	p-Wert	<0,001	<0,001
p-STAT3 (Fläche)	0,679	0,520	CD79a (Fläche)	0,668	0,978
p-Wert	0,012	0,068	p-Wert	0,013	<0,001

3.4.4 Primär kutanes diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom

In den PCBLT Proben zeigte sich eine Vielzahl von signifikanten Korrelationen. Wie bereits bei den CTCL zeigt Tabelle 14 diejenigen Kombinationen zweier Marker, für die eindeutige Hinweise auf einen Zusammenhang beobachtet wurden. Positive Korrelationen ergaben sich zwischen den Markern CD4 und CD30, CD4 und p-ERK, CD4 und PD-1, CD8 und CD20, CD8 und p-ERK, CD8 und p-STAT3, CD20 und CD30, CD20 und PD-1 sowie CD30 und p-ERK. Negative Korrelationen ergaben sich zwischen BCL-2 und p-STAT3 sowie CD4 und CD79a.

Darüber hinaus zeigten sich statistisch schwächere positive Korrelationen zwischen BCL-2 und PD-L1 sowie CD79a und PDL1.

Tabelle 14: Auswahl der Korrelationen zwischen den untersuchten Markern des primär kutanen diffus-großzelligen B-Zell-Lymphoms (die obere Zeile gibt den Korrelationskoeffizienten an, die untere Zeile den p-Wert, signifikant positive Korrelationen sind rot markiert, signifikant negative Korrelationen blau)

	BCL-2 (Zellzahl)	BCL-2 (Fläche)		CD4 (Zellzahl)	CD4 (Fläche)
p-STAT3 (Zellzahl)	-0,493	-0,507	CD30 (Zellzahl)	0,438	0,794
p-Wert	0,053	0,045	p-Wert	0,089	<0,001
p-STAT3 (Fläche)	-0,455	-0,459	CD30 (Fläche)	0,332	0,696
p-Wert	0,077	0,073	p-Wert	0,208	0,003

	CD4 (Zellzahl)	CD4 (Fläche)		CD4 (Zellzahl)	CD4 (Fläche)
CD79a (Zellzahl)	-0,608	-0,480	p-ERK (Zellzahl)	0,846	0,950
p-Wert	0,012	0,060	p-Wert	<0,001	<0,001
CD79a (Fläche)	-0,529	-0,443	p-ERK (Fläche)	0,794	0,933
p-Wert	0,035	0,086	p-Wert	<0,001	<0,001

	CD4 (Zellzahl)	CD4 (Fläche)		CD8 (Zellzahl)	CD8 (Fläche)
PD-1 (Zellzahl)	0,448	0,551	CD20 (Zellzahl)	0,501	0,543
p-Wert	0,082	0,027	p-Wert	0,048	0,030
PD-1 (Fläche)	0,430	0,488	CD20 (Fläche)	0,503	0,536
p-Wert	0,097	0,055	p-Wert	0,047	0,033

	CD8 (Zellzahl)	CD8 (Fläche)
p-ERK (Zellzahl)	0,576	0,539
p-Wert	0,020	0,031
p-ERK (Fläche)	0,620	0,583
p-Wert	0,010	0,018

	CD8 (Zellzahl)	CD8 (Fläche)
p-STAT3 (Zellzahl)	0,655	0,685
p-Wert	0,006	0,003
p-STAT3 (Fläche)	0,670	0,704
p-Wert	0,005	0,002

	CD20 (Zellzahl)	CD20 (Fläche)
CD30 (Zellzahl)	0,573	0,467
p-Wert	0,020	0,068
CD30 (Fläche)	0,535	0,391
p-Wert	0,033	0,134

	CD20 (Zellzahl)	CD20 (Fläche)
PD-1 (Zellzahl)	0,471	0,550
p-Wert	0,066	0,027
PD-1 (Fläche)	0,422	0,516
p-Wert	0,104	0,041

	CD30 (Zellzahl)	CD30 (Fläche)
p-ERK (Zellzahl)	0,797	0,650
p-Wert	<0,001	0,007
p-ERK (Fläche)	0,786	0,657
p-Wert	<0,001	0,006

3.4.5 Primär kutanes Follikelzentrumslymphom

Ähnlich wie bei den PCBLT Proben ergaben sich bei Betrachtung der Proben des PCFCL eine Vielzahl von signifikanten Korrelationen zwischen den untersuchten Markern. Konkret zeigten sich eindeutige Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von CD4 und p-MEK, CD4 und PD-1, CD20 und CD79a, CD30 und CD79a, CD30 und p-ERK, p-ERK und p-MEK, p-ERK und PD-1 sowie p-MEK und PD-1 (Tabelle 15). Dabei handelte es sich bis auf die Korrelation der Marker CD30 und p-ERK um positive Korrelationen.

Weiterhin ergaben sich statistisch schwächere positive Korrelationen zwischen BCL-2 und CD4, BCL-2 und CD79a, CD20 und CD30, CD20 und p-MEK sowie PD-1 und CD79a. Schwach negative Korrelationen zeigten sich zwischen CD8 und CD79a sowie zwischen p-ERK und CD20.

Tabelle 15: Auswahl der Korrelationen zwischen den untersuchten Markern des primär kutanen Follikelzentrumslymphoms (die obere Zeile gibt den Korrelationskoeffizienten an, die untere Zeile den p-Wert, signifikant positive Korrelationen sind rot markiert, signifikant negative Korrelationen blau)

	CD4 (Zellzahl)	CD4 (Fläche)
p-MEK (Zellzahl)	0,372	0,473
p-Wert	0,081	0,023
p-MEK (Fläche)	0,347	0,495
p-Wert	0,105	0,016

	CD4 (Zellzahl)	CD4 (Fläche)
PD-1 (Zellzahl)	0,657	0,632
p-Wert	<0,001	0,001
PD-1 (Fläche)	0,642	0,577
p-Wert	<0,001	0,004

	CD20 (Zellzahl)	CD20 (Fläche)
CD79a (Zellzahl)	0,720	0,403
p-Wert	<0,001	0,056
CD79a (Fläche)	0,530	0,329
p-Wert	0,009	0,126

	CD30 (Zellzahl)	CD30 (Fläche)
CD79a (Zellzahl)	0,546	0,494
p-Wert	0,007	0,017
CD79a (Fläche)	0,472	0,403
p-Wert	0,023	0,057

	CD30 (Zellzahl)	CD30 (Fläche)
p-ERK (Zellzahl)	-0,420	-0,369
p-Wert	0,046	0,083
p-ERK (Fläche)	-0,387	-0,356
p-Wert	0,068	0,096

	p-ERK (Zellzahl)	p-ERK (Fläche)
p-MEK (Zellzahl)	0,494	0,495
p-Wert	0,017	0,016
p-MEK (Fläche)	0,449	0,458
p-Wert	0,032	0,028

	p-ERK (Zellzahl)	p-ERK (Fläche)
PD-1 (Zellzahl)	0,466	0,456
p-Wert	0,025	0,029
PD-1 (Fläche)	0,500	0,493
p-Wert	0,015	0,017

	p-MEK (Zellzahl)	p-MEK (Fläche)
PD-1 (Zellzahl)	0,670	0,657
p-Wert	<0,001	<0,001
PD-1 (Fläche)	0,735	0,714
p-Wert	<0,001	<0,001

3.4.6 Primär kutanes Marginalzonen-Lymphom

Eindeutige Hinweise auf einen positiven Zusammenhang zeigten sich bei Betrachtung der Proben des PCMZL zwischen CD4 und CD8, CD4 und PD-1, CD4 und p-STAT3, CD8 und p-STAT3, CD20 und CD79a, CD30 und PD-1, p-MEK und CD79a sowie PD-1 und p-STAT3 (Tabelle 16).

Weniger eindeutige ebenfalls positive Korrelationen zeigten sich zwischen CD20 und p-MEK, PD-1 und CD79a, p-STAT3 und CD79a sowie p-ERK und p-STAT3. Negative Korrelationen, die ebenfalls weniger eindeutig waren, zeigten sich zwischen CD4 und CD79a sowie CD20 und CD30.

Tabelle 16: Auswahl der Korrelationen zwischen den untersuchten Markern des primär kutanen Marginalzonen-Lymphoms (die obere Zeile gibt den Korrelationskoeffizienten an, die untere Zeile den p-Wert, signifikante Korrelationen sind rot markiert)

	CD4 (Zellzahl)	CD4 (Fläche)
CD8 (Zellzahl)	0,517	0,534
p-Wert	0,034	0,027
CD8 (Fläche)	0,450	0,448
p-Wert	0,070	0,071

	CD4 (Zellzahl)	CD4 (Fläche)
PD-1 (Zellzahl)	0,476	0,528
p-Wert	0,029	0,014
PD-1 (Fläche)	0,444	0,579
p-Wert	0,044	0,006

	CD4 (Zellzahl)	CD4 (Fläche)
p-STAT3 (Zellzahl)	0,434	0,561
p-Wert	0,072	0,015
p-STAT3 (Fläche)	0,450	0,579
p-Wert	0,061	0,012

	CD8 (Zellzahl)	CD8 (Fläche)
p-STAT3 (Zellzahl)	0,780	0,791
p-Wert	<0,001	<0,001
p-STAT3 (Fläche)	0,612	0,518
p-Wert	0,009	0,033

	CD20 (Zellzahl)	CD20 (Fläche)
CD79a (Zellzahl)	0,588	0,587
p-Wert	0,005	0,005
CD79a (Fläche)	0,494	0,680
p-Wert	0,023	0,001

	CD30 (Zellzahl)	CD30 (Fläche)
PD-1 (Zellzahl)	0,785	0,786
p-Wert	<0,001	<0,001
PD-1 (Fläche)	0,517	0,519
p-Wert	0,014	0,013

	CD79a (Zellzahl)	CD79a (Fläche)
p-MEK (Zellzahl)	0,525	0,460
p-Wert	0,021	0,047
p-MEK (Fläche)	0,542	0,468
p-Wert	0,017	0,043

	PD-1 (Zellzahl)	PD-1 (Fläche)
p-STAT3 (Zellzahl)	0,398	0,530
p-Wert	0,102	0,024
p-STAT3 (Fläche)	0,649	0,826
p-Wert	0,004	<0,001

4 DISKUSSION

4.1 Das Tissue-Microarray als Analysemethode

Die immunhistochemische Untersuchung der Proben nicht einzeln, sondern gesammelt über ein TMA durchzuführen, stellt eine verhältnismäßig neue Methode dar. Zur Beurteilung der Methode lohnt eine Betrachtung der bereits etablierten untersuchten Marker. Sowohl die im Vergleich zu den übrigen CTCL signifikant gesteigerte CD30 Expression der PCALCL Proben als auch die deutliche Expression von CD4 auf CTCL Proben und die Expression von CD20 und CD79a auf CBCL Proben entsprachen den Erwartungen^{4, 23, 34}. Somit ermöglicht das TMA die effiziente immunhistochemische Analyse großer Probenzahlen bei einer theoretisch vollständig automatisierbaren digitalen Auswertung. Die Immunhistochemie ist als notwendige Ergänzung der genetischen Analysen zu sehen, da letztere lediglich die Veränderungen auf DNA oder RNA-Ebene detektieren, jedoch keine Aussage darüber ermöglichen, inwieweit diese Veränderungen auf Ebene der Proteinexpression tatsächlich relevant sind.

Dennoch weist die Methode Schwächen auf. So kommt es bei der Übertragung der Proben aus dem Probenblock auf den TMA-Block leicht zu minimalen Verschiebungen und zu Materialverlusten (insbesondere bei derbem Gewebe wie der Haut), sodass im fertigen TMA-Block letzten Endes nicht ausschließlich das gewünschte Tumorgewebe vorliegt und präventiv zwei Stenzen aus jedem Block entnommen werden müssen. Je mehr Schnitte aus einem TMA-Block erstellt werden, desto weniger kann garantiert werden, dass nach wie vor dasselbe Gewebe vorliegt. Auch das Erstellen der Schnitte selbst birgt das Risiko von Materialverlusten. Ebenso ist darauf hinzuweisen, dass die Immunhistochemie zwar eine hohe Spezifität, jedoch eine geringe Sensitivität aufweist, sodass sich für zukünftige Untersuchungen ähnlicher Art die Immunfluoreszenz besser eignen würde. Mit dieser wäre es außerdem möglich, zwei oder mehr Marker in einem Schnitt anzufärben und so zuverlässiger zu unterscheiden, ob die Expression auf einer Tumorzelle oder einer tumorinfiltrierenden Zelle erfolgt. Für die Frage, welche Marker gemeinsam angefärbt werden sollten, bietet diese Arbeit eine wertvolle Entscheidungshilfe.

Aus der vorliegenden Arbeit ergaben sich Hinweise für die Anwendung in zukünftigen Untersuchungen. Zunächst ist die Methode ideal für deutlich höhere Probenzahlen geeignet, weshalb mit Blick auf die Seltenheit der kutanen Lymphome multizentrische Studien deutlich aussagekräftigere Ergebnisse liefern könnten. Entscheidendes Verbesserungspotenzial liegt ebenso in der digitalen Auswertung der Färbungen. Grundsätzlich ist ein weniger leistungsstarker Computer zwar in der Lage die Auswertung vorzunehmen; dies erfordert jedoch manuelle Vorarbeit (d.h. das Zuschneiden der Bilder). Ein leistungsstärkerer Computer (hier ist vor allem auf den Arbeitsspeicher zu achten) erlaubt ein deutlich effizienteres Arbeiten, bei dem die manuelle Vorarbeit entfallen würde. Zudem kam es in der vorliegenden Arbeit bei der Bildauswertung auf Grund der gewählten Software und Methode leicht zu Ungenauigkeiten, da FiJi nicht in der Lage ist, tatsächlich Zellen zu erkennen oder Artefakte von diesen zu unterscheiden. Die Wahl einer anderen diesbezüglich weiter entwickelten Software würde genauere Ergebnisse ermöglichen.

Wie bereits von Sundram et al. und Rodríguez-Pinilla et al. beschrieben, konnte insgesamt die Eignung des TMAs zur effizienten immunhistochemischen Untersuchung kutaner Lymphomproben bestätigt werden ^{125, 126}.

4.2 Diagnostische und therapeutische Relevanz der Unterschiede zwischen den Entitäten

4.2.1 Unterschiede zwischen Mycosis fungoides und Sézary Syndrom

Relevante Unterschiede zwischen MF und SS ergaben sich bei der Expression von p-MEK und p-STAT3 jeweils zugunsten einer verstärkten Expression in Sézary Proben. Da vor allem in frühen Stadien der Erkrankung eine Unterscheidung der beiden Entitäten erschwert ist, kommen p-MEK und p-STAT3 als weitere Bausteine zur Differenzierung beider Entitäten in Frage ⁸. Auf Grund der geringen Zahl untersuchter Proben kann die vorliegende Arbeit lediglich als Screening für differenzierende Marker gewertet werden. Zur Bestätigung der Ergebnisse bedarf es weiterer größerer Studien. Bisher ist eine unterschiedliche Expression von p-MEK und p-STAT3 in der Literatur nicht eindeutig beschrieben. Dennoch passt die verstärkte Expression der Marker in SS Zellen zu bisherigen Untersuchungen und pathophysiologischen Überlegungen. Diese werden im Verlauf ausführlicher diskutiert.

Sofern sich die verstärkte Expression von p-MEK und p-STAT3 in Sézary Proben bestätigt, ergäben sich therapeutische Ansatzpunkte. Aktuell werden MEK-Inhibitoren wie Trametinib und Cobimetinib bereits erfolgreich in der Therapie maligner Melanome eingesetzt ^{127, 128}. *In vitro* führte der Proteinkinaseinhibitor Sorafenib zur Apoptose maligner Zellen aus NRAS-mutierten CTCL-Zelllinien und in geringerem Maß sogar zur Apoptose von T-Zellen, die von Sézary Patienten stammten, welche keine NRAS-Mutation zeigten ⁶⁴. p-STAT3 eignet sich ebenfalls als Ziel therapeutischer Interventionen. So konnte beispielsweise *in vitro* die Aktivierung von STAT3 in MF und SS Zelllinien mittels Antihistaminika, Cucurbitin E und I oder Alitretonin reduziert werden ¹²⁹⁻¹³¹. Zudem korreliert die Aktivierung von STAT3 mit der Resistenz von CTCL-Zelllinien gegenüber einer Vorinostattherapie ¹³².

Aktivierende Mutationen, die den MAPK-Signalweg betreffen, sind für CTCL mehrfach beschrieben, jedoch fehlte es bislang an Vergleichen zwischen MF und SS auf immunhistochemischer Ebene ^{44, 133}. Der hier beobachtete Unterschied in der Expression von p-MEK erscheint mit Blick auf die bisherigen Erkenntnisse zur unterschiedlichen Expression von Oberflächenmarkern plausibel. Während sowohl maligne Zellen der MF als auch maligne Zellen des SS den CCR4-Rezeptor, welcher die Migration der Zellen in die Haut und ins Blut ermöglicht, auf ihrer Oberfläche tragen, zeigen maligne Zellen des SS zusätzlich den CCR7-Rezeptor ^{58, 134, 135}. Beide Rezeptoren sind in der Lage, den MAPK-Signalweg zu aktivieren ⁵⁸. Deshalb wäre es denkbar, dass das gleichzeitige Vorliegen von CCR4 und CCR7, wie es bei dem SS der Fall ist, zu einer vergleichsweise stärkeren Aktivierung des MAPK-Signalwegs und dementsprechend von MEK führt. Dies würde theoretisch ebenso zu einer gesteigerten Aktivierung von p-ERK führen. Entsprechende signifikante Unterschiede zwischen MF und SS konnten jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Bei Vergleich genetischer Veränderungen der MF und des SS durch Park et al. zeigte sich eine signifikante Häufung von ERK betreffenden aktivierenden Mutationen in MF Proben ¹³⁶. Die Aktivierung von ERK könnte dementsprechend in MF Zellen teilweise unabhängig von p-MEK erfolgen. Auf Basis dessen wäre ein ausgleichender Effekt denkbar, der dazu führt, dass die ursprünglich stärkere Aktivierung des MAPK-Signalwegs in SS Zellen sich bei Vergleich von p-ERK nicht mehr zeigt. Diese hypothetischen Überlegungen bedürfen weiterer Überprüfung und können mit den hier erhobenen Daten nicht belegt werden.

Ähnlich wie die gesteigerte Expression von p-MEK wurden die gesteigerte Expression von p-STAT3 sowie entsprechende genetische Veränderungen des Signalwegs für CTCL mehrfach beschrieben^{137, 138}. Ein Vergleich zwischen MF und SS fehlt jedoch bisher. Olzewska et al. verglichen lediglich zwischen CTCL Patienten mit Beteiligung des Blutes und solchen ohne Beteiligung des Blutes und konnten für diese keinen Unterschied hinsichtlich der Expression von STAT3 feststellen¹³⁹. Auf der Ebene genetischer Veränderungen sind Vergleiche zwischen den Entitäten bisher nur vereinzelt erfolgt⁴⁴. Park et al. verglichen die Häufigkeit von Veränderungen bestimmter Gene bezüglich der Diagnose, wobei sich jedoch für den JAK-STAT-Signalweg keine relevanten Unterschiede zwischen MF und SS ergaben¹⁴⁰. Eine mögliche Erklärung für den im Vergleich zu MF Proben gesteigerten Nachweis von p-STAT3 in SS Proben liegt in der autokrinen Aktivierung der Sézary Zellen durch IL-21 (Abbildung 19). Die Expression von IL-21 wird über p-STAT3 gesteigert. IL-21 wiederum aktiviert indirekt p-STAT3 und ermöglicht so einen selbstverstärkenden Effekt. Bislang ist jedoch nicht eindeutig beschrieben, ob dieser Mechanismus spezifisch für das SS ist oder auch bei malignen Zellen der MF auftritt.^{53, 103, 141}

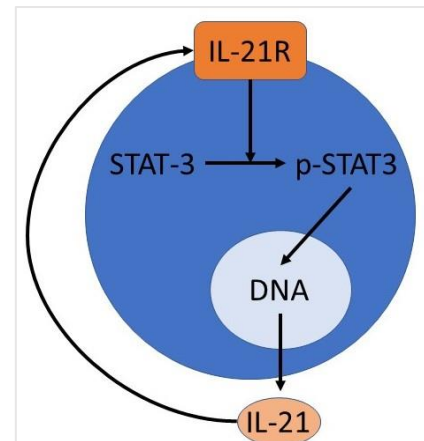


Abbildung 19: Autokrine p-STAT3 Aktivierung in Sézary Zellen^{53, 103, 141}

Ein gesteigerter Nachweis von PD-1 in SS Haut- und Blutproben verglichen mit MF Proben wird wiederholt beschrieben⁸. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Diese Diskrepanz könnte durch mehrere Faktoren bedingt sein. Zum einen wurden besonders deutliche Unterschiede zwischen den Entitäten vor allem in denjenigen Studien gesehen, die Blutproben untersuchten¹⁴². In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch ausschließlich Hautproben berücksichtigt. Die in der Literatur beschriebenen Unterschiede in Hautproben waren bereits weniger ausgeprägt, jedoch immer noch deutlich nachweisbar¹⁴³. Zum anderen wurden in der vorliegenden Arbeit zahlreiche Proben eingeschlossen, die nach einer bereits erfolgten Therapie entnommen wurden. Samimi et al. beschrieben bereits, dass der Nachweis von PD-1 auf Sézary Zellen nach Therapien teilweise deutlich zurückgeht¹⁴². Zuletzt ist die geringe Größe der Stichprobe in der

vorliegenden Arbeit anzuführen. Tendenziell wurde hier eine gesteigerte Expression von PD-1 in Sézary Proben gesehen, jedoch war diese möglicherweise auf Grund einer zu geringen Patientenzahl nicht signifikant. Auf Basis dieser Ergebnisse PD-1 als diagnostischen Marker anzuzweifeln, scheint dementsprechend nicht sinnvoll.

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Schwächen, wie dem Einschluss von Proben nach bereits erfolgter Therapie und der geringen Größe der Stichprobe, ist bezogen auf den Vergleich von MF und SS die fehlende Differenzierung nach Tumorstadien anzuführen. Insbesondere der Vergleich früher MF-Stadien mit Sézary Proben wäre interessant, da es hier besonders häufig zu diagnostischen Schwierigkeiten kommt. Dieser Vergleich war jedoch auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht möglich und sollte in zukünftigen Studien erfolgen. Ebenso wäre ein Vergleich mit benignen inflammatorischen Veränderungen der Haut interessant, da es hier häufig zu diagnostischen Unsicherheiten kommt.⁸

Insgesamt konnten mit p-MEK und p-STAT3 zwei immunhistochemische Marker mit diagnostischer und therapeutischer Relevanz identifiziert werden, welche einerseits einen weiteren möglichen Baustein zur Unterscheidung von MF und SS bilden, andererseits Erkenntnisse über die molekulare Pathogenese liefern sowie therapeutische Zielstrukturen darstellen. Weitere Untersuchungen an einem größeren Kollektiv sind allerdings zur Evaluierung insbesondere der diagnostischen Bedeutung notwendig.

4.2.2 Unterschiede zwischen kutanen B-Zell-Lymphomen

Bei Vergleich der drei großen CBCL Entitäten zeigten sich bezogen auf CD4, CD20 und CD79a signifikante Unterschiede. In PCBLT lagen signifikant weniger CD4+ Zellen vor als in PCMZL Proben. Zusätzlich waren es weniger CD4+ Zellen als in PCFCL Proben. Dieser Unterschied war jedoch grenzwertig nicht signifikant. In PCFCL Proben zeigten sich außerdem signifikant mehr CD20+ Zellen als in PCBLT und PCMZL Proben. Die CD79a Expression war in PCMZL Proben signifikant geringer als in PCBLT und PCFCL Proben. Im Folgenden sollen diese Unterschiede auf ihre diagnostische und therapeutische Relevanz geprüft sowie vor dem Hintergrund aktueller Literatur eingeordnet werden.

Bei Betrachtung der CD4+ Zellen, stellt sich zunächst die Frage, ob es sich hierbei um maligne Zellen oder tumorinfiltrierende CD4+ T-Zellen handelt. Eine Expression von CD4 auf Zellen der CBCL wurde bisher nicht beschrieben und erscheint pathogenetisch unwahrscheinlich¹⁰⁵. Zudem zeigte der Vergleich der CD20 und CD4 Färbungen, dass die CD4+ Zellen eher kein CD20 exprimieren. Maligne Zellen wären CD20+. Es sind dementsprechend am ehesten CD4+ T-Zellen, die in PCBLT Proben verglichen mit den anderen Entitäten seltener vorkommen. Dieser Unterschied ist sowohl diagnostisch als auch therapeutisch relevant. Die diagnostische Relevanz ergibt sich vor allem für die Unterscheidung von PCBLT und PCFCL, da sich beide Entitäten klinisch und histologisch ähneln, in der Therapie und Prognose jedoch deutlich unterscheiden^{11, 105}. Hier könnte eine Mitbetrachtung der Tumormikroumgebung die Diagnose erleichtern. Therapeutisch relevant ist die veränderte Tumormikroumgebung, da PCBLT potentiell Therapieansätzen zugänglich wären, die die Immunantwort gegenüber den malignen Zellen steigern^{144, 145}. Bereits Felcht et al. beschrieben die geringe Zahl CD4+FOXP3+ Zellen in der Tumormikroumgebung der PCBLT verglichen mit PCMZL und PCFCL Proben. Sie kamen zu dem Schluss, dass es sich bei den CD4+FOXP3+ Zellen um regulatorische T-Zellen handelt, welche sich gegen maligne Zellen richten, und dass deren reduzierte Zahl in PCBLT am ehesten als Teil einer möglicherweise durch die maligne Zelle selbst ausgelösten reduzierten Immunantwort gegen Tumorzellen zu interpretieren ist (Abbildung 20)¹⁴⁴. Diese Hypothese würde zu der schlechteren Prognose der PCBLT passen. Für nicht kutane diffus-großzellige Lymphome wurden vergleichbare Effekte beschrieben¹⁴⁶. Grundsätzlich können regulatorische T-Zellen im Kontext maligner Erkrankungen sehr unterschiedlich wirken. Zu unterscheiden sind regulatorische T-Zellen, welche die Immunantwort gegen Tumorzellen vermindern, von solchen, welche die Immunantwort gegen Tumorzellen steigern¹⁴⁶. Bei PCBLT scheinen ähnlich wie bei nicht kutanen diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen letztere pathophysiologisch relevant zu sein^{144, 146}.



Abbildung 20: Schematische Darstellung der Beziehung zwischen regulatorischen T-Zellen und malignen Zellen in primär kutanen diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen ^{144, 146}

Die Unterschiede zwischen PCFCL, PCMZL und PCBLT hinsichtlich der Expression von CD20 und CD79a hingegen scheinen nicht von diagnostischer oder therapeutischer Relevanz zu sein, obgleich CD20 selbstverständlich therapeutischer Angriffspunkt für die Therapie mit dem etablierten monoklonalen Antikörper Rituximab ist ¹⁴⁷. Sowohl CD79a, das zudem in systemischen diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen über Polatuzumab Vedotin therapeutisch genutzt wird, als auch CD20 sind als Oberflächenmarker von B-Zellen und als diagnostischer Marker von allen drei hier untersuchten CBCL gut etabliert ^{148, 149}. Die beobachteten Unterschiede könnten durch die Auswahl unterschiedlich dichter Infiltrate für das TMA bedingt sein. Insbesondere PCMZL Proben, für welche hier eine geringere Zahl CD79a+ Zellen nachgewiesen wurde, neigen zu weniger dichten Infiltraten ¹⁰⁵. Gleichzeitig ist der Einfluss von teilweise bereits erfolgten Therapien auf das Expressionsmuster zu berücksichtigen. So ist beispielsweise der Verlust der CD20 Expression maligner B-Zellen eine mögliche Folge der Rituximabtherapie, die bei PCBLT Patienten verglichen mit den anderen Entitäten häufiger eingesetzt wird ¹⁵⁰. Dies würde erklären, warum PCBLT Proben ähnlich viele CD79a+ Zellen wie PCFCL Proben zeigen, jedoch weniger CD20+ Zellen als PCFCL Proben.

Ebenfalls Folge des Einschlusses von Proben, die nach bereits erfolgter Therapie gewonnen wurden, könnte der fehlende Unterschied in der BCL-2 Expression zwischen PCFCL und PCMZL sein, den unter anderem Hoefnagel et al. beschrieben haben ¹⁵¹. Generell wird BCL-2 als diagnostischer Marker zur Unterscheidung von PCFCL und PCMZL genutzt ¹⁰⁵. Neben der Rituximabtherapie wirken sich UV-Therapien auf die Expression von BCL-2 aus ^{152, 153}. Welche Therapien vor Entnahme

der hier untersuchten Proben bereits erfolgt sind, wurde jedoch nicht mit erhoben, weshalb sich diese Hypothese mit den vorliegenden Daten nicht prüfen lässt. In zukünftigen ähnlich gelagerten Arbeiten wäre es sinnvoll entweder nur Proben der initialen Diagnosestellung einzuschließen oder die erfolgten Therapien in die Datenerhebung miteinzuschließen.

Die geringere Expression von PD-1 auf tumorinfiltrierenden Zellen in PCBLT Proben, wie sie von Cetinözman et al. und Mitteldorf et al. beschrieben wurde, zeigte sich auch hier^{94, 154}. Diese war jedoch vermutlich auf Grund der zu geringen Probenzahl nicht signifikant. Zudem finden sich PD-1+ tumorinfiltrierende Zellen eher im Randbereich des Infiltrats, welcher methodenbedingt häufig nicht mit untersucht wurde.

Insgesamt konnte durch die Bestätigung der unterschiedlichen Zusammensetzung der Tumormikroumgebung der PCBLT hinsichtlich CD4+ Zellen ein weiterer diagnostisch und therapeutisch relevanter Marker identifiziert werden. Zur Etablierung als diagnostischen Marker sind jedoch Untersuchungen an größeren Stichproben notwendig, die Vergleiche mit Pseudolymphomen einschließen. Ebenso können erst zukünftige Arbeiten zeigen, inwieweit die regulatorischen T-Zellen in der Umgebung von PCBLT therapeutischen Interventionen zugänglich sind.

4.2.3 Stadienabhängige Veränderungen der Mycosis fungoides

Für BCL-2, CD4 und CD20 ergaben sich jeweils stadienabhängige Veränderungen der Expression in MF Proben. Diagnostisch, therapeutisch und für das Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung relevant erscheinen die Veränderungen von BCL-2 und CD20. CD4 hingegen ist als Oberflächenmarker der MF gut etabliert. Eine Stadienabhängigkeit wurde bisher nicht beschrieben. Die Unterscheidung zwischen CD4+ malignen Zellen und CD4+ tumorinfiltrierenden T-Zellen war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, wäre jedoch zur Beantwortung der Frage, inwieweit es sich um einen diagnostisch, therapeutisch oder pathophysiologisch relevanten Zusammenhang handelt, notwendig.

Die beobachtete reduzierte Expression von BCL-2 mit zunehmendem Tumorstadium ist diagnostisch relevant, da somit ein Abfall der BCL-2 Expression als Zeichen für ein Fortschreiten der MF interpretiert werden kann. Zudem ist es naheliegend, dass gegen

BCL-2 gerichtete Therapien wie Venetoclax (ABT-199) in frühen Stadien der MF effektiver wirken können, da eine gesteigerte BCL-2 Expression *in vitro* zu einem verbesserten Ansprechen auf die Therapie führt ¹¹⁰. Allgemein wird von einer anti-apoptotischen Wirkung von BCL-2 auf die malignen Zellen der MF ausgegangen, wodurch sich die Erfolge der gegen BCL-2 gerichteten Therapien erklären lassen ¹⁵⁵. Die Beobachtung einer geringeren Expression mit Fortschreiten der Erkrankung erscheint somit vor einem pathophysiologischen Hintergrund widersprüchlich und ist nicht unstrittig. Youssef et al. sahen beispielsweise einen positiven Zusammenhang zwischen Tumorstadium und BCL-2 Expression ¹⁵⁶. Talaat et al. und Maj et al. sahen hingegen keinen Zusammenhang zwischen BCL-2 Expression und MF Tumorstadium, wobei bei Maj et al. mit einem p-Wert von 0,06 der tendenziell inverse Zusammenhang nur grenzwertig nicht signifikant war ^{155, 157}. Sekulovic et al. sahen schließlich den hier ebenfalls beobachteten inversen Zusammenhang zwischen Tumorstadium und BCL-2 Expression ¹⁵⁸. Auch bei Betrachtung der Expression von p-STAT3, das als Marker des JAK-STAT-Signalwegs an der Expression von BCL-2 beteiligt sein sollte, zeigten sich in der vorliegenden Arbeit keine stadienabhängigen Veränderungen. In der Literatur ergaben sich ähnlich wie bei BCL-2 widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Stadienabhängigkeit von p-STAT3 ^{139, 159}. Der Grund für diese widersprüchlichen Beobachtungen liegt sicher unter anderem in der geringen Probenzahl der meisten MF Studien und in der gleichzeitig großen Variabilität der BCL-2 Expression. Ein inverser Zusammenhang scheint bei Betrachtung der Literatur aktuell wahrscheinlicher, da die Arbeiten, die ihn beschreiben, eine größere Zahl an Patienten einschließen und zudem eine gleichmäßigere Verteilung auf die Tumorstadien zeigen ^{157, 158}. Die vorliegende Arbeit kann auf Grund der geringen Patientenzahl und dem Fehlen von Proben aus den Stadien III und IV die Frage nach dem tatsächlichen Zusammenhang ebenfalls nicht zufriedenstellend beantworten. Die pathophysiologische Bedeutung von BCL-2 scheint insgesamt nicht abschließend geklärt und komplexer zu sein, als bislang angenommen.

Bislang nur wenig untersucht ist die Rolle von B-Zellen als Teil der Tumormikroumgebung der MF. Die hier beobachtete zunehmende Expression von CD20 mit fortschreitendem Tumorstadium ist wahrscheinlich auf einen Anstieg tumorinfiltrierender B-Zellen zurückzuführen. Zwar sind vereinzelt Fälle CD20+ MF beschrieben worden, diese sind jedoch äußerst selten ^{85, 160-162}. Eine Zunahme CD20+

B-Zellen mit Fortschreiten der Erkrankung ist sowohl diagnostisch - als Marker für die Tumorprogression - als auch therapeutisch relevant, da in Einzelfällen mit besonders hoher Infiltration durch B-Zellen Rituximab erfolgreich eingesetzt werden konnte ^{162, 163}. Zudem eröffnen sich neue Perspektiven auf die Pathophysiologie der Erkrankung. In vielen soliden Tumoren wirken tumorinfiltrierende B-Zellen an der Immunantwort gegen den Tumor mit; im Mausmodell konnten jedoch regulatorische B-Zellen identifiziert werden, welche immunsuppressiv wirken und so das Wachstum maligner Zellen unterstützen ¹⁶⁴. Ein solcher das Tumorstadium unterstützender Mechanismus würde gut zu der Zunahme von B-Zellen in höheren Tumorstadien der MF passen, wie er in mehreren weiteren Untersuchungen ebenfalls beobachtet wurde ^{162, 165 166}. Der Nachweis einer tatsächlichen immunsuppressiven Wirkung dieser B-Zellen, die Untersuchung der konkreten Mechanismen und die Frage, inwieweit die malignen Zellen das Vorhandensein solcher B-Zellen unterstützen, sollte Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.

Insgesamt konnten über die Betrachtung der stadienabhängigen Veränderungen mit BCL-2 und CD20 für Diagnose, Therapie und Verständnis der Pathophysiologie relevante Marker identifiziert werden, obwohl die Aussagekraft der Arbeit zweifellos durch die geringe Probenzahl begrenzt ist. Es wurde zwar stets nur die zeitlich erste Probe eines Patienten berücksichtigt; diese war jedoch nicht zwingend die Probe, welche bei der initialen Diagnosestellung entnommen wurde. Deshalb können durch vorherige Therapien ausgelöste Veränderungen der Expression nicht ausgeschlossen werden. Für zukünftige Arbeiten sollten außerdem Kofärbungen mit mehreren Markern durchgeführt werden, um sicher zwischen Tumorzellen und tumorinfiltrierenden Zellen zu unterscheiden.

4.3 Relevante Signalketten kutaner Lymphome

4.3.1 Mycosis fungoides

Zwischen folgenden Markern ergaben sich in MF Proben signifikante positive Zusammenhänge: CD20 und CD79a, CD4 und p-MEK, CD30 und CD4, CD30 und PD-1. Diese sind jedoch hinsichtlich der daraus abzuleitenden Erkenntnisse für die Pathophysiologie und hinsichtlich der therapeutischen Relevanz unterschiedlich zu bewerten.

Zunächst ist die Korrelation zwischen CD20 und CD79a leicht dadurch erklärbar, dass beide auf B-Zellen exprimiert werden. Dementsprechend schwanken beide Marker je nach Vorkommen von tumorinfiltrierenden B-Zellen in ähnlicher Weise. Weitere Konsequenzen ergeben sich jedoch aus dieser Beobachtung nicht. Sie wird dementsprechend für die folgenden Diagnosegruppen (ausgenommen PCBLT, wo diese Marker nicht korrelierten) nicht noch einmal gesondert diskutiert.

Unklar ist, ob sich aus der positiven Korrelation von CD4 und p-MEK eine Konsequenz ergibt. Eine solche Korrelation wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Naheliegender ist die Annahme, dass CD4 die Anzahl maligner Zellen in einer Probe widerspiegelt und diese Zellen wie bereits beschrieben verstärkt p-MEK exprimieren^{44, 133}. Problematisch an dieser Bewertung ist jedoch, dass es sich bei CD4+ Zellen ebenso gut um tumorinfiltrierende T-Helferzellen handeln könnte, da eine Unterscheidung auf Basis der gewählten Methode nicht möglich und auch insgesamt sehr schwierig ist.

Eine ähnliche Problematik ergibt sich bei der Bewertung der Korrelation von CD30 und CD4 sowie der Korrelation von CD30 und PD-1. CD30 wird sowohl auf malignen T-Zellen der MF als auch auf tumorinfiltrierenden T-Zellen und Makrophagen exprimiert^{81, 167}. Es ist also unklar, ob die beobachtete Korrelation durch eine Koexpression von CD30 und CD4 auf einer Zelle zustande kommt oder ob sie einen Hinweis auf gegenseitige Beeinflussung verschiedener Zelltypen liefert. Eine Kofärbung von CD30 mit CD4 sowie CD8 und CD163 in zukünftigen Arbeiten scheint empfehlenswert, da ein besseres Verständnis dieser Beziehung unter anderem für die Therapie mit Brentuximab Vedotin relevant wäre, welche sich gegen CD30 richtet¹⁶⁷.

PD-1 kann ebenfalls sowohl auf malignen T-Zellen der MF vorliegen als auch auf tumorinfiltrierenden T-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen^{98, 143}. Die Bindung an PD-1 durch PD-L1 hemmt die Immunantwort dieser Zellen, weshalb eine Vielzahl maligner Zellen PD-L1 exprimieren, um der gegen sie gerichteten Immunantwort zu entgehen. Dieser Mechanismus ist wahrscheinlich auch in der Pathophysiologie der MF relevant, da PD-1-Inhibitoren erfolgreich eingesetzt werden konnten⁹⁸. Unklar ist jedoch bisher die Rolle des auf malignen MF Zellen exprimierten PD-1⁹⁸. Dementsprechend schwierig ist die Beurteilung der beobachteten Korrelation von

CD30 und PD-1. Denkbar wäre einerseits, dass diese eine Koexpression von CD30 und PD-1 auf malignen Zellen oder auf Zellen der Tumormikroumgebung widerspiegelt. Andererseits könnte sie die Wechselwirkung zwischen PD-1 und CD30 exprimierenden Zellen in der Umgebung des Tumors oder eine Wechselwirkung zwischen maligner Zelle und Tumormikroumgebung abbilden. Auch hier sind zum Verständnis des Zusammenhangs Kofärbungen von CD30 und PD-1 notwendig, um zunächst festzustellen, ob die Expression auf verschiedenen Zellen vorliegt. Ein besseres Verständnis des Zusammenhangs zwischen CD30 und PD-1 könnte sowohl für die Therapie mit Brentuximab Vedotin als auch für die Therapie mit PD-1 Inhibitoren wie Pembrolizumab relevant sein.

Neben den beobachteten Korrelationen lohnt eine Betrachtung derjenigen Marker, für die ein Zusammenhang naheliegend gewesen wäre. Der fehlende Zusammenhang zwischen p-MEK und p-ERK etwa deutet drauf hin, dass p-ERK in MF Proben nicht allein durch p-MEK reguliert wird, was zu den bereits beschriebenen genetischen Veränderungen der MF passt ¹³⁶. Die Expression von BCL-2 scheint nicht, wie teilweise angenommen, ausschließlich von p-STAT3 abhängig zu sein, da hier ebenfalls keine signifikante Korrelation festgestellt werden konnte ^{103 168}.

Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit jedoch allenfalls Hinweise auf Zusammenhänge beschrieben werden, die einer weiteren Untersuchung bedürfen. Zum einen fehlen Kofärbungen, weshalb verlässliche Aussagen darüber, auf welchen Zellen die jeweiligen Marker exprimiert werden, nicht möglich sind. Zum anderen vergrößert sich durch die hohe Zahl an Tests das Risiko eines alpha-Fehlers, d. h. einer möglichen Beschreibung einer Korrelation, die tatsächlich nicht vorliegt. Dennoch bieten die beschriebenen Beobachtungen Hinweise für zukünftige Forschung zu einem verbesserten Verständnis der Pathophysiologie der MF, welches die Grundlage neuer Therapien bildet.

4.3.2 Sézary Syndrom

Die beobachteten Zusammenhänge zwischen verschiedenen Markern bei Betrachtung der Sézary Proben waren keinesfalls identisch mit denen der MF. Signifikante Korrelationen ergaben sich zwischen CD79a und CD8, p-STAT3 und PD-L1 sowie dem Quotienten aus CD4 und CD8, und PD-L1. Ähnlich wie bei der MF

zeigte sich bei Sézary Proben kein Zusammenhang zwischen p-MEK und p-ERK sowie p-STAT3 und BCL-2. Die Gründe für den fehlenden Zusammenhang könnten ähnlich gelagert sein.

Die positive Korrelation von CD79a und CD8 deutet am ehesten auf die Beziehung zweier Zellen der Tumormikroumgebung hin. Zwar sind vereinzelt CD8+ maligne Zellen des SS beschrieben, diese sind jedoch äußerst selten ¹⁶⁹. Zum sicheren Ausschluss dieser Möglichkeit wäre eine Kofärbung mit CD4 oder CD3 sinnvoll. Ebenso erscheint eine Expression von CD79a auf malignen T-Zellen nahezu ausgeschlossen. Es ist dementsprechend davon auszugehen, dass es sich bei den CD79a+ Zellen um tumorinfiltrierende B-Zellen handelt. Dies passt zu der - wenn auch weniger eindeutigen - positiven Korrelation zwischen CD8 und CD20. Dennoch überrascht die Beobachtung, dass sich analog zur Zahl CD8+ am ehesten zytotoxischer T-Zellen die Zahl der tumorinfiltrierenden B-Zellen gleichsinnig verändert. Bei Fortschreiten der Erkrankung wurde bisher ein Anstieg der tumorinfiltrierenden B-Zellen - wie er auch hier in MF Proben beobachtet wurde - bei gleichzeitigem Rückgang der CD8+ T-Zellen beschrieben ^{162, 170}. Auf Grund der geringen Zahl an Studien, die sich bislang mit den tumorinfiltrierenden Zellen des SS beschäftigt haben, und der Tatsache, dass die genannten Untersuchungen in der Regel MF Proben und SS Proben gemeinsam betrachtet haben, fehlt es aktuell noch an einem umfassenden Verständnis der Tumormikroumgebung des SS. Der hier entstandene Widerspruch ließe sich möglicherweise im Verlauf weiterer Untersuchungen auflösen. Diese wären insbesondere bezüglich der Rolle der tumorinfiltrierenden B-Zellen therapeutisch relevant, da sich diese durch eine Rituximabtherapie reduzieren lassen ¹⁶⁹.

Die Korrelation zwischen p-STAT3 und PD-L1 fügt sich demgegenüber leichter in die bisherigen Erkenntnisse zur Pathophysiologie des SS ein. Die gesteigerte Aktivierung von STAT3 in malignen Zellen des SS wurde bereits in 4.2.1 beschrieben. Die positive Korrelation mit PD-L1 unterstützt die Annahme, dass dessen Expression auf malignen Zellen über p-STAT3 vermittelt wird ¹⁷¹⁻¹⁷⁴. PD-L1 ist für das Überleben der malignen Zelle relevant, da es tumorinfiltrierende Zellen des Immunsystems über deren PD-1 Rezeptor hemmt, wodurch die Tumorzelle der Immunantwort entgeht ¹⁷¹. Dadurch gewinnt die therapeutische Beeinflussung des JAK-STAT-Signalwegs mit der

potentiellen Steigerung der Immunantwort gegen die maligne Zelle eine weitere Dimension. Inwieweit dies praktisch tatsächlich möglich ist, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen. Einschränkend ist anzumerken, dass PD-L1 ebenso auf verschiedenen tumorinfiltrierenden Zellen exprimiert wird und somit nicht zweifelsfrei davon ausgegangen werden kann, dass hier ein Signalweg der malignen Zelle abgebildet wird ¹⁷³.

Hinweise auf die Veränderung der Tumormikroumgebung durch die Expression von PD-L1 gibt die Korrelation mit dem CD4/CD8-Quotienten. Bisher wird angenommen, dass PD-L1 sowohl die Zahl CD4+ und CD8+ tumorinfiltrierender T-Zellen reduziert als auch deren Wirkung hemmt ⁹⁷. Die Bildung regulatorischer CD4+ T-Zellen wird durch PD-L1 gefördert ⁹⁷. Diese hemmen wiederum zytotoxische CD8+ T-Zellen ⁹⁷. Dazu passt die hier beobachtete Erhöhung des CD4/CD8-Quotienten bei einer gesteigerten Expression von PD-L1. Ebenfalls dazu passend zeigte sich in anderen Untersuchungen bei Fortschreiten der Erkrankung gleichzeitig eine Erhöhung des CD4/CD8-Quotienten und eine gesteigerte Expression von PD-L1 ^{134, 171}. Dies unterstreicht neben der pathophysiologischen Relevanz der Wechselwirkung zwischen Tumorzelle und tumorinfiltrierenden Zellen die therapeutische Relevanz von PD1-Inhibitoren für die Therapie des SS, da diese das Potential haben, die den Tumor fördernden Veränderungen der Tumormikroumgebung aufzuhalten oder umzukehren ⁹⁷.

Insgesamt sind bezüglich der Interpretation dieser Korrelationen dieselben Einschränkungen zu nennen, die bereits im vorherigen Abschnitt erläutert wurden und die ebenso für die folgenden Abschnitte gelten. Dennoch unterstreichen die Ergebnisse die pathophysiologische und therapeutische Relevanz der Tumormikroumgebung für das SS und legen deren weitere Erforschung nahe.

4.3.3 Primär kutanes anaplastisch großzelliges Lymphom

Lediglich zwischen CD8 und p-STAT3 zeigte sich bei Betrachtung der PCALCL eine potentiell relevante Korrelation. Diese erscheint zunächst widersprüchlich, sofern man davon ausgeht, dass mit CD8 tumorinfiltrierende Zellen angefärbt wurden. In diesem Fall wäre eine negative Korrelation naheliegender, da p-STAT3 über die Expression von PD-L1 auf malignen Zellen eher eine Reduktion CD8+ zytotoxischer T-Zellen in

der Umgebung des Tumors vermitteln würde ^{171, 173, 175}. Dieser Zusammenhang scheint jedoch bei PCALCL weniger oder gar nicht ausgeprägt zu sein. Zwar wiesen Gerbe et al. für verschiedene PCALCL eine Korrelation zwischen p-STAT3 und PD-L1 nach, diese konnte jedoch hier nicht beobachtet werden ¹⁷⁶. Zudem sahen Ferreira et al. für PCALCL keine Korrelation zwischen PD-L1 und der Zahl zytotoxischer T-Zellen in der Umgebung des Tumors ¹⁷⁷. Eine Steigerung der Zahl zytotoxischer T-Zellen auf Grund einer gesteigerten p-STAT3 Expression scheint insgesamt nicht plausibel und wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Deshalb sollte eine weitere mögliche Interpretation in Betracht gezogen werden. Anders als bei MF und SS, wo CD8+ Varianten sehr selten sind, treten diese bei PCALCL in etwa 20 % der Fälle auf ^{178, 179}. Die hier beobachtete Korrelation könnte also einen Zusammenhang zwischen CD8+ malignen Zellen und deren gesteigerter p-STAT3 Expression beschreiben. Zur Bestätigung dieser Hypothese wären weitere Färbungen notwendig, um zweifelsfrei festzustellen, welche Zellen CD8+ sind und ob diese mit den p-STAT3 exprimierenden Zellen identisch sind. Dies hätte mögliche therapeutische Konsequenzen, da die Hemmung des JAK-STAT-Signalwegs bei CD8+ PCALCL dann eher zum Therapieerfolg beitragen könnte als bei CD8 negativen Varianten.

Darüber hinaus zeigten sich keine eindeutigen Korrelationen in PCALCL Proben. Ein Zusammenhang zwischen p-STAT3 und BCL-2 oder p-MEK und p-ERK blieb wie bereits bei MF und SS aus, wobei die Gründe ähnlich gelagert sein könnten, da auch für PCALCL im MAPK-Signalweg Mutationen nachgewiesen werden konnten ¹¹⁵. Allgemein sind PCALCL deutlich weniger untersucht als MF und SS. Die Frage, inwieweit sich CD8+ PCALCL von CD8- Varianten unterscheiden und welche therapeutischen Konsequenzen sich aus Unterschieden ergeben, bietet deshalb einen von vielen interessanten Ansatzpunkten zum besseren Verständnis der Erkrankung.

4.3.4 Primär kutanes diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom

Für PCBLT zeigte sich eine Vielzahl an Korrelationen. Zur besseren Einordnung ist es sinnvoll, die untersuchten Marker danach aufzuteilen, ob die Färbung eher auf maligne Zellen oder auf tumorinfiltrierende Zellen zurückzuführen ist. Hier wurde davon ausgegangen, dass CD20, CD79a, PD-L1, BCL-2, p-STAT3, p-ERK und p-MEK eher malignen Zellen und CD4, CD8, PD-1 und CD30 eher tumorinfiltrierenden Zellen

zuzuordnen ist ^{94, 154, 180, 181}. Auf Basis dieser Einteilung lassen sich die beobachteten Korrelationen drei Kategorien zuordnen:

- (1) Korrelationen, die wahrscheinlich auf Signalketten oder Koexpressionen der malignen Zelle zurückzuführen sind,
- (2) Korrelationen, die wahrscheinlich auf Signalketten oder Koexpressionen tumorinfiltrierender Zellen zurückzuführen sind,
- (3) Korrelationen, die auf Wechselwirkungen zwischen malignen Zellen und tumorinfiltrierenden Zellen hindeuten.

Die negative Korrelation von p-STAT3 und BCL-2 ist der ersten Kategorie zuzuordnen. Da bisher davon auszugehen ist, dass die BCL-2 Expression durch p-STAT3 vermittelt wird und die Therapie mit Rituximab dazu passend zu einer reduzierten BCL-2 Expression und einem Rückgang von p-STAT3 führt, wäre eine positive Korrelation zu erwarten gewesen ¹⁸⁰. In diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen des ABC-Typs (activated B-cell origin) wurde jedoch ebenfalls ein negativer Zusammenhang zwischen p-STAT3 und BCL-2 beschrieben ¹⁸². Inwieweit es sich hier um ähnliche Mechanismen in PCBLT und in nicht kutanen diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen handelt, wäre durch weitere Untersuchungen zu prüfen.

In die zweite Kategorie fallen die positiven Korrelationen zwischen CD30 und CD4 sowie zwischen PD-1 und CD4. Letztere ist am ehesten auf die Koexpression von PD-1 und CD4 auf tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten zurückzuführen ^{94, 154}. Weniger eindeutig ist die Zuordnung der CD30 Expression zu einem Zelltyp, da CD30 sowohl in einigen wenigen Fällen auf malignen Zellen des PCBLT nachgewiesen wurde als auch auf CD4+ oder CD8+ T-Zellen ^{181, 183}. Auf Grund der Seltenheit der Fälle scheint die Expression auf tumorinfiltrierenden Zellen relevanter. Somit wäre eine Koexpression auf CD4+ T-Lymphozyten als Erklärung des Zusammenhangs denkbar. Es könnte sich jedoch auch um eine Modulierung der Zahl regulatorischer T-Zellen durch CD30+ Zellen handeln, wie sie in großzelligen Lymphomen nach Organtransplantationen beobachtet wurde ¹⁸⁴. Zur eindeutigeren Zuordnung wäre eine Kofärbung von CD30 und CD4 sinnvoll.

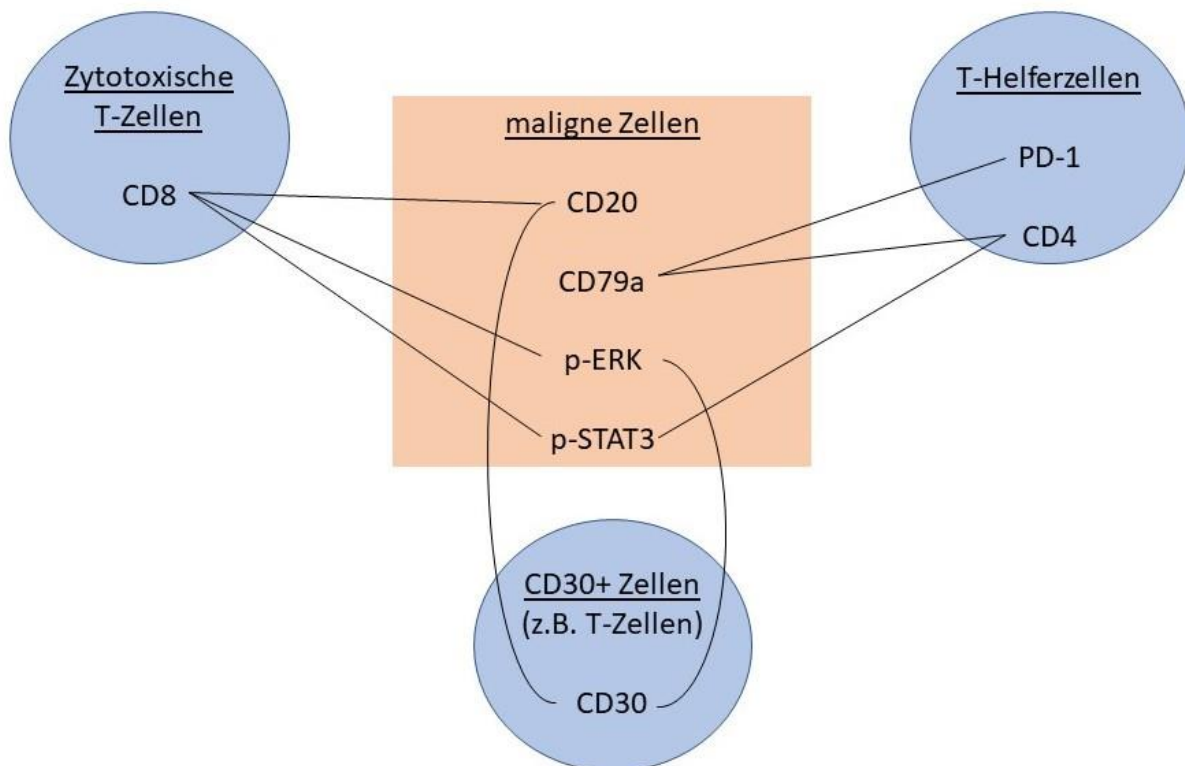


Abbildung 21: Korrelationen in Proben primär kutan diffus-großzelliger B-Zell-Lymphome, die auf Wechselwirkungen der malignen Zelle mit tumorinfiltrierenden Zellen hindeuten

Die übrigen Korrelationen zwischen CD79a und CD4, p-ERK und CD4, CD20 und CD8, CD8 und p-ERK, p-STAT3 und CD8, CD30 und CD20, PD-1 und CD20 sowie CD30 und p-ERK entfallen auf die dritte Kategorie (Abbildung 21). Da bisher nur wenig Literatur zu tumorinfiltrierenden Zellen und insbesondere zur Wechselwirkung zwischen Tumormikroumgebung und malignen Zellen des PCBLT vorliegt, ist eine differenzierte Einordnung jeder Korrelation für sich genommen nicht möglich. Dennoch ergibt sich das Gesamtbild einer wechselseitigen Beeinflussung maligner und tumorinfiltrierender Zellen. Auch ohne eine Interpretation und Prüfung jeder einzelnen Korrelation unterstützt dieses Bild einer intensiven Wechselwirkung, die Notwendigkeit weiterer Forschung im Bereich der Tumormikroumgebung zum Verständnis der Pathophysiologie des PCBLT und lässt therapeutisches Potenzial vermuten.

Bei Betrachtung insbesondere der dritten Kategorie werden die Grenzen der vorliegenden Arbeit erneut deutlich. Hier können allenfalls Hinweise auf mögliche relevante Zusammenhänge gesammelt werden, eine differenzierte Betrachtung und endgültige Interpretation bleibt jedoch zukünftigen Arbeiten vorbehalten. Zudem zeigt sich anhand der fehlenden Korrelation von CD79a und CD20, dass es auf Grund der

Einbeziehung von Proben nach bereits erfolgter Therapie zu Verfälschungen - wie zum Beispiel dem hier vermuteten Verlust von CD20 nach Rituximabtherapie - kommt¹⁵⁰. Es konnten dennoch einerseits weitere Belege für intensive Wechselwirkungen mit der Tumormikroumgebung und andererseits Ansatzpunkte für weitere Forschungsarbeiten geliefert werden.

4.3.5 Primär kutanes Follikelzentrumslymphom

Ähnlich wie für PCBLT konnten für PCFCL Korrelationen identifiziert werden, die auf Wechselwirkungen der malignen Zelle und der Tumormikroumgebung schließen lassen. Analog zum vorherigen Absatz können diese in drei Kategorien eingeteilt werden.

Betrachten wir zunächst Hinweise auf Signalketten innerhalb der malignen Zelle: Anders als bei anderen Entitäten war in PCFCL Proben der Zusammenhang zwischen p-ERK und p-MEK, wie er im MAPK-Signalweg zu erwarten wäre, eindeutig zu beobachten. Diese Beobachtung passt zu Erkenntnissen aus genetischen Untersuchungen der PCFCL Zellen. In diesen konnten, anders als in anderen kutanen Lymphomen, keine Mutationen nachgewiesen werden, die sich auf ERK auswirken könnten, weshalb dessen Aktivierung wahrscheinlich überwiegend durch p-MEK moduliert wird¹⁸⁵.

Mit Blick auf mögliche Zusammenhänge innerhalb der tumorinfiltrierenden Zellen zeigte sich wie bereits bei PCBLT Proben die positive Korrelation von CD4 und PD-1. Diese ist am ehesten auf eine Koexpression der beiden Marker auf tumorinfiltrierenden T-Helferzellen zurückzuführen^{94, 154}. Eine Expression von PD-1 auf malignen Zellen konnte in PCFCL Proben bisher nicht beobachtet werden^{94, 154}. Außerdem zeigte sich eine positive Korrelation von CD4 und CD8. Bisher existieren kaum Untersuchungen zu tumorinfiltrierenden Lymphozyten des PCFCL. Lediglich Cetinözman et al. wiesen nach, dass in PCFCL Proben zwischen 10 und 50 % CD3+ T-Zellen vorliegen¹⁵⁴. Gleichzeitig legen die von Felcht et al. erhobenen Daten nahe, dass es sich bei einem großen Teil der CD4+ Zellen in PCFCL Proben um regulatorische T-Zellen handelt¹⁴⁴. Es ist auf dieser Basis jedoch keine eindeutige Aussage darüber möglich, ob es sich bei der hier beobachteten Korrelation zwischen CD4 und CD8 lediglich um eine gemeinsame Veränderung der Zahl CD4+ und CD8+ T-Zellen je nach Intensität der

Immunantwort handelt oder ob die CD4+ Zellen als regulatorische T-Zellen die Zahl der CD8+ Zellen mitbeeinflussen.

Die dritte Kategorie bestehend aus den Korrelationen, welche auf Wechselwirkungen zwischen malignen Zellen und tumorinfiltrierenden Zellen hindeuten, lässt sich weiter in zwei Untergruppen unterteilen: Einerseits die Korrelationen mit CD30 und andererseits die den MAPK-Signalweg betreffenden Korrelationen. Die Expression von CD30 korrelierte positiv mit der von CD79a und negativ mit der von p-ERK. CD30 wurde bisher nur in Einzelfällen auf malignen Zellen des PCFCL nachgewiesen^{82, 186}. Es fehlen jedoch systematische Untersuchungen, die Aufschluss über die tatsächliche Häufigkeit der Expression auf malignen Zellen geben^{82, 186}. Dementsprechend könnte die hier beobachtete Korrelation theoretisch auf eine Koexpression von CD79a und CD30 auf malignen Zellen zurückgehen. Dies erscheint vor dem Hintergrund der negativen Korrelation mit p-ERK eher unwahrscheinlich, da bei einer Expression von CD30 auf malignen Zellen durch die Aktivierung des MAPK-Signalwegs eher mit einer positiven Korrelation mit p-ERK zu rechnen wäre¹⁸⁷. Vermutlich handelt es sich also bei beiden Korrelationen um Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen der malignen Zelle und CD30+ Zellen der Tumormikroumgebung. Eine weitere Betrachtung der Expression von CD30 sowohl auf malignen Zellen als auch auf tumorinfiltrierenden Zellen der PCFCL erscheint sinnvoll, um mögliche pathophysiologisch relevante Mechanismen oder relevante Subgruppen zu identifizieren.

Auffallend viele positive Korrelationen zeigten sich zwischen PD-1 oder CD4 und den Markern p-ERK oder p-MEK. Naheliegender erscheint - sofern man davon ausgeht, dass p-ERK und p-MEK überwiegend in malignen Zellen nachgewiesen wurden - entweder ein aktivierender Einfluss CD4+ und PD-1+ Zellen der Tumormikroumgebung auf den MAPK-Signalweg der Tumorzellen oder eine Steigerung der Zahl CD4+ und PD-1+ Zellen durch einen aktiveren MAPK-Signalweg in malignen Zellen. Bis auf vereinzelte Untersuchungen genetischer Veränderung, welche ohne wegweisende Erkenntnisse für die Pathogenese blieben, ist der MAPK-Signalweg in PCFCL bisher kaum untersucht. Vor dem Hintergrund der hier erhobenen Daten ist jedoch seine pathogenetische Relevanz insbesondere mit Blick auf Wechselwirkungen mit der Tumormikroumgebung zumindest zu diskutieren. Eine konkrete Einordnung seiner

Bedeutung kann aus den hier erhobenen Daten nicht vorgenommen werden, bietet jedoch einen Ansatzpunkt für zukünftige Arbeiten.

4.3.6 Primär kutanes Marginalzonen-Lymphom

Auch bei Betrachtung der Korrelationen des PCMZL bietet sich die in 4.3.4 beschriebene Einteilung an, obwohl die Zuordnung hier ebenso lediglich auf Annahmen aufbaut, welche Zelltypen den Marker hauptsächlich exprimieren. Diese müssen in zukünftigen Arbeiten überprüft werden.

Die positive Korrelation von CD79a und p-MEK geht am ehesten auf eine verstärkte Aktivierung des MAPK-Signalwegs in malignen Zellen, die typischerweise CD79a+ sind, zurück. Untersuchungen der Aktivität des MAPK-Signalwegs in malignen Zellen der PCMZL fehlen jedoch bislang. Vergleichende Untersuchungen des Signalwegs mit gesunden Zellen oder CTCL Proben erscheinen unter Berücksichtigung seiner Rolle in CTCL sowie auf Grund der hier beobachteten Korrelation sinnvoll.

Bezüglich Korrelationen, die auf Zellen der Tumormikroumgebung zurückgehen, zeigte sich auch für PCMZL eine positive Korrelation von CD8 und CD4 sowie von PD-1 und CD4. Erstere ist am ehesten auf eine gemeinsame Veränderung der Zahl CD4+ und CD8+ T-Zellen in der Tumormikroumgebung je nach Ausprägung der Immunantwort gegen die malignen Zellen zurückzuführen. Eine gegenseitige Beeinflussung ist nicht wahrscheinlich, da regulatorische T-Zellen in PCMZL Proben bisher kaum nachgewiesen wurden^{35, 188}. Die Korrelation von PD-1 und CD4 scheint die Koexpression beider Marker auf T-Helferzellen abzubilden, wie sie für tumorinfiltrierende Zellen des PCMZL bereits beschrieben wurde^{94, 154}. PD-1 wurde bisher nicht auf malignen Zellen des PCMZL nachgewiesen⁹⁴.

Die größte Gruppe bildeten auch bei Betrachtung des PCMZL Korrelationen, die Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen malignen Zellen und Tumormikroumgebung geben. Dabei zeigten sich einerseits eine positive Korrelation zwischen CD30 und PD-1 und andererseits positive Korrelationen zwischen den Markern tumorinfiltrierender T-Zellen (CD4, CD8, PD-1) und p-STAT3. Die Korrelation von CD30 und PD-1 geht wahrscheinlich auf das von Prieto-Torres et al. beschriebene histologische Bild in PCMZL zurück, in welchem sich bei CD30+ Varianten PD-1+

Zellen rosettenartig um maligne Zellen gruppieren ¹⁸⁹. Die Wechselwirkung zwischen maligner Zelle und den PD-1+ Zellen ist bisher nicht differenzierter beschrieben worden. Ebenso fehlen Angaben zur Häufigkeit CD30+ Varianten des PCMZL, sodass unklar ist, ob die hier beobachtete CD30 Expression tatsächlich auf maligne Zellen zurückgeht.

Da sowohl CD4 als auch PD-1 und CD8 positiv mit p-STAT3 korrelieren, ergeben sich Hinweise auf Zusammenhänge zwischen der Immunantwort in der Umgebung des Tumors und der Aktivierung von STAT3 in der malignen Zelle. Untersuchungen des JAK-STAT-Signalwegs fehlen bislang für PCMZL. Diese wären jedoch die Voraussetzung für Aussagen darüber, ob hier tatsächlich ein kausaler Zusammenhang vorliegt und inwieweit dieser pathogenetisch relevant und therapeutisch nutzbar ist. Ebenso sollte überprüft werden, ob die hier beobachtete Aktivierung von STAT3 tatsächlich überwiegend in malignen Zellen und nicht in tumorinfiltrierenden Zellen stattfindet.

Insgesamt ist sowohl die Rolle der Tumormikroumgebung als auch die Veränderung von Signalwegen in der malignen Zelle für PCMZL kaum untersucht. Dadurch gestaltet sich die Einordnung der Beziehungen zwischen den untersuchten Markern schwierig. Es konnten relevante Ansatzpunkte für zukünftige Forschung - wie zum Beispiel die weitere Untersuchung des JAK-STAT-Signalwegs - identifiziert werden. Zudem scheint auch bei PCMZL Proben die weitere Charakterisierung der Beziehung von malignen Zellen mit Zellen der Tumormikroumgebung sinnvoll.

4.4 Konklusion und Ausblick

Insgesamt konnte durch die vorliegende Arbeit der TMA als Methode zur Auswertung größerer Probenzahlen kutaner Lymphome weiter etabliert werden. Dabei wurden relevante diagnostische und therapeutische Marker auf Proteinebene identifiziert. Zusätzlich ergaben sich Ansatzpunkte zum besseren Verständnis der Pathophysiologie kutaner Lymphome sowie deren zielgerichteter Therapie.

Von besonderer diagnostischer Relevanz sind die Identifikation von p-MEK und p-STAT3 zur Unterscheidung von MF und SS sowie die Unterschiede im Hinblick auf die Anzahl CD4+ Zellen in der Tumormikroumgebung der CBCL. Diese

Beobachtungen sind außerdem für die Entwicklung neuer Therapieformen und die Anwendung bereits bestehender Therapien relevant. Mit BCL-2 und CD20 konnten zwei potentielle Marker für die Tumorprogression der MF identifiziert werden.

Durch die Korrelation der untersuchten Marker ergaben sich Hinweise auf relevante Signalketten. Vor allem die enge Beziehung zwischen Tumor und Tumormikroumgebung konnte weiter herausgearbeitet werden. So zeigten sich für das SS Zusammenhänge zwischen der PD-L1 Expression der malignen Zelle und dem Verhältnis zwischen CD4+ und CD8+ Zellen in der Tumorumgebung. In PCFCL Proben ergaben sich Hinweise auf Wechselwirkungen des MAPK-Signalwegs mit tumorinfiltrierenden T-Zellen. Ebenso scheinen in PCMZL Zusammenhänge zwischen der Aktivierung von STAT3 und der Zahl tumorinfiltrierender T-Zellen zu bestehen. In PCBLT Proben waren Korrelationen von Markern der malignen Zelle und Markern tumorinfiltrierender Zellen besonders zahlreich.

Da die Identifikation des Zelltyps auf Grund fehlender Kofärbungen nicht sicher möglich war, sollten in zukünftige Arbeiten zur Überprüfung der hier identifizierten Marker und Zusammenhänge neben einer größeren Probenzahl und einer gezielteren Auswahl von Proben vor jeglicher Therapie vor allem auf Kofärbungen derjenigen Marker Wert gelegt werden, deren sichere Zuordnung zu einem Zelltyp hier nicht möglich war. Insbesondere zur Bestätigung der diagnostischen Marker scheinen multizentrische Studien mit größeren Patientenkollektiven sinnvoll. Die zahlreichen Wechselwirkungen zwischen malignen Zellen und Tumormikroumgebung sollten, sofern sie sich in weiteren Arbeiten bestätigen, auf ihr therapeutisches Potenzial überprüft werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Kutane T- und B-Zell-Lymphome umfassen eine heterogene Gruppe seltener maligner Erkrankungen der Haut. Häufige T-Zell-Lymphome sind die Mycosis fungoides (MF), das Sézary Syndrom (SS) und das primär kutane anaplastisch großzellige Lymphom (PCALCL). Das primär kutane diffus-großzellige B-Zell-Lymphom, leg type (PCBLT), das primär kutane Follikelzentrumslymphom (PCFCL) und das primär kutane Marginalzonen-Lymphom (PCMZL) sind relevante Vertreter kutaner B-Zell-Lymphome. Durch die Seltenheit der Erkrankung und die Ähnlichkeiten im klinischen und histologischen Erscheinungsbild vergehen häufig Jahre bis zur korrekten Diagnose. Eine besondere Herausforderung stellt die histologische Unterscheidung von Mycosis fungoides und Sézary Syndrom dar. Patienten mit kutanen Lymphomen stehen außerdem aktuell keine kurativen Therapieoptionen zur Verfügung. Verglichen mit häufigeren malignen Erkrankungen besteht nur ein unzureichendes Verständnis pathophysiologischer Veränderungen, welches die Basis zur Entwicklung neuer Therapieansätze bildet. Eine vielversprechende Methode zur immunhistochemischen Untersuchung größerer Probenzahlen, die zum besseren Verständnis der Pathophysiologie und zur Identifikation diagnostisch und therapeutisch relevanter Marker beitragen kann, ist das Tissue-Microarray.

In der vorliegenden Arbeit wurden 121 Proben von 57 Patienten mit kutanen T- und B-Zell-Lymphomen unter Verwendung eines Tissue-Microarrays immunhistochemisch auf folgende Marker untersucht: CD4, CD8, CD20, CD30, CD79a, PD-1, PD-L1, p-STAT3, BCL-2, p-MEK und p-ERK. Die Eignung des Tissue-Microarrays als Methode zur effizienten Analyse kutaner Lymphomproben, hauptsächlich mit Screening- aber auch mit Bestätigungscharakter, konnte dabei belegt werden.

Mit p-STAT3 und p-MEK konnten zwei Marker zur Unterscheidung von Mycosis fungoides und Sézary Syndrom identifiziert werden. Beide waren in Sézary Proben signifikant stärker exprimiert. Darüber hinaus zeigte sich in Mycosis fungoides Proben eine stadienabhängige Veränderung von BCL-2, dessen Expression in höheren Stadien abnahm, und CD20, dessen Expression in höheren Stadien zunahm. Beide Marker kämen somit als Hinweisgeber für eine Tumorprogression in Frage. Mögliche diagnostisch relevante Unterschiede ergaben sich für kutane B-Zell-Lymphome

hinsichtlich der Zahl CD4+ Zellen in der Umgebung des Tumors. In Proben primär kutaner diffus-großzelliger B-Zell-Lymphome, leg type zeigte sich deren Zahl verglichen mit den beiden anderen untersuchten B-Zell-Lymphomen vermindert.

Neben diesen diagnostisch und therapeutisch relevanten Markern konnten Ansatzpunkte zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie kutaner Lymphome herausgearbeitet werden. Insbesondere die zentrale Rolle der Wechselwirkung zwischen Tumormikroumgebung und maligner Zelle ist hier zu unterstreichen. So konnten für das Sézary Syndrom Zusammenhänge zwischen der PD-L1 Expression der malignen Zelle und dem Verhältnis zwischen CD4+ und CD8+ Zellen in der Tumorumgebung beobachtet werden. Ebenso zeigten die verschiedenen kutanen B-Zell-Lymphome zahlreiche Korrelationen zwischen Markern, die eher Signalwegen der malignen Zellen zuzuordnen sind, und Markern, die eher auf Zellen der Tumormikroumgebung zurückgehen. In primär kutanen Follikelzentrumslymphomen könnte nach den hier erhobenen Ergebnissen der MAP-Kinase-Signalweg, in primär kutanen Marginalzonen-Lymphomen der JAK-STAT-Signalweg, relevant für die Beziehung zwischen maligner Zelle und Tumormikroumgebung sein.

Auf Grund der geringen Probenzahl sollten die Beobachtungen in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Insbesondere die beschriebenen Korrelationen liefern lediglich Hinweise auf mögliche Zusammenhänge. Aussagen über deren pathophysiologische Bedeutung können erst auf Basis zukünftiger Forschungen getroffen werden. Die hier aufgezeigten Ansatzpunkte bieten das Potential zu einem tieferen Verständnis kutaner Lymphome sowie einer Verbesserung von Diagnostik und Therapie.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Klemke, C-D: Kutane Lymphome. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 12: 7-31, 2014.
2. Sampogna, F, Frontani, M, Baliva, G, Lombardo, GA, Alvetreti, G, Di Pietro, C, Tabolli, S, Russo, G, Abeni, D: Quality of life and psychological distress in patients with cutaneous lymphoma. *British Journal of Dermatology*, 160: 815-822, 2009.
3. Demierre, MF, Gan, S, Jones, J, Miller, DR: Significant impact of cutaneous T-cell lymphoma on patients' quality of life: results of a 2005 National Cutaneous Lymphoma Foundation Survey. *Cancer*, 107: 2504-2511, 2006.
4. Hristov, AC, Tejasvi, T, Wilcox, RA: Mycosis fungoides and Sézary syndrome: 2019 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American journal of hematology*, 94: 1027-1041, 2019.
5. Foss, FM, Girardi, M: Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome. *Hematology/oncology clinics of North America*, 31: 297-315, 2017.
6. Kempf, W, Zimmermann, AK, Mitteldorf, C: Cutaneous lymphomas-An update 2019. *Hematol Oncol*, 37 Suppl 1: 43-47, 2019.
7. Nagler, AR, Samimi, S, Schaffer, A, Vittorio, CC, Kim, EJ, Rook, AH: Peripheral blood findings in erythrodermic patients: importance for the differential diagnosis of Sezary syndrome. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 66: 503-508, 2012.
8. Jawed, SI, Myskowski, PL, Horwitz, S, Moskowitz, A, Querfeld, C: Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sezary syndrome): part I. Diagnosis: clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 70: 205.e201-216; quiz 221-202, 2014.
9. Beyeler, M, Burg, G, Dummer, R: Kutane Lymphome. *Der Hautarzt*, 55: 1005-1017, 2004.
10. Swerdlow, SH, Campo, E, Pileri, SA, Harris, NL, Stein, H, Siebert, R, Advani, R, Ghielmini, M, Salles, GA, Zelenetz, AD: The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 127: 2375-2390, 2016.
11. Willemze, R, Cerroni, L, Kempf, W, Berti, E, Facchetti, F, Swerdlow, SH, Jaffe, ES: The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood*, 133: 1703-1714, 2019.
12. Dippel, E, Assaf, C, Becker, JC, Bergwelt-Baildon, Mv, Bernreiter, S, Cozzio, A, Eich, HT, Elsayad, K, Follmann, M, Grabbe, S, Hillen, U, Klapper, W, Klemke, C-D, Loquai, C, Meiss, F, Mitteldorf, C, Wehkamp, U, Nashan, D, Nicolay, JP, Oschlies, I, Schlaak, M, Stranzenbach, R, Stoll, C, Vag, T, Weichenthal, M, Wobser, M, Stadler, R: S2k - Leitlinie - Kutane Lymphome (ICD10 C82 - C86) Update 2021. 30.06.2021 ed. <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/032-027.html>, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2021.
13. Willemze, R, Jaffe, ES, Burg, G, Cerroni, L, Berti, E, Swerdlow, SH, Ralfkiaer, E, Chimenti, S, Diaz-Perez, JL, Duncan, LM, Grange, F, Harris, NL, Kempf, W, Kerl, H, Kurrer, M, Knobler, R,

- Pimpinelli, N, Sander, C, Santucci, M, Sterry, W, Vermeer, MH, Wechsler, J, Whittaker, S, Meijer, CJLM: WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*, 105: 3768-3785, 2005.
14. Swerdlow, SH, Campo, E, Pileri, SA, Harris, NL, Stein, H, Siebert, R, Advani, R, Ghielmini, M, Salles, GA, Zelenetz, AD, Jaffe, ES: The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 127: 2375-2390, 2016.
 15. Mitteldorf, C, Grabbe, S, Stadler, R: WHO-Klassifikation und klinisches Spektrum der kutanen Lymphome. *Der Hautarzt*, 68: 682-695, 2017.
 16. Wilcox, RA: Cutaneous T-cell lymphoma: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American journal of hematology*, 92: 1085-1102, 2017.
 17. Pulitzer, M: Cutaneous T-cell Lymphoma. *Clinics in laboratory medicine*, 37: 527-546, 2017.
 18. Vonderheid, EC, Pena, J, Nowell, P: Sezary cell counts in erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: implications for prognosis and staging. *Leukemia & lymphoma*, 47: 1841-1856, 2006.
 19. Kohnken, R, Fabbro, S, Hastings, J, Porcu, P, Mishra, A: Sézary Syndrome: Clinical and Biological Aspects. *Current hematologic malignancy reports*, 11: 468-479, 2016.
 20. Klemke, CD, Booken, N, Weiss, C, Nicolay, JP, Goerdts, S, Felcht, M, Geraud, C, Kempf, W, Assaf, C, Ortonne, N, Battistella, M, Bagot, M, Knobler, R, Quaglino, P, Arheiliger, B, Santucci, M, Jansen, P, Vermeer, MH, Willemze, R: Histopathological and immunophenotypical criteria for the diagnosis of Sezary syndrome in differentiation from other erythrodermic skin diseases: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Cutaneous Lymphoma Task Force Study of 97 cases. *The British journal of dermatology*, 173: 93-105, 2015.
 21. Boonk, SE, Zoutman, WH, Marie-Cardine, A, van der Fits, L, Out-Luiting, JJ, Mitchell, TJ, Tosi, I, Morris, SL, Moriarty, B, Booken, N, Felcht, M, Quaglino, P, Ponti, R, Barberio, E, Ram-Wolff, C, Jantti, K, Ranki, A, Bernengo, MG, Klemke, CD, Bensussan, A, Michel, L, Whittaker, S, Bagot, M, Tensen, CP, Willemze, R, Vermeer, MH: Evaluation of Immunophenotypic and Molecular Biomarkers for Sezary Syndrome Using Standard Operating Procedures: A Multicenter Study of 59 Patients. *The Journal of investigative dermatology*, 136: 1364-1372, 2016.
 22. Scarisbrick, JJ, Prince, HM, Vermeer, MH, Quaglino, P, Horwitz, S, Porcu, P, Stadler, R, Wood, GS, Beylot-Barry, M, Pham-Ledard, A: Cutaneous Lymphoma International Consortium study of outcome in advanced stages of mycosis fungoides and Sézary syndrome: effect of specific prognostic markers on survival and development of a prognostic model. *Journal of Clinical Oncology*, 33: 3766, 2015.
 23. Brown, RA, Fernandez-Pol, S, Kim, J: Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma. *J Cutan Pathol*, 44: 570-577, 2017.
 24. Kempf, W, Pfaltz, K, Vermeer, MH, Cozzio, A, Ortiz-Romero, PL, Bagot, M, Olsen, E, Kim, YH, Dummer, R, Pimpinelli, N, Whittaker, S, Hodak, E, Cerroni, L, Berti, E, Horwitz, S, Prince, HM, Guitart, J, Estrach, T, Sanches, JA, Duvic, M, Ranki, A, Dreno, B, Ostheeren-Michaelis, S, Knobler, R, Wood, G, Willemze, R: EORTC, ISCL, and USCLC consensus recommendations for the treatment of primary cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorders:

- lymphomatoid papulosis and primary cutaneous anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*, 118: 4024-4035, 2011.
25. Kempf, W, Kazakov, DV, Paredes, BE, Laeng, HR, Palmedo, G, Kutzner, H: Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma with angioinvasive features and cytotoxic phenotype: a rare lymphoma variant within the spectrum of CD30+ lymphoproliferative disorders. *Dermatology (Basel, Switzerland)*, 227: 346-352, 2013.
26. Senff, NJ, Kluin-Nelemans, HC, Willemze, R: Results of bone marrow examination in 275 patients with histological features that suggest an indolent type of cutaneous B-cell lymphoma. *British journal of haematology*, 142: 52-56, 2008.
27. Swerdlow, SH, Quintanilla-Martinez, L, Willemze, R, Kinney, MC: Cutaneous B-cell lymphoproliferative disorders: report of the 2011 Society for Hematopathology/European Association for Haematopathology workshop. *American journal of clinical pathology*, 139: 515-535, 2013.
28. Goteri, G, Ranaldi, R, Simonetti, O, Capretti, R, Menzo, S, Stramazotti, D, Morichetti, D, Offidani, AM, Rupoli, S, Leoni, P: Clinicopathological features of primary cutaneous B-cell lymphomas from an academic regional hospital in central Italy: no evidence of *Borrelia burgdorferi* association. *Leukemia & lymphoma*, 48: 2184-2188, 2007.
29. Skala, SL, Hristov, B, Hristov, AC: Primary Cutaneous Follicle Center Lymphoma. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 142: 1313-1321, 2018.
30. Senff, NJ, Noordijk, EM, Kim, YH, Bagot, M, Berti, E, Cerroni, L, Dummer, R, Duvic, M, Hoppe, RT, Pimpinelli, N: European Organization for Research and Treatment of Cancer and International Society for Cutaneous Lymphoma consensus recommendations for the management of cutaneous B-cell lymphomas. *Blood*, 112: 1600-1609, 2008.
31. Schafernak, KT, Variakojis, D, Goolsby, CL, Tucker, RM, Martínez-Escala, ME, Smith, FA, Dittman, D, Chenn, A, Guitart, J: Clonality assessment of cutaneous B-cell lymphoid proliferations: a comparison of flow cytometry immunophenotyping, molecular studies, and immunohistochemistry/in situ hybridization and review of the literature. *The American Journal of dermatopathology*, 36: 781-795, 2014.
32. Farhadian, J, Terushkin, V, Meehan, SA, Latkowski, JA: Primary cutaneous marginal-zone lymphoma. *Dermatology online journal*, 22, 2016.
33. Hope, CB, Pincus, LB: Primary Cutaneous B-cell Lymphomas. *Clinics in laboratory medicine*, 37: 547-574, 2017.
34. Suárez, AL, Pulitzer, M, Horwitz, S, Moskowitz, A, Querfeld, C, Myskowski, PL: Primary cutaneous B-cell lymphomas: Part I. Clinical features, diagnosis, and classification. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 69: 329.e321-329.e313, 2013.
35. Eninger, JT, Kant, JA, Swerdlow, SH: Cutaneous marginal zone lymphomas have distinctive features and include 2 subsets. *The American journal of surgical pathology*, 34: 1830-1841, 2010.
36. Schreuder, M, Hoefnagel, J, Jansen, P, Van Krieken, J, Willemze, R, Hebeda, K: FISH analysis of MALT lymphoma-specific translocations and aneuploidy in primary cutaneous marginal zone lymphoma. *The Journal of pathology*, 205: 302-310, 2005.

37. Grange, F, Beylot-Barry, M, Courville, P, Maubec, E, Bagot, M, Vergier, B, Souteyrand, P, Machet, L, Dalac, S, Esteve, E: Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type: clinicopathologic features and prognostic analysis in 60 cases. *Archives of dermatology*, 143: 1144-1150, 2007.
38. Swerdlow, S, Campo, E, Harris, N, Jaffe, E, Pileri, S, Stein, H, Thiele, J, Vardiman, J: WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC. *World Health Organization Classification of Tumours*, 2008.
39. Hristov, AC: Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type: diagnostic considerations. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 136: 876-881, 2012.
40. Muniesa, C, Pujol, RM, Estrach, MT, Gallardo, F, García-Muret, MP, Climent, J, Salar, A, Servitje, O: Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type and secondary cutaneous involvement by testicular B-cell lymphoma share identical clinicopathological and immunophenotypical features. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 66: 650-654, 2012.
41. Grange, F, Bekkenk, MW, Wechsler, J, Meijer, C, Cerroni, L, Bernengo, M, Bosq, J, Hedelin, G, Fink Puches, R, Van Vloten, W: Prognostic factors in primary cutaneous large B-cell lymphomas: a European multicenter study. *Journal of Clinical Oncology*, 19: 3602-3610, 2001.
42. Yumeen, S, Girardi, M: Insights Into the Molecular and Cellular Underpinnings of Cutaneous T Cell Lymphoma. *Yale J Biol Med*, 93: 111-121, 2020.
43. Walia, R, Yeung, CCS: An Update on Molecular Biology of Cutaneous T Cell Lymphoma. *Front Oncol*, 9: 1558, 2019.
44. Bastidas Torres, AN, Najidh, S, Tensen, CP, Vermeer, MH: Molecular advances in cutaneous T-cell lymphoma. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 37: 81-86, 2018.
45. da Silva Almeida, AC, Abate, F, Khiabani, H, Martinez-Escala, E, Guitart, J, Tensen, CP, Vermeer, MH, Rabadan, R, Ferrando, A, Palomero, T: The mutational landscape of cutaneous T cell lymphoma and Sézary syndrome. *Nature genetics*, 47: 1465-1470, 2015.
46. Choi, J, Goh, G, Walradt, T, Hong, BS, Bunick, CG, Chen, K, Bjornson, RD, Maman, Y, Wang, T, Tordoff, J: Genomic landscape of cutaneous T cell lymphoma. *Nature genetics*, 47: 1011-1019, 2015.
47. Wang, L, Ni, X, Covington, KR, Yang, BY, Shiu, J, Zhang, X, Xi, L, Meng, Q, Langridge, T, Drummond, J, Donehower, LA, Doddapaneni, H, Muzny, DM, Gibbs, RA, Wheeler, DA, Duvic, M: Genomic profiling of Sezary syndrome identifies alterations of key T cell signaling and differentiation genes. *Nature genetics*, 47: 1426-1434, 2015.
48. Ungewickell, A, Bhaduri, A, Rios, E, Reuter, J, Lee, CS, Mah, A, Zehnder, A, Ohgami, R, Kulkarni, S, Armstrong, R, Weng, W-K, Gratzinger, D, Tavallaee, M, Rook, A, Snyder, M, Kim, Y, Khavari, PA: Genomic analysis of mycosis fungoides and Sézary syndrome identifies recurrent alterations in TNFR2. *Nature genetics*, 47: 1056-1060, 2015.
49. Kanehisa, M, Goto, S: KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28: 27-30, 2000.

50. Nicolay, JP, Wobser, M: Cutaneous B-cell lymphomas - pathogenesis, diagnostic workup, and therapy. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, 14: 1207-1224, 2016.
51. Owen, KL, Brockwell, NK, Parker, BS: JAK-STAT Signaling: A Double-Edged Sword of Immune Regulation and Cancer Progression. *Cancers*, 11, 2019.
52. Maurus, K, Appenzeller, S, Roth, S, Brändlein, S, Kneitz, H, Goebeler, M, Rosenwald, A, Geissinger, E, Wobser, M: Recurrent Oncogenic JAK and STAT Alterations in Cutaneous CD30-Positive Lymphoproliferative Disorders. *The Journal of investigative dermatology*, 140: 2023-2031.e2021, 2020.
53. Nicolay, JP, Felcht, M, Schledzewski, K, Goerdts, S, Géraud, C: Sézary syndrome: old enigmas, new targets. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, 14: 256-264, 2016.
54. Rosenquist, R, Beà, S, Du, MQ, Nadel, B, Pan-Hammarström, Q: Genetic landscape and deregulated pathways in B-cell lymphoid malignancies. *J Intern Med*, 282: 371-394, 2017.
55. Cinats, A, Heck, E, Robertson, L: Janus Kinase Inhibitors: A Review of Their Emerging Applications in Dermatology. *Skin therapy letter*, 23: 5-9, 2018.
56. Courtney, AH, Lo, WL, Weiss, A: TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation. *Trends in biochemical sciences*, 43: 108-123, 2018.
57. Devata, S, Wilcox, RA: Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Review with a Focus on Targeted Agents. *American journal of clinical dermatology*, 17: 225-237, 2016.
58. García-Díaz, N, Piris, M, Ortiz-Romero, PL, Vaqué, JP: Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: An Integrative Review of the Pathophysiology, Molecular Drivers, and Targeted Therapy. *Cancers*, 13, 2021.
59. Barrios, DM, Do, MH, Phillips, GS, Postow, MA, Akaike, T, Nghiem, P, Lacouture, ME: Immune checkpoint inhibitors to treat cutaneous malignancies. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 83: 1239-1253, 2020.
60. Morrison, DK: MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4, 2012.
61. Park, J, Yang, J, Wenzel, AT, Ramachandran, A, Lee, WJ, Daniels, JC, Kim, J, Martinez-Escala, E, Amankulor, N, Pro, B, Guitart, J, Mendillo, ML, Savas, JN, Boggon, TJ, Choi, J: Genomic analysis of 220 CTCLs identifies a novel recurrent gain-of-function alteration in RLTPR (p.Q575E). *Blood*, 130: 1430-1440, 2017.
62. Watanabe, M, Sasaki, M, Itoh, K, Higashihara, M, Umezawa, K, Kadin, ME, Abraham, LJ, Watanabe, T, Horie, R: JunB induced by constitutive CD30-extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase signaling activates the CD30 promoter in anaplastic large cell lymphoma and reed-sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Cancer research*, 65: 7628-7634, 2005.
63. Chakraborty, AR, Robey, RW, Luchenko, VL, Zhan, Z, Piekarz, RL, Gillet, J-P, Kossenkov, AV, Wilkerson, J, Showe, LC, Gottesman, MM, Collie, NL, Bates, SE: MAPK pathway activation leads to Bim loss and histone deacetylase inhibitor resistance: rationale to combine romidepsin with an MEK inhibitor. *Blood*, 121: 4115-4125, 2013.

64. Kiessling, MK, Nicolay, JP, Schlor, T, Klemke, CD, Suss, D, Krammer, PH, Gulow, K: NRAS mutations in cutaneous T cell lymphoma (CTCL) sensitize tumors towards treatment with the multikinase inhibitor Sorafenib. *Oncotarget*, 8: 45687-45697, 2017.
65. Mitchell, S, Vargas, J, Hoffmann, A: Signaling via the NF κ B system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 8: 227-241, 2016.
66. Vermeer, MH, Willemze, R: Recent advances in primary cutaneous B-cell lymphomas. *Current opinion in oncology*, 26: 230-236, 2014.
67. Damsky, WE, Choi, J: Genetics of Cutaneous T Cell Lymphoma: From Bench to Bedside. *Current treatment options in oncology*, 17: 33, 2016.
68. Kim, EJ, Lewis, DJ, Duvic, M: Novel Mutations Involving NF-kappaB and B-Cell Signaling Pathways in Primary Cutaneous Large B-Cell Lymphoma, Leg-Type and Comparison with Sezary Syndrome. *The Journal of investigative dermatology*, 137: 1831-1833, 2017.
69. Rendón-Serna, N, Correa-Londoño, LA, Velásquez-Lopera, MM, Bermudez-Muñoz, M: Cell signaling in cutaneous T-cell lymphoma microenvironment: promising targets for molecular-specific treatment. *International journal of dermatology*, 2021.
70. Wozniak, MB, Piris, MA: Cutaneous T-cell lymphoma: two faces of the same coin. *The Journal of investigative dermatology*, 130: 348-351, 2010.
71. Nicolay, JP, Muller-Decker, K, Schroeder, A, Brechmann, M, Mobs, M, Geraud, C, Assaf, C, Goerd, S, Krammer, PH, Gulow, K: Dimethyl fumarate restores apoptosis sensitivity and inhibits tumor growth and metastasis in CTCL by targeting NF-kappaB. *Blood*, 128: 805-815, 2016.
72. Burger, JA, Wiestner, A: Targeting B cell receptor signalling in cancer: preclinical and clinical advances. *Nature reviews Cancer*, 18: 148-167, 2018.
73. Koning, MT, Quinten, E, Zoutman, WH, Kielbasa, SM, Mei, H, van Bergen, CAM, Jansen, P, Vergroesen, RD, Willemze, R, Vermeer, MH, Tensen, CP, Veelken, H: Acquired N-Linked Glycosylation Motifs in B-Cell Receptors of Primary Cutaneous B-Cell Lymphoma and the Normal B-Cell Repertoire. *The Journal of investigative dermatology*, 139: 2195-2203, 2019.
74. Efremov, DG, Turkalj, S, Laurenti, L: Mechanisms of B Cell Receptor Activation and Responses to B Cell Receptor Inhibitors in B Cell Malignancies. *Cancers*, 12, 2020.
75. Ducharme, O, Beylot-Barry, M, Pham-Ledard, A, Bohers, E, Vially, PJ, Bandres, T, Faur, N, Frison, E, Vergier, B, Jardin, F, Merlio, JP, Gros, A: Mutations of the B-Cell Receptor Pathway Confer Chemoresistance in Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma Leg Type. *The Journal of investigative dermatology*, 139: 2334-2342.e2338, 2019.
76. Wilcox, RA: Cutaneous B-cell lymphomas: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American journal of hematology*, 93: 1427-1430, 2018.
77. Pulitzer, MP, Horna, P, Almeida, J: Sézary syndrome and mycosis fungoides: An overview, including the role of immunophenotyping. *Cytometry B Clin Cytom*, 100: 132-138, 2021.
78. Farhood, B, Najafi, M, Mortezaee, K: CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *Journal of cellular physiology*, 234: 8509-8521, 2019.
79. Pierce, JM, Mehta, A: Diagnostic, prognostic and therapeutic role of CD30 in lymphoma. *Expert review of hematology*, 10: 29-37, 2017.

80. Sabattini, E, Pizzi, M, Tabanelli, V, Baldin, P, Sacchetti, CS, Agostinelli, C, Zinzani, PL, Pileri, SA: CD30 expression in peripheral T-cell lymphomas. *Haematologica*, 98: e81-e82, 2013.
81. Kamijo, H, Miyagaki, T: Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: Updates and Review of Current Therapy. *Current treatment options in oncology*, 22: 10, 2021.
82. Kampa, F, Mitteldorf, C: A review of CD30 expression in cutaneous neoplasms. *Journal of Cutaneous Pathology*, 48: 495-510, 2021.
83. Scarisbrick, JJ: Brentuximab vedotin therapy for CD30-positive cutaneous T-cell lymphoma: a targeted approach to management. *Future oncology (London, England)*, 13: 2405-2411, 2017.
84. Frings, VG, Roth, S, Riedmiller, AL, Schäfer, K, Goebeler, M, Rosenwald, A, Geissinger, E, Wobser, M: Primary Cutaneous T-cell Lymphoma with Aberrant Expression of CD20. *Acta Derm Venereol*, 97: 534-536, 2017.
85. Hagen, JW, Schaefer, JT, Magro, CM: CD20+ mycosis fungoides: a report of three cases and review of the literature. *The American Journal of dermatopathology*, 35: 833-841, 2013.
86. Helmink, BA, Reddy, SM, Gao, J, Zhang, S, Basar, R, Thakur, R, Yizhak, K, Sade-Feldman, M, Blando, J, Han, G, Gopalakrishnan, V, Xi, Y, Zhao, H, Amaria, RN, Tawbi, HA, Cogdill, AP, Liu, W, LeBleu, VS, Kugeratski, FG, Patel, S, Davies, MA, Hwu, P, Lee, JE, Gershenwald, JE, Lucci, A, Arora, R, Woodman, S, Keung, EZ, Gaudreau, PO, Reuben, A, Spencer, CN, Burton, EM, Haydu, LE, Lazar, AJ, Zappasodi, R, Hudgens, CW, Ledesma, DA, Ong, S, Bailey, M, Warren, S, Rao, D, Krijgsman, O, Rozeman, EA, Peeper, D, Blank, CU, Schumacher, TN, Butterfield, LH, Zelazowska, MA, McBride, KM, Kalluri, R, Allison, J, Petitprez, F, Fridman, WH, Sautès-Fridman, C, Hacohen, N, Rezvani, K, Sharma, P, Tetzlaff, MT, Wang, L, Wargo, JA: B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature*, 577: 549-555, 2020.
87. Petitprez, F, de Reyniès, A, Keung, EZ, Chen, TW, Sun, CM, Calderaro, J, Jeng, YM, Hsiao, LP, Lacroix, L, Bougoüin, A, Moreira, M, Lacroix, G, Natario, I, Adam, J, Lucchesi, C, Laizet, YH, Toulmonde, M, Burgess, MA, Bolejack, V, Reinke, D, Wani, KM, Wang, WL, Lazar, AJ, Roland, CL, Wargo, JA, Italiano, A, Sautès-Fridman, C, Tawbi, HA, Fridman, WH: B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature*, 577: 556-560, 2020.
88. Kempf, W, Denisjuk, N, Kerl, K, Cozzio, A, Sander, C: Primary cutaneous B-cell lymphomas. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, 10: 12-22; quiz 23, 2012.
89. Riaz, IB, Zahid, U, Kamal, MU, Husnain, M, McBride, A, Hua, A, Hamadani, AA, George, L, Zeeshan, A, Sipra, QR, Raina, A, Rahman, B, Puvvada, S, Anwer, F: Anti-CD 19 and anti-CD 20 CAR-modified T cells for B-cell malignancies: a systematic review and meta-analysis. *Immunotherapy*, 9: 979-993, 2017.
90. Chu, PG, Arber, DA: CD79: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 9: 97-106, 2001.
91. Han, Y, Liu, D, Li, L: PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American journal of cancer research*, 10: 727-742, 2020.
92. Ai, L, Xu, A, Xu, J: Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond. *Advances in experimental medicine and biology*, 1248: 33-59, 2020.

93. Xie, M, Huang, X, Ye, X, Qian, W: Prognostic and clinicopathological significance of PD-1/PD-L1 expression in the tumor microenvironment and neoplastic cells for lymphoma. *Int Immunopharmacol*, 77: 105999, 2019.
94. Mitteldorf, C, Bieri, M, Wey, N, Kerl, K, Kamarachev, J, Pfaltz, M, Kutzner, H, Roncador, G, Tomasini, D, Kempf, W: Expression of programmed death-1 (CD279) in primary cutaneous B-cell lymphomas with correlation to lymphoma entities and biological behaviour. *The British journal of dermatology*, 169: 1212-1218, 2013.
95. Lang, CCV, Ramelyte, E, Dummer, R: Innovative Therapeutic Approaches in Primary Cutaneous B Cell Lymphoma. *Front Oncol*, 10: 1163, 2020.
96. Menguy, S, Prochazkova-Carlotti, M, Beylot-Barry, M, Saltel, F, Vergier, B, Merlio, JP, Pham-Ledard, A: PD-L1 and PD-L2 Are Differentially Expressed by Macrophages or Tumor Cells in Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg Type. *The American journal of surgical pathology*, 42: 326-334, 2018.
97. Wilcox, RA, Feldman, AL, Wada, DA, Yang, Z-Z, Comfere, NI, Dong, H, Kwon, ED, Novak, AJ, Markovic, SN, Pittelkow, MR, Witzig, TE, Ansell, SM: B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders. *Blood*, 114: 2149-2158, 2009.
98. Khodadoust, MS, Rook, AH, Porcu, P, Foss, F, Moskowitz, AJ, Shustov, A, Shanbhag, S, Sokol, L, Fling, SP, Ramchurren, N, Pierce, R, Davis, A, Shine, R, Li, S, Fong, S, Kim, J, Yang, Y, Blumenschein, WM, Yearley, JH, Das, B, Patidar, R, Datta, V, Cantu, E, McCutcheon, JN, Karlovich, C, Williams, PM, Subrahmanyam, PB, Maecker, HT, Horwitz, SM, Sharon, E, Kohrt, HE, Cheever, MA, Kim, YH: Pembrolizumab in Relapsed and Refractory Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: A Multicenter Phase II Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 38: 20-28, 2020.
99. Yu, H, Lee, H, Herrmann, A, Buettner, R, Jove, R: Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nature reviews Cancer*, 14: 736-746, 2014.
100. Abraham, RM, Zhang, Q, Odum, N, Wasik, MA: The role of cytokine signaling in the pathogenesis of cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer biology & therapy*, 12: 1019-1022, 2011.
101. Johnson, DE, O'Keefe, RA, Grandis, JR: Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, 15: 234-248, 2018.
102. Warren, CFA, Wong-Brown, MW, Bowden, NA: BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis*, 10: 177, 2019.
103. Netchiporouk, E, Litvinov, IV, Moreau, L, Gilbert, M, Sasseville, D, Duvic, M: Deregulation in STAT signaling is important for cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) pathogenesis and cancer progression. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*, 13: 3331-3335, 2014.
104. Pileri, A, Agostinelli, C, Bertuzzi, C, Grandi, V, Maio, V, Lastrucci, I, Santucci, M, Pimpinelli, N: BCL-2 Expression in Primary Cutaneous Follicle Center B-Cell Lymphoma and Its Prognostic Role. *Front Oncol*, 10: 662, 2020.
105. Goyal, A, LeBlanc, RE, Carter, JB: Cutaneous B-Cell Lymphoma. *Hematology/oncology clinics of North America*, 33: 149-161, 2019.

106. Froehlich, TC, Müller-Decker, K, Braun, JD, Albrecht, T, Schroeder, A, Gülow, K, Goerdts, S, Krammer, PH, Nicolay, JP: Combined inhibition of Bcl-2 and NFκB synergistically induces cell death in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*, 134: 445-455, 2019.
107. Jung, JT, Kim, DH, Kwak, EK, Kim, JG, Park, TI, Sohn, SK, Do, YR, Kwon, KY, Song, HS, Park, EH: Clinical role of Bcl-2, Bax, or p53 overexpression in peripheral T-cell lymphomas. *Annals of hematology*, 85: 575-581, 2006.
108. Dulmage, BO, Geskin, LJ: Lessons learned from gene expression profiling of cutaneous T-cell lymphoma. *The British journal of dermatology*, 169: 1188-1197, 2013.
109. Ryan, CE, Davids, MS: BCL-2 Inhibitors, Present and Future. *Cancer J*, 25: 401-409, 2019.
110. Cyrenne, BM, Lewis, JM, Weed, JG, Carlson, KR, Mirza, FN, Foss, FM, Girardi, M: Synergy of BCL2 and histone deacetylase inhibition against leukemic cells from cutaneous T-cell lymphoma patients. *Blood*, 130: 2073-2083, 2017.
111. Guo, YJ, Pan, WW, Liu, SB, Shen, ZF, Xu, Y, Hu, LL: ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med*, 19: 1997-2007, 2020.
112. Kiessling, MK, Oberholzer, PA, Mondal, C, Karpova, MB, Zipser, MC, Lin, WM, Girardi, M, Macconail, LE, Kehoe, SM, Hatton, C, French, LE, Garraway, LA, Polier, G, Süß, D, Klemke, C-D, Krammer, PH, Gülow, K, Dummer, R: High-throughput mutation profiling of CTCL samples reveals KRAS and NRAS mutations sensitizing tumors toward inhibition of the RAS/RAF/MEK signaling cascade. *Blood*, 117: 2433-2440, 2011.
113. Guenova, E, Hoetzenecker, W, Rozati, S, Levesque, MP, Dummer, R, Cozzio, A: Novel therapies for cutaneous T-cell lymphoma: what does the future hold? *Expert opinion on investigational drugs*, 23: 457-467, 2014.
114. Xiao, M, Hennessey, D, Iyer, A, O'Keefe, S, Zhang, F, Sivanand, A, Gniadecki, R: Transcriptomic Changes During Stage Progression of Mycosis Fungoides. *bioRxiv*, 2021.
115. Torres, ANB, Melchers, RC, Van Grieken, L, Out-Luiting, JJ, Mei, H, Agaser, C, Kuipers, TB, Quint, KD, Willemze, R, Vermeer, MH: Whole-genome profiling of primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma. *Haematologica*, 2020.
116. Li, H, Wang, C, Ma, P, Zhang, M, Yang, H, Yuan, S, Wei, J, Tao, L, Qian, K, Xu, M, Li, L: The retinoid derivant ECPIRM selectively exhibited anti-proliferation effects in cutaneous T-Cell lymphoma via ITK-mediated signaling pathway. *Journal of dermatological science*, 97: 208-215, 2020.
117. Seto, AG, Beatty, X, Lynch, JM, Hermreck, M, Tetzlaff, M, Duvic, M, Jackson, AL: Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma. *British journal of haematology*, 183: 428-444, 2018.
118. Levidou, G, Siakantaris, M, Papadaki, T, Papadavid, E, Vassilakopoulos, TP, Angelopoulou, MK, Marinos, L, Nikolaou, V, Economidi, A, Antoniou, C, Patsouris, E, Korkolopoulou, P: A comprehensive immunohistochemical approach of AKT/mTOR pathway and p-STAT3 in mycosis fungoides. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 69: 375-384, 2013.

119. Miyagaki, T, Sugaya, M, Murakami, T, Asano, Y, Tada, Y, Kadono, T, Okochi, H, Tamaki, K, Sato, S: CCL11-CCR3 interactions promote survival of anaplastic large cell lymphoma cells via ERK1/2 activation. *Cancer research*, 71: 2056-2065, 2011.
120. Jawhar, NM: Tissue microarray: a rapidly evolving diagnostic and research tool. *Annals of Saudi medicine*, 29: 123, 2009.
121. Labno, C: Two ways to count cells with ImageJ. *Integrated Light Microscopy Core, University of Chicago*, 2019.
122. SAS/STAT® 14.1 User's Guide The MIXED Procedure. <https://support.sas.com/documentation/onlinedoc/stat/141/mixed.pdf>, 2021.
123. Weiß, C, Weiß, C: *Basiswissen medizinische statistik*, Springer, 2005.
124. Olsen, E, Vonderheid, E, Pimpinelli, N, Willemze, R, Kim, Y, Knobler, R, Zackheim, H, Duvic, M, Estrach, T, Lamberg, S: Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood*, 110: 1713-1722, 2007.
125. Sundram, U, Kim, Y, Mraz-Gernhard, S, Hoppe, R, Natkunam, Y, Kohler, S: Expression of the bcl-6 and MUM1/IRF4 proteins correlate with overall and disease-specific survival in patients with primary cutaneous large B-cell lymphoma: a tissue microarray study. *J Cutan Pathol*, 32: 227-234, 2005.
126. Rodríguez-Pinilla, SM, Ortiz-Romero, PL, Monsalvez, V, Tomás, IE, Almagro, M, Sevilla, A, Camacho, G, Longo, MI, Pulpillo, Á, Diaz-Pérez, JA, Montes-Moreno, S, Castro, Y, Echevarría, B, Trébol, I, Gonzalez, C, Sánchez, L, Otín, AP, Requena, L, Rodríguez-Peralto, JL, Cerroni, L, Piris, M: TCR- γ expression in primary cutaneous T-cell lymphomas. *The American journal of surgical pathology*, 37: 375-384, 2013.
127. Grimaldi, AM, Simeone, E, Festino, L, Vanella, V, Strudel, M, Ascierto, PA: MEK Inhibitors in the Treatment of Metastatic Melanoma and Solid Tumors. *American journal of clinical dermatology*, 18: 745-754, 2017.
128. Samatar, AA, Poulikakos, PI: Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nature reviews Drug discovery*, 13: 928-942, 2014.
129. Brouwer, IJ, Out-Luiting, JJ, Vermeer, MH, Tensen, CP: Cucurbitacin E and I target the JAK/STAT pathway and induce apoptosis in Sézary cells. *Biochem Biophys Res*, 24: 100832, 2020.
130. Dobbeling, U, Waeckerle-Men, Y, Zabel, F, Graf, N, Kundig, TM, Johansen, P: The antihistamines clemastine and desloratadine inhibit STAT3 and c-Myc activities and induce apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cell lines. *Experimental dermatology*, 22: 119-124, 2013.
131. Yang, H, Tao, Y, Zhang, M, Ma, P, Li, L, Diao, Q: Effects of 9-cis-retinoic acid on the proliferation and apoptosis of cutaneous T-cell lymphoma cells. *Anti-cancer drugs*, 30: 56-64, 2019.
132. Fantin, VR, Loboda, A, Paweletz, CP, Hendrickson, RC, Pierce, JW, Roth, JA, Li, L, Gooden, F, Korenchuk, S, Hou, XS, Harrington, EA, Randolph, S, Reilly, JF, Ware, CM, Kadin, ME, Frankel, SR, Richon, VM: Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription predicts vorinostat resistance in cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer research*, 68: 3785-3794, 2008.

133. Stadler, R, Hain, C, Cieslak, C, Stranzenbach, R: Molecular pathogenesis of cutaneous lymphoma- Future directions. *Experimental dermatology*, 29: 1062-1068, 2020.
134. Larocca, C, Kupper, T: Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: An Update. *Hematology/oncology clinics of North America*, 33: 103-120, 2019.
135. Nicolay, JP, Albrecht, JD, Alberti-Violetti, S, Berti, E: CCR4 in cutaneous T-cell lymphoma: Therapeutic targeting of a pathogenic driver. *European Journal of Immunology*, 2021.
136. Park, J, Yang, J, Wenzel, AT, Ramachandran, A, Lee, WJ, Daniels, JC, Kim, J, Martinez-Escala, E, Amankulor, N, Pro, B: Genomic analysis of 220 CTCLs identifies a novel recurrent gain-of-function alteration in RLTPR (p. Q575E). *Blood*, 130: 1430-1440, 2017.
137. García-Colmenero, L, González, J, Sandoval, J, Guillén, Y, Diaz-Lagares, A, Andrades, E, Iglesias, A, Nonell, L, Pujol, RM, Bigas, A, Espinosa, L, Gallardo, F: Epigenetic Silencing of Tumor Suppressor miR-124 Directly Supports STAT3 Activation in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Cells*, 9, 2020.
138. van Kester, MS, Out-Luiting, JJ, von dem Borne, PA, Willemze, R, Tensen, CP, Vermeer, MH: Cucurbitacin I inhibits Stat3 and induces apoptosis in Sézary cells. *The Journal of investigative dermatology*, 128: 1691-1695, 2008.
139. Olszewska, B, Żawrocki, A, Lakomy, J, Karczewska, J, Gleń, J, Zabłotna, M, Malek, M, Jankau, J, Lange, M, Biernat, W, Nowicki, RJ, Sokołowska-Wojdyło, M: Mapping signal transducer and activator of transcription (STAT) activity in different stages of mycosis fungoides and Sezary syndrome. *International journal of dermatology*, 59: 1106-1112, 2020.
140. Chang, LW, Patrone, CC, Yang, W, Rabionet, R, Gallardo, F, Espinet, B, Sharma, MK, Girardi, M, Tensen, CP, Vermeer, M, Geskin, LJ: An Integrated Data Resource for Genomic Analysis of Cutaneous T-Cell Lymphoma. *The Journal of investigative dermatology*, 138: 2681-2683, 2018.
141. van der Fits, L, Out-Luiting, JJ, van Leeuwen, MA, Samsom, JN, Willemze, R, Tensen, CP, Vermeer, MH: Autocrine IL-21 stimulation is involved in the maintenance of constitutive STAT3 activation in Sézary syndrome. *The Journal of investigative dermatology*, 132: 440-447, 2012.
142. Samimi, S, Benoit, B, Evans, K, Wherry, EJ, Showe, L, Wysocka, M, Rook, AH: Increased programmed death-1 expression on CD4+ T cells in cutaneous T-cell lymphoma: implications for immune suppression. *Archives of dermatology*, 146: 1382-1388, 2010.
143. Cetinozman, F, Jansen, PM, Vermeer, MH, Willemze, R: Differential expression of programmed death-1 (PD-1) in Sezary syndrome and mycosis fungoides. *Archives of dermatology*, 148: 1379-1385, 2012.
144. Felcht, M, Heck, M, Weiss, C, Becker, JC, Dippel, E, Müller, CS, Nashan, D, Sachse, MM, Nicolay, JP, Booken, N, Goerdts, S, Klemke, CD: Expression of the T-cell regulatory marker FOXP3 in primary cutaneous large B-cell lymphoma tumour cells. *The British journal of dermatology*, 167: 348-358, 2012.
145. Borst, J, Ahrends, T, Bąbala, N, Melief, CJM, Kastenmüller, W: CD4(+) T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 18: 635-647, 2018.
146. Wang, J, Ke, XY: The four types of Tregs in malignant lymphomas. *Journal of hematology & oncology*, 4: 50, 2011.

147. Malachowski, SJ, Sun, J, Chen, PL, Seminario-Vidal, L: Diagnosis and Management of Cutaneous B-Cell Lymphomas. *Dermatologic clinics*, 37: 443-454, 2019.
148. Vitiello, P, Sica, A, Ronchi, A, Caccavale, S, Franco, R, Argenziano, G: Primary Cutaneous B-Cell Lymphomas: An Update. *Front Oncol*, 10: 651, 2020.
149. Malecek, M-K, Watkins, MP, Bartlett, NL: Polatuzumab vedotin for the treatment of adults with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Expert opinion on biological therapy*, 21: 831-839, 2021.
150. Duman, BB, Sahin, B, Ergin, M, Guvenc, B: Loss of CD20 antigen expression after rituximab therapy of CD20 positive B cell lymphoma (diffuse large B cell extranodal marginal zone lymphoma combination): a case report and review of the literature. *Med Oncol*, 29: 1223-1226, 2012.
151. Hoefnagel, JJ, Vermeer, MH, Jansen, PM, Fleuren, GJ, Meijer, CJ, Willemze, R: Bcl-2, Bcl-6 and CD10 expression in cutaneous B-cell lymphoma: further support for a follicle centre cell origin and differential diagnostic significance. *The British journal of dermatology*, 149: 1183-1191, 2003.
152. Wobser, M, Voigt, H, Eggert, AO, Houben, R, Kauczok, CS, Brocker, EB, Becker, JC: Bcl-2 expression in rituximab refractory cutaneous B-cell lymphoma. *British journal of cancer*, 96: 1540-1543, 2007.
153. Breuckmann, F, von Kobyletzki, G, Avermaete, A, Kreuter, A, Altmeyer, P: Efficacy of ultraviolet A1 phototherapy on the expression of bcl-2 in atopic dermatitis and cutaneous T-cell lymphoma in vivo: a comparison study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 18: 217-222, 2002.
154. Cetinozman, F, Koens, L, Jansen, PM, Willemze, R: Programmed death-1 expression in cutaneous B-cell lymphoma. *J Cutan Pathol*, 41: 14-21, 2014.
155. Talaat, IM, Abdelmaksoud, RE, Guimei, M, Agamia, NF, Nugud, A, El-Serafi, AT: Potential role for microRNA-16 (miR-16) and microRNA-93 (miR-93) in diagnosis and prediction of disease progression in mycosis fungoides in Egyptian patients. *PLoS One*, 14: e0224305, 2019.
156. Youssef, R, Hegazy, RA, Fawzy, MM, Abdel Halim, DM, Nabil, N, Sayed, SS, Shaker, OG: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, a possible culprit in mycosis fungoides: an immunohistochemical study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 26: 1522-1532, 2012.
157. Maj, J, Jankowska-Konsur, A, Plomer-Niezgoda, E, Sadakierska-Chudy, A, Reich, A: Altered expression of Bcl-2, c-Myc, H-Ras, K-Ras, and N-Ras does not influence the course of mycosis fungoides. *Arch Med Sci*, 9: 895-898, 2013.
158. Kandolf Sekulović, L, Cikota, B, Jović, M, Skiljević, D, Stojadinović, O, Medenica, L, Magić, Z: The role of apoptosis and cell-proliferation regulating genes in mycosis fungoides. *Journal of dermatological science*, 55: 53-56, 2009.
159. Perez, C, Mondejar, R, Garcia-Diaz, N, Cereceda, L, Leon, A, Montes, S, Duran Vian, C, Perez Paredes, MG, Gonzalez-Moran, A, Alegre de Miguel, V, Sanz Anquela, JM, Frias, J, Limeres, MA, Gonzalez, LM, Martin Davila, F, Beltran, M, Mollejo, M, Mendez, JR, Gonzalez, MA, Gonzalez Garcia, J, Lopez, R, Gomez, A, Izquierdo, F, Ramos, R, Camacho, C, Rodriguez-Pinilla, SM, Martinez, N, Vaque, JP, Ortiz-Romero, PL, Piris, MA: Advanced-stage mycosis

- fungoides: role of the signal transducer and activator of transcription 3, nuclear factor-kappaB and nuclear factor of activated T cells pathways. *The British journal of dermatology*, 2019.
160. Harms, KL, Harms, PW, Anderson, T, Betz, BL, Ross, CW, Fullen, DR, Hristov, AC: Mycosis fungoides with CD20 expression: report of two cases and review of the literature. *J Cutan Pathol*, 41: 494-503, 2014.
161. Jullié, ML, Carlotti, M, Vivot, A, Jr., Beylot-Barry, M, Ortonne, N, Frouin, E, Carlotti, A, de Muret, A, Balme, B, Franck, F, Merlio, JP, Vergier, B: CD20 antigen may be expressed by reactive or lymphomatous cells of transformed mycosis fungoides: diagnostic and prognostic impact. *The American journal of surgical pathology*, 37: 1845-1854, 2013.
162. Theurich, S, Schlaak, M, Steguweit, H, Heukamp, LC, Wennhold, K, Kurschat, P, Rabenhorst, A, Hartmann, K, Schlösser, H, Shimabukuro-Vornhagen, A, Holtick, U, Hallek, M, Stadler, R, von Bergwelt-Baildon, M: Targeting Tumor-Infiltrating B Cells in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34: e110-116, 2016.
163. Nikolaou, V, Iliakis, T, Marinos, L, Voudouri, D, Sidiropoulou, P, Rigopoulos, D, Stratigos, AJ: Another window into tumor microenvironment: a case of B-cell rich folliculotropic mycosis fungoides responding to rituximab. *Australas J Dermatol*, 61: e226-e228, 2020.
164. Zhang, Y, Gallastegui, N, Rosenblatt, JD: Regulatory B cells in anti-tumor immunity. *Int Immunol*, 27: 521-530, 2015.
165. Atzmony, L, Moyal, L, Feinmesser, M, Gorovitz, B, Hirshberg, A, Amitay-Laish, I, Prag-Naveh, H, Barzilai, A, Hodak, E: Stage-dependent Increase in Expression of miR-155 and Ki-67 and Number of Tumour-associated Inflammatory Cells in Folliculotropic Mycosis Fungoides. *Acta Derm Venereol*, 100: adv00230, 2020.
166. Nielsen, PR, Eriksen, JO, Sørensen, MD, Wehkamp, U, Lindahl, LM, Bzorek, M, Iversen, L, Woetman, A, Ødum, N, Litman, T, Gjerdrum, LMR: Role of B-cells in Mycosis Fungoides. *Acta Derm Venereol*, 101: adv00413, 2021.
167. Kim, YH, Tavallaee, M, Sundram, U, Salva, KA, Wood, GS, Li, S, Rozati, S, Nagpal, S, Krathen, M, Reddy, S, Hoppe, RT, Nguyen-Lin, A, Weng, WK, Armstrong, R, Pulitzer, M, Advani, RH, Horwitz, SM: Phase II Investigator-Initiated Study of Brentuximab Vedotin in Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome With Variable CD30 Expression Level: A Multi-Institution Collaborative Project. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33: 3750-3758, 2015.
168. Nielsen, M, Kaestel, CG, Eriksen, KW, Woetmann, A, Stokkedal, T, Kaltoft, K, Geisler, C, Röpke, C, Odum, N: Inhibition of constitutively activated Stat3 correlates with altered Bcl-2/Bax expression and induction of apoptosis in mycosis fungoides tumor cells. *Leukemia*, 13: 735-738, 1999.
169. Miyashiro, D, Torrealba, MP, Manfrere, KC, Pereira, J, Sato, MN, Sanches, JA: Double-positive CD4 and CD8 Sézary syndrome. *JAAD Case Rep*, 3: 485-488, 2017.
170. Torrealba, MP, Manfrere, KC, Miyashiro, DR, Lima, JF, de, MOL, Pereira, NZ, Cury-Martins, J, Pereira, J, Duarte, AJS, Sato, MN, Sanches, JA: Chronic activation profile of circulating CD8+ T cells in Sézary syndrome. *Oncotarget*, 9: 3497-3506, 2018.

171. Kantekure, K, Yang, Y, Raghunath, P, Schaffer, A, Woetmann, A, Zhang, Q, Odum, N, Wasik, M: Expression patterns of the immunosuppressive proteins PD-1/CD279 and PD-L1/CD274 at different stages of cutaneous T-cell lymphoma/mycosis fungoides. *The American Journal of dermatopathology*, 34: 126-128, 2012.
172. Marzec, M, Zhang, Q, Goradia, A, Raghunath, PN, Liu, X, Paessler, M, Wang, HY, Wysocka, M, Cheng, M, Ruggeri, BA, Wasik, MA: Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 20852-20857, 2008.
173. de Charette, M, Houot, R: Hide or defend, the two strategies of lymphoma immune evasion: potential implications for immunotherapy. *Haematologica*, 103: 1256-1268, 2018.
174. Falchi, L: Immune Dysfunction in Non-Hodgkin Lymphoma: Avenues for New Immunotherapy-Based Strategies. *Current hematologic malignancy reports*, 12: 484-494, 2017.
175. Yi, S, Sun, J, Qiu, L, Fu, W, Wang, A, Liu, X, Yang, Y, Kadin, ME, Tu, P, Wang, Y: Dual Role of EZH2 in Cutaneous Anaplastic Large Cell Lymphoma: Promoting Tumor Cell Survival and Regulating Tumor Microenvironment. *The Journal of investigative dermatology*, 138: 1126-1136, 2018.
176. Gerbe, A, Alame, M, Dereure, O, Gonzalez, S, Durand, L, Tempier, A, De Oliveira, L, Tournet, A, Costes-Martineau, V, Cacheux, V, Szablewski, V: Systemic, primary cutaneous, and breast implant-associated ALK-negative anaplastic large-cell lymphomas present similar biologic features despite distinct clinical behavior. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 475: 163-174, 2019.
177. Ferreira, CR, Zhao, S, Sanches, JA, Miyashiro, D, Cury-Martins, J, Azevedo, RS, Zerbini, MCN, Natkunam, Y, Gratzinger, D: Clinicopathologic and microenvironmental analysis of primary cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorders: a 26 year experience from an academic medical center in Brazil. *Diagn Pathol*, 14: 115, 2019.
178. Cocks, M, Porcu, P, Wick, MR, Gru, AA: Recent Advances in Cutaneous T-cell Lymphoma: Diagnostic and Prognostic Considerations. *Surg Pathol Clin*, 12: 783-803, 2019.
179. Massone, C, Cerroni, L: Phenotypic variability in primary cutaneous anaplastic large T-cell lymphoma: a study on 35 patients. *The American Journal of dermatopathology*, 36: 153-157, 2014.
180. Cheson, BD: Rituximab: clinical development and future directions. *Expert opinion on biological therapy*, 2: 97-110, 2002.
181. Albrecht, H, Woodroof, JM, Reyes, R, Powers, BC, Fraga, GR: CD30 expression in cutaneous B-cell and post-transplant peripheral T-cell lymphoma: report of 2 cases. *Dermatology online journal*, 20, 2014.
182. van Krieken, JH: New developments in the pathology of malignant lymphoma: a review of the literature published from April 2010–July 2010. *Journal of Hematopathology*, 3: 117-126, 2010.
183. Sukswai, N, Lyapichev, K, Khoury, JD, Medeiros, LJ: Diffuse large B-cell lymphoma variants: an update. *Pathology*, 52: 53-67, 2020.
184. Hartley, C, Vaughan, JW, Jarzembowski, J, Kroft, SH, Hosking, P, Harrington, AM, Olteanu, H: CD30 expression in monomorphic posttransplant lymphoproliferative disorder, diffuse large B-

- cell lymphoma correlates with greater regulatory T-cell infiltration. *American journal of clinical pathology*, 148: 485-493, 2017.
185. Barasch, NJ, Liu, Y-C, Ho, J, Bailey, N, Aggarwal, N, Cook, JR, Swerdlow, SH: The molecular landscape and other distinctive features of primary cutaneous follicle center lymphoma. *Human pathology*, 106: 93-105, 2020.
186. Kempf, W, Kazakov, DV, Rütten, A, Rupec, RA, Talarcik, P, Ballová, V, Kerl, K, Dummer, R, Lautenschlager, S, Zimmermann, DR, Tinguely, M: Primary cutaneous follicle center lymphoma with diffuse CD30 expression: a report of 4 cases of a rare variant. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71: 548-554, 2014.
187. van der Weyden, CA, Pileri, SA, Feldman, AL, Whisstock, J, Prince, HM: Understanding CD30 biology and therapeutic targeting: a historical perspective providing insight into future directions. *Blood cancer journal*, 7: e603, 2017.
188. Carlsen, ED, Swerdlow, SH, Cook, JR, Gibson, SE: Class-switched Primary Cutaneous Marginal Zone Lymphomas Are Frequently IgG4-positive and Have Features Distinct From IgM-positive Cases. *The American journal of surgical pathology*, 43: 1403-1412, 2019.
189. Prieto-Torres, L, Manso, R, Cieza-Díaz, DE, Jo, M, Kilany Perez, L, Montenegro-Damaso, T, Eraña, I, Lorda, M, Suarez Massa, D, Machan, S: Large Cells With CD30 Expression and Hodgkin-like Features in Primary Cutaneous Marginal Zone B-Cell Lymphoma. *The American journal of surgical pathology*, 43: 1191-1202, 2019.

7 TABELLARISCHER ANHANG

A1: CD4 Färbeprotokoll

Protokoll-Nr. 4 : CD 4 (21.01.2020)
Prozedur: U OptiView DAB IHC v5 (v1.00.0117)
BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module

Gewebebank Universitätsklinikum Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 220/221 69120 Heidelberg

Schritt-Nr	Protokollschritt
------------	------------------

- 1 Mixer aktivieren
- 2 Mixer deaktivieren
- 3 [72°C ist die Standardtemperatur]
- 4 Objektträger-Temperatur von [62 °C] auf Mittlere Temperaturen (Entparaffinierung) erhöhen
- 5 Inkubieren für 4 Minuten
- 6 EZPrep Vol. ausgleichen
- 7 Objektträger mit EZ Prep spülen
- 8 EZPrep Vol. ausgleichen
- 9 Coverslip auftragen
- 10 Objektträger mit EZ Prep spülen
- 11 EZPrep Vol. ausgleichen
- 12 Coverslip auftragen
- 13 Mixer aktivieren
- 14 Objektträger-Heizung ausschalten
- 15 Pausenpunkt (Landezone)
- 16 Objektträger mit EZ Prep spülen
- 17 Cell Conditioner Nr.1 lang auftragen
- 18 Abgabe von Cell Cond. u. Coverslip lang
- 19 [100°C ist die Standardtemperatur]
- 20 Erwärme Objektträger auf [90 °C] und inkubiere für 4 Minuten (Cell Conditioner Nr.1)
- 21 Inkubieren für 4 Minuten
- 22 Inkubieren für 8 Minuten
- 23 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 24 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 25 Inkubieren für 8 Minuten
- 26 Inkubieren für 8 Minuten
- 27 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 28 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 29 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 30 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 31 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 32 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 33 Objektträger-Heizung ausschalten
- 34 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 35 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 36 Spülen mit Reaktionspuffer
- 37 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 38 Coverslip auftragen
- 39 Pausenpunkt (Landezone)
- 40 Aufwärmen der Objektträger auf 36 Grad C
- 41 Spülen mit Reaktionspuffer
- 42 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 43 Coverslip auftragen
- 44 [Wenn keine Temperatur ausgewählt wurde, lautet der Standardwert 36°C.]
- 45 Aufwärmen der Objektträger auf 36 Grad C

* Ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe
 Gewebebank Universitätsklinikum Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 220/221 69120 Heidelberg
 VSS v12.3 Build 0055

Gedruckt 17.02.2020 08:03:03
 Seite 1 von 3

Protokoll-Nr. 4 : CD 4 (21.01.2020)
Prozedur: U OptiView DAB IHC v5 (v1.00.0117)
BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module

Gewebebank Universitaetsklinikum Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 220/221 69120 Heidelberg

Schritt-Nr	Protokollschritt
------------	------------------

- | | |
|----|--|
| 46 | Spülen mit Reaktionspuffer |
| 47 | Objekträger-Volumen bei Reaction Buffer bei der Etikettenreinigung anpassen |
| 48 | Coverslip auftragen |
| 49 | Hand Apply (Primär Antikörper), and Incubate for [0 Stunden 24 Min] |
| 50 | Aufwärmen der Objekträger auf 36 Grad C |
| 51 | Spülen mit Reaktionspuffer |
| 52 | Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens |
| 53 | 1 Tropfen OV PEROX IHBTR auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren. |
| 54 | Spülen mit Reaktionspuffer |
| 55 | 230 µl + zufügen VA Reaction Buffer |
| 56 | Coverslip auftragen |
| 57 | Spülen mit Reaktionspuffer |
| 58 | 230 µl + zufügen VA Reaction Buffer |
| 59 | Coverslip auftragen |
| 60 | Spülen mit Reaktionspuffer |
| 61 | [Wenn kein Wert ausgewählt wurde, führt HQ Universal Linker die Abgabe und Inkubation 8 Min. lang mit normalem Objekttr |
| 62 | Objekträger-Volumen bei Reaction Buffer bei der Etikettenreinigung anpassen |
| 63 | Coverslip, einen Tropfen von OV HQ UNIV LINKR auftragen und für 8 Minuten inkubieren |
| 64 | Spülen mit Reaktionspuffer |
| 65 | 230 µl + zufügen VA Reaction Buffer |
| 66 | Coverslip auftragen |
| 67 | Spülen mit Reaktionspuffer |
| 68 | 230 µl + zufügen VA Reaction Buffer |
| 69 | Coverslip auftragen |
| 70 | Spülen mit Reaktionspuffer |
| 71 | [Wenn kein Wert ausgewählt wurde, führt HRP Multimer die Abgabe und Inkubation 8 Min. lang mit normalem Objekträger-Vc |
| 72 | Objekträger-Volumen bei Reaction Buffer bei der Etikettenreinigung anpassen |
| 73 | Coverslip, einen Tropfen von OV HRP MULTIMER auftragen und für 8 Minuten inkubieren |
| 74 | Spülen mit Reaktionspuffer |
| 75 | 230 µl + zufügen VA Reaction Buffer |
| 76 | Coverslip auftragen |
| 77 | Spülen mit Reaktionspuffer |
| 78 | 230 µl + zufügen VA Reaction Buffer |
| 79 | Coverslip auftragen |
| 80 | Spülen mit Reaktionspuffer |
| 81 | Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens |
| 82 | 1 Tropfen OV H2O2 und einen Tropfen OV DAB auftragen, LCS auftragen und für 8 Minuten inkubieren. |
| 83 | Spülen mit Reaktionspuffer |
| 84 | Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens |
| 85 | 1 Tropfen OV COPPER auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren. |
| 86 | Spülen mit Reaktionspuffer |
| 87 | Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens |
| 88 | 1 Tropfen von [HEMATOXYLIN II] (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [12 Minuten] inkubieren. |
| 89 | Spülen mit Reaktionspuffer |
| 90 | Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens |

* Ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe
 Gewebebank Universitaetsklinikum Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 220/221 69120 Heidelberg
 VSS v12.3 Build 0055

Gedruckt 17.02.2020 08:03:04

Seite 2 von 3

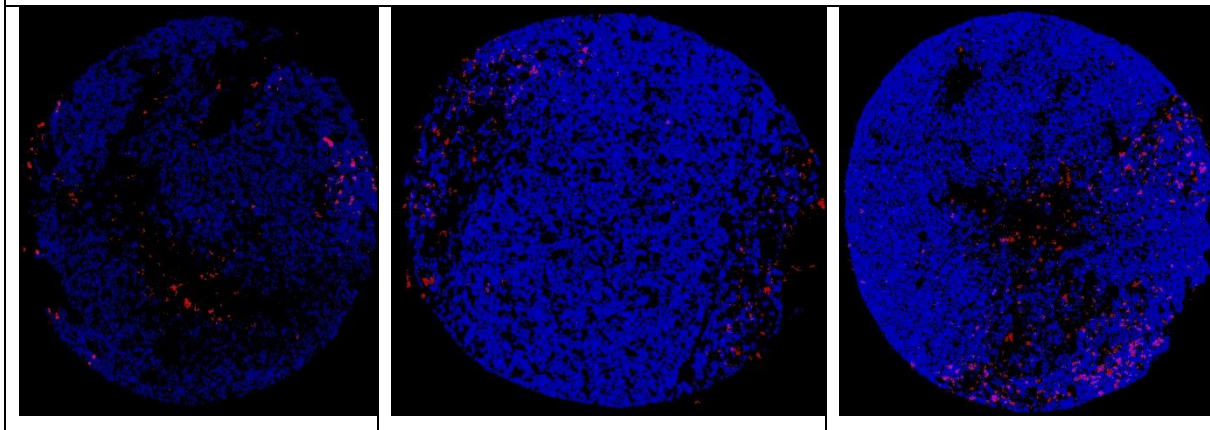
Protokoll-Nr. 4 : CD 4 (21.01.2020)	
Prozedur: U OptiView DAB IHC v5 (v1.00.0117)	
BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module	
Gewebebank Universitaetsklinikum Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 220/221 69120 Heidelberg	
Schritt-Nr	Protokollschritt
91	Coverslip auftragen
92	Spülen mit Reaktionspuffer
93	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
94	1 Tropfen von [BLUING REAGENT] (Nach-Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.
95	Spülen mit Reaktionspuffer
96	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
97	Coverslip auftragen
98	Objekträger-Heizung ausschalten
99	Spülen mit Reaktionspuffer

A2: Macros zur Auswertung	
Zerlegen in RGB-Kanäle und Auswahl des blauen Kanals	imageTitle=getTitle(); run("Split Channels"); selectWindow(imageTitle+" (blue)")
Setzen des Grenzwertes und Zählen der Zellen sowie Bestimmung der gefärbten Fläche (der Wert für x1 ist aus Tabelle A3 zu entnehmen)	setAutoThreshold("Default dark"); run("Threshold..."); setThreshold(0, x1); setOption("BlackBackground", true); run("Convert to Mask"); run("Watershed"); run("Analyze Particles...", "size=10-Infinity summarize");

A3: Werte für den Grenzwert (x1)	
Probe	Grenzwert
CBCL-BCL2	90
CTCL-BCL-2	135
CBCL-p-ERK	120
CTCL-p-ERK	145
CBCL-p-MEK	130
CTCL-p-MEK	150
CBCL-PDL-1	100

CTCL-PDL-1	90
CBCL-p-STAT3	140
CTCL-p-STAT3	160
CBCL-CD30	90
CTCL-CD30	105
CBCL-CD4	145
CTCL-CD4	140
CBCL-CD8	105
CTCL-CD8	120
CBCL-PD-1	130
CTCL-PD-1	100
CBCL-CD79a	90
CTCL-CD79a	130
CBCL-CD20	100
CTCL-CD20	140

A4: Beispielhafter Vergleich der CD20 Färbung (blau) und CD4 Färbung (rot) in drei CBCL Proben durch nachträgliches Zusammenfügen und Bearbeiten der Bilder



8 LEBENSLAUF

PERSONALIEN

Name: Eva Maria Guth, geb. Ditscheid
Geburtsdatum: 27.01.1994
Geburtsort: Troisdorf
Familienstand: verheiratet
Vater: Egon Herbert Ditscheid
Mutter: Elke Ditscheid, geb. Unterstell

SCHULISCHER WERDEGANG

2003 – 2012 Städtisches Gymnasium Hennef
29.06.2012 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2012/13 Beginn des Studiums der Humanmedizin
an der Med. Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
05.09.2014 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
WS 2014/15 Beginn des Master of Science programme Health Economics
an der Med. Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
12.04.2018 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
06.06.2019 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)
Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: gut (1,66)
03.07.2019 Approbation als Ärztin
14.08.2019 Master of Science (M.Sc.) in Health Economics
Note: sehr gut (1,3)

9 DANKSAGUNG

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Jan P. Nicolay für den Vorschlag und die Überlassung des Themas, die vielfältigen hilfreichen Anregungen, die hervorragende Betreuung und die detaillierte Korrektur der Arbeit.

Frau Prof. Dr. Christel Weiß der Medizinischen Fakultät Mannheim danke ich für die statistische Auswertung und die umfassende Unterstützung im Bereich der Statistik und der graphischen Aufarbeitung der Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. Timo Gaiser des pathologischen Instituts der Universitätsmedizin Mannheim danke ich ebenso wie Frau Nina Wilhelm des pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Heidelberg für die Durchführung eines Teils der immunhistochemischen Färbungen sowie die Erstellung der Tissue Microarrays.

Herrn PD Dr. Cleo-Aron Weis des pathologischen Instituts der Universitätsmedizin Mannheim danke ich für die Digitalisierung der gefärbten Schnitte.

Weiterhin danke ich Frau Sayran Arif-Said für die Einweisung und Unterstützung bei der Erstellung der histologischen Schnitte und der immunhistochemischen Färbungen.

Frau Dr. Anna Bläss, Frau Elke Ditscheid, Frau Laura Messerer, Herrn Felix Guth, Herrn Andreas Huber, Herrn Dr. Robert Huerkamp, Herrn Marcel Knöller und Herrn Matthias Winkler danke ich für Ihre Unterstützung beim Korrekturlesen der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann, meinen Eltern und meinen Schwiegereltern für ihre liebevolle Begleitung und Ermutigung.