

Aus dem Institut für Pathologie
des Unfallkrankenhauses Berlin

DISSERTATION

Tumor-assoziierte Makrophagen beim Hodgkin-Lymphom

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Laura Werner

aus Berlin

Datum der Promotion: 04.06.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Abstrakt	1
1.1	Deutsche Fassung.....	1
1.2	Englische Fassung	3
2	Zusammenfassung.....	5
2.1	Forschungsstand	5
2.1.1	Makrophagen	5
2.1.2	Klassische und alternative Aktivierung.....	5
2.1.3	M1/M2 Modell	5
2.1.4	Makrophagenmarker.....	6
2.1.5	MYC	7
2.1.6	Hodgkin-Lymphome.....	7
2.1.7	Epstein-Barr Virus.....	8
2.2	Erweiterte Methodik.....	9
2.2.1	Material	9
2.2.2	Doppelimmunhistochemie	10
2.3	Wesentliche neue Ergebnisse.....	12
2.3.1	Tumorassoziierte Makrophagen.....	12
2.3.2	Einfluss von MYC.....	14
2.3.3	EBV Status.....	14
2.4	Klinische Anwendung	16
2.4.1	Tumor-assoziierte Makrophagen.....	16
2.5	Weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen	18
2.6	Literaturverzeichnis	19
3	Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung	24
3.1	Eidesstattliche Versicherung.....	24
3.2	Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation	25
4	Auszug aus der Journal Summary List	26
5	Druckexemplar der Publikation	27
6	Lebenslauf.....	38
7	Publikationsliste.....	42
8	Danksagung	43

1 Abstrakt

1.1 Deutsche Fassung

Einleitung

Makrophagen sind Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei Reparaturprozessen, sondern auch bei der Entwicklung von Tumoren. Bei der Differenzierung von Makrophagen unterscheidet man die klassische M1-Aktivierung und die alternative M2-Aktivierung. Während M1-polarisierte Makrophagen antimikrobielle Eigenschaften besitzen und überwiegend Tumorstwachstum-supprimierende Faktoren ausschütten, produzieren M2-polarisierte Makrophagen für die Wundheilung benötigte Zytokine, die auch das Tumorstwachstum fördern können. Das M1/M2-Modell ist hilfreich, stellt allerdings nicht das ganze Spektrum der Makrophagen-Differenzierung dar. Das Protoonkogen MYC ist während der M2-Differenzierung hochreguliert und steuert die Expression von M2-spezifischen tumorfördernden Genen. Die Inaktivierung von MYC zieht eine Hemmung des Tumorstwachstums in Mausmodellen nach sich.

Methodik

Gewebeschnitte von 76 HL Fällen wurden immunhistochemisch simultan mit Makrophagen-Markern (CD68 oder CD163) zusammen mit einem MYC-spezifischen Antikörper angefärbt. Der Epstein-Barr Virus (EBV)-Status der Fälle war bekannt. Die Anzahl an markierten Makrophagen pro Quadratmillimeter wurde quantitativ ausgewertet und verglichen. Für die klinisch-pathologische Korrelation wurden die Fälle für jede Makrophagenpopulation in drei Kategorien mit geringer Anzahl (Klasse 1), mittlerer Anzahl (Klasse 2) und hoher Anzahl (Klasse 3) von Makrophagen eingeteilt.

Ergebnisse

MYC+ Zellen machten 21% bzw. 18% der CD68+ und CD163+ Zellen aus. Eine hohe Anzahl an Makrophagen (Klasse 3) war mit dem schlechtesten Krankheitsverlauf assoziiert. Mittlere Anzahlen an Makrophagen (Klasse 2) waren in den meisten Fällen mit einer besseren Prognose als niedrige oder hohe Anzahlen verbunden.

Fälle mit einem EBV+ Status wiesen höhere Anzahlen an CD68+ und CD163+ Makrophagen auf. Des Weiteren konnte bei EBV+ Fällen eine Anreicherung von MYC- Makrophagen beobachtet werden, während sich dies für MYC+ Makrophagen nicht nachweisen ließ.

Schlussfolgerung

Die Beobachtung, dass bei HL eine mittlere Makrophagenanzahl häufig mit einem besseren Überleben vergesellschaftet war, als eine niedrige oder hohe Anzahl, erinnert an die von Prehn aufgestellte Hormesishypothese. Danach besteht zwischen der Anzahl tumor-infiltrierender Immunzellen und dem Tumorwachstum keine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung. Prehn postulierte, dass eine sehr kleine Anzahl tumor-infiltrierender Immunzellen nicht ausreicht, um das Tumorwachstum zu unterstützen. Diese müssen eine bestimmte Schwelle überschreiten, um das Wachstum zu fördern. Sehr hohe Anzahlen an Immunzellen können das Tumorwachstum wieder hemmen.

Unsere Beobachtungen legen die Annahme nahe, dass beim klassischem HL (cHL) eine mittlere Anzahl von Makrophagen einen hemmenden Einfluss auf das Tumorwachstum haben kann, während Makrophagen in geringer und insbesondere in hoher Zahl das Tumorwachstum fördern können. Diese neue Beobachtung einer hormetischen Beziehung zwischen Makrophagenanzahl und der Prognose von HL sollte in weiteren Untersuchungen verfolgt und bei anderen Tumorentitäten überprüft werden.

1.2 Englische Fassung

Background

Tumour-associated macrophages (TAM) are known to have a major impact on pathogenesis and progression of malignant tumours. Macrophages are broadly defined according to the M1/M2 paradigm. M1-polarised macrophages are believed to exert cytotoxic and anti-neoplastic effects while M2-polarised macrophages contribute to wound healing and tumour growth. It is generally accepted that M2-polarised TAM are dominant in many tumours, thus supporting tumour growth and poor disease outcome. Recently, a new population of MYC-positive macrophages has been described. The proto-oncogene MYC is up-regulated during M2-differentiation and controls the expression of M2-specific genes. Further, deficiency in MYC-positive macrophages has been shown to inhibit tumour growth in a mouse melanoma model. The aim of the work was to investigate the prognostic relevance of TAM in Hodgkin-lymphoma (HL) taking MYC into account.

Methods

Paraffin sections of 76 HL patients with known EBV status were investigated by immunohistochemical double staining using antibodies directed against macrophage-specific surface antigens (CD68, CD163) together with a reagent detecting MYC. Numbers of labelled cells were counted per mm² and assessed in the context of disease-free survival (DFS) and overall survival (OS).

Results

Cases were divided into three classes, according to total numbers of macrophages (CD68+ and CD163+) and of MYC- and MYC+ subgroups for both CD68+ and CD163+ cells. In general, high numbers of macrophages were associated with worst DFS and OS while intermediate numbers mostly showed the best prognosis.

EBV+ cases displayed higher numbers of macrophages, especially of CD163+ macrophages, than EBV- cases and were associated with poor outcome.

Conclusions

Our observation that intermediate numbers of TAM in a HL microenvironment may be associated with a better outcome than very low or very high numbers is reminiscent of the hormesis hypothesis as proposed by Prehn., according to which there is no linear dose-response relationship. Prehn suggested that tumor-infiltrating immune cells need to be present in numbers above a certain threshold in order to support tumour growth and may become inhibitory at very large numbers. Our results suggest that small numbers of TAM

may have a growth-promoting effect in classical HL (cHL) and, with increasing numbers, macrophages may be inhibitory. Finally, very high numbers may again support tumor growth. This finding merits further investigation and should be considered with respect to other tumour entities.

2 Zusammenfassung

2.1 Forschungsstand

2.1.1 Makrophagen

Makrophagen sind essenzielle Bestandteile der angeborenen Immunabwehr. Ihnen werden zahlreiche Funktionen bei der Phagozytose, der Reparatur und Regeneration von Gewebe, der Stoffwechselregulation, der Antigenpräsentation und, nach neueren Erkenntnissen, auch bei der Entstehung maligner Tumore zugeschrieben [1-5].

Im Knochenmark entwickeln sich Monozyten aus myeloischen Stammzellen. Diese Monozyten zirkulieren im Blutkreislauf und differenzieren nach Einwanderung in das Gewebe zu Makrophagen. Die Ausbildung und Funktion der Makrophagen wird von dem umgebenden Mikromilieu beeinflusst [6]. Die Modulation der verschiedenen Makrophagen-Differenzierungszustände erfolgt über Zytokine und Chemokine. Unabhängig von Monozyten können ortsständige Gewebemakrophagen auch während der Embryogenese im Dottersack entstehen [7].

2.1.2 Klassische und alternative Aktivierung

Im Gegensatz zu Lymphozyten, bei denen sich klare, genetisch fixierte Differenzierungslinien beschreiben lassen, zeichnen sich Makrophagensubpopulationen durch große Heterogenität und Plastizität aus. Unter der Stimulation von Interferon (IFN)- γ bilden Makrophagen antimikrobielle und toxische Eigenschaften aus. Diese Form der Differenzierung wird als klassische Aktivierung bezeichnet [8].

Von der klassischen Aktivierung unterscheidet man die alternative Aktivierung von Makrophagen. Bei dieser stimulieren Interleukin(IL)-4 und IL-13 die Differenzierung der Makrophagen und fördern deren Funktionen bei der Wundheilung, Angiogenese und Abwehr von Parasiten [8, 9].

2.1.3 M1/M2 Modell

Es werden verschiedene Polarisierungszustände der Makrophagen definiert, wobei je nach Differenzierung M1- bzw. M2-Makrophagen unterschieden werden. Dabei spielen verschiedene Stoffwechselwege eine Rolle. Die Unterschiede im Arginin-Metabolismus nahmen Mills et al. [10] als Grundlage für die Einteilung der Makrophagen in das M1/M2-Muster. Bei der klassischen Aktivierung stimulieren verschiedene Faktoren, wie IFN- γ , die u.a. von T-Helfer (Th1)-Zellen ausgeschüttet werden, die Differenzierung von Makrophagen [8, 10]. IFN- γ aktiviert beispielsweise den Transkriptionsfaktor STAT1 im Zellkern, welcher die Expression spezifischer Gene, z.B. von inflammatorischen Zytokinen, wie IL-12 und der

Stickstoffmonoxid-Synthetase (NO-Synthetase) [8, 11] stimuliert. Die NO-Synthetase metabolisiert Arginin zu NO, das gewebeschädigende, toxische und antimikrobielle Effekte besitzt [8]. Klassisch aktivierte Makrophagen spielen eine große Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen und werden als M1-Makrophagen bezeichnet.

Von der klassischen Aktivierung unterscheidet man die alternative Aktivierung. Hierbei werden Makrophagen von Th2-Zellen stimuliert, die u.a. IL-4, IL-10 und IL-13 ausschütten und so die Differenzierung der Makrophagen in sogenannte M2-Makrophagen fördern [8-10]. Interleukine aktivieren Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise CMAF, und bewirken eine Genexpression von IL-10 und des Enzyms Arginase [12, 13]. Letztere wandelt Arginin zu Ornithin um, aus welchem wiederum Polyamine und Proline entstehen [8]. Polyamine fördern die Proliferation und Regeneration von Geweben, Proline sind für die Kollagensynthese entscheidend [14].

M2-Makrophagen werden demzufolge vielfältige Funktionen zugeschrieben. Sie stimulieren Th2-Immunreaktionen, wirken immunsuppressiv und fördern den Bindegewebsumbau, die Angiogenese, die Wundheilung und das Wachstum von Tumoren. In diesem Zusammenhang spricht man auch von M2-polarisierten tumorassoziierten Makrophagen (TAM). TAM können sowohl M1-, als auch M2-polarisiert sein. Den überwiegenden Anteil machen M2-polarisierte Makrophagen aus. Mehrere Studien haben den Einfluss von TAM auf das Tumorwachstum in Zusammenhang mit einer verschlechterten Überlebensprognose in unterschiedlichen Tumoren, wie diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom [15], Aderhautmelanom [16], intrahepatisches cholangiozelluläres Karzinom [17], Pankreaskarzinom [18], Schilddrüsenkarzinom [19] untersucht.

2.1.4 Makrophagenmarker

Die auf Monozyten bzw. Makrophagen exprimierte Glykoproteine CD68 und CD163 zeigen unterschiedliche Charakteristika. Beide Glykoproteine gehören als Membranproteine der Familie der Scavengerrezeptoren an. Das Oberflächenprotein CD68 befindet sich auf Monozyten und Makrophagen. Unter Verwendung des Klons PG-M1, der spezifisch mit Makrophagen in den Keimzentren und interfollikulären Regionen reagiert, nicht aber mit follikulären dendritischen Zellen im Keimzentrum, wurde ein selektives Anfärben der Makrophagen ermöglicht [20]. CD68 gilt als ein generischer Makrophagenmarker. Der Rezeptor CD163 wird ebenfalls auf den Oberflächen von Monozyten und Gewebemakrophagen exprimiert [21]. In vielen Arbeiten wird CD163 als ein M2 Marker angesehen, andere Untersuchungen widersprechen dieser Annahme, da CD163+ Makrophagen auch M1-spezifische Transkriptionsfaktoren, wie z.B. pSTAT1, aufweisen können [22].

Um die unterschiedlichen Differenzierungszustände der Makrophagen zu erfassen, finden M1-spezifische Expressionsprodukte, wie STAT1, NOS2, IL-12, IL-23 und RBP-J, sowie typische Th1-Chemokine, wie CCL19 und CXCL10, als potentielle M1-Marker Verwendung [11, 22, 23].

Unter den potenziellen M2-Markern erlangen Arginase, IL-10, CMAF und MYC Bedeutung [8, 12, 24]. Der Transkriptionsfaktor CMAF reguliert hierbei in den Makrophagen eine verstärkte IL-10 Expression [12]. Der Transkriptionsfaktor MYC hingegen ist an der Expression von Genen der alternativen Aktivierung beteiligt und wurde von Pello et. al. [24] als putativer M2 Marker beschrieben.

2.1.5 MYC

MYC spielt als Protoonkogen eine wichtige Rolle bei Wachstums- und Differenzierungsprozessen [25]. Translokationen von MYC sind entscheidend bei der Entstehung von Burkitt-Lymphomen [26].

Als Transkriptionsfaktor kontrolliert MYC eine Anzahl an Genen, die mit der alternativen Aktivierung von Makrophagen assoziiert sind und zeigt eine direkte Interaktion mit den Promotoren der Gene für ALOX15, MRC1, SCARB1 [24]. Folglich wurde eine höhere Expression von MYC in M2 Makrophagen nachgewiesen, sowie eine MYC-abhängige Expression der tumorfördernden Faktoren MMP9, VEGF, TGF- β und HIF-1 α in M2 polarisierten TAM [24]. Die Ausschaltung des MYC-Gens in Makrophagen resultierte in einer reduzierten Expression dieser Faktoren, einer fehlerhaften Tumorangiogenese und einem verminderten Tumorwachstum. Diese Prozesse konnten für Fibrosarkome und Melanome in Mausmodellen gezeigt werden [27]. Das Vorkommen und Verhalten in anderen Tumorentitäten sind bisher noch nicht geklärt.

2.1.6 Hodgkin-Lymphome

Hodgkin-Lymphome (HL) sind eine Gruppe von bösartigen Neubildungen des lymphatischen Gewebes, meist der Lymphknoten. Histologisch unterteilt man HL in zwei große Gruppen: das klassische HL (cHL), das mit 95% die Mehrzahl der HL einnimmt, und das noduläre lymphozytenprädominante HL [28]. Das cHL wird noch einmal in vier Untergruppen untergliedert: noduläre Sklerose, gemischte Zellularität, lymphozytenreich und lymphozytenarm. Die Krankheit beginnt häufig im jungen Erwachsenenalter zwischen dem 20. bis 30. Lebensjahr [29]. Die noduläre Sklerose ist hier der häufigste diagnostizierte Subtyp. Der zweite, etwas kleinere, Häufigkeitsgipfel liegt nach dem 65. Lebensjahr [29].

In Deutschland erkranken pro Jahr etwa 1.060 Frauen und 1.430 Männer am HL (RKI 2016) [25]. Die Prognose des HL ist in der Regel sehr günstig: das relative fünf-Jahres-Überleben liegt bei Männern und Frauen zwischen 86 % und 84 % [30].

Histologisch kennzeichnet das cHL eine variable, üblicherweise kleine Anzahl von Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS) Zellen. Reed-Sternberg-Zellen sind groß und haben mindestens zwei Kerne mit eosinophilen Nukleolen. Einkernige Varianten werden als Hodgkin-Zellen bezeichnet [28]. Diese Zellen sind typischerweise in eine große Zahl von Immunzellen im Tumormikromilieu eingebettet. Neben Lymphozyten, Mastzellen, Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten finden sich viele Makrophagen. Die Untersuchung des Vorkommens von Makrophagen im cHL zeigte eine schlechte Überlebensprognose im Zusammenhang mit hohen Anzahlen an Makrophagen an [31, 32]. Eine in Studien häufig verwendete Einteilung von Makrophagenanzahlen ist der Ansatz einer Gliederung in zwei Kategorien: niedrige und hohe Anzahlen an Makrophagen, wobei hohe Anzahlen mit einer schlechten Prognose beschrieben werden [32-34].

Das Vorkommen und die Bedeutung von MYC bei Makrophagen im cHL wurde bisher allerdings nicht untersucht.

Die Risikofaktoren, die zu der Entstehung eines HL beitragen, sind bisher nur teilweise erforscht. Diskutiert werden angeborene und erworbene Besonderheiten des Immunsystems sowie virale Infektionen. Dabei steht vor allem das Epstein-Barr Virus im Zentrum der Betrachtung.

2.1.7 Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus (EBV) gehört zu der Gruppe der humanen Herpesviren. Eine Infektion im Jugend- bzw. Erwachsenenalter führt häufig zum Pfeiffer-Drüsenfiebers (infektiöse Mononukleose). Anschließend persistiert das EBV lebenslang in B-Lymphozyten [35]. Über 90% der Erwachsenen sind persistent mit EBV infiziert. Unter Immunsuppression kann das EBV reaktiviert werden. Viele Erkrankungen werden in ihrer Entstehung mit dem EBV in Verbindung gebracht, wie beispielsweise Burkitt-Lymphome [36], Nasopharynxkarzinome [36], Hodgkin-Lymphome [37], Lupus erythematodes [38], multiple Sklerose [39].

Der Zusammenhang zwischen EBV Infektion und der Überlebenswahrscheinlichkeit beim HL wurde in einigen Studien untersucht und kontrovers diskutiert [40-44]. Dabei zeigten Patienten mit EBV+ Tumorzellen schlechtere fünf-Jahres-Überlebensdaten als Patienten mit EBV- Tumorzellen [40-42]. Andere Studien widersprechen dieser These [43, 44]. Diese zeigten entweder keine Korrelation zwischen Status der Tumorzellen und dem Überleben [43] oder ein besseres Überleben der Patienten mit EBV+ Tumorzellen [44]. Das Patientenalter kann hierbei eine entscheidende Rolle spielen. So wird vermutet, dass EBV im jungen Alter einen protektiven Faktor, mit zunehmendem Alter eher einen Risikofaktor darstellt [45, 46].

2.2 Erweiterte Methodik

2.2.1 Material

Das untersuchte Material entstammt dem Archiv des Institutes für Pathologie der Universität Erlangen in Form von Paraffinblöcken aus den Jahren 1991 bis 2007. Vierundachtzig Patienten mit diagnostiziertem HL wurden in die Studie eingeschlossen. Die in Paraffin eingebetteten Gewebelöcke wurden als Tissue Micro Arrays (TMA) aufgearbeitet. Dreiundfünfzig Proben stammten von Männern und 31 von Frauen. Das Durchschnittsalter lag bei 40 Jahren mit einer Altersspanne von 4 bis 84 Jahren.

Wegen eines Gewebsverlusts während der Färbung der Objektträger mussten acht Fälle aus der Studie ausgeschlossen werden. Die eingeschlossenen 76 Fälle und deren klinisch-pathologische Angaben sind in der Tabelle 1 dargestellt. HL wurden gemäß der Ann-Arbor-Klassifikation klassifiziert (Tabelle 1). Der EBV Status der Patienten war bekannt und mittels der EBV-spezifischen in situ Hybridisation und der Immunhistochemie zum Nachweis des EBV latenten Membranproteins 1 (LMP1) untersucht worden.

Alle Gewebeproben wurden zu diagnostischen Zwecken eingeschickt und erst nach Abschluss der Diagnostik für die weiterführenden Untersuchungen benutzt. Kein Material wurde zum Zweck dieser Untersuchungen entnommen.

Tabelle 1: Klinisch-pathologische Angaben

Klinisch-pathologische Angaben	n (%)
cHL Fälle	76 (100)
Nodulär-sklerosierende Form	51 (67.1)
Gemischtzellige Form	23 (30.3)
Lymphozytenreiche Form	1 (1.3)
Interfollikuläre Form	1 (1.3)
Geschlecht	
Männer	46 (61)
Frauen	30 (39)
EBV Status	
negativ	50 (66)
positiv	26 (34)
Ann-Arbor	
Stadium I	13 (17)
Stadium II	32 (42)
Stadium III	14 (18)
Stadium IV	11 (15)
Stadium unbekannt	6 (8)

2.2.2 Doppelimmunhistochemie

Um die unterschiedlichen Aktivierungszustände der Makrophagen zu erfassen, wurde ein immunhistologisches Doppelmarkierungsverfahren angewendet. Hier wird nach der Detektion des M2-spezifischen Transkriptionsfaktors MYC ein immunhistologischer Nachweis von Makrophagen mit CD68- bzw. CD163-Antikörpern angeschlossen.

Im ersten Schritt, der Antigendemaskierung, wird die verlorengegangene Antigenität der Proteine in formalin-fixiertem, paraffiniertem Gewebe wiederhergestellt. Um die bei der Fixierung von Geweben in Formalin ausgebildeten Quervernetzungen (Maskierungen) zwischen den Proteinen aufzubrechen und die Immunreaktivität der Antigene wieder herzustellen, wurden die Paraffinschnitte im Leica BOND III System (Leica, Wetzlar, Deutschland) deparaffiniert (Bond Dewax Solution) und anschließend mit einem EDTA-basierten Puffer bei 100°C behandelt (Bond Epitope Retrieval (ER) Solution 2, heat induced epitope retrieval (HIER)). Nach erfolgter Inkubation mit dem Primärantikörper (MYC Antikörper, 1:50, monoklonal, Kaninchen, Klon EP121, Biocare Medical, Pacheco, Kalifornien, USA) wird ein Enzym-Polymer hinzugefügt, das mehrere Sekundärantikörper mit mehreren Meerrettich-Peroxidase Molekülen (Horse Radish Peroxidase (HRP), Bond Polymer Refine Detection) besitzt. Diese Peroxidasen können ein zugegebenes farbloses Substrat in ein farbiges Endprodukt umwandeln. Das hier verwendete Chromogen Diaminobenzidin (DAB) wird in Gegenwart von Wasserstoffperoxid durch die Peroxidase oxidiert und bildet einen unlöslichen, braunen Farbniederschlag. Der Farbniederschlag, welcher an den Stellen der Primärantikörper-Zielantigen-Reaktion bindet, ermöglicht eine Visualisierung der gewünschten Zielstruktur.

Folgendes Protokoll/Programm wurde im Bond III verwendet:

- 1) Entparaffinierung: Bond Dewax Solution, Alkohol, Bond Wash Solution, 30 min, 72°
- 2) Vorbehandlung: HIER durch ER2, 20 min, 100°
- 3) Bond Wash Solution, 3 min, Raumtemperatur
- 4) Bond Peroxidase Block, 5 min, Raumtemperatur
- 5) Bond Wash Solution, 2 min, Raumtemperatur
- 6) MYC Antikörper, 60 min, Raumtemperatur
- 7) Bond Wash Solution, 2 min, Raumtemperatur
- 8) Bond Post Primary, 8 min, Raumtemperatur
- 9) Bond Wash Solution, 3x2 min, Raumtemperatur
- 10) Bond Polymer Refine Detection, 8 min, Raumtemperatur
- 11) Bond Wash Solution, 2x2 min, Raumtemperatur
- 12) Deionized Water, Raumtemperatur

- 13) Mixed DAB Refine, 10 min, Raumtemperatur
- 14) Deionized Water, Raumtemperatur

Anschließend erfolgt die Detektion von Makrophagen-spezifischen Antigenen. Nach erfolgter Inkubation mit dem Primärantikörper (CD68 Antikörper, 1:800, Klon PG-M1, Agilent Dako, Santa Clara, Kalifornien, USA oder CD163 Antikörper, 1:400, Klon 10D6, Leica, Newcastle Upon Tyne, GB) und der Verstärkungsreagenz (PostBlock, Zytomed Systems) wird das Enzym-Polymer (Alkaline Phosphatase Polymer Kit, Zytomed Systems) hinzugefügt, das mehrere Sekundärantikörper mit mehreren alkalischen Phosphatasen enthält. Diese Phosphatasen setzen nach Hinzugabe eines Chromogens (Vector Blue Chromogen) eine enzymatische Reaktion in Gang, welche das farblose Substrat in ein farbiges (blaues) Endprodukt umwandelt.

Folgendes Protokoll wurde angewendet:

- 1) Waschpuffer, 5 min, Raumtemperatur
- 2) AP-Polymer Kit: Blocking Solution, 5 min, Raumtemperatur
- 3) Waschpuffer, 2 min, Raumtemperatur
- 4) CD68/ CD163 Primärantikörper: 30 min, Raumtemperatur
- 5) Waschpuffer, 3x2 min, Raumtemperatur
- 6) AP-Polymer Kit: PostBlock Reagent, 30 min, Raumtemperatur
- 7) Waschpuffer, 3x2 min, Raumtemperatur
- 8) AP-Polymer Kit: AP-Polymer, 30 min, Raumtemperatur
- 9) Waschpuffer, 3x2 min, Raumtemperatur
- 10) Vector Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit III, 8 min, Raumtemperatur
- 11) Mikroskopische Kontrolle
- 12) Waschpuffer, 5 min, Raumtemperatur
- 13) Schnitte lufttrocknen und eindecken

Die angefärbten Schnittpräparate wurden unter einem Olympus-Mikroskop BX53 bei 20facher Objektivvergrößerung digital fotografiert. Kriterien für die Bildauswahl waren Ausschnitte mit der höchsten Makrophagenanzahl, sowie das Vorkommen von Tumorzellen in den ausgewählten Bereichen. Anschließend wurde die Makrophagenanzahl pro Quadratmillimeter manuell mit dem Programm ImageJ ausgezählt.

2.3 Wesentliche neue Ergebnisse

2.3.1 Tumorassoziierte Makrophagen

TAM sind bei verschiedenen Tumorentitäten [15-19], einschließlich des HL [31-34, 47], häufig mit einer schlechten Prognose verbunden und werden derzeit als potenzielle therapeutische Ziele in Betracht gezogen. In früheren Studien wurde üblicherweise der Ansatz einer zweistufigen Analyse mit einer Unterteilung der Makrophagen in zwei Klassen (niedrige und hohe Makrophagenanzahlen) verwendet [33, 34, 47-49]. In dieser Studie wurden dagegen die HL-Fälle in drei Klassen mit niedriger, mittlerer und hoher Anzahl von TAMs unterteilt. Diese Analyse ermöglichte eine differenziertere Analyse der Auswirkungen unterschiedlicher Makrophagenanzahlen auf die Prognose der cHL. Zunächst konnte auch mit diesem Ansatz die Beobachtung bestätigt werden, dass die Anzahl der TAM für die Prognose des cHL entscheidend ist und dass die höchste Anzahl von TAM (Klasse 3 in der aktuellen Studie) häufig mit der schlechtesten Prognose verbunden ist [31-34, 47].

Mit dem hier verfolgten dreistufigen Ansatz konnte außerdem gezeigt werden, dass Fälle mit einer mittleren Anzahl von Makrophagen (Klasse 2 in der aktuellen Studie) überwiegend einen besseren Verlauf aufwiesen als Fälle mit niedrigen oder hohen Anzahlen an Makrophagen. Dies wurde für die Gesamtzahl der CD68+ und CD163+ Makrophagen sowie MYC+ und MYC- Makrophagen beobachtet. Eine Ausnahme bildeten CD68+/MYC- Makrophagen, die den besten Verlauf in der Gruppe mit den niedrigsten Makrophagenzahlen (Klasse 1) zeigten. Eine noch differenziertere Analyse mit einer Aufteilung in vier Gruppen erbrachte keine zusätzlichen Informationen (nicht gezeigt).

Die Beobachtung der besten Prognose bei mittleren Makrophagenzahlen erinnert an die von Prehn vorgeschlagene Hormesishypothese für tumorinfiltrierende Immunzellen [50]. Prehn geht grundsätzlich davon aus, dass tumor-infiltrierende Immunzellen einen fördernden Einfluss auf das Tumorwachstum haben können, und dass eine sehr kleine Anzahl von Tumor-infiltrierenden Immunzellen hierfür möglicherweise nicht ausreicht. Diese müssen eine bestimmte Schwelle überschreiten, um das Wachstum zu fördern (Abbildung 1, schwarze Kurve). Sehr hohe Anzahlen an Immunzellen können das Tumorwachstum wieder hemmen [50, 51].

Die Daten der vorliegenden Studie deuten auf eine umgekehrte Situation hin, in der eine geringe Anzahl von Tumor-assoziierten Makrophagen eine wachstumsfördernde Wirkung auf cHL haben kann (Klasse 1, Tabelle 2), während mittlere Anzahlen von Makrophagen eine hemmende Wirkung auf das Tumorwachstum zeigen (Klasse 2, Tabelle 2). Sehr hohe Anzahlen (Klasse 3, Tabelle 2) können das Tumorwachstum wieder unterstützen (Abbildung 1, graue Kurve). Diese Schlussfolgerung wird durch die Ergebnisse von Pearce et al. [52] unterstützt, die zeigten, dass das Tumorwachstum bei Darmkrebs und Burkitt-Lymphom in

Tiermodellen durch hohe Dosen von Antitumor-Antikörpern gehemmt, aber durch niedrige Dosen stimuliert wird [52]. Interessanterweise beobachteten die Autoren in dieser Studie eine hohe Anzahl von TAM bei Tieren, die mit der tumorfördernden Dosis behandelt worden waren, während bei Tieren, die mit einer tumorhemmenden Dosis behandelt worden waren, die Anzahl tumorassoziierter Makrophagen gering war [52]. Schließlich zeigten die Autoren, dass die tumorfördernde Wirkung von Antikörpern von der Anwesenheit von Makrophagen abhängt [52].

Abbildung 1: Grafik zur Veranschaulichung der Hormesishypothese von Prehn (schwarze Kurve) und der in der aktuellen Studie gezeigten inversen hormetischen Beziehung von Makrophagenanzahl und Verlauf beim cHL (graue Kurve).

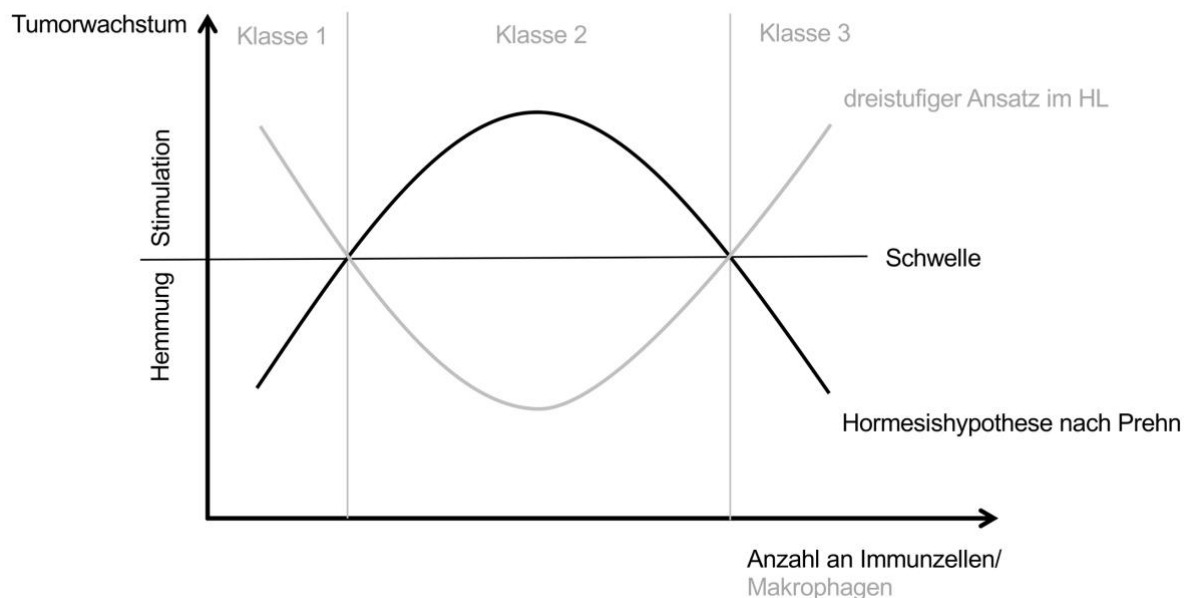


Tabelle 2: Unterteilung der Makrophagenanzahlen/mm² in 3 Klassen

	CD68+	CD163+	CD68+/MYC-	CD163+/MYC-	CD68+/MYC+	CD163+/MYC+
Klasse 1	≤ 724	≤ 769	≤ 561	≤ 593	≤ 134	≤ 142
Klasse 2	725 - 937	770 - 1325	562 - 704	594 - 949	135 - 218	143 - 259
Klasse 3	≥ 938	≥ 1326	≥ 705	≥ 950	≥ 219	≥ 260

Die Daten der vorliegenden Studie bestätigen zwar den negativen prognostischen Einfluss einer hohen Anzahl von Makrophagen in der cHL-Mikroumgebung, weisen jedoch darauf hin, dass keine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung besteht, und werfen somit ein neues Licht auf

die Rolle von Makrophagen beim cHL. Wahrscheinlich hängen die Auswirkungen der TAM auf das Ergebnis beim cHL nicht nur mit der Gesamtzahl der Makrophagen zusammen, sondern auch von Änderungen der Makrophagenpolarisation.

Diese Beobachtung, die auf eine inverse hormetische Beziehung zwischen Makrophagen und dem Ergebnis des Krankheitsverlaufes beim cHL hinweist, sollte Ausgangspunkt weiterer Untersuchungen sein, da Auswirkungen auf andere Tumorentitäten zu vermuten sind.

2.3.2 Einfluss von MYC

Die von Pello et al. [24] beschriebene Rolle von MYC als Schlüsselfaktor bei der alternativen Aktivierung der M2-Makrophagen wurde in weiterführenden Arbeiten vorrangig in Melanom- und Fibrosarkommodellen bestätigt [27]. Durch Deletion des MYC-Gens in Makrophagen konnte in den eingesetzten Mausmodellen eine defekte Tumorangio-genese und ein reduziertes Tumorwachstum gezeigt werden [27]. Bisher liegen keine Studien vor, die sich mit der möglichen Rolle dieser MYC+ und MYC- Makrophagen in menschlichen Tumormodellen befassen.

In der vorliegenden Studie konnte zunächst gezeigt werden, dass MYC+ Makrophagen einen Anteil von 21% bzw. 18% der CD68+ und CD163+ Zellen ausmachten.

Basierend auf den Beobachtungen von Pello et al. wird die Hypothese aufgestellt, dass MYC+ Makrophagen im Vergleich zu MYC- Makrophagen mit einer schlechteren Prognose bei cHL assoziiert sind. In den Analysen verhielten sich MYC- Makrophagen ähnlich wie Gesamtmakrophagen. Insbesondere waren die schlechteste Prognose mit den höchsten Makrophagenzahlen (Klasse 3) und die beste Prognose mit mittleren Makrophagenanzahlen (Klasse 2) sowohl für DFS als auch für OS assoziiert.

Für MYC+ Makrophagen zeigten die Kaplan-Meier-Analysen in der aktuellen Studie keinen klaren Trend, während bei der Cox-Regression erneut das Muster der besten Prognose mit mittleren Makrophagenanzahlen (Klasse 2) gezeigt werden konnte.

Für die Zukunft wäre es wichtig, die Rolle von MYC detaillierter in unterschiedlichen Tumorentitäten zu untersuchen, um die Rolle der MYC+ Makrophagen genauer definieren zu können.

2.3.3 EBV Status

EBV ist ein etablierter Co-Faktor in der Pathogenese von HL [53-56]. Ob und in welchem Ausmaß die EBV-Infektion der Tumorzellen das klinische Ergebnis bei cHL beeinflusst ist jedoch nicht abschließend geklärt, da weitere unterschiedliche Einflussfaktoren, wie beispielsweise das Alter des Patienten, den Verlauf der Krankheit beeinflussen können [40-42, 57].

In der vorliegenden Studie waren EBV+ Fälle mit einer schlechteren Prognose für cHL assoziiert als EBV- Fälle und durch eine höhere Anzahl tumorassoziierter Makrophagen gekennzeichnet. Es wird daher angenommen, dass die EBV-vermittelte Zytokin- und Chemokinsynthese durch die HRS-Zellen zu einer Akkumulation von Makrophagen in der cHL-Mikroumgebung führen und durch diesen Mechanismus zu einem schlechteren Ergebnis beitragen kann.

2.4 Klinische Anwendung

Allgemein stellen Makrophagen einen bedeutenden Prognosefaktor bei malignen Tumoren dar und werden als mögliches therapeutisches Ziel diskutiert [58, 59]. In Abhängigkeit von der Tumorentität können Makrophagen mit einem klinisch günstigen oder ungünstigen Verlauf in Verbindung stehen. Makrophagen können das Tumorstadium unterstützen, indem sie den Bindegewebsumbau und die Angiogenese fördern, lokale Immunreaktionen hemmen oder direkt mit den Tumorzellen interagieren. Diese Funktionen werden größtenteils von M2-polarisierten TAM übernommen.

2.4.1 Tumor-assoziierte Makrophagen

Bis heute ist die Heterogenität und Verteilung der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen in den unterschiedlichen Tumoren unzureichend untersucht und nicht nach einheitlichen Kriterien erfasst. Auch die Funktion der Makrophagen bei der Pathogenese und Krankheitsentwicklung von Tumoren ist nicht abschließend geklärt. Der derzeitige Forschungsstand betont, dass Makrophagen einen entscheidenden Anteil an Wachstumsprozessen im Tumormikromilieu haben. Da das Vorhandensein von hohen Anzahlen an TAM bei unterschiedlichen Tumoren generell mit einer ungünstigen Prognose einhergeht [16, 18, 19, 31, 60], kann eine quantitative Bestimmung von TAM zu einer Einschätzung der Malignität des Tumors beitragen. Scores zur Abschätzung der Makrophagendichte, bezogen auf eine standardisierte Fläche eines histologischen Präparates, wären hier für die Zukunft interessant. Die Bestimmung der Makrophagenverteilung ist für die Klinik essenziell, um den Verlauf und die Prognose besser einschätzen zu können und ggf. einen Therapieansatz für maligne Tumore entwickeln zu können.

Neben der Gesamtanzahl der TAM kann auch der Polarisierungszustand der Makrophagen (M1/M2 Makrophagen) das Ergebnis beim cHL beeinflussen [32, 61].

Das Verhältnis an M1/M2 Makrophagen erfordert weitere, eingehendere Untersuchungen zu dem genauen Vorkommen der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen beim cHL, um ein Verteilungsmuster identifizieren zu können und Rückschlüsse auf die Rolle der Populationen in der Krankheitsentstehung von HL ziehen zu können. So können neue Therapieansätze entwickelt werden, um in frühen Stadien eine Veränderung des Tumormikromilieus zu erzielen. Grundvoraussetzung für das einheitliche Detektieren der Makrophagen wäre eine Standardisierung von Verfahren für die Charakterisierung des inflammatorischen Mikromilieus von Tumoren. Auch die einheitliche Verwendung der verwendeten Marker ist wichtig, um eine bessere Vergleichbarkeit von klinischen Studien herzustellen.

Ziel ist es, das Tumormikromilieu und die unterschiedlichen Differenzierungszustände von Makrophagen hier besser zu erfassen und unterschiedlichen Stadien zuordnen zu können. Der hier verfolgte dreistufige Ansatz stellt dar, dass keine lineare Beziehung zwischen Makrophagenanzahl und Prognose besteht. Für die Zukunft sollten weitere Untersuchungen der Dosis-Wirkungs-Beziehung im Zusammenhang mit Veränderungen der Makrophagenpolarisation sowie die Anwendung des dreistufigen Systems auf weitere Tumorentitäten prioritär untersucht werden.

2.5 Weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen

Als ein mögliches Ziel der antineoplastischen Therapie rückt das Mikromilieu maligner Tumoren immer mehr in den Vordergrund. Die unter 2.4.1 beschriebene Detektion der Makrophagenverteilung in verschiedenen Tumorentitäten ist essenziell und kann grundlegend neue Perspektiven für die Therapie von malignen Tumoren eröffnen. Besonders TAM, die überwiegend M2-polarisiert sind, haben hier eine bedeutende Funktion und werden vermehrt als tumorfördernde Einheit diskutiert. Klassisch aktivierte M1 Makrophagen hingegen werden als tumorsupprimierende Population beschrieben.

Demzufolge könnte eine therapeutische Umlenkung von M2- zu M1-Makrophagen helfen, das Wachstum von Tumoren zu reduzieren. Eine Depletion von M2 Makrophagen unter Immuntherapeutika können dabei eine wichtige Rolle spielen [62, 63].

Wie eine Umprogrammierung allerdings aussehen könnte und welche Auswirkungen auf das Tumormikromilieu, den Tumor und schlussendlich den ganzen Organismus folgen, muss intensiv beforscht werden. Dabei wäre eine individuelle Analyse des inflammatorischen Mikromilieus maligner Tumoren Grundvoraussetzung.

Das Aufgabenfeld der Pathologen würde sich erweitern. Analysen von Tumormikromilieus und Makrophagenpopulationen setzen lichtmikroskopisch sichtbare hochspezifische Marker von Makrophagen und anderen inflammatorischen Zellen voraus. Verschiedene Markerkombinationen müssten entwickelt werden, die der Heterogenität der Makrophagen gerecht werden.

Die Unterteilung in M1/M2-Makrophagen ist bisher ein attraktives und verbreitetes Modell. Aufgrund der Komplexität der Heterogenität der Makrophagen ist eine Nomenklatur basierend auf der Art des Aktivierungssignals ein weiterer sinnvoller Ansatz [64]. Des Weiteren wäre eine einheitliche Verwendung von Makrophagenmarkern und die verwendeten Kombinationen für die Identifikation von Makrophagen als Grundlage für zukünftige Analysen von Vorteil.

In der Zukunft sind Methoden zur Standardisierung für die Charakterisierung des inflammatorischen Mikromilieus von Tumoren von hoher Relevanz, um therapeutisch zu vergleichbaren Ergebnissen zu kommen.

2.6 Literaturverzeichnis

1. Mantovani, B., Rabinovitch, M. & Nussenzweig, V. Phagocytosis of immune complexes by macrophages. Different roles of the macrophage receptor sites for complement (C3) and for immunoglobulin (IgG). *J Exp Med* **135**, 780-792, <https://doi.org/10.1084/jem.135.4.780> (1972).
2. Leibovich, S. J. & Ross, R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* **78**, 71-100, (1975).
3. Folkman, J. & Klagsbrun, M. Angiogenic factors. *Science* **235**, 442-447, <https://doi.org/10.1126/science.2432664> (1987).
4. Rosenthal, A. S. & Shevach, E. M. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J Exp Med* **138**, 1194-1212, <https://doi.org/10.1084/jem.138.5.1194> (1973).
5. McBride, W. H. Phenotype and functions of intratumoral macrophages. *Biochim Biophys Acta* **865**, 27-41, [https://doi.org/10.1016/0304-419x\(86\)90011-9](https://doi.org/10.1016/0304-419x(86)90011-9) (1986).
6. Stout, R. D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S. K. & Suttles, J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* **175**, 342-349, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.1.342> (2005).
7. Epelman, S., Lavine, K. J. & Randolph, G. J. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* **41**, 21-35, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013> (2014).
8. Classen, A., Lloberas, J. & Celada, A. Macrophage activation: classical versus alternative. *Methods Mol Biol* **531**, 29-43, https://doi.org/10.1007/978-1-59745-396-7_3 (2009).
9. Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* **176**, 287-292, <https://doi.org/10.1084/jem.176.1.287> (1992).
10. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* **164**, 6166-6173, (2000).
11. Lawrence, T. & Natoli, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* **11**, 750-761, <https://doi.org/10.1038/nri3088> (2011).
12. Cao, S., Liu, J., Chesi, M., Bergsagel, P. L., Ho, I. C., Donnelly, R. P. & Ma, X. Differential regulation of IL-12 and IL-10 gene expression in macrophages by the basic leucine zipper transcription factor c-Maf fibrosarcoma. *J Immunol* **169**, 5715-5725, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.10.5715> (2002).
13. Pauleau, A. L., Rutschman, R., Lang, R., Pernis, A., Watowich, S. S. & Murray, P. J. Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression. *J Immunol* **172**, 7565-7573, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.12.7565> (2004).
14. Banan, A., McCormack, S. A. & Johnson, L. R. Polyamines are required for microtubule formation during gastric mucosal healing. *Am J Physiol* **274**, G879-885, (1998).
15. Shen, L., Li, H., Shi, Y., Wang, D., Gong, J., Xun, J., Zhou, S., Xiang, R. & Tan, X. M2 tumour-associated macrophages contribute to tumour progression via legumain remodelling the extracellular matrix in diffuse large B cell lymphoma. *Sci Rep* **6**, 30347, <https://doi.org/10.1038/srep30347> (2016).
16. Bronkhorst, I. H., Ly, L. V., Jordanova, E. S., Vrolijk, J., Versluis, M., Luyten, G. P. & Jager, M. J. Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 643-650, <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5979> (2011).
17. Hasita, H., Komohara, Y., Okabe, H., Masuda, T., Ohnishi, K., Lei, X. F., Beppu, T., Baba, H. & Takeya, M. Significance of alternatively activated macrophages in patients

- with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Sci* **101**, 1913-1919, <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01614.x> (2010).
18. Kurahara, H., Shinchu, H., Mataka, Y., Maemura, K., Noma, H., Kubo, F., Sakoda, M., Ueno, S., Natsugoe, S. & Takao, S. Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res* **167**, e211-219, <https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.05.026> (2011).
 19. Ryder, M., Ghossein, R. A., Ricarte-Filho, J. C., Knauf, J. A. & Fagin, J. A. Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* **15**, 1069-1074, <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0036> (2008).
 20. Falini, B., Flenghi, L., Pileri, S., Gambacorta, M., Bigerna, B., Durkop, H., Eitelbach, F., Thiele, J., Pacini, R., Cavaliere, A., Martelli, M., Cardarelli, N., Sabattini, E., Poggi, S. & Stein, H. PG-M1: a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. *Am J Pathol* **142**, 1359-1372, (1993).
 21. Lau, S. K., Chu, P. G. & Weiss, L. M. CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol* **122**, 794-801, <https://doi.org/10.1309/QHD6-YFN8-1KQX-UUH6> (2004).
 22. Barros, M. H., Hauck, F., Dreyer, J. H., Kempkes, B. & Niedobitek, G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One* **8**, e80908, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080908> (2013).
 23. Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M. & Mantovani, A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* **177**, 7303-7311, (2006).
 24. Pello, O. M., De Pizzol, M., Mirolo, M., Soucek, L., Zammataro, L., Amabile, A., Doni, A., Nebuloni, M., Swigart, L. B., Evan, G. I., Mantovani, A. & Locati, M. Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology. *Blood* **119**, 411-421, <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-339911> (2012).
 25. Schmidt, E. V. The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene* **18**, 2988-2996, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202751> (1999).
 26. Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R. C. & Croce, C. M. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7824-7827, <https://doi.org/10.1073/pnas.79.24.7824> (1982).
 27. Pello, O. M., Chevre, R., Laoui, D., De Juan, A., Lolo, F., Andres-Manzano, M. J., Serrano, M., Van Ginderachter, J. A. & Andres, V. In vivo inhibition of c-MYC in myeloid cells impairs tumor-associated macrophage maturation and pro-tumoral activities. *PLoS One* **7**, e45399, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045399> (2012).
 28. Hansmann, M. L. & Willenbrock, K. WHO classification of Hodgkin's lymphoma and its molecular pathological relevance. *Pathologe* **23**, 207-18, <https://doi.org/10.1007/s00292-002-0529-1> (2002).
 29. Studygroup, G. H. Epidemiologie. Abgerufen am 02. Mai 2020, von <https://www.ghsq.org/epidemiologie>.
 30. Institut, R. K (2019, Dezember 17). Krebs in Deutschland für 2015/2016. Abgerufen am 02. Mai 2020, von https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html
 31. Steidl, C., Lee, T., Shah, S. P., Farinha, P., Han, G., Nayar, T., Delaney, A., Jones, S. J., Iqbal, J., Weisenburger, D. D., Bast, M. A., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, H. K., Rimsza, L. M., Campo, E., Delabie, J., Braziel, R. M., Cook, J. R., Tubbs, R. R., Jaffe, E. S., Lenz, G., Connors, J. M., Staudt, L. M., Chan, W. C. & Gascoyne, R. D. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* **362**, 875-885, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0905680> (2010).
 32. Zaki, M. A., Wada, N., Ikeda, J., Shibayama, H., Hashimoto, K., Yamagami, T., Tatsumi, Y., Tsukaguchi, M., Take, H., Tsudo, M., Morii, E. & Aozasa, K. Prognostic

- implication of types of tumor-associated macrophages in Hodgkin lymphoma. *Virchows Arch* **459**, 361-366, <https://doi.org/10.1007/s00428-011-1140-8> (2011).
33. Kamper, P., Bendix, K., Hamilton-Dutoit, S., Honore, B., Nyengaard, J. R. & d'Amore, F. Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* **96**, 269-276, <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.031542> (2011).
 34. Yoon, D. H., Koh, Y. W., Kang, H. J., Kim, S., Park, C. S., Lee, S. W., Suh, C. & Huh, J. CD68 and CD163 as prognostic factors for Korean patients with Hodgkin lymphoma. *Eur J Haematol* **88**, 292-305, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2011.01731.x> (2012).
 35. Babcock, G. J., Decker, L. L., Freeman, R. B. & Thorley-Lawson, D. A. Epstein-barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J Exp Med* **190**, 567-576, <https://doi.org/10.1084/jem.190.4.567> (1999).
 36. Nonoyama, M., Huang, C. H., Pagano, J. S., Klein, G. & Singh, S. DNA of Epstein-Barr virus detected in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 3265-3268, <https://doi.org/10.1073/pnas.70.11.3265> (1973).
 37. Grasser, F. A., Murray, P. G., Kremmer, E., Klein, K., Remberger, K., Feiden, W., Reynolds, G., Niedobitek, G., Young, L. S. & Mueller-Lantzsch, N. Monoclonal antibodies directed against the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 (EBNA1): immunohistologic detection of EBNA1 in the malignant cells of Hodgkin's disease. *Blood* **84**, 3792-3798, (1994).
 38. Gross, A. J., Hochberg, D., Rand, W. M. & Thorley-Lawson, D. A. EBV and systemic lupus erythematosus: a new perspective. *J Immunol* **174**, 6599-6607, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.6599> (2005).
 39. Serafini, B., Rosicarelli, B., Franciotta, D., Magliozzi, R., Reynolds, R., Cinque, P., Andreoni, L., Trivedi, P., Salvetti, M., Faggioni, A. & Aloisi, F. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* **204**, 2899-2912, <https://doi.org/10.1084/jem.20071030> (2007).
 40. Jarrett, R. F., Stark, G. L., White, J., Angus, B., Alexander, F. E., Krajewski, A. S., Freeland, J., Taylor, G. M., Taylor, P. R., Scotland & Newcastle Epidemiology of Hodgkin Disease Study, G. Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study. *Blood* **106**, 2444-2451, <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3759> (2005).
 41. Diepstra, A., van Imhoff, G. W., Schaapveld, M., Karim-Kos, H., van den Berg, A., Vellenga, E. & Poppema, S. Latent Epstein-Barr virus infection of tumor cells in classical Hodgkin's lymphoma predicts adverse outcome in older adult patients. *J Clin Oncol* **27**, 3815-3821, <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.5138> (2009).
 42. Stark, G. L., Wood, K. M., Jack, F., Angus, B., Proctor, S. J., Taylor, P. R. & Northern Region Lymphoma, G. Hodgkin's disease in the elderly: a population-based study. *Br J Haematol* **119**, 432-440, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03815.x> (2002).
 43. Enblad, G., Sandvej, K., Lennette, E., Sundstrom, C., Klein, G., Glimelius, B. & Pallesen, G. Lack of correlation between EBV serology and presence of EBV in the Hodgkin and Reed-Sternberg cells of patients with Hodgkin's disease. *Int J Cancer* **72**, 394-397, [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19970729\)72:3<394::aid-ijc3>3.0.co;2-k](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19970729)72:3<394::aid-ijc3>3.0.co;2-k) (1997).
 44. Engel, M., Essop, M. F., Close, P., Hartley, P., Pallesen, G. & Sinclair-Smith, C. Improved prognosis of Epstein-Barr virus associated childhood Hodgkin's lymphoma: study of 47 South African cases. *J Clin Pathol* **53**, 182-186, <https://doi.org/10.1136/jcp.53.3.182> (2000).
 45. Keegan, T. H., Glaser, S. L., Clarke, C. A., Gulley, M. L., Craig, F. E., Diguseppe, J. A., Dorfman, R. F., Mann, R. B. & Ambinder, R. F. Epstein-Barr virus as a marker of survival after Hodgkin's lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol* **23**, 7604-7613, <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.6310> (2005).

46. Barros, M. H., Hassan, R. & Niedobitek, G. Tumor-associated macrophages in pediatric classical Hodgkin lymphoma: association with Epstein-Barr virus, lymphocyte subsets, and prognostic impact. *Clin Cancer Res* **18**, 3762-3771, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0129> (2012).
47. Tan, K. L., Scott, D. W., Hong, F., Kahl, B. S., Fisher, R. I., Bartlett, N. L., Advani, R. H., Buckstein, R., Rimsza, L. M., Connors, J. M., Steidl, C., Gordon, L. I., Horning, S. J. & Gascoyne, R. D. Tumor-associated macrophages predict inferior outcomes in classic Hodgkin lymphoma: a correlative study from the E2496 Intergroup trial. *Blood* **120**, 3280-3287, <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-421057> (2012).
48. Azambuja, D., Natkunam, Y., Biasoli, I., Lossos, I. S., Anderson, M. W., Morais, J. C. & Spector, N. Lack of association of tumor-associated macrophages with clinical outcome in patients with classical Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* **23**, 736-742, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr157> (2012).
49. Tudor, C. S., Bruns, H., Daniel, C., Distel, L. V., Hartmann, A., Gerbitz, A. & Buettner, M. J. Macrophages and dendritic cells as actors in the immune reaction of classical Hodgkin lymphoma. *PLoS One* **9**, e114345, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114345> (2014).
50. Prehn, R. T. The immune reaction as a stimulator of tumor growth. *Science* **176**, 170-171, <https://doi.org/10.1126/science.176.4031.170> (1972).
51. Prehn, R. T. The initial immune reaction to a new tumor antigen is always stimulatory and probably necessary for the tumor's growth. *Clin Dev Immunol* **2010**, <https://doi.org/10.1155/2010/851728> (2010).
52. Pearce, O. M., Laubli, H., Verhagen, A., Secret, P., Zhang, J., Varki, N. M., Crocker, P. R., Bui, J. D. & Varki, A. Inverse hormesis of cancer growth mediated by narrow ranges of tumor-directed antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 5998-6003, <https://doi.org/10.1073/pnas.1209067111> (2014).
53. Herbst, H., Dallenbach, F., Hummel, M., Niedobitek, G., Pileri, S., Muller-Lantzsch, N. & Stein, H. Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4766-4770, <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4766> (1991).
54. Murray, P. G., Young, L. S., Rowe, M. & Crocker, J. Immunohistochemical demonstration of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein in paraffin sections of Hodgkin's disease. *J Pathol* **166**, 1-5, <https://doi.org/10.1002/path.1711660102> (1992).
55. Deacon, E. M., Pallesen, G., Niedobitek, G., Crocker, J., Brooks, L., Rickinson, A. B. & Young, L. S. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J Exp Med* **177**, 339-349, <https://doi.org/10.1084/jem.177.2.339> (1993).
56. Pallesen, G., Hamilton-Dutoit, S. J., Rowe, M. & Young, L. S. Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. *Lancet* **337**, 320-322, [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)90943-j](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)90943-j) (1991).
57. Barros, M. H., Vera-Lozada, G., Soares, F. A., Niedobitek, G. & Hassan, R. Tumor microenvironment composition in pediatric classical Hodgkin lymphoma is modulated by age and Epstein-Barr virus infection. *Int J Cancer* **131**, 1142-1152, <https://doi.org/10.1002/ijc.27314> (2012).
58. Brown, J. M., Recht, L. & Strober, S. The Promise of Targeting Macrophages in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* **23**, 3241-3250, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3122> (2017).
59. Zhou, J., Tang, Z., Gao, S., Li, C., Feng, Y. & Zhou, X. Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. *Front Oncol* **10**, 188, <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00188> (2020).
60. Panico, L., Ronconi, F., Lepore, M., Tenneriello, V., Cantore, N., Dell'Angelo, A. C., Ferbo, U. & Ferrara, F. Prognostic role of tumor-associated macrophages and angiogenesis in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* **54**, 2418-2425, <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.778405> (2013).

61. Barros, M. H., Segges, P., Vera-Lozada, G., Hassan, R. & Niedobitek, G. Macrophage polarization reflects T cell composition of tumor microenvironment in pediatric classical Hodgkin lymphoma and has impact on survival. *PLoS One* **10**, e0124531, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124531> (2015).
62. Coussens, L. M., Zitvogel, L. & Palucka, A. K. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science* **339**, 286–291, <https://doi.org/10.1126/science.1232227> (2013).
63. Poh, A. R. & Ernst, M. Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside. *Front Oncol* **8**, 49, <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00049> (2018).
64. Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J. L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., Sica, A., Suttles, J., Udalova, I., van Ginderachter, J. A., Vogel, S. N. & Wynn, T. A. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14-20, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008> (2014).

3 Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

3.1 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Laura Werner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Tumor-assoziierte Makrophagen beim Hodgkin-Lymphom“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

3.2 Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation:

Autoren: Laura Werner, Johannes H. Dreyer, David Hartmann, Mário Henrique M. Barros, Maïke Büttner-Herold, Ulrike Grittner, Gerald Niedobitek

Titel: Tumor-associated macrophages in classical Hodgkin lymphoma: hormetic relationship to outcome

Fachzeitschrift: Scientific Reports

Erscheinungsdatum: 10. Juni 2020

Beitrag im Einzelnen:

Für die Erhebung der Daten wurden von mir alle histologischen Schnitte im Labor immunhistologisch angefärbt, anschließend unter dem Mikroskop begutachtet und entsprechend der in der Publikation genannten Kriterien fotografiert. Darauf folgte eine Auszählung der Zellen in den Bildern manuell durch mich.

Nach selbstständiger Einlesung des kompletten Datensatzes in SPSS und entsprechender Einarbeitung durch Frau Dr. Grittner habe ich die statistischen Methoden für die Datenauswertung zum Großteil selbstständig ausgeführt. Die graphische Aufbereitung der Tabellen und Abbildungen wurde ebenfalls von mir durchgeführt.

Die erste Fassung des Manuskripts wurde von mir selbst erstellt. Korrekturvorschläge der Koautoren wurden von mir konsekutiv eingearbeitet.

Das Manuskript wurde von mir beim oben genannten Journal eingereicht. Kommentare seitens der Reviewer wurden von mir bewertet und notwendige Änderungen in Rücksprache mit den Koautoren bis zur finalen Version umgesetzt.

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

4 Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"MULTIDISCIPLINARY SCIENCES"** Selected Category
 Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 69 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE	745,692	43.070	1.285010
2	SCIENCE	680,994	41.037	1.070190
3	National Science Review	1,842	13.222	0.006500
4	Science Advances	21,901	12.804	0.110010
5	Nature Communications	243,793	11.878	1.103290
6	Nature Human Behaviour	1,230	10.575	0.006550
7	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA	661,118	9.580	1.022190
8	Science Bulletin	3,569	6.277	0.009840
9	Scientific Data	3,240	5.929	0.015610
10	Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	1,994	5.122	0.006540
11	Journal of Advanced Research	2,691	5.045	0.004780
12	Research Synthesis Methods	1,932	5.043	0.005420
13	GigaScience	2,674	4.688	0.012510
14	Annals of the New York Academy of Sciences	46,385	4.295	0.025840
15	Scientific Reports	302,086	4.011	1.061540
16	Journal of the Royal Society Interface	12,933	3.224	0.029190
17	NPJ Microgravity	203	3.111	0.000670
18	PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY A-MATHEMATICAL PHYSICAL AND ENGINEERING SCIENCES	19,227	3.093	0.028200

5 Druckexemplar der Publikation

Werner, L., Dreyer, J. H., Hartmann, D., Barros, M. H. M., Büttner-Herold, M., Grittner, U. & Niedobitek, G. Tumor-associated macrophages in classical Hodgkin lymphoma: hormetic relationship to outcome. *Scientific Reports* **10**, 9410, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66010-z> (2020).

6 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7 Publikationsliste

Werner, L., Dreyer, J. H., Hartmann, D., Barros, M. H. M., Büttner-Herold, M., Grittner, U. & Niedobitek, G. Tumor-associated macrophages in classical Hodgkin lymphoma: hormetic relationship to outcome. *Scientific Reports* **10**, 9410, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66010-z> (2020).

8 Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes sowie ständige Gesprächsangebote während der Erstellung meiner Dissertation möchte ich Herrn Prof. Dr. Niedobitek danken. Frau Dr. Grittner danke ich für die statistische Unterstützung und Ermutigung. Für die stete Diskussionsbereitschaft möchte ich Herrn Dr. Dreyer und Herrn Dr. Barros danken. Ebenso gilt mein besonderer Dank meinem Co-Autoren für ihre kritischen Kommentare und ihren Beitrag. PD Dr. Helge Kampen danke ich für das Korrekturlesen des Manuskripts. David Hartmann danke ich für die Zeit, das Engagement und das Interesse für den informatischen Anteil der Arbeit. Frau Al-Sheikhyaqoop danke ich für die Bereitstellung ihres Mikroskops. Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe des Unfallkrankenhauses Berlin für ihre Unterstützung bei den praktischen Arbeiten: Frau Höls, Frau Wolf, Frau Ritter, Frau Nätke, Herrn Sulik und Frau Szajko.

Mein spezieller und innigster Dank geht an meine Familie, ohne die die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Zudem möchte ich mich bei allen Freunden und Kollegen bedanken, die mich ständig unterstützt haben. Vielen herzlichen Dank!