

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

Auswirkungen der PD-1/PD-L1-Interaktion auf die Proliferation von HRS-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Niels Merlin Köthemann
aus Geseke

promoviert am 26. Juni 2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Privatdozent Dr. nat. med. Dr. med. S. Borchmann
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. A. Hillmer

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herr Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Andreas Engert

Herr PD Dr. nat. med. Dr. med. Sven Borchmann

Frau Dr. med. Anne-Catherine Neumann

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit untersuchten klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-540, L-1236 und KM-H2 sind durch die Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. nat. med. Dr. med. Sven Borchmann zur Verfügung gestellt worden.

Die in dieser Arbeit verwendeten PBMCs sind von mir aus Buffy-Coat-Produkten gesunder Donoren isoliert worden, die durch die Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Köln zur Verfügung gestellt wurden.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn PD Dr. nat. med. Dr. med. Sven Borchmann ausgeführt worden.

Die in dieser Arbeit angegebenen, mittels Durchflusszytometrie durchgeführten Experimente sind von mir mit Unterstützung von Frau Dr. med. Anne-Catherine Neumann ausgeführt worden.

Die in dieser Arbeit angegebenen, mittels Lumineszenzmessung durchgeführten Experimente sind von mir selbst ausgeführt worden.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten sind gemeinsam von Herrn PD Dr. nat. med. Dr. med. Sven Borchmann und mir ausgewertet worden.

Die in dieser Arbeit abgebildeten Diagramme und Grafiken sind von mir selbst erstellt worden.

Die vorliegende Dissertationsschrift ist von mir selbst unter Beratung und Unterstützung von Herrn PD Dr. nat. med. Dr. med. Sven Borchmann erstellt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 26.06.2026

Unterschrift:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich auf meinem bisherigen Weg sowie beim Studium der Medizin und bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Betreuer und Leiter der Arbeitsgruppe Herrn PD Dr. nat. med. Dr. med. Sven Borchmann. Seine stets freundliche und unterstützende Haltung sowie seine professionelle Beratung und Betreuung waren für meine Forschungstätigkeit im Labor sowie für die Datenauswertung und letztendlich Anfertigung dieser Arbeit essenziell.

Ein zusätzlich besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Andreas Engert für die fachliche Führung während meiner Promotionszeit und die Weiterleitung an die Arbeitsgruppe.

Darüber hinaus möchte ich Frau Dr. med. Anne-Catherine Neumann sowie allen weiteren Kolleginnen und Kollegen aus der Arbeitsgruppe und dem Labor für ihre Unterstützung danken.

Zu guter Letzt gebührt mein tiefster Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich in all den Jahren stets in jeglichen Situationen unterstützt haben, mir Beistand geleistet haben, mich ermutigt haben und mir die Kraft geschenkt haben, meine Ziele zu erreichen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. ZUSAMMENFASSUNG	12
2. EINLEITUNG	14
2.1. Das Hodgkin-Lymphom	14
2.1.1. Definition, Epidemiologie und Klinik	14
2.1.2. Histologie des klassischen Hodgkin-Lymphoms	15
2.1.3. Stadieneinteilung, Therapie und Prognose	16
2.2. Die HRS-Zellen und ihre Mikroumgebung	20
2.2.1. Die HRS-Zellen	20
2.2.2. Die Mikroumgebung der HRS-Zellen	22
2.2.3. Mechanismen zur Umgehung einer Antitumor-Immunantwort	23
2.3. Die Rolle von PD-1 und den Liganden PD-L1 und PD-L2	24
2.4. Die Rolle von NK-Zellen als alternative Effektorzellen	27
2.5. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	28
3. MATERIAL UND METHODEN	30
3.1. Material	30
3.1.1. Chemikalien	30
3.1.2. Humane Zytokine, Antikörper und Antikörper-Derivate	30
3.1.3. Medikamente	30
3.1.4. Equipment	31
3.1.5. Zubehör	31
3.1.6. Software	32
3.1.7. Zelllinien	32
3.1.8. Medien und Puffer	33
3.2. Methoden	34
3.2.1. Inkubation der Zellen	34
3.2.2. Subkultivierung, Kryokonservierung und Auftauen der Zellen	34
3.2.3. Zellzählung	35
3.2.4. Detektion von PD-L1 auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie	35
3.2.5. Isolierung der PBMCs	36

3.2.6.	Messung der Proliferation mittels Lumineszenzmessung	37
3.2.7.	Statistische Auswertung	38
4.	ERGEBNISSE	40
4.1.	Basale PD-L1-Expression der HRS-Zellen und PD-L1-Expression nach Stimulation mit IFN- γ	40
4.2.	Einfluss von PBMCs und Einfluss von löslichem PD-1 auf die Proliferation der HRS-Zellen	45
4.3.	Einfluss von löslichem PD-1 in Kombination mit Nivolumab auf die Proliferation der HRS-Zellen	48
4.4.	Überblick über die Ergebnisse der Zelllinie L-428	49
5.	DISKUSSION	52
5.1.	Die klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-540, L-1236 und KM-H2 tragen den Liganden PD-L1 auf ihrer Oberfläche	52
5.2.	IFN- γ scheint die PD-L1-Expression in HRS-Zellen stimulieren zu können	53
5.3.	Der Kontakt zu PBMCs stimuliert die Proliferation der HRS-Zellen	54
5.4.	Der Effekt der PBMCs auf die Proliferation der HRS-Zellen kann auf die PD-1/PD-L1-Interaktion zurückzuführen sein	55
5.5.	Die Blockade der PD-1/PD-L1-Interaktion durch Nivolumab kann den Effekt der PD-1/PD-L1-Interaktion auf die Proliferation der HRS-Zellen aufheben	57
5.6.	Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien	59
5.7.	Limitationen	59
5.8.	Fazit und Ausblick	61
6.	LITERATURVERZEICHNIS	64
7.	ANHANG	71
7.1.	Abbildungsverzeichnis	71
7.2.	Tabellenverzeichnis	71

Abkürzungsverzeichnis

%.....	Prozent
°C.....	Grad Celsius
µg.....	Mikrogramm
µl.....	Mikroliter
µm.....	Mikrometer
A.....	Fläche
ABVD	Adriamycin® = Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin
Akt.....	Proteinkinasen B
AP-1	Aktivator-Protein-1
ASCT	Autologe Stammzelltransplantation
ATP	Adenosintriphosphat, Adenosintriphosphat
AWMF ..	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
B2M.....	β2-Mikroglobulin
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BCR	B-Zell-Rezeptor
BEACOPP.....	Bleomycin, Etoposid, Adriamycin® = Doxorubicin, Cyclophosphamid, Oncovin® = Vincristin, Procarbazine, Prednison
BrECADD.....	Brentuximab-Vedotin, Etoposid, Cyclophosphamid, Adriamycin® = Doxorubicin, Dacarbazin, Dexamethason
BSA.....	Bovines Serumalbumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
ca.....	Circa
cHL.....	Klassisches Hodgkin-Lymphom
CT	Computertomographie
CTLA-4.....	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DC.....	Dendritische Zellen
DKG	Deutsche Krebsgesellschaft e.V.
DMEM/F-12.....	Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Ham's F-12

DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
EBV	<i>Epstein-Barr-Virus</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
ERK.....	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS	<i>Fetales Rinderserum</i>
FSC.....	<i>Forward scatter</i>
Gal1	<i>Galectin-1</i>
GHSG	<i>German Hodgkin Study Group</i>
Gy	<i>Gray</i>
h.....	<i>Stunde</i>
HDCT	<i>Hochdosischemotherapie</i>
HLA	<i>Humanes Leukozytenantigen-System</i>
HRS-Zellen.....	<i>Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen</i>
IARC	<i>Internationale Agentur für Krebsforschung</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IF-RT.....	<i>Involved-field-Radiotherapie</i>
IgG1	<i>Immunglobulin G1</i>
IL.....	<i>Interleukin</i>
IRF-1	<i>Interferon regulatory factor 1</i>
IS-RT.....	<i>Involved-site-Radiotherapie</i>
ITIM.....	<i>Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Inhibitions-Motiv</i>
ITSM	<i>Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Schalter-Motiv</i>
JAK	<i>Just another kinase</i>
LDCHL	<i>Lymphozytenarmes klassisches Hodgkin-Lymphom</i>
LMP1.....	<i>Latent membrane protein 1</i>
LRCHL	<i>Lymphozytenreiches klassisches Hodgkin-Lymphom</i>
Luc	<i>Firefly-Luciferase</i>

MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCCHL	<i>Mischtyp des klassischen Hodgkin-Lymphoms</i>
MHC	<i>Haupthistokompatibilitätskomplex</i>
ml	<i>Milliliter</i>
mm/h	<i>Millimeter pro Stunde</i>
n	<i>Anzahl der Versuchsdurchläufe</i>
N-AVD	<i>Nivolumab – Adriamycin® = Doxorubicin, Vinblastin, Dacarbazin</i>
NFKBIA	<i>NF-κB inhibitor alpha</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
ng	<i>Nanogramm</i>
NK-Zellen	<i>Natürliche Killer-Zellen</i>
NLPHL	<i>Noduläres lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom</i>
NSCHL	<i>Nodulär sklerosierender Typ des klassischen Hodgkin-Lymphoms</i>
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death protein 1 ligand 1</i>
PD-L2	<i>Programmed cell death 1 ligand 2</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PET	<i>Positronenemissionstomographie</i>
PI3K	<i>Phosphoinositid-3-Kinasen</i>
PTPN1	<i>Protein-tyrosine phosphatase non-receptor-type 1</i>
PVAG	<i>Prednison, Vinblastin, Adriamycin® = Doxorubicin, Gemcitabine</i>
RANK	<i>Receptor activator of NF-κB</i>
rcf	<i>Relative Zentrifugationskraft</i>
RPMI-1640-Medium	<i>Roswell-Park-Memorial-Institute-1640-Medium</i>
SHP-1	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1</i>
SHP-2	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase 2</i>
SOCS1	<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i>

SSC.....	<i>Side scatter</i>
STAT	<i>Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription</i>
TARC	<i>Thymusaktivitätsreguliertes Chemokin</i>
TCR.....	<i>T-Zell-Rezeptor</i>
TGF-β.....	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th2-Zellen	<i>Typ-2-Helfer-T-Zellen</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
TNFAIP3	<i>TNF alpha induced protein 3</i>
Tr1.....	<i>Typ-1-regulatorische T-Zellen</i>
Treg.....	<i>Regulatorische T-Zellen</i>
WHO	<i>Weltgesundheitsorganisation</i>
β.....	<i>Beta</i>
γ.....	<i>Gamma</i>
κ.....	<i>Kappa</i>

1. Zusammenfassung

Das klassische Hodgkin-Lymphom ist eine maligne Erkrankung des lymphatischen Systems, die durch die charakteristischen Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) definiert ist. Trotz der Seltenheit und des allgemein guten Therapieerfolges dieser Erkrankung bedingt die Häufigkeitsverteilung mit einer Spitze im jungen Erwachsenenalter zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr eine hohe Anzahl Krankheitsbetroffener und Krankheitsüberlebender. Aufgrund dessen ist eine effektive und zielgerichtete Behandlung, die mit möglichst geringen therapiebedingten (Langzeit-) Nebenwirkungen einhergeht von großer Bedeutung.

Einen pharmakologischen Angriffspunkt für eine solche zielgerichtete Therapie bietet die PD-1/PD-L1-Interaktion. Diese ist durch Überexpression des Liganden PD-L1 in den HRS-Zellen hochreguliert und dient nach herkömmlichem Verständnis durch Bindung an die PD-1-Rezeptoren von CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen hauptsächlich der Unterdrückung einer gegen die Tumorzellen gerichteten Immunreaktion. Zielgerichtete Wirkstoffe, die diesen Interaktionsweg als Angriffspunkt haben – wie der Anti-PD-1-Antikörper Nivolumab –, sind bereits klinisch erfolgreich etabliert. Der Therapieerfolg wird dadurch erklärt, dass durch die Blockade der PD-1/PD-L1-Interaktion die Umgehung der Antitumor-Immunreaktion verhindert wird und so wieder eine erfolgreiche Immunreaktion gegen die Tumorzellen stattfinden kann. Für eine solche spezifische Immunreaktion durch CD8⁺-zytotoxische T-Zellen sind MHC-I-Komplexe zur Antigenpräsentation auf der Tumorzelle notwendig. In vielen Fällen des klassischen Hodgkin-Lymphoms sind diese jedoch deutlich vermindert oder fehlen gänzlich. Da trotzdem ein Therapieerfolg durch den Einsatz von Anti-PD-1-Antikörpern wie Nivolumab festgestellt werden kann, müssen weitere Auswirkungen der PD-1/PD-L1-Interaktion – neben der Unterdrückung einer Antitumor-Immunantwort – vermutet werden, die dann durch die PD-1/PD-L1-Blockade unterbunden werden und so den klinischen Erfolg dieser Substanzen erklären.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das pro-inflammatorische und physiologischerweise antitumoral-wirkende Zytokin IFN- γ , welches im Tumormilieu ubiquitär vorhanden ist, die Expression des Liganden PD-L1 auf der Zelloberfläche der HRS-Zellen scheinbar stimulieren kann. Dies untermauert die Anpassungsmechanismen der Tumorzellen im umgebenden Gewebe und hebt zudem die Bedeutung dieses Liganden für die HRS-Zellen hervor.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die PD-1/PD-L1-Interaktion möglicherweise mit einer bidirektionalen Signaltransduktion einhergeht – es kommt scheinbar

nicht nur zu den bekannten Auswirkungen in der PD-1-Rezeptor-tragenden T-Zelle mit Herunterregulierung ihrer Aktivität, sondern ebenfalls zu Auswirkungen in der PD-L1-tragenden Tumorzelle mit Stimulation der Zellproliferation und verstärktem Zellüberleben. Es konnte gezeigt werden, dass die agonistische Bindung an den Liganden PD-L1 der HRS-Zellen die Proliferation steigert. Ähnliches ist auch im Jahr 2019 in einer Arbeit von Jalali et al. für HRS-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms beschrieben worden. Durch die Unterbindung dieser PD-L1-basierten Auswirkungen in den HRS-Zellen selbst könnte der klinische Therapieerfolg von Wirkstoffen wie Nivolumab auch für die klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien erklärt werden, denen MHC-I-Komplexe für eine spezifische Antitumor-Immunreaktion durch CD8⁺-zytotoxische T-Zellen fehlen. Damit könnte sich zukünftig das Verständnis der gegen die PD-1/PD-L1-Interaktion gerichteten Wirkstoffe dahingehend ändern, dass die Unterbindung der durch den Liganden PD-L1 retrograd in den HRS-Zellen ausgelösten Auswirkungen einen alternativen oder ergänzenden Wirkmechanismus zur Unterbindung der Unterdrückung einer Antitumor-Immunreaktion darstellt.

2. Einleitung

2.1. Das Hodgkin-Lymphom

2.1.1. Definition, Epidemiologie und Klinik

Das Hodgkin-Lymphom ist eine maligne Erkrankung des lymphatischen Systems. Die Erstbeschreibung als eigenständige Krankheit erfolgte bereits im Jahr 1832 durch den englischen Arzt und späteren Namensgeber der Erkrankung Sir Thomas Hodgkin. Dieser beschrieb in seiner Abhandlung „On the Morbid Appearances of the Adsorbent Glands and Spleen“¹ den Obduktionsbefund verschiedener am Hodgkin-Lymphom erkrankter Patienten.¹ Charakteristische histologische Veränderungen der Erkrankung sind die Hodgkin-Lymphom-definierenden einkernigen Hodgkin- und zwei- bis mehrkernigen Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen), die 1898 durch Carl Sternberg und 1902 durch Dorothy Reed erstmalig beschrieben wurden.^{2,3}

Heutzutage werden nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zwei Hauptformen des Hodgkin-Lymphoms unterschieden, von denen das klassische Hodgkin-Lymphom (cHL) mit ca. 95 % der Fälle in seiner Häufigkeit deutlich überwiegt. Das seltenere noduläre lymphozytenprädominante Hodgkin-Lymphom (NLPHL) macht nur ca. 5 % der Hodgkin-Lymphom-Erkrankungen aus.^{4,5}

Insgesamt ist das Hodgkin-Lymphom eine seltene Erkrankung. Die Inzidenz liegt weltweit und altersunabhängig bei 2-3 Erkrankungsfällen pro 100.000 Personen pro Jahr.⁶ Für das Jahr 2020 schätzt die internationale Agentur für Krebsforschung (IARC) weltweit 83.100 Neuerkrankungen (Männer: 49.000, Frauen: 34.100) mit einer altersstandardisierten Rate von 1,0 / 100.000 (Männer: 1,2 / 100.000, Frauen: 0,8 / 100.000).⁷ Betrachtet man das Erkrankungsalter, so lässt sich in industrialisierten Ländern eine bimodale Häufigkeitsverteilung feststellen. Ein erster Gipfel der Erkrankungshäufigkeit liegt zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr. Ein weiterer Häufigkeitsanstieg ist um das 65. Lebensjahr auszumachen.⁸ Aufgrund dieser für Krebserkrankungen allgemein untypischen Häufigkeitsverteilung ist das Hodgkin-Lymphom trotz der Tatsache, dass es sich insgesamt um eine seltene Erkrankung handelt, bei jungen Erwachsenen eine der häufigsten Krebserkrankungen.⁹

Ein ätiologisch bedeutender Faktor scheint eine durchgemachte Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) zu sein.¹⁰ Mit dem γ-Herpesvirus sind weltweit über 90 % der Menschen infiziert, die Primärinfektion erfolgt dabei meist bereits im Kindesalter und verläuft asymptomatisch. Im jungen Erwachsenenalter kann EBV zu dem Krankheitsbild einer

infektiösen Mononukleose führen, bei der es neben klinischen Symptomen wie Fieber sowie Schwellung von Lymphknoten und Gaumenmandeln zu einer namensgebenden Leukozytose mit mononukleären Zellen im Blut kommen kann.¹¹ Das Virus infiziert mit hoher Affinität B-Lymphozyten und schleust seine DNA in den Zellkern ein, wo diese auch im Anschluss an die klinisch manifestierte Erkrankung latent verbleibt.¹² Patienten mit durchgemachter infektiöser Mononukleose haben ein signifikant erhöhtes Risiko, an einem klassischen Hodgkin-Lymphom zu erkranken.¹³

Klinisch äußert sich das Hodgkin-Lymphom meist in einer schmerzlosen Lymphknotenschwellung. Betroffen sind in ca. 70 % der Fälle zervikale Lymphknoten, seltener sind axilläre, inguinale, mediastinale oder abdominelle Lymphknoten primär befallen.^{4,5} Zusätzlich treten bei einigen Patienten unspezifische Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Leistungsabfall und eine B-Symptomatik auf. Der Begriff B-Symptomatik bezieht sich auf den Zusatz „B“ in der Ann-Arbor-Klassifikation (Tabelle 1) maligner Lymphome und umfasst Fieber über 38 °C, Nachtschweiß sowie ungewollten Gewichtsverlust von über 10 % des Körpergewichts innerhalb von 6 Monaten.^{4,5} Ein nahezu pathognomonisches, aber seltenes Phänomen ist der sogenannte Alkoholschmerz, bei dem es nach Alkoholgenuss zu Schmerzen in den betroffenen vergrößerten Lymphknoten kommt.¹⁴ Ein weiteres charakteristisches, aber seltenes, das Fieber betreffende Phänomen ist das sogenannte Pel-Ebstein-Fieber. Es beschreibt ein undulierendes Fieber mit 3-10 Tage langen fieberfreien Intervallen.^{15,16}

2.1.2. Histologie des klassischen Hodgkin-Lymphoms

Die Diagnosestellung umfasst obligat eine Biopsie beziehungsweise Exstirpation eines betroffenen Lymphknotens mit histopathologischer Untersuchung. Unter dem Lichtmikroskop können im gefärbten Lymphknotenpräparat die erkrankungsdefinierenden Merkmale des klassischen Hodgkin-Lymphoms, die HRS-Zellen, identifiziert und damit die Diagnose gesichert werden. Die malignen HRS-Zellen machen jedoch nur ca. 1 % des Tumordinfiltrats aus, der Großteil setzt sich aus nicht-malignen Zellen wie T- und B-Lymphozyten, Histiocyten, eosinophilen Granulozyten, Mastzellen und Fibroblasten sowie extrazellulärer Matrix zusammen. Typischerweise werden die HRS-Zellen rosettenartig von T-Lymphozyten umgeben. Anhand der Zusammensetzung der Zellen des Tumordinfiltrats unterscheidet die WHO verschiedene histologische Subtypen des klassischen Hodgkin-Lymphoms:

- nodulär-sklerosierender Typ (NSCHL; ca. 65 %),
- Mischtyp (MCCHL; ca. 25 %),
- lymphozytenreiches klassisches Hodgkin-Lymphom (LRCHL; ca. 4 %) und
- lymphozytenarmes klassisches Hodgkin-Lymphom (LDCHL; ca. 1 %).^{4,5,17}

2.1.3. Stadieneinteilung, Therapie und Prognose

Nach abgeschlossener Diagnostik kann die Hodgkin-Lymphom-Erkrankung anhand der Ann-Arbor-Klassifikation (Tabelle 1) in vier Stadien eingeteilt werden.

Tabelle 1: Ann-Arbor-Klassifikation⁵

(Quelle: in Anlehnung an die S3-Leitlinie - Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Hodgkin Lymphoms bei erwachsenen Patienten; Langversion 3.2; AWMF Registernummer: 018/029 OL. 2022. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hodgkin-lymphom> (Zuletzt abgerufen am 23.02.2025).)

Stadium I	Befall einer Lymphknotenregion oder Ein einziger lokalisierter Befall außerhalb des lymphatischen Systems
Stadium II	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf der gleichen Seite des Zwerchfells oder Lokalisierter Befall außerhalb des lymphatischen Systems und von Lymphknotenregionen auf der gleichen Seite des Zwerchfells
Stadium III	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen bzw. von Organen außerhalb des lymphatischen Systems auf beiden Seiten des Zwerchfells
Stadium IV	Nicht lokalisierter, diffuser oder disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohne Befall von lymphatischen Gewebe
Zusätze	A: Es liegen keine B-Symptome vor B: Es liegen B-Symptome vor (B-Symptome sind definiert als Fieber über 38 °C, Nachtschweiß und Gewichtsverlust von über 10 % des Körpergewichts innerhalb von 6 Monaten)

Zusätzlich zur Ann-Arbor-Klassifikation erfolgt nach der German Hodgkin Study Group (GHSG) eine ergänzende Einteilung (Tabelle 2) anhand vorliegender Risikofaktoren:

- Vorliegen eines großen Mediastinaltumors, gemessen im Röntgen- oder Computertomographiebild des Brustkorbs; der Tumor gilt als groß, wenn er ein Drittel des Brustkorb-Durchmessers oder mehr misst.⁵
- Extranodalbefall – jede Ausbreitung des Tumors, die über die Lymphknoten, die Milz, den Thymus, den Waldeyer-Rachenring, den Blinddarm und die Peyer-Plaques hinausgeht.⁵
- Hohe Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) von 50 mm/h bei A-Symptomen und 30 mm/h, wenn B-Symptome vorhanden sind.⁵

- Drei oder mehr Lymphknotenareale sind betroffen. Dabei entsprechen die Lymphknotenareale nicht der Lymphknotenregion in der Ann-Arbor-Einteilung, sondern sie umfassen zum Teil mehrere Lymphknoten.⁵

Tabelle 2: Risikogruppen nach der German Hodgkin Study Group (GHSg)⁵

(Quelle: in Anlehnung an die S3-Leitlinie - Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Hodgkin Lymphoms bei erwachsenen Patienten; Langversion 3.2; AWMF Registernummer: 018/029 OL. 2022. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hodgkin-lymphom> (Zuletzt abgerufen am 23.02.2025).)

Frühe Stadien	Stadium IA oder B und IIA oder B nach Ann-Arbor ohne Risikofaktoren
Mittlere Stadien	Stadium IA oder B und Stadium IIA mit einem oder mehreren Risikofaktoren oder Stadium IIB, wenn die Risikofaktoren hohe BSG und/oder ≥ 3 Lymphknotenareale vorliegen
Fortgeschrittene Stadien	Stadium IIB, wenn die Risikofaktoren Extranodalbefall und/oder großer Mediastinaltumor vorliegen oder Stadium IIIA oder B oder Stadium IVA oder B

Die Behandlung von Patienten mit einem Hodgkin-Lymphom richtet sich maßgeblich nach der Stadieneinteilung anhand der Risikofaktoren nach GHSg. Bei Abwesenheit von Ausschlusskriterien wird die Behandlung im Rahmen einer klinischen Studie empfohlen.⁵

Die Therapie für erwachsene Patienten in frühen Stadien umfasst anhand der aktuellen S3-Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und der Deutschen Krebshilfe aus dem Jahr 2022 zwei Zyklen ABVD (Adriamycin® = Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin) mit anschließender 20 Gy Involved-site-Radiotherapie (IS-RT).⁵

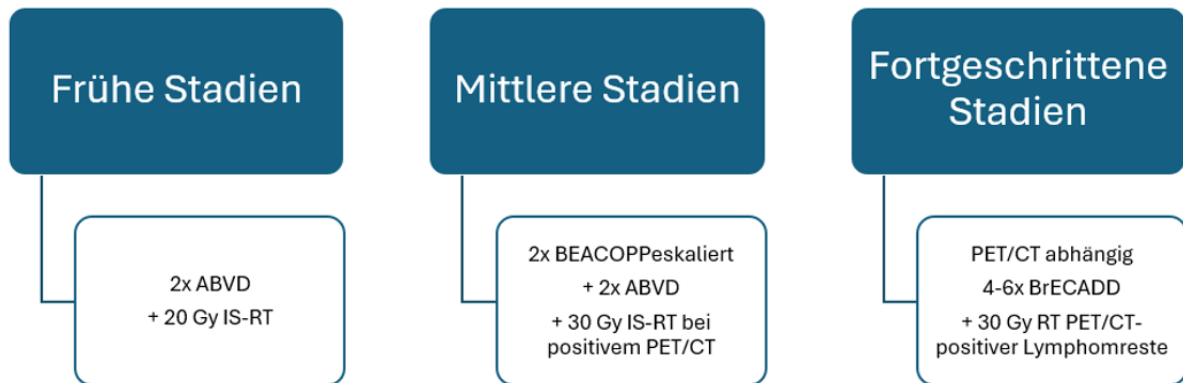
Für Patienten mit einer Hodgkin-Lymphom-Erkrankung in mittleren Stadien ist eine Chemotherapie mit 2x BEACOPPeskaliert (Bleomycin, Etoposid, Adriamycin® = Doxorubicin, Cyclophosphamid, Oncovin® = Vincristin, Procarbazin, Prednison) + 2x ABVD beziehungsweise bei einem Lebensalter von >60 Jahren mit 4x A(B)VD empfohlen. Nach der aktuellen S3-Leitlinie soll im Anschluss an die Polychemotherapie bei allen Patienten in diesen

Stadien eine IS-RT mit 30 Gy erfolgen.⁵ Die HD-17-Studie der GHSG aus dem Jahr 2021 konnte jedoch zeigen, dass bei Patienten unter 60 Jahren in mittleren Erkrankungsstadien mit einer negativen Positronenemissionstomographie/ Computertomographie (PET/CT) nach den Chemotherapie-Zyklen ein Unterlassen der Radiotherapie zu keinem relevanten klinischen Nachteil führt. Somit ändern sich für diese Patientengruppe die Therapieempfehlungen dahingehend und die Nebenwirkungen der Radiotherapie bleiben aus.¹⁸

Die Behandlung in fortgeschrittenen Stadien für Patienten bis einschließlich 60 Jahren ist ebenfalls abhängig von den Ergebnissen Therapie-begleitend durchzuführender PET/CTs. Nach der aktuellen S3-Leitlinie sollen Patienten mit einem Hodgkin-Lymphom in fortgeschrittenen Stadien 2x BEACOPPeskaliert und anschließend mit negativer PET/CT zwei weitere und mit positiver PET/CT vier weitere Zyklen BEACOPPeskaliert erhalten.⁵ Die HD-21-Studie der GHSG konnte im Jahr 2024 zeigen, dass ein neues Therapieregime – BrECADD (Brentuximab-Vedotin, Etoposid, Cyclophosphamid, Adriamycin® = Doxorubicin, Dacarbazin, Dexamethason) – für diese Patientengruppe nicht nur klinisch effektiver wirkt, sondern zusätzlich auch mit einem geringeren Nebenwirkungspotenzial einhergeht. Die pharmakologische Kombination Brentuximab-Vedotin stellt ein Immunkonjugat – eine Verknüpfung eines gegen CD30 gerichteten Antikörpers (Brentuximab) mit einem Zytostatikum (Vedotin) – dar, was eine zielgerichtete Wirkung der Chemotherapie ermöglicht. Eingesetzt wird BrECADD ebenfalls PET/CT-abhängig mit 4-6 Therapiezyklen. Somit ändern sich auch für diese Patientengruppe die Therapieempfehlungen dahingehend.¹⁹ Eine weitere Studie aus dem Jahr 2024 hat zudem eine Erstlinientherapie mit N-AVD (Nivolumab – Adriamycin® = Doxorubicin, Vinblastin, Dacarbazin) für Patienten mit einem Hodgkin-Lymphom in fortgeschrittenen Stadien untersucht und konnte nicht nur die klinische Effektivität, sondern zudem auch eine geringere Toxizität als die Kombination von Brentuximab-Vedotin mit weiteren Zytostatika beweisen. Nivolumab ist ein Anti-PD-1-Antikörper, der als Immuncheckpoint-Inhibitor fungiert, wodurch nicht nur eine zielgerichtete Therapie, sondern – als Monotherapie – auch eine Zytostatika-freie Therapie ermöglicht werden könnte.²⁰ Einzug in die aktuellen Empfehlungen zur Erstlinientherapie hat ein Nivolumab-basiertes Therapieregime bisher noch nicht erhalten. Für Patienten >60 Jahre in fortgeschrittenen Stadien sind abhängig vom Allgemeinzustand 6-8 Zyklen A(B)VD oder PVAG (Prednison, Vinblastin, Adriamycin® = Doxorubicin, Gemcitabine) vorgesehen.⁵ Bei allen Patienten in fortgeschrittenen Stadien soll nach Abschluss der Chemotherapie-Zyklen eine PET/CT erfolgen, um die Indikation einer anschließenden Radiotherapie zu evaluieren. Es soll eine 30 Gy Radiotherapie von im PET/CT positiven Lymphomresten von >1,5 cm Größe erfolgen.^{5,19}

Abbildung 1 gibt einen Überblick über die aktuell empfohlene Erstlinienbehandlung des klassischen Hodgkin-Lymphoms.²¹

Empfohlene Erstlinienbehandlung des klassischen Hodgkin-Lymphoms für Patienten bis einschließlich 60 Jahren



Empfohlene Erstlinienbehandlung des klassischen Hodgkin-Lymphoms für Patienten über 60 Jahren

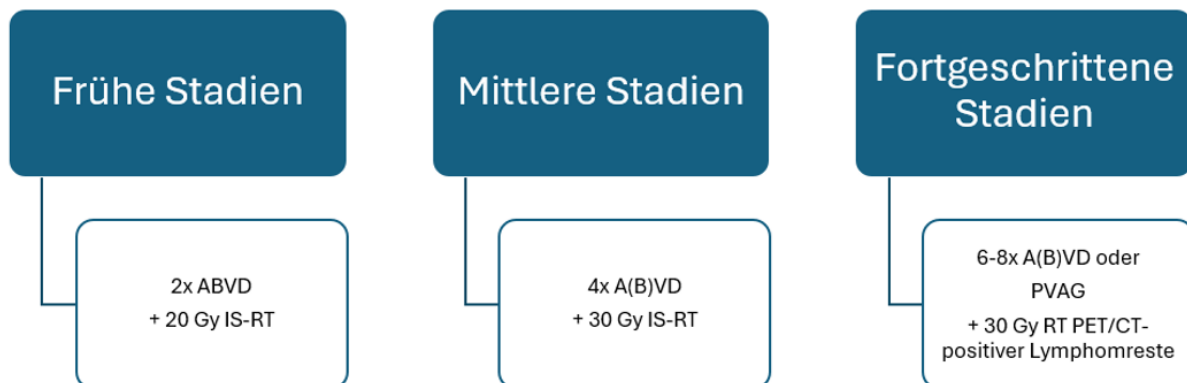


Abbildung 1: Empfohlene Erstlinienbehandlung des klassischen Hodgkin-Lymphoms²¹

Übersicht der aktuell empfohlenen Erstlinienbehandlung des klassischen Hodgkin-Lymphoms für Patienten bis einschließlich 60 Jahren (oben) sowie für Patienten über 60 Jahren (unten).

(Quelle: in Anlehnung an Abbildung 3 und Abbildung 4 von onkopedia - Hodgkin Lymphom. 2023. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/hodgkin-lymphom> (Zuletzt abgerufen am 23.02.2025).)

Eine Ausnahme der dargestellten Therapieempfehlungen stellt das NLPHL im Ann-Arbor-Stadium IA ohne Risikofaktoren dar. Bei Patienten dieser Konstellation besteht die Empfehlung für eine alleinige 30 Gy Involved-field-Radiotherapie (IF-RT) ohne vorangegangene Chemotherapie.⁵

Allgemein ist das Ansprechen des Hodgkin-Lymphoms auf die Erstlinienbehandlung mittels Stadien-adaptierter Chemo- und Strahlentherapie gut. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt für alle Stadien durchschnittlich über 80 % und allein für frühe Stadien über 90 %.²² Auch bei einem Krankheitsrezidiv oder einer primär refraktären Erkrankung kann oft ein gutes Therapieergebnis erzielt werden. Die Zweilinientherapie stellt für geeignete Patienten hauptsächlich eine Hochdosischemotherapie (HDCT) mit anschließender autologer Stammzelltransplantation (ASCT) dar. Weitere Therapieoptionen bei erneutem Krankheitsrezidiv oder weiterhin refraktärer Erkrankung stellen eine Behandlung mit dem Immunkonjugat Brentuximab-Vedotin oder mit den Anti-PD-1-Antikörpern Nivolumab oder Pembrolizumab dar.⁵

2.2. Die HRS-Zellen und ihre Mikroumgebung

2.2.1. Die HRS-Zellen

Die einkernigen Hodgkin- und mehrkernigen Reed-Sternberg-Zellen sind die charakteristischen malignen Zellen, die das klassische Hodgkin-Lymphom definieren. Bei ihnen handelt es sich um große Zellen mit einem Durchmesser von teilweise um die 50 µm. Sie besitzen reichlich Zytoplasma und einen beziehungsweise mehrere Zellkerne mit eosinophilem Kernkörperchen. Immunhistochemisch definieren sich die HRS-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms typischerweise durch das gleichzeitige Tragen der beiden Oberflächenmarker CD15 und CD30 (TNF-Rezeptor 8). Im Tumorgewebe des Hodgkin-Lymphoms sind sie jedoch rar und machen lediglich ca. 1 % des Zellinfiltrats aus. Trotz ihrer Rarität im Tumordinfiltrat handelt es sich bei ihnen um die klonalen Tumorzellen des Hodgkin-Lymphoms.²³

Histogenese der HRS-Zellen

In nahezu allen Fällen entwickeln sich die Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen aus B-Lymphozyten. Durch Analyse der somatischen Mutationen in den Immunglobulin-V-Genen der HRS-Zellen konnte festgestellt werden, dass sie vermutlich von prä-apoptotischen Keimzentrum-B-Zellen abstammen.^{24,25} Einen charakteristischen B-Zell-Phänotyp inklusive funktionsfähigem B-Zell-Rezeptor (BCR) weisen sie jedoch nicht mehr auf. Da B-Zellen mit funktionslosem BCR physiologischerweise durch Apoptose zugrunde gehen, sind für die Entstehung der HRS-Zellen anti-apoptotische und proliferationsstimulierende Modifikationen intrazellulärer Signalwege notwendig.²⁶ Auch, wenn die genaue Pathogenese der HRS-Zellen noch nicht vollständig verstanden ist, sind heutzutage einige Veränderungen bekannt, die für die Entstehung und das Überleben der HRS-Zellen essenziell sind.

Molekularpathogenese der HRS-Zellen

Eine häufige molekulare Veränderung in HRS-Zellen ist die kontinuierliche Aktivität von NF- κ B (engl.: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells).²⁷ NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, dem eine große Bedeutung in der Regulation der Immunantwort sowie in der Zellproliferation und Apoptose-Regulation zukommt. Die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges erfolgt hauptsächlich durch die Aktivierung verschiedener TNF-Rezeptoren (TNF: Tumornekrosefaktor) wie CD40 oder RANK (receptor activator of NF- κ B). Die Aktivierung führt durch eine intrazelluläre Signalkaskade zur Transkription verschiedener Zyto- und Chemokine, Rezeptoren und Proteine weiterer intrazellulärer Signalwege, die für die Proliferation der HRS-Zellen unabdinglich sind.²⁸ In den HRS-Zellen konnten bereits einige Veränderungen identifiziert werden, die die ständige Aktivierung von NF- κ B bewirken. Häufig liegen inaktivierende Mutationen in dem NF- κ B-Hauptinhibitor NFKBIA (engl.: NF- κ B inhibitor alpha) vor.²⁹ Auch inaktivierende Mutationen im TNFAIP3-Gen (TNF alpha induced protein 3), welches für den negativen NF- κ B-Regulator A20 kodiert, sind beschrieben.³⁰ Zudem kommen Amplifikationen des REL-Gens und damit eine Überexpression des c-Rel-Proteins, einem Mitglied der NF- κ B-Familie, in HRS-Zellen vor.³¹

Eine Besonderheit stellen EBV-positive HRS-Zellen dar. Diese sind unter anderem durch das Vorhandensein des Transmembranproteins LMP1 (engl.: latent membrane protein 1) gekennzeichnet, welches ähnlich wie CD40, aber unabhängig von einer Liganden-Bindung den NF- κ B-Signalweg aktivieren kann.³²

Ein weiterer typischer Anpassungsmechanismus der HRS-Zellen ist die kontinuierliche Aktivität des JAK-STAT-Signalweges.³³ Dieser intrazelluläre Signalweg umfasst verschiedene Januskinasen (JAK; engl.: just another kinase), die hauptsächlich durch Zytokin-Rezeptoren aktiviert werden und ihrerseits verschiedene STAT-Proteine aktivieren. Die aktivierten STAT-Proteine (STAT: Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription) fördern als Transkriptionsfaktoren im Zellkern die Transkription verschiedener Gene für beispielsweise Zyto- und Chemokine. Die ständige Aktivität dieses Signalweges in HRS-Zellen resultiert unter anderem aus inaktivierenden Mutationen im SOCS1-Gen (engl.: suppressor of cytokine signaling 1) oder PTPN1-Gen (engl.: protein-tyrosine phosphatase non-receptor-type 1), welche jeweils für Inhibitoren der JAK-STAT-Signaltransduktion kodieren.^{34,35} Zusätzlich besitzen HRS-Zellen häufig eine Amplifikation des Genabschnittes 9p24.1, in dem unter anderem der JAK2-Genlokus liegt. In diesem Genabschnitt liegen ebenfalls die Gene für die Immuncheckpoint-Liganden PD-L1 und PD-L2.³⁶

2.2.2. Die Mikroumgebung der HRS-Zellen

Die Hodgkin-Lymphom-Mikroumgebung ist ein fundamentaler Bestandteil und bietet den HRS-Zellen ein Umfeld zum Überleben, zur Wachstumsstimulation und zur Umgehung einer Antitumor-Immunantwort. Unabhängig vom histologischen Subtyp des klassischen Hodgkin-Lymphoms sind T-Lymphozyten ein Hauptbestandteil der zellulären Mikroumgebung. Dabei machen CD4⁺-Helfer-T-Zellen nicht nur den größten Anteil im Tumorerinfiltrat aus, sondern bilden rosettenförmig auch die direkte Kontaktumgebung der HRS-Zellen. Weitere oft vertretene Zellpopulationen sind B-Lymphozyten, Histiozyten, eosinophile Granulozyten, Mastzellen und Fibroblasten.⁴

Die spezielle Mikroumgebung formen sich die HRS-Zellen zum Großteil durch die Exkretion bestimmter Chemokine selbst. Eines der wichtigsten Vertreter ist das Chemokin CCL17 (TARC: thymusaktivitätsreguliertes Chemokin). CCL17 bindet an den Chemokin-Rezeptor CCR4 der CD4⁺-Helfer-T-Zell-Subpopulationen Th2-Zellen (Typ-2-Helfer-T-Zellen) und Treg (regulatorische T-Zellen) und beeinflusst dadurch deren Chemotaxis.³⁷ Solche CCR4-positiven T-Zellen sind überwiegend in den rosettenartigen Zellformationen in der direkten Kontaktumgebung der HRS-Zellen zu finden. Auch durch Anregung einer bestimmten zellulären Differenzierungsrichtung können die HRS-Zellen ihre Mikroumgebung definieren. So stimuliert beispielsweise das von den HRS-Zellen sezernierte IL-13 die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th2-Zellen.³⁸

Die HRS-Zellen sind abhängig von dem Vorhandensein verschiedener Zytokine aus ihrer Mikroumgebung. Hier spielen v.a. Interleukine (IL) eine Hauptrolle. Exemplarisch werden einige dieser Interleukine vorgestellt. IL-3 wird von aktivierten Th2-Zellen, sowie Eosinophilen und Mastzellen ausgeschüttet und dient den HRS-Zellen zur Protektion gegen Apoptose und zur Proliferationsstimulation.³⁹ IL-7 wird von Fibroblasten sowie als autokriner Faktor von den HRS-Zellen selbst gebildet und dient diesen ebenfalls als Proliferationsstimulator.⁴⁰ Ein weiteres von den HRS-Zellen selbst sezerniertes Interleukin ist IL-13. IL-13 führt in den HRS-Zellen durch die Aktivierung von JAK1 und folgend von STAT6 autokrin zu einer verstärkten Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges.³⁸

Zahlreiche direkte Zell-Zell-Interaktionen mit den Zellen der Mikroumgebung stellen ebenfalls einen wichtigen Aspekt im Überleben der HRS-Zellen dar. Ein Beispiel bildet hier CD30 (TNF-Rezeptor 8), welches von den HRS-Zellen auf ihrer Oberfläche exprimiert wird. Eosinophile und Mastzellen der Mikroumgebung tragen vermehrt den CD30-Liganden (CD153).^{41,42} Die Rezeptor-Liganden-Bindung von CD30 bewirkt die Ausschüttung verschiedener

proliferationsstimulierender Zytokine und zusätzlich die verstärkte Expression von B7-Proteinen, welche Funktionen im Rahmen der Interaktion mit T-Zellen übernehmen.⁴³

2.2.3. Mechanismen zur Umgehung einer Antitumor-Immunantwort

Neben dem generellen Überleben und Wachstum ist die Umgehung einer gegen die Tumorzellen gerichteten Immunantwort eine essenzielle Fähigkeit der HRS-Zellen. Hierbei rücken sowohl Veränderungen der HRS-Zellen selbst als auch Eigenschaften ihrer speziell geformten Mikroumgebung in den Vordergrund.

Ein häufiger Mechanismus von Tumorzellen zur Umgehung einer Immunantwort sind Veränderungen in der Antigenpräsentation durch MHC-Komplexe (Haupthistokompatibilitätskomplex; HLA: humanes Leukozytenantigen-System). Es werden hauptsächlich MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Komplexe unterschieden. MHC-Klasse-I-Komplexe werden auf der Oberfläche von nahezu allen Zellen exprimiert und dienen der Antigenpräsentation für CD8⁺-zytotoxische T-Zellen. Erkennen CD8⁺-zytotoxische T-Zellen ihr spezifisches Antigen, leiten sie die Apoptose der Zielzelle ein. In vielen HRS-Zellen sind MHC-Klasse-I-Komplexe deutlich vermindert oder fehlen gänzlich.⁴⁴ Häufig sind Mutationen im B2M-Gen dafür verantwortlich, dessen zugehöriges Protein, β 2-Mikroglobulin (B2M), eine essenzielle Proteinuntereinheit des MHC-Klasse-I-Komplexes darstellt.⁴⁵

Einen weiteren Aspekt in der Umgehung einer Antitumor-Immunantwort stellen sogenannte Immuncheckpoints dar. Immuncheckpoints sind immunologische Regulationsmoleküle, denen eine Hauptrolle in der Steuerung der Immunreaktion sowie der Immuntoleranz zukommt. Physiologischerweise dienen Immuncheckpoints zur Entwicklung und Aufrechterhaltung einer immunologischen Selbsttoleranz und somit zur Verhinderung von Autoimmunreaktionen. Ein bedeutendes Beispiel ist das auf aktivierten T-Zellen vorhandene Transmembranprotein aus der Immunglobulin-Superfamilie CTLA-4 (CD152; engl.: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4). Die von HRS-Zellen vermehrt exprimierten B7-Proteine CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) binden mit einer höheren Affinität an den inhibitorischen Rezeptor CTLA-4 als an den kostimulatorischen Rezeptor CD28 und bewirken dadurch eine Herunterregulation der Aktivierung und Proliferation der T-Zelle.⁴⁶ Auch PD-1 ist ein wichtiger Vertreter solcher Immuncheckpoints.

Darüber hinaus sezernieren HRS-Zellen immunsuppressive Zytokine wie TGF- β (engl.: transforming growth factor beta) und IL-10.^{47,48} Auch die Tumormikroumgebung ist Teil der immunsuppressiven Mechanismen. So sind die in der Mikroumgebung häufig vorkommenden Treg selbst immunsuppressiv und enthalten unter anderem die TGF- β - und IL-10-

produzierenden Treg-Subpopulationen CD4⁺CD25⁺-Treg und Tr1 (Typ-1-regulatorische T-Zellen).⁴⁹ Außerdem exprimieren HRS-Zellen Gal1 (Galectin-1), welches Apoptose in aktivierten T-Zellen induziert sowie zusätzlich eine weitere Differenzierung naiver T-Zellen in Treg bewirkt.⁵⁰

2.3. Die Rolle von PD-1 und den Liganden PD-L1 und PD-L2

Die Expression von PD-1 (CD279; engl.: programmed cell death protein 1) wurde im Jahr 1992 durch ein Forscherteam um den japanischen Immunologen Tasuku Honjo in Apoptose-durchlaufenden T-Zellen entdeckt und dementsprechend benannt.⁵¹ PD-1 ist ein Transmembranprotein aus der Immunglobulin-Superfamilie und kommt auf der Oberfläche von aktivierten T- und B-Zellen, natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), Monozyten und dendritischen Zellen (DC) vor. Im reaktiven Lymphgewebe ist PD-1 hauptsächlich auf Keimzentrum-assoziierten T-Lymphozyten zu finden.⁵² PD-1 ist der Rezeptor der beiden Liganden PD-L1 (B7-H1; CD274; engl.: programmed cell death 1 ligand 1) und PD-L2 (B7-DC; CD273; engl.: programmed cell death 1 ligand 2) aus der B7-Protein-Familie. PD-L1 ist auf der Oberfläche von vielen verschiedenen, auch nicht-hämatopoetischen Zellen vertreten. PD-L2 ist dagegen in weniger Zelltypen exprimiert. Die Expression von PD-1 sowie von PD-L1 und PD-L2 ist abhängig von Zytokinen des inflammatorischen Milieus, so konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor IRF-1 (engl.: interferon regulatory factor 1) für die kontinuierliche Expression und die durch IFN- γ (IFN: Interferon) induzierte Überexpression von PD-L1 verantwortlich ist.⁵³

Die PD-1-Signalkaskade

PD-1 stellt einen bedeutenden Immuncheckpoint dar und dient der Regulation der Immunantwort sowie der Aufrechterhaltung einer immunologischen Selbsttoleranz zur Verhinderung von Autoimmunreaktionen.^{54,55} In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von PD-1 zur Entwicklung von Lupus-ähnlichen Autoimmunerkrankungen mit Arthritis und Glomerulonephritis führt.⁵⁶

Ähnlich der Bindung von CD80 und CD86 an CTLA-4 führt die Liganden-Bindung von PD-L1 und PD-L2 an PD-1 aktivierter T-Zellen zur Herunterregulation der T-Zell-Aktivierung.⁵⁷ Die intrazelluläre Domäne von PD-1 enthält zwei Phosphorylierungsstellen, ein Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Inhibitions-Motiv (ITIM) und ein Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Schalter-Motiv (ITSM). Durch die Liganden-Bindung an PD-1 können die beiden Phosphatasen SHP-1 (PTPN6; engl.: Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1) und SHP-2 (PTPN11; engl.: Src homology region 2 domain-containing phosphatase 2) an diese Motive des intrazellulären PD-1-Abschnittes binden. SHP-1 und SHP-2 scheinen die intrazellulären Haupteffektoren der PD-1-Signaltransduktion zu sein. Durch SHP-1 und SHP-2 bewirkt PD-1

eine Hemmung der Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors (TCR) mit Hemmung der TCR-vermittelten Proliferation und Zytokin-Sekretion, eine Blockade der durch CD28 induzierten Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL (engl.: B-cell lymphoma-extra large) sowie die Inaktivierung des proliferationsstimulierenden und anti-apoptotischen PI3K-Akt-Signalweges (PI3K: Phosphoinositid-3-Kinasen; Akt: Proteinkinasen B).^{54,55,58-60}

Expression von PD-L1 und PD-L2 in HRS-Zellen

Die beiden PD-1-Liganden PD-L1 und PD-L2 sind in HRS-Zellen deutlich überexprimiert. In nahezu allen Fällen liegt dem eine Amplifikation des Genabschnittes 9p24.1 zugrunde, welcher die genetische Information der Liganden enthält. Darüber hinaus befindet sich in diesem Abschnitt das Gen für JAK2 und auch der kontinuierlich aktivierte JAK-STAT-Signalweg induziert die weitere verstärkte Transkription des PD-L1-Gens und somit die weitere verstärkte Expression von PD-L1.³⁶ Außerdem geht eine kontinuierliche Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 (Aktivator-Protein-1) sowie eine EBV-Infektion der HRS-Zellen mit einer vermehrten PD-L1-Gen-Transkription und somit vermehrten PD-L1-Expression einher.⁶¹ PD-L1 und PD-L2 der HRS-Zellen binden die PD-1-Rezeptoren von infiltrierenden CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen und verhindern auf diese Weise eine gezielt gegen sie gerichtete Immunreaktion.^{62,63} Generell geht die Amplifikation von 9p24.1 und damit die Überexpression von PD-L1 und PD-L2 in HRS-Zellen mit einem schlechteren klinischen Ansprechen auf herkömmliche Therapieregime einher.⁶⁴

PD-1 beziehungsweise PD-L1 und PD-L2 als therapeutische Zielstrukturen

Die Überexpression von PD-L1 und PD-L2 in den HRS-Zellen stellt eine kritische Anpassung dar, die das Überleben und Vermehren der Hodgkin-Lymphom-Zellen im umgebenden Gewebe maßgeblich begünstigt. In Anbetracht dessen bietet die Blockade der PD-L1-beziehungsweise PD-L2-Interaktion mit den PD-1-Rezeptoren der T-Lymphozyten eine effektive und zielgerichtete Therapieoption. In den letzten Jahren konnten viele klinische Studien die Effektivität einer pharmakologischen Blockade dieses Interaktionsweges in der Behandlung des klassischen Hodgkin-Lymphoms zeigen.⁶⁵⁻⁷⁰ Für den Anti-PD-1-Antikörper Nivolumab konnte beispielsweise bereits im Jahr 2018 durch Armand et al. eine Verringerung des Tumorleidens durch ein klassisches Hodgkin-Lymphom bei Patienten mit Rezidiv oder refraktärer Erkrankung nach Hochdosismethotherapie und autologer Stammzelltransplantation bei über 95 % der eingeschlossenen Patienten verzeichnet werden. Die durch ein unabhängiges radiologisches Überprüfung-Committee festgestellte objektive Ansprechrates in dieser Studie lag trotz des fortgeschrittenen Erkrankungsverlaufs bei 69 %, wovon 16 % eine komplette Remission und 53 % eine partielle Remission erreichten. Das mediane Progressions-freie Überleben der eingeschlossenen Patienten in dieser Studie lag

bei 14,7 Monaten (Konfidenzintervall von 95 %; 11,3 bis 18,5 Monate).⁶⁷ Die monoklonalen Anti-PD-1-Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab haben daraufhin bereits den Einzug in die aktuelle S3-Leitlinie zur Therapie des Hodgkin-Lymphoms bei erwachsenen Patienten mit Rezidiv oder Progress nach Hochdosismotherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation und Behandlung mit Brentuximab-Vedotin erhalten.⁵ Auch in Therapiesituationen noch vor einer Hochdosismotherapie und autologen Stammzelltransplantation konnte bei Patienten mit einem Hodgkin-Lymphom in Progress oder Rezidiv durch die Behandlung mit Nivolumab in Kombination mit Brentuximab-Vedotin eine gute klinische Effektivität bewiesen werden. In einer Studie von Advani et al. wurde eine objektive Ansprechrate von 85 % erzielt, wovon 67 % eine komplette Remission erreichten.⁷¹ In Studien wie der N-AVD-Studie aus dem Jahr 2024 wurde Nivolumab zudem auch bereits als Erstlinientherapie beim klassischen Hodgkin-Lymphom eingesetzt. Es wurde ein Therapieregime aus Nivolumab + AVD mit einem Regime aus Brentuximab-Vedotin + AVD verglichen. Hier zeigte sich für das Nivolumab-basierte Therapieregime nicht nur eine höhere klinische Effektivität mit einem 2-Jahres Progressions-freiem Überleben von 92 % (Konfidenzintervall von 95 %; 89 % bis 94 %) im Vergleich zu 83 % (Konfidenzintervall von 95 %; 79 % bis 86 %) beim Brentuximab-Vedotin-basiertem Regime, sondern zusätzlich eine nebenwirkungsärmere Behandlung mit geringeren Therapieabbrüchen.²⁰

Therapieerfolg trotz fehlender MHC-I-Komplexe – bidirektionale Signaltransduktion?

Der Therapieerfolg von Anti-PD-1-Antikörpern impliziert, dass durch die Blockade der PD-1-vermittelten T-Zell-Hemmung wieder eine adäquate T-Zell-herbeigeführte Antitumor-Immunantwort stattfindet und so die HRS-Zellen des Hodgkin-Lymphoms erfolgreich immunologisch bekämpft werden können. Pharmakologische Wirkstoffe, die solche Immuncheckpoints wie die PD-1/PD-L1-Interaktion blockieren, werden dementsprechend Immuncheckpoint-Inhibitoren genannt und die Therapie mit solchen Substanzen kann aufgrund der implizierten Wirkung der Immuntherapie zugeordnet werden. Für eine gezielte Immunreaktion benötigen CD8⁺-zytotoxische T-Zellen jedoch die Antigenpräsentation über MHC-I-Komplexe. In HRS-Zellen sind MHC-I-Komplexe jedoch meist deutlich vermindert oder fehlen gänzlich. Aufgrund dessen müssen zusätzlich andere Mechanismen für den Therapieerfolg der Anti-PD-1-Antikörper in der Behandlung des Hodgkin-Lymphoms vermutet werden.^{44,72}

Ein möglicher Ansatz des Anti-PD-1-Therapieerfolges könnte darin begründet sein, dass die PD-1/PD-L1-Interaktion nicht nur die inhibitorischen Effekte auf die PD-1-tragende T-Zelle vermittelt, sondern bidirektional die PD-L1-tragende HRS-Zelle durch die Liganden-Rezeptor-Bindung proliferationsstimulierende Signale erfährt. Die Anti-PD-1-Antikörper würden dann

durch die Bindung an PD-1 eine solche stimulierende Signaltransduktion in den HRS-Zellen unterbinden. Diese mögliche bidirektionale Signaltransduktion durch die PD-1/PD-L1-Interaktion beziehungsweise die retrograde Signaltransduktion durch PD-L1 könnte somit den Erfolg der Anti-PD-1-Antikörper trotz fehlender MHC-I-Komplexe und damit unwahrscheinlicher Antitumor-Immunreaktion durch CD8⁺-zytotoxische T-Zellen erklären.

2.4. Die Rolle von NK-Zellen als alternative Effektorzellen

Ein weiterer zusätzlich möglicher Erklärungsansatz des Therapieerfolges von Anti-PD-1-Antikörpern könnte in der Beteiligung weiterer Effektorzellen wie den natürlichen Killer-Zellen begründet sein. NK-Zellen spielen eine bedeutende Rolle in der angeborenen Immunabwehr gegen Krebszellen sowie virusinfizierten Zellen und können Zellen mit fehlenden MHC-I-Komplexen erkennen und lysieren. Sie tragen verschiedene aktivierende und inhibierende Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die den Aktivitätsstatus der NK-Zelle regulieren. Viele dieser Oberflächenrezeptoren interagieren mit MHC-I-Komplexen. Fehlt die MHC-I-Präsentation auf der Zelloberfläche der Zielzelle, wie es bei Tumorzellen – so auch bei den HRS-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms⁴⁴ – sowie bei virusinfizierten Zellen der Fall sein kann, so überwiegen aktivierende Signale in den NK-Zellen und sie attackieren die Zelle.⁷³ Das Erkennen von solchen transformierten körpereigenen Zellen als fremd durch natürliche Killer-Zellen ist bereits in der Mitte der 1980er Jahre durch den schwedischen Mediziner und Immunologen Klas Kärre in der „Missing-self-Hypothese“ postuliert worden.⁷⁴

Auch die NK-Zellen tragen den PD-1-Rezeptor auf ihrer Oberfläche. Durch die Bindung von PD-L1 der HRS-Zellen an den PD-1-Rezeptor der NK-Zelle wird die Aktivität der NK-Zelle gehemmt. Eine Blockade der PD-1/PD-L1-Interaktion durch Immuncheckpoint-Inhibitoren könnte somit die Antitumor-Immunreaktion von NK-Zellen, welche durch das Fehlen von MHC-I-Komplexen auf den HRS-Zellen getriggert wird, reaktivieren. Diese Theorie wird dadurch unterstützt, dass gezeigt werden konnte, dass Patienten, die an einem klassischen Hodgkin-Lymphom erkrankt sind, ein höheres Level an im peripheren Blut zirkulierenden, PD-1-positiven NK-Zellen aufweisen.⁷⁵ Hierdurch könnten sich Kombinationstherapien zur PD-1/PD-L1-Blockade ergeben. Beispielsweise könnte die Wirksamkeit einer Therapie mit Anti-PD-1-Antikörpern durch die Kombination mit AFM13, einen bispezifischen Antikörper, der CD30 der HRS-Zellen und CD16A der NK-Zellen bindet, effektiv verstärkt werden.⁷⁶⁻⁷⁸

2.5. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Die Entwicklung und Etablierung zielgerichteter Krebstherapien stellen einen Wendepunkt in der Behandlung onkologisch erkrankter Patienten dar. Herkömmliche Zytostatika- und Radiotherapie-basierte Behandlungsregime wirken ungezielt und sind mit erheblichen, die Lebensqualität einschränkenden, teilweise lebensbedrohlichen direkten und langzeitigen Nebenwirkungen verbunden. Überlebende nach erfolgreicher Behandlung eines Hodgkin-Lymphoms haben ein signifikant erhöhtes Risiko für Sekundärmalignome, kardiovaskuläre Erkrankungen, pulmonale Erkrankungen, Infektionen, Schilddrüsenerkrankungen sowie Beeinträchtigungen der Fruchtbarkeit.⁷⁹ Da viele junge Menschen an einem Hodgkin-Lymphom erkranken und die Prognose der Erkrankung im Allgemeinen sehr gut ist, sind viele Menschen von den Langzeitnebenwirkungen der Behandlung betroffen.^{8,9,22} So stellen neue, zielgerichtete, nebenwirkungsärmere Therapiemöglichkeiten nicht nur für Patienten in therapierefraktären oder rezidierten Erkrankungssituationen eine wichtige Rolle, sondern erhalten zudem immer mehr den Einzug in die Erstlinientherapie des Hodgkin-Lymphoms, wodurch die Anzahl von therapiebedingten Komplikationen und Langzeitnebenwirkungen deutlich reduziert werden kann.^{19,20}

Für die Entwicklung und Etablierung zielgerichteter Krebstherapien ist ein genaues Verständnis molekularpathologischer Vorgänge in den Tumorzellen sowie in der Interaktion mit der Tumorumgebung essenziell. Diese Arbeit beschäftigt sich mit einem für die zielgerichtete Tumorbehandlung vielversprechenden Signalweg, der PD-1/PD-L1-Interaktion, und untersucht die Auswirkungen dieser Interaktion auf die Proliferation der HRS-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms.

Zunächst werden die basale PD-L1-Expression sowie die PD-L1-Expression nach Stimulation mit IFN- γ mittels Durchflusszytometrie per FACS-Analyse (FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting) gemessen, um das Vorhandensein dieser Liganden auf der Oberfläche der verwendeten klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428^{80,81}, L-540⁸², L-1236^{83,84} und KM-H2⁸⁵ nachzuweisen.

Die Messung der Zellproliferation erfolgt über eine Lumineszenzmessung. In die HRS-Zellen ist das Gen zur Expression der Firefly-Luciferase (Luc) eingebracht worden. Durch dieses Enzym können die HRS-Zellen zugegebenes D-Luciferin unter ATP-Verbrauch und Emission von Photonen umsetzen. Die emittierten Photonen können als Biolumineszenzsignal gemessen werden. Anhand des Verlaufs der Signalstärke lassen sich Rückschlüsse auf die Proliferation der Zellen schließen.⁸⁶

Es wird die Proliferation der HRS-Zellen unter Einfluss von PBMCs (engl.: peripheral blood mononuclear cells), von löslichem PD-1 und von löslichem PD-1 in Kombination mit dem Anti-PD-1-Antikörper Nivolumab gemessen. PBMCs ist ein Sammelbegriff für die mononukleären Zellen des peripheren Blutes und sie umfassen hauptsächlich Lymphozyten und Monozyten. Damit enthalten die PBMCs diejenigen Zellen, die den PD-1-Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen und in der direkten Mikroumgebung der HRS-Zellen vorkommen. Um zu evaluieren, ob ein durch die Interaktion der HRS-Zellen mit den PBMCs auftretender Effekt auf die HRS-Zellproliferation auf die PD-1/PD-L1-Interaktion zurückzuführen sein kann, wird im anschließenden Versuch der PD-1/PD-L1-Signalweg in den HRS-Zellen direkt getriggert. Durch Zugabe von löslichem PD-1-Rezeptor (als rekombinanter humaner PD-1-Fc-Chimäre) erfolgt die agonistische Bindung an PD-L1 und dadurch die Initiierung der erwarteten intrazellulären PD-L1-Signalkaskade in den HRS-Zellen. Abschließend wird überprüft, ob sich die möglichen Auswirkungen der PD-1/PD-L1-Interaktion auf die Zellproliferation durch den löslichen PD-1-Rezeptor mittels Zugabe des Anti-PD-1-Antikörpers Nivolumab aufheben lassen.

Die beschriebenen Versuche zu den Auswirkungen auf die Zellproliferation werden zusätzlich unter Nährstoffmangelbedingungen mit einem geringeren Serum-Anteil im Nährmedium durchgeführt. Hierdurch sollen die *in vivo* herrschenden Umgebungsbedingungen der HRS-Zellen näher simuliert werden, um die Ergebnisse der Versuchsreihen reliabler zu gestalten und mögliche Auswirkungen der Interaktionen auf die Proliferation der HRS-Zellen hervorzuheben.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

	Hersteller
DMEM/F-12 + GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
RPMI-1640-Medium + GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
FBS	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
PBS-Pufferlösung	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
DMSO-Lösung	Carl Roth (Deutschland)
Trypanblau	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
D-Luciferin	Biozym Scientific (Deutschland)
Triton™ X-100-Lösung	Carl Roth (Deutschland)
Ficoll®	Carl Roth (Deutschland)
EDTA	Carl Roth (Deutschland)

3.1.2. Humane Zytokine, Antikörper und Antikörper-Derivate

Tabelle 4: Verwendete humane Zytokine, Antikörper und Antikörper-Derivate

	Hersteller
Recombinant Human IFN-γ (carrier-free)	BioLegend (Art.-Nummer: 570202) (California, USA)
Recombinant Human PD-1 (CD279)-Fc Chimera (carrier-free)	BioLegend (Art.-Nummer: 785106) (California, USA)
PE anti-human CD274 (B7-H1, PD-L1) Antibody	BioLegend (Art.-Nummer: 393608) (California, USA)
PE Human IgG1 Isotype Ctrl Recombinant Antibody	BioLegend (Art.-Nummer: 403503) (California, USA)

3.1.3. Medikamente

Das für die Versuchsreihen verwendete Medikament Opdivo® (Wirkstoff: Nivolumab) wurde freundlicherweise aus einem Restbestand von der Apotheke des Universitätsklinikums Köln zur Verfügung gestellt.

Tabelle 5: Verwendete Medikamente

Opdivo® (Wirkstoff: Nivolumab)	Aus einem Restbestand von der Apotheke des Universitätsklinikums Köln
-----------------------------------	--

3.1.4. Equipment

Tabelle 6: Verwendetes Equipment

	Hersteller
Inkubator	Binder (Deutschland), Sanyo (Japan)
Zellkulturbank	Infitek (China)
Wasserbad	Memmert (Deutschland)
Kühlschrank	Liebherr (Schweiz)
-80 °C-Gefrierschrank	Sanyo (Japan)
Stickstofftank	Taylor-Wharton (Texas, USA)
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA), Eppendorf (Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld Superior (Deutschland)
Lichtmikroskop	Zeiss (Deutschland)
Automatischer Zellzähler (EVE™ Automatic cell counter)	NanoEntek (Südkorea)
Automatischer Zellzähler (Invitrogen Countes 2 FL)	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
Laborwaage	Kern & Sohn (Deutschland)
Magnetrührer	IKA (Deutschland)
FACS-Gerät (BD LSRFortessa)	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Lumineszenz-Messgerät (GloMax® Discover System)	Promega (Wisconsin, USA)

3.1.5. Zubehör

Tabelle 7: Verwendetes Zubehör

	Hersteller
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One (Österreich)
Pipetten und Pipettierspitzen	Sarstedt (Deutschland), VWR (Pennsylvania, USA), Eppendorf (Deutschland)
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt (Deutschland), VWR (Pennsylvania, USA), Eppendorf (Deutschland)

Reaktionsgefäße	Eppendorf (Deutschland)
Kryoröhrchen	Sarstedt (Deutschland)
Mr.-Frosty™-Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
Weiß 96-Well-Platten	Corning (New York, USA), Brand (Deutschland)

3.1.6. Software

Tabelle 8: Verwendete Software

	Entwickler
Microsoft Word (Version 2503)	Microsoft Corporation (Washington, USA)
Microsoft Excel (Version 2503)	Microsoft Corporation (Washington, USA)
GraphPad Prism (Version 10.4.2)	GraphPad Software (California, USA)
EndNote™ (Version X9.3.3)	Clarivate Analytics (Pennsylvania, USA)
Floreada.io (Update 8/6/24) (https://floreada.io ; Zuletzt abgerufen am 14.04.2025)	/

3.1.7. Zelllinien

Hodgkin-Lymphom-Zelllinien

Die folgenden etablierten, humanen klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien sind für die Versuche dieser Arbeit verwendet worden:

Tabelle 9: Verwendete Hodgkin-Lymphom-Zelllinien

	Alter und Geschlecht des Patienten	Materialursprung	Histologischer Subtyp
L-428 ^{80,81,87}	37 Jahre, weiblich	Pleuraerguss	Nodulär-sklerosierender Typ
L-540 ^{82,87}	20 Jahre, weiblich	Knochenmark	Nodulär-sklerosierender Typ
L-1236 ^{83,84,87}	34 Jahre, männlich	Peripheres Blut	Mischtyp
KM-H2 ^{85,87}	74 Jahre, männlich	Pleuraerguss	Mischtyp

Diese wurden freundlicherweise der Arbeitsgruppe durch PD Dr. rer. nat. Hinrich Hansen (Universität zu Köln, Köln, Deutschland) zur Verfügung gestellt und enthalten bereits aus vorherigen Arbeiten das Luc-Gen zur Expression der Firefly-Luciferase.

PBMCs

Die in dieser Arbeit verwendeten PBMCs sind aus Buffy-Coat-Produkten gesunder Donoren, die sonst keinen Verwendungszweck haben, isoliert worden. Diese wurden freundlicherweise durch die Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Köln bereitgestellt.

Tabelle 10: Verwendete PBMCs

PBMCs	Isoliert aus Buffy-Coat-Produkten gesunder Donoren (Reste der Blutspende) der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Köln
-------	--

3.1.8. Medien und Puffer

Die für die Zellkultur und die Versuchsreihen verwendeten Medien und Puffer wurden wie in Tabelle 11 beschrieben selbst zusammengestellt.

Tabelle 11: Verwendete Medien und Puffer

	Zusammensetzung
Nährmedium für die Zellkultur und die Versuchsreihen	45 % DMEM/F-12 + GlutaMAX™ 45 % RPMI-1640-Medium + GlutaMAX™ 9 % FBS 1 % Penicillin-Streptomycin
Nährmedium mit geringerem FBS-Anteil für die Versuchsreihen unter Nährstoffmangel	49 % DMEM/F-12 + GlutaMAX™ 49 % RPMI-1640-Medium + GlutaMAX™ 1 % FBS 1 % Penicillin-Streptomycin
Freezing-Zusatz	80 % FBS 20 % DMSO-Lösung
FACS-Puffer	PBS-Pufferlösung 1 % FBS 2 mM EDTA

3.2. Methoden

3.2.1. Inkubation der Zellen

Die Hodgkin-Lymphom-Zellen sind als Suspensionskultur in Zellkulturflaschen in einem für die Zellkultivierung ausgelegten CO₂-Inkubator mit einer 5-prozentigen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C kultiviert worden. Das zur Zellkultur verwendete Nährmedium setzt sich aus 45 % DMEM/F-12 + GlutaMAX™, 45 % RPMI-1640-Medium + GlutaMAX™, 9 % FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin zusammen (Tabelle 11). Die Grundlage des Nährmediums stellen die zur Kultivierung von Säugetierzellen etablierten Standardmedien DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Ham's F-12) und RPMI-1640-Medium (Roswell-Park-Memorial-Institute-1640-Medium) dar. Das enthaltene GlutaMAX™ verbessert die Zellviabilität und minimiert die Ansammlung von Ammoniak. Das zugegebene FBS (fetales Rinderserum [engl.: fetal bovine serum]) enthält unter anderem verschiedene Proteine, hauptsächlich BSA (bovines Serumalbumin [engl.: bovine serum albumine]), und Wachstumsfaktoren. Der Zusatz von 1 % Penicillin-Streptomycin erfolgt zur Verhinderung einer bakteriellen Kontamination. Die Arbeit mit den kultivierten Zellen wurde stets unter einer sterilen Zellkulturbank durchgeführt.

3.2.2. Subkultivierung, Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Subkultivierung der Zellen:

Zur Subkultivierung wurde der Zellkulturflascheninhalt mit den sich in Suspension befindenden Zellen direkt im Verhältnis von 1:2 oder 1:3 auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt und diese mit frischem Nährmedium aufgefüllt. Der Zeitpunkt zur Subkultivierung ist individuell anhand des lichtmikroskopischen Zellbildes sowie des farblich sichtbaren Verbrauchszustandes des Nährmediums festgelegt worden.

Kryokonservierung der Zellen:

Zur Kryokonservierung wurde der Inhalt der Zellkulturflasche in ein Zentrifugenröhrchen überführt und dieses für 3 Minuten mit 300 rcf zentrifugiert. Anschließend wurde der flüssige Überstand abgesaugt, der Zellrückstand in 1000 µl frischem Medium resuspendiert und davon jeweils 500 µl in ein zuvor mit 1500 µl Freezing-Zusatz befülltes Kryoröhrchen pipettiert. Der Freezing-Zusatz setzt sich aus 80 % FBS und 20 % DMSO-Lösung zusammen (Tabelle 11). Das DMSO (Dimethylsulfoxid) dient als Kryoprotektivum und soll die Bildung von intra- und extrazellulären Eiskristallen beim Einfrieren verhindern. Die auf diese Weise erstellten Kryoröhrchen wurden zunächst im Mr.-Frosty™-Gefrierbehälter für 24 Stunden bei -80 °C schonend eingefroren und anschließend im Stickstofftank eingelagert.

Auftauen der Zellen:

Um kryokonservierte Zellen aus dem Stickstofftank aufzutauen, wurde zunächst vorbereitend etwas frisches Medium in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt und im Wasserbad auf ca. 37 °C erwärmt. Das Kryoröhrchen wurde dann aus dem Stickstofftank entnommen und solange zügig warmes Medium in das noch gefrorene Kryoröhrchen und wieder zurück in das Zentrifugenröhrchen pipettiert, bis der gesamte Inhalt des Kryoröhrchens aufgetaut und im warmen Medium des Zentrifugenröhrchens war. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen für 3 Minuten mit 300 rcf zentrifugiert, der flüssige Überstand abgesaugt und der Zellrückstand in frischem Medium resuspendiert, um das für aufgetaute Zellen toxische DMSO aus dem Freezing-Zusatz zu entfernen. Die so aufgetauten Zellen wurden dann in eine Zellkulturflasche überführt und diese mit frischem Nährmedium aufgefüllt.

3.2.3. Zellzählung

Die Zählung der Zellen ist mit einer Neubauer-Zählkammer sowie mit einem automatischen Zellzähler durchgeführt worden. Dafür wurde zunächst der Inhalt der Zellkulturflasche in ein Zentrifugenröhrchen übergeben, dieses für 3 Minuten mit 300 rcf zentrifugiert, der flüssige Überstand abgesaugt und der Zellrückstand in 1000 µl frischem Medium resuspendiert.

Für die Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer muss eine 1:10-Verdünnung erstellt werden. Dazu wurde ein Reaktionsgefäß mit 80 µl PBS-Pufferlösung (PBS: phosphatgepufferte Salzlösung) sowie 10 µl Trypanblau gefüllt. Es wurde 10 µl der Zellsuspension aus dem Zentrifugenröhrchen hinzugegeben. Aus dem so erstellten Reaktionsgefäß konnten dann 10 µl in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden. Aus der auf diese Weise ermittelten Zellkonzentration im Reaktionsgefäß ließ sich die Zellkonzentration im Zentrifugenröhrchen zurückerrechnen.

Für die Zellzählung mittels automatischem Zellzähler konnte direkt aus der Zellsuspension des Zentrifugenröhrchens ein Reaktionsgefäß mit einer Mischung mit Trypanblau im Verhältnis von 1:1 erstellt werden. Aus diesem Reaktionsgefäß wurde die spezielle Slide des automatischen Zellzählers befüllt und die Zellkonzentration vom Zellzählgerät ermittelt.

Durch die Zugabe von Trypanblau, welches lediglich abgestorbene Zellen mit perforierter Zellmembran färbt, wurde bei jeder Zellzählung zusätzlich die Zellviabilität geprüft.

3.2.4. Detektion von PD-L1 auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie mittels FACS-Analyse können die Zellen einerseits anhand ihrer Größe (Vorwärtsstreulicht, FSC; engl.: forward scatter) und Granularität (Seitenstreulicht, SSC; engl.: side scatter) sowie andererseits anhand des Vorhandenseins bestimmter

Oberflächenmarker charakterisiert und sortiert werden. Zur Detektion von PD-L1 auf der Zelloberfläche wurde ein gegen PD-L1 gerichteter Antikörper verwendet, an dem ein Fluoreszenzfarbstoff (PE: Phycoerythrin) gekoppelt ist. Die Zellen, an denen solche mit PE-gekoppelten Antikörper gebunden sind, können vom FACS-Gerät durch Fluoreszenz-Emission identifiziert werden.

Zur FACS-Analyse wurden die HRS-Zellen zunächst gezählt und dann in Zentrifugenröhrchen mit jeweils 200.000 Zellen pro Zelllinie gefüllt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit einem FACS-Puffer, bestehend aus PBS-Pufferlösung mit 1 % FBS und 2 mM EDTA, gewaschen (Tabelle 11). Die Waschungen erfolgten jeweils durch Zentrifugation für 3 Minuten mit 300 rcf, Absaugen des flüssigen Überstandes und Resuspension der Zellen in dem FACS-Puffer. Im Anschluss an die ersten Waschungen wurde der PE-Anti-PD-L1-Antikörper hinzugegeben. In den Kontrollreihen erfolgte die Zugabe eines PE-IgG1-Isotyp-Kontroll-Antikörpers. Nach Antikörperzugabe erfolgten eine 30-minütige Inkubation auf Eis in Dunkelheit sowie anschließend erneut zwei Waschungen mit dem FACS-Puffer. Abschließend ist die FACS-Analyse am FACS-Gerät durchgeführt worden.

Für die Untersuchung der induzierten PD-L1-Expression durch IFN- γ wurden die Zellen jeweils für 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden mit 10 ng pro ml humanem IFN- γ inkubiert, bevor die FACS-Vorbereitung und PE-Anti-PD-L1-Antikörperzugabe sowie die anschließende FACS-Analyse erfolgten.

Das FACS-Gating erfolgte anhand von Größe und Granularität der Zellen und dementsprechend anhand der Intensität der FSC- und SSC-Profile in den jeweiligen Dotplot-Diagrammen der FACS-Analyse. Für jede Zelllinie ist ein Gate festgelegt und folgend für alle FACS-Analysen der jeweiligen Zelllinie gleich gesetzt worden. Das Gate wurde dabei jeweils so gewählt, dass sowohl Zelltrümmer als auch Streuungen herausgerechnet werden.

3.2.5. Isolierung der PBMCs

Die PBMCs sind aus Buffy-Coat-Produkten gesunder Donoren isoliert worden, die durch die Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Köln bereitgestellt wurden. Die Buffy-Coat-Produkte wurden zunächst zusammen mit PBS-Pufferlösung in Zentrifugenröhrchen gefüllt. Weitere leere Zentrifugenröhrchen wurden mit Ficoll®, einem synthetischen Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, befüllt. Die Buffy-Coat-PBS-Mischung wurde dann jeweils ohne Vermischung auf das Ficoll® geschichtet und anschließend für 20 Minuten mit 760 rcf zentrifugiert. Aufgrund der Dichtegradienten bilden sich so mehrere Schichten in den Zentrifugenröhrchen: die unterste Schicht enthält restliche Erythrozyten, die folgende Schicht enthält die in Ficoll® gelösten Granulozyten, die darauffolgende Schicht enthält die PBMCs

und die oberste Schicht enthält Thrombozyten und restliches Blutplasma. Die oberste Schicht wurde entfernt, sodass die PBMC-Schicht jeweils abgesaugt und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt werden konnte. Diese Zentrifugenröhrchen wurden erneut mit PBS-Pufferlösung aufgefüllt und anschließend dreimal für 8 Minuten mit 350 rcf zentrifugiert. Nach jeder Zentrifugation wurde dabei der flüssige Überstand abpipettiert und das Zellpellet in 1000 µl PBS-Pufferlösung resuspendiert. Durch diese Waschvorgänge werden die restlichen Thrombozyten entfernt. Abschließend konnten die mit PBMCs gefüllten Zentrifugenröhrchen in einem gemeinsamen Zentrifugenröhrchen gesammelt und wie oben beschrieben gezählt sowie deren Zellviabilität geprüft werden.

3.2.6. Messung der Proliferation mittels Lumineszenzmessung

Die Messung der Zellproliferation erfolgte mittels Detektion eines Biolumineszenzsignals der HRS-Zellen. Durch die Integration des Firefly-Luciferase-Gens in das Genom der HRS-Zellen sind diese dazu in der Lage, die Firefly-Luciferase zu exprimieren und dadurch zugegebenes D-Luciferin unter ATP-Verbrauch und Emission von Photonen umzusetzen. Diese als Biolumineszenzsignal messbaren Photonen lassen Rückschlüsse auf die Zellanzahl und im Verlauf somit auf die Zellproliferation schließen.⁸⁶

Für diese Versuchsreihen wurden die HRS-Zellen zunächst gezählt und dann zu jeweils 10.000 Zellen in 200 µl Nährmedium in ein Well einer weißen 96-Well-Platte gesät. Anschließend wurde je nach Versuchsreihe die entsprechende zu untersuchende Einflusskomponente zu den HRS-Zellen in die Wells gegeben:

- Einfluss von PBMCs:

Die PBMCs wurden jeweils in einem Verhältnis von 1:20 in die bereits mit HRS-Zellen besäten Wells hinzugegeben. Bei 10.000 HRS-Zellen pro Well entsprach dies der Zugabe von jeweils 200.000 PBMCs pro Well.

- Einfluss von löslichem PD-1:

Die Zugabe von löslichem PD-1 (als rekombinanter humaner PD-1-Fc-Chimäre) erfolgte in einer Konzentration von 100 ng pro ml.

- Einfluss von löslichem PD-1 + Nivolumab:

Die Zugabe von löslichem PD-1 (als rekombinanter humaner PD-1-Fc-Chimäre) erfolgte in einer Konzentration von 100 ng pro ml und die Zugabe von Nivolumab in einer Konzentration von 20 µg pro ml.

Die Kontrollreihen wurden jeweils ebenfalls mit 10.000 Zellen in 200 µl Medium sowie mit zusätzlich 1 % Triton™ X-100 (Octoxinol 9) pro Well befüllt. Abschließend wurde D-Luciferin in einer Konzentration von 30 µg pro ml in alle Wells gegeben. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit von Luciferin wurden die 96-Well-Platten ab diesem Schritt lichtgeschützt verpackt. Die 96-Well-Platten wurden dann für ca. 15 Minuten in dem Zellinkubator inkubiert. Anschließend wurde der Lumineszenzwert zu Stunde 0 als Referenzwert gemessen und die 96-Well-Platten zurück in den Inkubator gestellt. Die folgenden Lumineszenzmessungen erfolgten davon ausgehend nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden.

Zusätzlich sind die Versuchsreihen der Proliferationsmessung zur Simulation von Nährstoffmangelbedingungen mit einem Nährmedium mit lediglich 1 % FBS-Anteil durchgeführt worden.

3.2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mittels der Softwareprogramme Microsoft Excel (Version 2503) und GraphPad Prism (Version 10.4.2) sowie bei den Daten der Durchflusszytometrie zusätzlich mit der Online-Software Floreada.io (Update 8/6/24; <https://floreada.io>; Zuletzt abgerufen am 14.04.2025).

Statistische Auswertung der PD-L1-Detektion

Die Versuche der Durchflusszytometrie mittels FACS-Analyse zur PD-L1-Detektion sind je Zelllinie dreimal ($n = 3$) durchgeführt worden. In jeder FACS-Analyse wurden 10.000 Ereignisse ausgewertet. Als Versuchsmesswerte wurden jeweils die Pulsfläche (A; engl.: area) der Signale des Fluoreszenzfarbstoffs Phycoerythrin (PE) der verwendeten Antikörper herangezogen (PE-A).

Zur Säulendiagramm-Darstellung der basalen PD-L1-Expression auf der Zelloberfläche wurden jeweils die arithmetischen Mittelwerte der Signalwerte des Anti-PD-L1-Antikörpers und der Kontrollmessungen mittels IgG1-Isotyp-Kontroll-Antikörper gegenübergestellt. Die Säulendiagramm-Darstellung der durch IFN- γ induzierten PD-L1-Expression erfolgte im Vergleich zur basalen PD-L1-Expression. Hierzu wurden jeweils die Signalwerte der 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden mit IFN- γ stimulierten HRS-Zellen durch die Signalwerte der basalen PD-L1-Expression dividiert, aus den drei Versuchsdurchläufen die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der jeweiligen Messwerte bestimmt und diese graphisch vergleichend visualisiert.

Die statistische Testung auf Mittelwertunterschiede erfolgte mittels ungepaartem t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %.

Statistische Auswertung der Proliferationseinflüsse

Die Proliferationsversuche mittels Lumineszenzmessung sind ebenfalls je Zelllinie dreimal durchgeführt worden ($n = 3$). Zudem enthielt jede Versuchsreihe jeweils 5 identisch gefüllte Wells mit Zellen derselben Zellgeneration (jeweils 5 technische Replikate). Jedes Well wurde mit jeweils 10.000 Zellen der jeweiligen Hodgkin-Lymphom-Zelllinie gefüllt.

Für jede Versuchsreihe wurden die Lumineszenzmesswerte nach 48 Stunden und nach 72 Stunden durch die jeweiligen Referenzwerte an Stunde 0 dividiert, um die Proliferationsveränderungen nach 48 Stunden beziehungsweise nach 72 Stunden zu erfassen. Es wurden jeweils die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Versuchsdurchläufe gebildet und für die Versuchsreihen die Proliferationsveränderungen der basalen Zellen den Proliferationsveränderungen der Zellen mit den jeweiligen Einflussfaktoren gegenübergestellt und in Säulendiagrammen graphisch vergleichend visualisiert.

Die statistische Testung auf Mittelwertunterschiede erfolgte mittels ungepaartem t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %.

Zur zusammenfassenden Darstellung der Proliferationseinflüsse und statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse der Zelllinie L-428 wurden diese zusätzlich gesondert als Kurvendiagramm sowie tabellarisch dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1. Basale PD-L1-Expression der HRS-Zellen und PD-L1-Expression nach Stimulation mit IFN- γ

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die vier verwendeten klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-540, L-1236 und KM-H2 durchflusszytometrisch mittels FACS-Analyse untersucht. Hierzu wurde für jede Zelllinie ein entsprechendes, anhand der Größe und Granularität der Zellen ausgewähltes Gate gesetzt, welches Zelltrümmer und Streuungen von der Analyse ausschließt (Abbildung 2). Für die Zelllinie KM-H2 zeigte sich im Dotplot-Diagramm der Durchflusszytometrie neben der entsprechend FSC- und SSC-Intensität analog zu den anderen Zelllinien zu erwartenden Zellpopulation eine weitere, etwas diffuser verteilte Zellpopulation mit höherer Zellgröße und Granularität.

Zunächst wurde die basale Expression von PD-L1 auf der Zelloberfläche der vier Hodgkin-Lymphom-Zelllinien untersucht. Die Durchflusszytometrie mittels FACS-Analyse ergab für alle vier Zelllinien ein entsprechendes Fluoreszenzsignal in den mit dem PE-Anti-PD-L1-Antikörper markierten Versuchsreihen. In der Abbildung 3 sind die Histogramme der FACS-Analysen dargestellt, in Abbildung 4 die entsprechenden Säulendiagramme mit den arithmetischen Mittelwerten sowie Standardabweichungen für jede Zelllinie. Das PD-L1-Fluoreszenzsignal der Zelllinien L-428, L-540 und L-1236 war dabei jeweils um ein Vielfaches höher als das Signal in den Kontrollmessungen mit dem PE-IgG1-Isotyp-Kontroll-Antikörper. Die größte Differenz ergab sich in den Messungen der Zelllinie L-540. Bei der Zelllinie KM-H2 zeigte sich insgesamt ein im Vergleich geringerer Unterschied in den Signalwerten zwischen den mit PE-Anti-PD-L1-Antikörper markierten Zellen und den mit PE-IgG1-Isotyp-Kontroll-Antikörper markierten Zellen. Vor allem die im Dotplot-Diagramm diffuser verteilte Zellpopulation (rechter Peak im Histogramm) zeigte ein stärkeres PD-L1-Fluoreszenzsignal im Vergleich zu den Kontrollmessungen.

Anschließend wurde die PD-L1-Expression auf der Oberfläche der HRS-Zellen nach unterschiedlich langer Stimulation mit IFN- γ gemessen. Die Abbildung 3 zeigt für die untersuchten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien jeweils die Fluoreszenzsignale der mit PE-Anti-PD-L1-Antikörper markierten Zellen nach 24-Stunden-, 48-Stunden- und 72-Stunden-langer Inkubation mit IFN- γ als Histogramme, die Abbildung 5 zeigt die Daten jeweils als arithmetische Mittelwerte sowie Standardabweichungen in Bezug zum Signalwert der Zellen ohne IFN- γ -Stimulation in Säulendiagrammen. In allen vier Zelllinien konnte durchschnittlich eine Zunahme des PD-L1-Signalwertes durch die Inkubation mit IFN- γ festgestellt werden. Für die Zelllinien L-428, L-540 und L-1236 wird tendenziell ein Maximum bei dem 1,5-fachen Wert

des basalen PD-L1-Signalwertes ohne IFN- γ -Stimulation erreicht. Die Zellen der Zelllinien L-428 und L-1236 erreichten dieses tendenzielle Maximum annähernd bereits nach 48-Stunden-langer Inkubation mit IFN- γ . Insgesamt die durchschnittlich stärkste Zunahme des PD-L1-Fluoreszenzsignals konnte in den Messungen der Zelllinie KM-H2 verzeichnet werden. Für diese Zelllinie ergibt sich tendenziell ein Maximum bei dem 3-fachen Wert im Vergleich zum basalen PD-L1-Signalwert ohne IFN- γ -Stimulation. Auch hier wird dieses tendenzielle Maximum annähernd bereits nach 48-Stunden erreicht. Betrachtet man die im Dotplot-Diagramm (Abbildung 2) unterschiedlich erscheinenden Zellpopulationen getrennt, so zeigt sich diese Zunahme des PD-L1-Signalwertes zwar bei beiden im Dotplot-Diagramm ersichtlichen Zellpopulationen, am stärksten jedoch für die im Dotplot-Diagramm diffuser verteilte Zellpopulation (rechter Peak im Histogramm). Eine statistische Signifikanz der Ergebnisse zeigte sich lediglich für die Zelllinie L-428 zu den Messungen nach 48-Stunden- und 72-Stunden-langer sowie für die Zelllinie KM-H2 zu der Messung nach 24-Stunden-langer Inkubation mit IFN- γ .

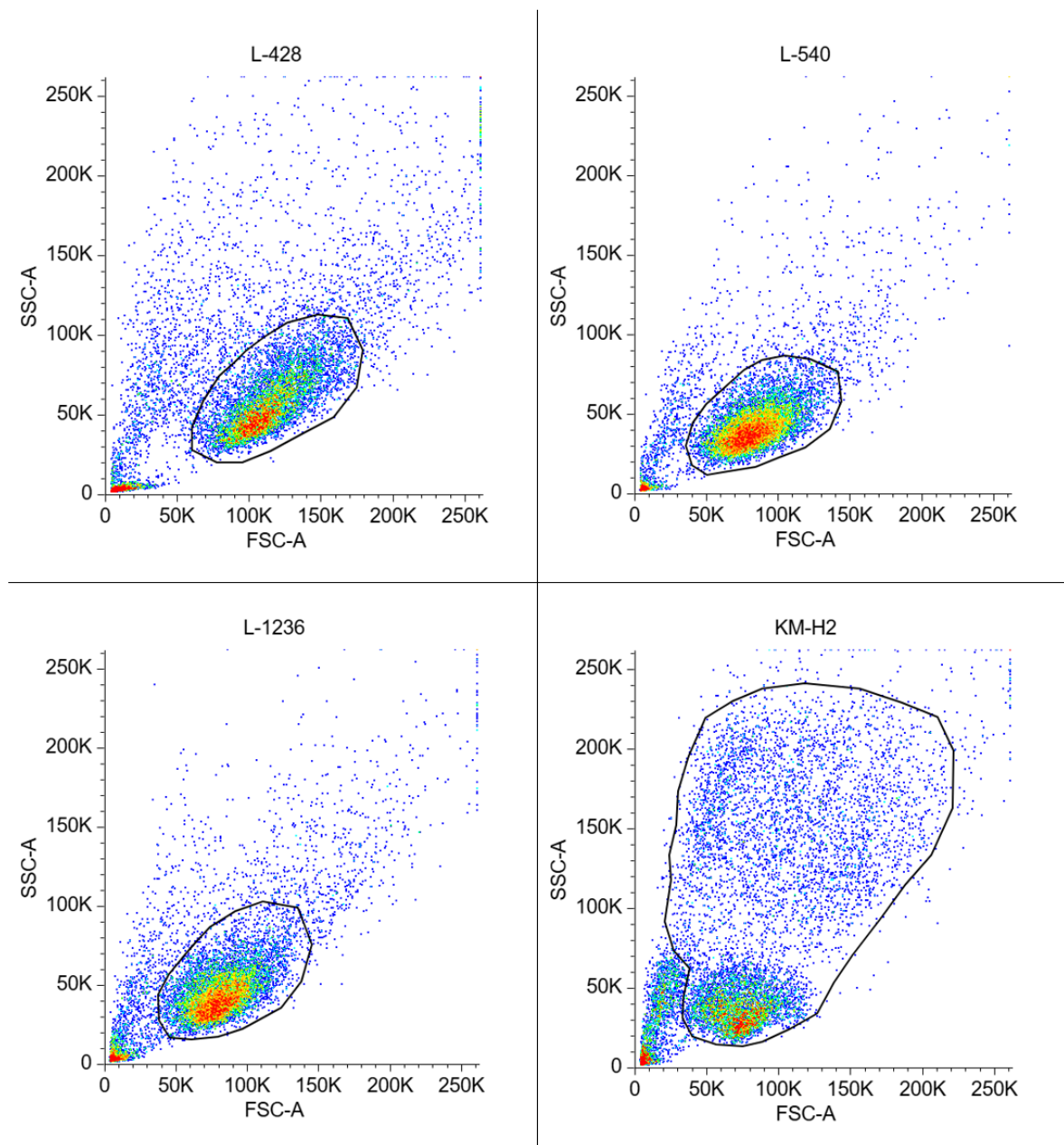


Abbildung 2: Dotplot-Diagramme der Hodgkin-Lymphom-Zelllinien in der Durchflusszytometrie

Dargestellt ist auf der X-Achse jeweils die Fläche des Vorwärtsstreulichtes (FSC-A; engl.: forward scatter - area) und auf der Y-Achse die Fläche des Seitenstreulichtes (SSC-A; engl.: side scatter - area). Abgebildet sind jeweils die Dotplot-Diagramme der Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-540, L-1236 und KM-H2. Jeder Punkt entspricht einem gemessenen Ereignis. Insgesamt sind pro Zelllinie 10.000 Ereignisse gemessen worden. Der schwarz umrandete Bereich entspricht dem gewählten Gate der jeweiligen Zellpopulationen.

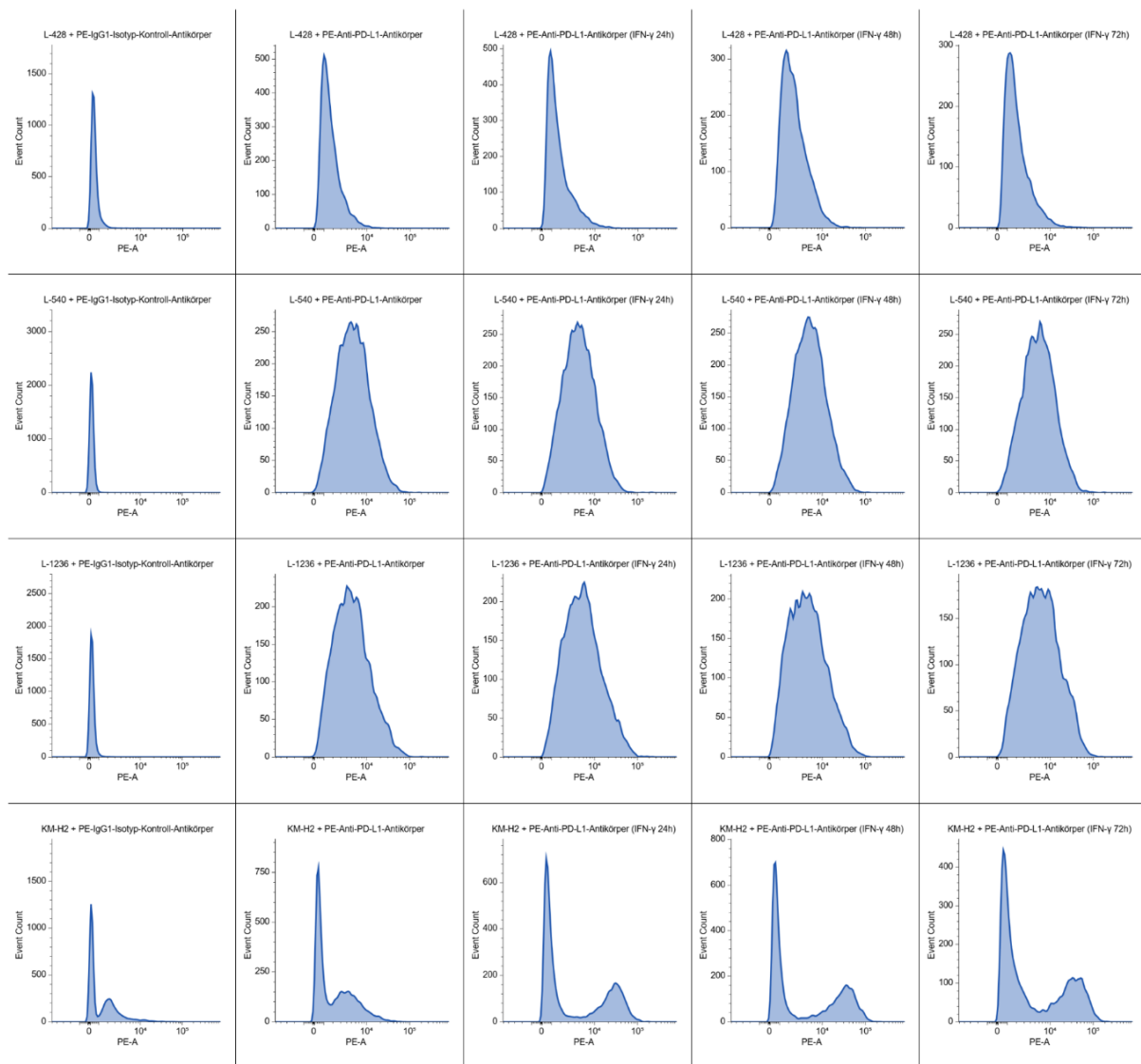


Abbildung 3: Histogramme der durchflusszytometrischen Versuche

Dargestellt ist auf der X-Achse (PE-A) jeweils die Pulsfläche (A; engl.: area) der Signale des Fluoreszenzfarbstoffs Phycoerythrin (PE) der verwendeten Antikörper und auf der Y-Achse jeweils die gemessene Ereignisanzahl (engl.: Event Count). Abgebildet sind jeweils die Histogramme der Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-540, L-1236 und KM-H2 für die durchflusszytometrischen Versuche mit PE-IgG1-Isotyp-Kontroll-Antikörper und mit PE-Anti-PD-L1-Antikörper sowie mit PE-Anti-PD-L1-Antikörper unter 24-Stunden-, 48-Stunden- und 72-Stunden-langer IFN-γ-Stimulation. Exemplarisch sind lediglich die Histogramme für den ersten Versuchsdurchlauf gezeigt.

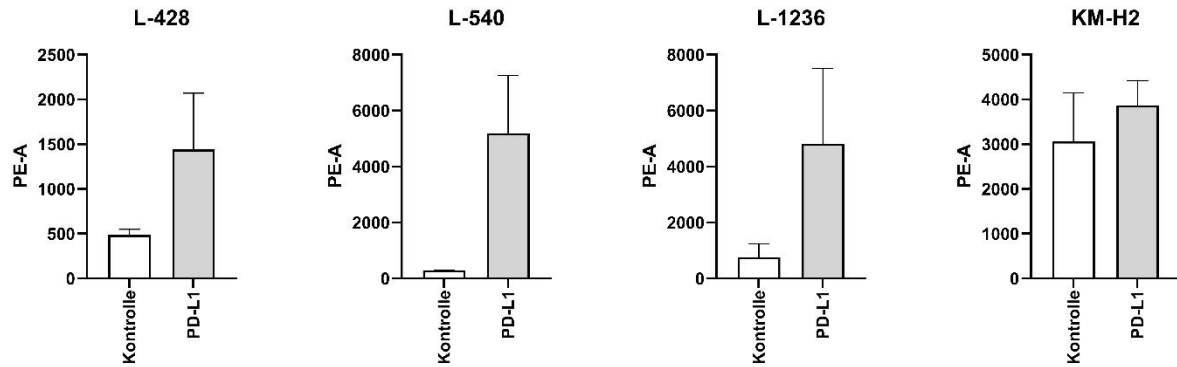


Abbildung 4: Basale PD-L1-Expression

Dargestellt ist auf der Y-Achse (PE-A) jeweils die Pulsfläche (A; engl.: area) der Signale des Fluoreszenzfarbstoffs Phycoerythrin (PE) der verwendeten Antikörper. Für die Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-540, L-1236 und KM-H2 sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Messungen mit dem PE-Anti-PD-L1-Antikörper (PD-L1) und der Kontrollmessungen mit dem PE-IgG1-Isotyp-Kontroll-Antikörper (Kontrolle) gegenübergestellt. n = 3.

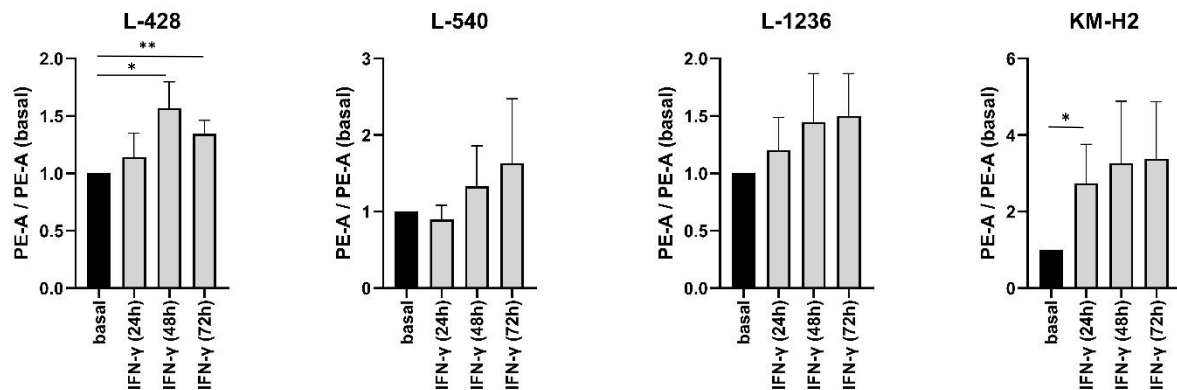


Abbildung 5: PD-L1-Expression nach Stimulation mit IFN-γ

Dargestellt ist auf der Y-Achse (PE-A / PE-A (basal)) jeweils der PE-A-Wert dividiert durch den PE-A-Wert der basalen Zellen ohne Zusatz von IFN-γ. Somit zeigen die Balken der jeweiligen Messungen mit 24-Stunden-, 48-Stunden- und 72-Stunden-langer IFN-γ-Stimulation die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der PD-L1-Signalwertzunahme im Vergleich zu den basalen Zellen für die Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-540, L-1236 und KM-H2.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %. Die statistische Signifikanz wird wie folgt interpretiert: p-Wert $\geq 0,05$: ns (nicht signifikant); p-Wert $< 0,05$: *; p-Wert $< 0,01$: **; p-Wert $< 0,001$: ***; p-Wert $< 0,0001$: ****. n = 3.

4.2. Einfluss von PBMCs und Einfluss von löslichem PD-1 auf die Proliferation der HRS-Zellen

Im Anschluss an die durchflusszytometrischen Versuche zur Beurteilung der PD-L1-Expression auf der Oberfläche der HRS-Zellen erfolgten die mittels Lumineszenzmessung durchgeführten Versuche zur Beurteilung der Zellproliferation unter dem Einfluss von PBMCs sowie unter dem Einfluss von löslichem PD-1.

Die Versuche zur Zellproliferation unter Einfluss von PBMCs zeigten für alle vier untersuchten klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien durchschnittlich einen stimulierenden Effekt der PBMCs auf die Zellproliferation (Abbildung 6). In den Versuchsdurchläufen mit nährstoffreichem Nährmedium (Abbildung 6 – links) zeigte sich dieser Proliferationsstimulus bei allen Zelllinien nach 72 Stunden statistisch signifikant im Vergleich zur Proliferation der basalen Zellen ohne Einflussfaktor. Bei den Zelllinien L-428 und L-540 zeigte sich dieser Proliferationsstimulus auch bereits nach 48 Stunden statistisch signifikant. Die höchste statistische Signifikanz konnte für die Zelllinie L-540 mit einem p-Wert von $<0,0001$ sowohl nach 48 Stunden als auch nach 72 Stunden verzeichnet werden. Bei den Zelllinien L-1236 und KM-H2 zeigte sich lediglich nach 72 Stunden ein statistisch signifikanter Proliferationsstimulus durch den Einfluss von PBMCs. Auch unter Nährstoffmangelbedingungen (Abbildung 6 – rechts) zeigte sich durchschnittlich ein stimulierender Effekt der PBMCs auf die Proliferation der HRS-Zellen. Vor allem bei der Zelllinie L-428, aber auch bei der Zelllinie KM-H2 amplifizierten sich diese proliferationsstimulierenden Auswirkungen unter Nährstoffmangelbedingungen im Vergleich zu den Ergebnissen in nährstoffreichem Nährmedium. Besonders hervorzuheben ist die Beobachtung, dass die Zellen unter dem Einfluss von PBMCs auch nach 72 Stunden weiter proliferierten, während die Zellzahl der basalen Zellen ohne PBMC-Einfluss bereits wieder abgenommen hat. Dieses zeigte sich unter Nährstoffmangelbedingungen bei den Zelllinien L-428, L-540 und KM-H2. Hier zeigte der t-Test für alle drei Zelllinien jeweils nach 48 Stunden und nach 72 Stunden eine statistische Signifikanz an. Nur bei der Zelllinie L-1236 zeigte sich nach 72 Stunden durch den Einfluss von PBMCs wie bei den basalen Zellen ohne Einflussfaktor keine weitere Zellproliferation mehr.

Die Ergebnisse des Einflusses von löslichem PD-1 auf die Proliferation der HRS-Zellen zeigten lediglich für die klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428 und L-540 durchschnittlich einen proliferationsstimulierenden Effekt (Abbildung 6). Bei den Versuchen mit nährstoffreichem Nährmedium zeigte sich dieser bei der Zelllinie L-428 nach 72 Stunden und bei der Zelllinie L-540 nach 48- und nach 72-Stunden als statistisch signifikant (Abbildung 6 – links). Unter Nährstoffmangelbedingungen (Abbildung 6 – rechts) verstärkte sich der

Proliferationsstimulus vor allem bei den Zellen der Zelllinie L-428. Hier ergab sich sowohl nach 48-Stunden als auch nach 72-Stunden ein Proliferationsstimulus mit jeweils hoher statistischer Signifikanz mit einem p-Wert von $<0,0001$. Zusätzlich konnte für diese Zelllinie – analog zur den Ergebnissen des Einflusses von PBMCs – eine weitere Zunahme der Zellproliferation nach 72 Stunden verzeichnet werden, während die Zellzahl der basalen Zellen ohne Einflussfaktor bereits wieder abgenommen hat. Für die Zelllinien L-1236 und KM-H2 konnte in den Versuchsreihen auch unter Nährstoffmangelbedingungen kein signifikanter Einfluss von löslichem PD-1 auf die Zellproliferation festgestellt werden.

Im Vergleich der beiden Einflussfaktoren PBMCs und löslicher PD-1 zeigte sich hauptsächlich bei den Zellen der Zelllinien L-428 und L-540 für beide Einflussfaktoren ein signifikanter stimulierender Effekt auf die Zellproliferation. Darunter konnte lediglich für die Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L-428 ein vergleichbarer Einfluss durch löslichen PD-1 wie durch PBMCs festgestellt werden.

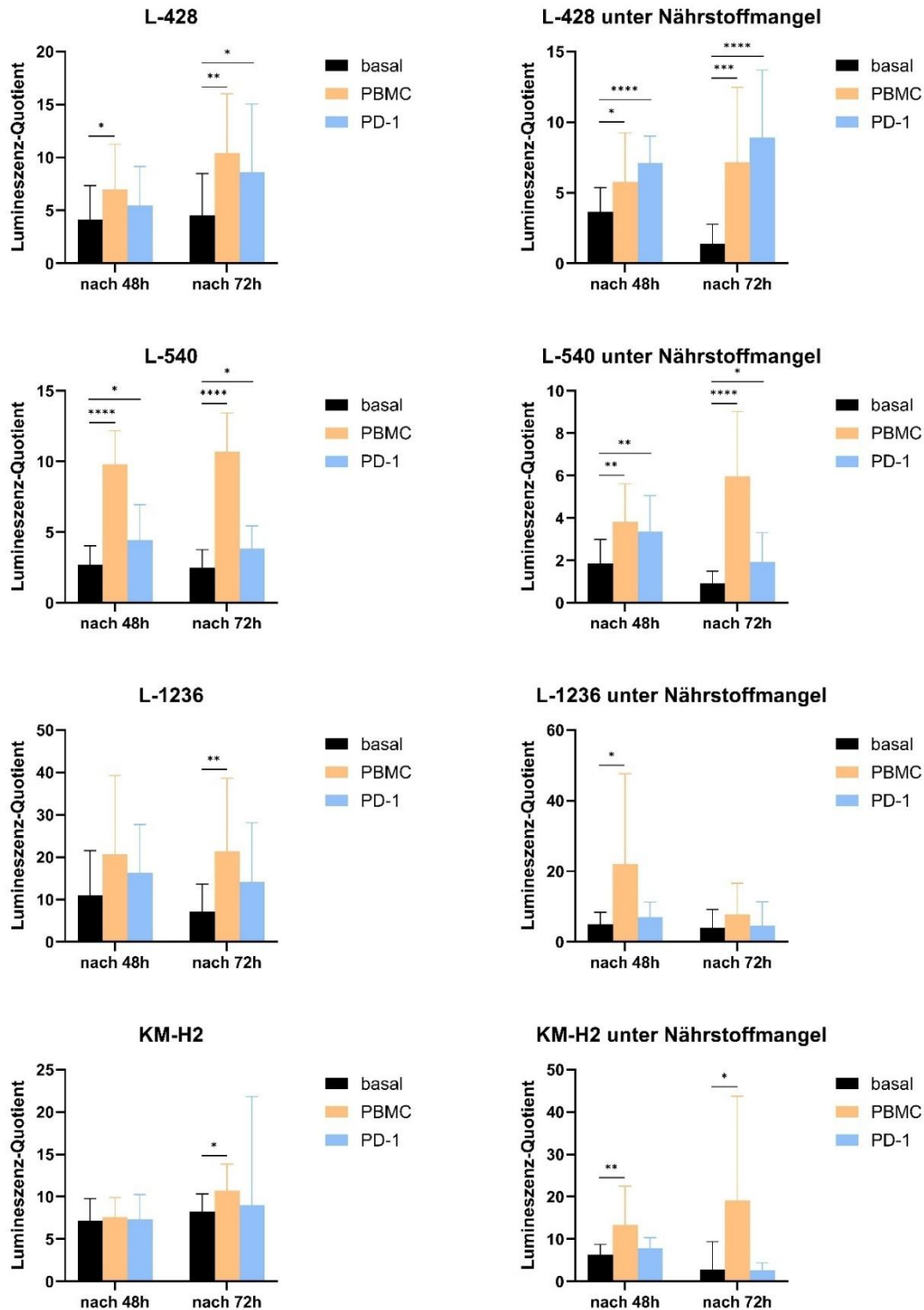


Abbildung 6: Zellproliferation unter dem Einfluss von PBMCs und von löslichem PD-1

Dargestellt ist auf der Y-Achse (Lumineszenz-Quotient) jeweils der gemessene Lumineszenzwert dividiert durch den jeweiligen an Stunde 0 gemessenen Referenzwert. Somit zeigen die Balken jeweils die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Proliferationsveränderung in Bezug auf den Referenzwert zu Stunde 0. Die Diagramme zeigen den Einfluss von PBMCs sowie von löslichem PD-1 im Vergleich zu den basalen Zellen ohne Einflussfaktor jeweils nach 48 Stunden und nach 72 Stunden für die Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-540, L-1236 und KM-H2.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %. Die statistische Signifikanz wird wie folgt interpretiert: p-Wert $\geq 0,05$: ns (nicht signifikant); p-Wert $< 0,05$: *; p-Wert $< 0,01$: **; p-Wert $< 0,001$: ***; p-Wert $< 0,0001$: ****. n = 3 mit jeweils 5 technischen Replikaten.

links: in Nährmedium mit 9 % FBS. rechts: unter Nährstoffmangel in Nährmedium mit 1 % FBS.

4.3. Einfluss von löslichem PD-1 in Kombination mit Nivolumab auf die Proliferation der HRS-Zellen

Aufgrund der in den vorherigen Versuchen hauptsächlich bei der Zelllinie L-428 feststellbaren Proliferationsveränderungen durch den Einfluss von löslichem PD-1, wurden die Versuche mit löslichem PD-1 in Kombination mit Nivolumab ausschließlich mit dieser klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinie sowie ausschließlich unter Nährstoffmangelbedingungen durchgeführt.

Es zeigte sich durch die Kombination von löslichem PD-1 mit Nivolumab kein signifikanter Proliferationsunterschied mehr zu den basalen Zellen ohne Einflussfaktor. Der stimulierende Effekt, der durch die Zugabe von löslichem PD-1 feststellbar war, zeigte sich in der Kombination von löslichem PD-1 mit Nivolumab nicht mehr. Auch die weitere Proliferationszunahme nach 72 Stunden blieb durch die Kombination mit Nivolumab aus. Analog zu den basalen Zellen ohne Einflussfaktor nahm die Zellzahl nach 72 Stunden durch die Kombination von löslichem PD-1 mit Nivolumab wieder ab, während sie durch alleinigen Einfluss von löslichem PD-1 statistisch signifikant weiter anstieg (Abbildung 7).

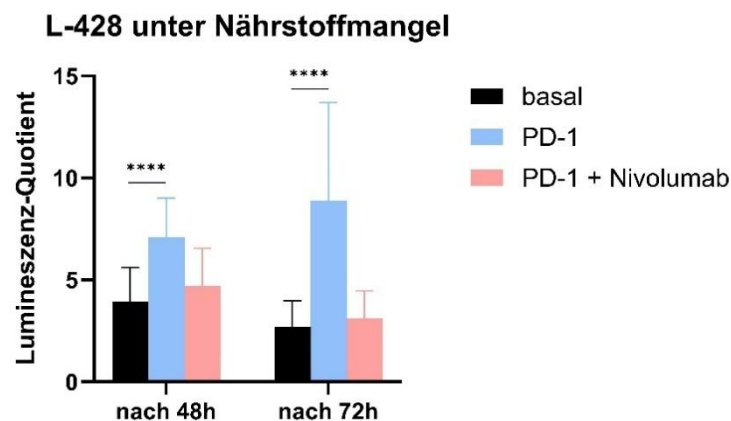


Abbildung 7: Zellproliferation unter dem Einfluss von löslichem PD-1 und von löslichem PD-1 + Nivolumab
Dargestellt ist auf der Y-Achse (Lumineszenz-Quotient) jeweils der gemessene Lumineszenzwert dividiert durch den jeweiligen an Stunde 0 gemessenen Referenzwert. Somit zeigen die Balken jeweils die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Proliferationsveränderung in Bezug auf den Referenzwert zu Stunde 0. Die Diagramme zeigen den Einfluss von löslichem PD-1 sowie von löslichem PD-1 in Kombination mit Nivolumab im Vergleich zu den basalen Zellen ohne Einflussfaktor jeweils nach 48 Stunden und nach 72 Stunden für die Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L-428.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %. Die statistische Signifikanz wird wie folgt interpretiert: p-Wert $\geq 0,05$: ns (nicht signifikant); p-Wert $< 0,05$: *; p-Wert $< 0,01$: **; p-Wert $< 0,001$: ***; p-Wert $< 0,0001$: ****. n = 3 mit jeweils 5 technischen Replikaten.

Unter Nährstoffmangel in Nährmedium mit 1 % FBS.

4.4. Überblick über die Ergebnisse der Zelllinie L-428

Im Rahmen der Fragestellung dieser Arbeit sind die Ergebnisse der Versuchsreihen mit der klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L-428 besonders hervorzuheben.

In den durchflusszytometrischen Versuchen der Zelllinie L-428 zeigte sich ein PD-L1-Signal, welches unter Inkubation mit IFN- γ statistisch signifikant verstärkt wurde (Abbildung 5 – links). Als zusammenfassende Übersicht über die Ergebnisse der Proliverationsversuche mit den HRS-Zellen der Zelllinie L-428 zeigt Abbildung 8 die Proliferationsveränderungen der Zellen unter den in dieser Arbeit untersuchten Einflüssen als Kurvendiagramm. Die Diagramme zeigen jeweils den Verlauf der Proliferationsveränderungen zu allen vier Messzeitpunkten über den gesamten Messzeitraum von 72 Stunden. Das Kurvendiagramm zu den Versuchsreihen mit PBMCs und mit löslichem PD-1 verdeutlicht den stimulierenden Einfluss dieser beiden Faktoren auf die Proliferation der HRS-Zellen im Vergleich zu den basalen Zellen (Abbildung 8 – oben). Das zugehörige Kurvendiagramm mit den Daten der unter Nährstoffmangel durchgeführten Versuche hebt zudem hervor, dass die basalen Zellen ohne Einflussfaktor nach 72 Stunden bereits absterben, während die Zellen mit dem jeweiligen Einflussfaktor – PBMCs oder löslichem PD-1 – auch nach 72 Stunden weiterhin proliferieren (Abbildung 8 – Mitte). Insgesamt zeigt sich im Vergleich der Kurven für die Zellen der Zelllinie L-428 ein ähnlicher Proliferationseinfluss durch löslichen PD-1 wie durch PBMCs. Das Kurvendiagramm mit den Ergebnissen der Versuche mit löslichem PD-1 sowie mit löslichem PD-1 in Kombination mit dem Anti-PD-1-Antikörper Nivolumab zeigt dahingegen durch die Zugabe von Nivolumab keinen Unterschied mehr in der Proliferation im Vergleich zu den basalen Zellen ohne Einflussfaktor. Der stimulierende Effekt durch den alleinigen Einfluss von löslichem PD-1 wird durch die Kombination mit Nivolumab aufgehoben und es zeigt sich ein ähnlicher Proliferationsverlauf wie bei den basalen Zellen ohne Einflussfaktor (Abbildung 8 – unten).

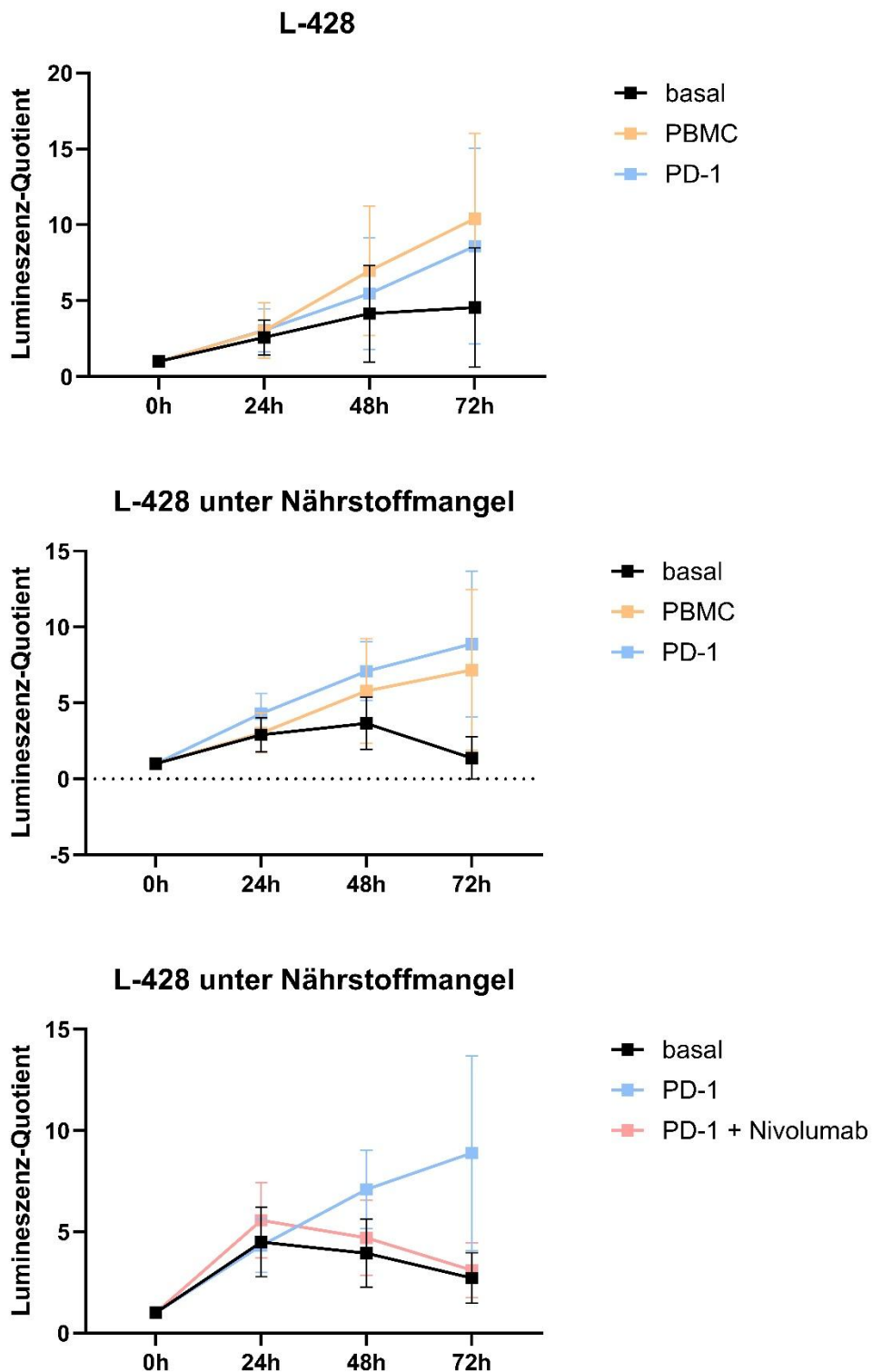


Abbildung 8: Überblick über die Proliferationsveränderungen der Zelllinie L-428

Dargestellt ist auf der Y-Achse (Lumineszenz-Quotient) jeweils der gemessene Lumineszenzwert dividiert durch den jeweiligen an Stunde 0 gemessenen Referenzwert. Die Kurven zeigen jeweils die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Proliferationsveränderung in Bezug auf den Referenzwert zu Stunde 0. Die Diagramme zeigen jeweils den Einfluss von PBMCs, löslichem PD-1 und löslichem PD-1 in Kombination mit Nivolumab im Vergleich zu den basalen Zellen ohne Einflussfaktor jeweils nach 0 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden für die Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L-428. n = 3 mit jeweils 5 technischen Replikaten. oben: in Nährmedium mit 9 % FBS. Mitte und unten: unter Nährstoffmangel in Nährmedium mit 1 % FBS.

In Tabelle 12 sind zusammenfassend die p-Werte sowie die entsprechende statistische Signifikanz als Ergebnisse der statistischen Auswertung der Proliferationsversuche mit den HRS-Zellen der Zelllinie L-428 aufgelistet. Der Tabelle kann entnommen werden, dass der Einfluss von PBMCs und von löslichem PD-1 eine statistisch signifikante Proliferationssteigerung bewirkt. Unter Nährstoffmangelbedingungen (Tabelle 12 – rechts) zeigt sich dieser signifikante Einfluss verstärkt mit höherer statistischer Signifikanz. Ein solcher signifikanter Proliferationsstimulus zeigt sich durch die Kombination von löslichem PD-1 mit Nivolumab nicht mehr.

Tabelle 12: Überblick über die statistische Auswertung der Proliferationsversuche der Zelllinie L-428

Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %. Die statistische Signifikanz wird wie folgt interpretiert: p-Wert $\geq 0,05$: ns (nicht signifikant); p-Wert $< 0,05$: *; p-Wert $< 0,01$: **; p-Wert $< 0,001$: ***; p-Wert $< 0,0001$: ****. n = 3 mit jeweils 5 technischen Replikaten.

links: in Nährmedium mit 9 % FBS. rechts: unter Nährstoffmangel in Nährmedium mit 1 % FBS.

	unter Nährstoffmangel			
	p-Wert	Signifikanz	p-Wert	Signifikanz
basal vs. PBMC				
Nach 48 Stunden	0,0497	*	0,0417	*
Nach 72 Stunden	0,0026	**	0,0003	***
basal vs. PD-1				
Nach 48 Stunden	0,3041	ns	$< 0,0001$	****
Nach 72 Stunden	0,0473	*	$< 0,0001$	****
basal vs. PD-1 + Nivolumab				
Nach 48 Stunden	/	/	0,2477	ns
Nach 72 Stunden	/	/	0,4258	ns

5. Diskussion

5.1. Die klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-540, L-1236 und KM-H2 tragen den Liganden PD-L1 auf ihrer Oberfläche

Wie in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt ist, zeigten alle vier untersuchten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien in der Durchflusszytometrie ein entsprechendes Fluoreszenzsignal durch die Bindung des PE-Anti-PD-L1-Antikörpers. Somit konnte zu Beginn dieser Arbeit verifiziert werden, dass die verwendeten klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien – L-428, L-540, L-1236 und KM-H2 – den Liganden PD-L1 auf ihrer Oberfläche tragen. Der Nachweis dieses Liganden auf der Zelloberfläche der für diese Arbeit verwendeten Zelllinien legitimiert die in der Folge durchgeführten Versuche zur Untersuchung der Auswirkungen der PD-1/PD-L1-Interaktion auf die Zellproliferation.

Der PD-L1-Fluoreszenzwert bei den drei Zelllinien L-428, L-540 und L-1236 war jeweils um ein Vielfaches höher als das Signal der Kontrollmessungen mittels PE-IgG1-Isotyp-Kontroll-Antikörper. Somit kann von einer spezifischen Bindung des PE-Anti-PD-L1-Antikörpers und damit von einer bereits hohen basalen Oberflächen-PD-L1-Dichte ausgegangen werden. Die Messungen der Zelllinie KM-H2 zeigten im Säulendiagramm der jeweiligen arithmetischen Mittelwerte (Abbildung 4) nur eine geringe Differenz gegenüber den Fluoreszenzwerten der Kontrollmessungen. Dies impliziert eine hohe Autofluoreszenz der KM-H2-Zellen oder eine unspezifische Bindung der FACS-Antikörper. Dadurch kann im Vergleich zu den drei anderen Zelllinien von einer eher geringeren basalen PD-L1-Dichte auf der Zelloberfläche ausgegangen werden. Zusätzlich zeigte das Dotplot-Diagramm dieser Zelllinie (Abbildung 2) zwei in Zellgröße und Granularität unterschiedliche Zellpopulationen. Unter Berücksichtigung der Histogramme dieser Zelllinie (Abbildung 3) scheint vor allem die im Dotplot-Diagramm diffuser verteilte Zellpopulation (rechter Peak im Histogramm) basal den Liganden PD-L1 auf der Oberfläche zu tragen.

Die Expression von PD-L1 auf der Zelloberfläche von Tumorzellen ist bereits seit längerem bekannt. Beispielsweise konnte in einer Arbeit aus dem Jahr 2002 von Dong et al. der Ligand PD-L1 auf der Oberfläche von Lungenkarzinom- und Ovarialkarzinom-Zellen nachgewiesen werden.⁸⁸ Die Expression und oft Überexpression von PD-L1 auf der Zelloberfläche der HRS-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms ist ebenfalls – wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit ausgeführt – schon seit längerem bekannt. In den meisten Fällen ist dies auf eine Amplifikation des Genabschnittes 9p24.1 zurückzuführen.³⁶ Auch für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien ist das Vorhandensein des Liganden PD-L1 auf der Zelloberfläche beschrieben worden. So arbeitete das Team um Jalali

et al. in einer Publikation aus dem Jahr 2019 unter anderem mit den Zelllinien L-428, L-540 und KM-H2 und konnte ebenfalls mittels Durchflusszytometrie unter Berücksichtigung einer Isotyp-Kontrolle die Expression von PD-L1 auf der Zelloberfläche nachweisen. Auch hier zeigte sich die geringste Differenz zur Isotyp-Kontrolle bei den Ergebnissen der Zelllinie KM-H2.⁸⁹ Bereits zuvor im Jahr 2010 konnte durch eine Arbeit von Green et al. für die vier klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-540, L-1236 und KM-H2 die verstärkte PD-L1-Expression auf die Amplifikation des Genabschnittes 9p24.1 zurückgeführt werden.³⁶

5.2. IFN- γ scheint die PD-L1-Expression in HRS-Zellen stimulieren zu können

Es konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation der HRS-Zellen mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IFN- γ die durchflusszytometrischen Fluoreszenzsignalwerte durch den PE-Anti-PD-L1-Antikörper durchschnittlich bei allen vier untersuchten klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien erhöht (Abbildung 3 und 5). Folglich scheint IFN- γ die Expression des Liganden PD-L1 auf der Zelloberfläche der HRS-Zellen stimulieren zu können. Eine statistische Signifikanz zeigte sich hier jedoch lediglich bei den Zellen der Zelllinie L-428 nach 48-Stunden- und 72-Stunden-langer sowie bei den Zellen der Zelllinie KM-H2 nach 24-Stunden-langer Inkubation mit IFN- γ .

Die Expressions-stimulierende Wirkung von IFN- γ scheint dabei tendenziell innerhalb der ersten 48 Stunden ein Maximum zu erreichen. Die durchschnittlich größte Steigerung der PD-L1-Zunahme durch IFN- γ konnte insgesamt bei der Zelllinie KM-H2 festgestellt werden. Betrachtet man die Ergebnisse der im Vergleich geringen basalen PD-L1-Expression der Zelllinie KM-H2 (Abbildung 3 und 4) in Zusammenhang mit der durch IFN- γ stimulierten PD-L1-Expression (Abbildung 3 und 5), lässt sich daraus schließen, dass die stimulierende Wirkung von IFN- γ auf die PD-L1-Expression vor allem in denjenigen Zellen verstärkt zu sein scheint, die basal nur eine geringere PD-L1-Expression aufweisen. Dabei ist jedoch auch hier zu berücksichtigen, dass die Zellen der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie KM-H2 im Dotplot-Diagramm (Abbildung 2) zwei in Zellgröße und Granularität unterschiedliche Zellpopulationen aufzeigen. Unter Berücksichtigung der Histogramme dieser Zelllinie (Abbildung 3) scheinen zwar beide Zellpopulationen eine Stimulation der PD-L1-Dichte auf der Zelloberfläche durch Inkubation mit IFN- γ zu erfahren, vor allem scheint jedoch die im Dotplot-Diagramm diffuser verteilte Zellpopulation (rechter Peak im Histogramm) eine stärkere Stimulation der PD-L1-Oberflächenexpression zu zeigen. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass sich bei dieser Zelllinie lediglich nach 24-Stunden-langer IFN- γ -Inkubation ein statistisch signifikanter PD-L1-Signalwertanstieg zeigte (Abbildung 5).

Insgesamt scheint sich die Erkenntnis vieler anderer Arbeiten, dass das Zytokin IFN- γ die Expression des Liganden PD-L1 auf der Zelloberfläche stimuliert, zu bestätigen. Hauptsächlich ist dieses bisher für solide Tumorentitäten gezeigt worden. So konnte von Dong et al. im Jahr 2002 eine durch IFN- γ induzierte PD-L1-Expression in Tumorzellen vom Lungenkarzinom, Ovarialkarzinom, Melanom und Kolonkarzinom nachgewiesen werden.⁸⁸ Auch in einer Arbeit von Lee et al. aus dem Jahr 2006 konnte eine Induktion der PD-L1-Expression in verschiedenen soliden Tumorzellen gezeigt werden. Zusätzlich konnte hier nachgewiesen werden, dass der Transkriptionsfaktor IRF-1 (engl.: interferon regulatory factor 1) nicht nur für die kontinuierliche PD-L1-Expression, sondern auch für die durch IFN- γ induzierte Überexpression von PD-L1 eine entscheidende Rolle spielt.⁵³ Dabei scheint IFN- γ über die JAK/STAT-Signalkaskade – die in vielen Tumorzellen, so auch in HRS-Zellen meist kontinuierlich aktiviert ist³³ – die Expression von IRF-1 und IRF-1 folglich die Expression von PD-L1 zu induzieren.⁹⁰ Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen auch für Zelllinien des klassischen Hodgkin-Lymphoms eine Stimulation der PD-L1-Expression auf der Zelloberfläche durch IFN- γ vermuten.

Typischerweise ist IFN- γ ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches unter anderem von aktivierten T-Zellen ausgeschüttet wird und die Immunreaktion unterstützt sowie in Tumorzellen eine vermehrte Antigen-Präsentation bewirkt – IFN- γ wird somit eine Antitumor-Wirkung zugeschrieben und ist im Tumormilieu ubiquitär vorhanden.^{91,92} Die Anpassung von Tumorzellen wie den HRS-Zellen an das umgebende Milieu sowie an die gegen sie gerichtete Immunreaktion und die Nutzung dieser für eigene Umgehungsmechanismen einer Antitumor-Immunreaktion wie die Expression des Liganden PD-L1 auf der Zelloberfläche zeigt die raffinierten Strategien von Tumorzellen zum Überleben im umgebenden Gewebe.

5.3. Der Kontakt zu PBMCs stimuliert die Proliferation der HRS-Zellen

Die Ergebnisse zum Proliferationseinfluss von PBMCs auf die HRS-Zellen zeigten für alle vier untersuchten klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien durchschnittlich einen stimulierenden Effekt der PBMCs auf die Zellproliferation (Abbildung 6, Abbildung 8). Dieser stimulierende Effekt amplifizierte sich bei drei (L-428, L-540 und KM-H2) der vier Zelllinien unter nährstoffarmen Bedingungen (Abbildung 6 – rechts, Abbildung 8 – Mitte). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass der Kontakt der HRS-Zellen zu den PBMCs – Zellen, die den Großteil der zellulären Tumormasse des klassischen Hodgkin-Lymphoms und der direkten Mikroumgebung der HRS-Zellen *in vivo* ausmachen⁴ – einen Proliferationsstimulus für die HRS-Zellen bewirkt.

Bei drei (L-428, L-540 und KM-H2) der vier untersuchten Zelllinien zeigte sich außerdem in den Versuchsreihen unter Nährstoffmangelbedingungen eine weitere Zunahme der Zellproliferation unter dem Einfluss von PBMCs, während die Zellzahl der basalen Zellen ohne Einflussfaktor bereits wieder abgenommen hat (Abbildung 6 – rechts, Abbildung 8 – Mitte). Somit zeigt sich der Proliferationsstimulus auf die HRS-Zellen durch die PBMCs unter Nährstoffmangelbedingungen – ähnlich den *in vivo* herrschenden Bedingungen in hochproliferativem Gewebe – besonders stark. Der Effekt wirkt hier dem Zelluntergang durch Nährstoffmangel – wie bei den basalen Zellen ohne Einflussfaktor – entgegen und führt zu einer weiteren Zellproliferation.

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, sind die HRS-Zellen dazu in der Lage, hauptsächlich durch die Exkretion von bestimmten Chemokinen, ihre zelluläre Mikroumgebung selbst zu formen.^{37,38} Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erneut auf, dass die Zellen der direkten Mikroumgebung der Hodgkin-Lymphom-Zellen – hier repräsentiert durch die PBMCs – nicht nur passive Zuschauerzellen sind, sondern einen aktiven Teil des Tumordinfiltrates ausmachen und die Proliferation der HRS-Zellen stimulieren. Die HRS-Zellen formen sich somit ein sie selbst unterstützendes Milieu in ihrer direkten Mikroumgebung.

5.4. Der Effekt der PBMCs auf die Proliferation der HRS-Zellen kann auf die PD-1/PD-L1-Interaktion zurückzuführen sein

Um zu evaluieren, ob der Effekt der PBMCs auf die Proliferation der HRS-Zellen auf die PD-1/PD-L1-Interaktion zurückzuführen sein kann, wurde anschließend die Zellproliferation unter direktem Einfluss von löslichem PD-1 untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen zeigten für zwei (L-428 und L-540) der vier untersuchten klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien einen stimulierenden Effekt auf die Zellproliferation, wobei sich der Einfluss bei einer der Zelllinien (L-428) analog dem Einfluss von PBMCs zeigte (Abbildung 6, Abbildung 8). Auch hier amplifizierte sich der stimulierende Effekt unter nährstoffarmen Bedingungen. Es konnte durch den Einfluss von löslichem PD-1 unter Nährstoffmangelbedingungen – ebenfalls wie durch den Einfluss von PBMCs – eine weitere Zunahme der Zellzahl auch nach 72 Stunden beobachtet werden, während die Zellzahl der basalen Zellen ohne Einflussfaktor bereits wieder abgenommen hat (Abbildung 6 – rechts, Abbildung 8 – Mitte). Die erhobenen Ergebnisse zeigen somit – wenn auch nicht für alle untersuchten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien –, dass der Effekt der Stimulation der Zellproliferation durch den Einfluss von PBMCs auf die PD-1/PD-L1-Interaktion zurückzuführen sein kann. Zu beachten ist hier jedoch, dass lediglich ein Vergleich der Proliferationsauswirkungen der beiden Einflussfaktoren erfolgt ist. Ein

kausaler Zusammenhang zum Mechanismus des Proliferationseinflusses durch PBMCs lässt sich hieraus nicht direkt ableiten.

Typischerweise resultiert eine Liganden-Rezeptor-Bindung in einem Effekt in der Rezeptor-tragenden Zelle. Dementsprechend wird in der Literatur der Bindung des Liganden PD-L1 an den PD-1-Rezeptor hauptsächlich einen Effekt in der PD-1-tragenden CD8⁺-zytotoxischen T-Zelle und hierdurch eine Umgehung einer Antitumor-Immunantwort zugeschrieben.⁵⁷ Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, stellt dies jedoch möglicherweise nicht die einzige Auswirkung der PD-1/PD-L1-Interaktion dar. Es wird scheinbar nicht nur unidirektional in der den PD-1-Rezeptor tragenden Zelle eine Signalkaskade ausgelöst, sondern ebenfalls in der den PD-L1-tragenden HRS-Zelle. Somit könnte die PD-1/PD-L1-Interaktion mit einer bidirektionalen Signaltransduktion einhergehen und den Tumorzellen simultan mehrere für sie vorteilhafte Auswirkungen bieten (Abbildung 9).

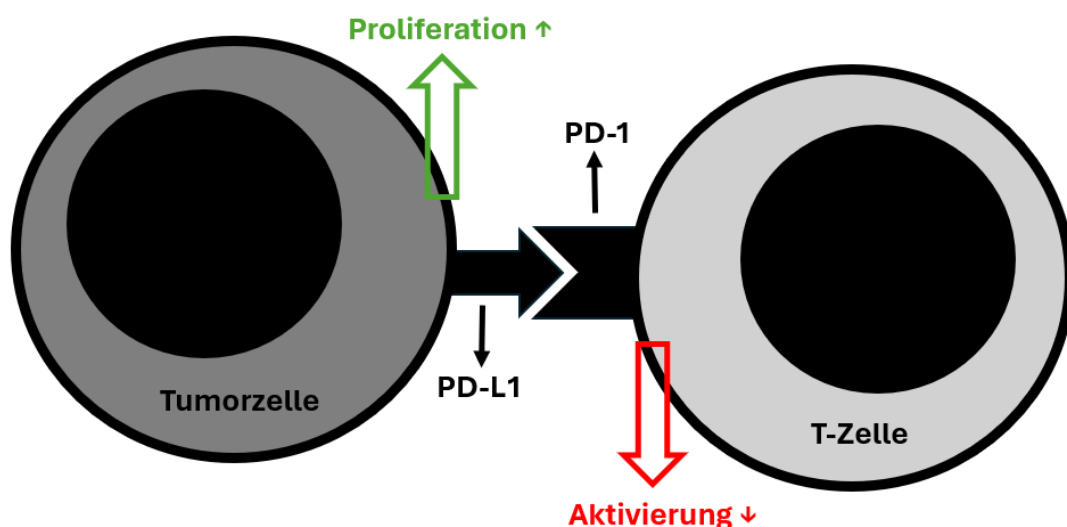


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer bidirektionalen PD-1/PD-L1-Interaktion

Schematische Darstellung der möglichen bidirektionalen PD-1/PD-L1-Interaktion entsprechend den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L-428. Die PD-1/PD-L1-Interaktion führt hier nicht nur zu einer wie in der Literatur hauptsächlich beschriebenen verminderten Aktivierung der PD-1-tragenden T-Zelle, sondern bidirektional zusätzlich zu einer Proliferationsstimulation in der PD-L1-tragenden Tumorzelle. (Quelle: eigene Darstellung)

Zu vergleichbaren Ergebnissen sind auch andere Arbeiten gekommen. Jalali et al. beschreiben in der Arbeit mit dem Titel „Reverse signaling via PD-L1 supports malignant cell growth and survival in classical Hodgkin lymphoma“⁸⁹ aus dem Jahr 2019 ihre Ergebnisse, in denen ebenfalls bestätigt wird, dass die PD-1/PD-L1-Interaktion zur einer Proliferationsstimulation der PD-L1-tragenden HRS-Zellen führt. Hier wurden unter anderem auch die in dieser Arbeit untersuchten klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-540

und KM-H2 verwendet. Die intrazelluläre Signaltransduktion über PD-L1 scheint den Zellzyklus- und proliferationsregulierenden MAPK-Signalweg (engl.: mitogen-activated protein kinase) sowie die mitochondriale Energieversorgung der Zelle zu beeinflussen. Die Level der phosphorylierten Kinasen p-P38 und p-ERK (engl.: extracellular signal-regulated kinase) des MAPK-Signalweges werden durch agonistische Bindung an PD-L1 reduziert, was die Proliferation der HRS-Zellen stimuliert und vor Apoptose schützt.⁸⁹ Umgekehrt konnte in einer Arbeit von Liu et al. gezeigt werden, dass antagonistische PD-L1-Antikörper das intrazelluläre Level der phosphorylierten MAPK-Kinase p-P38 erhöhen und folglich zur Apoptose führen.⁹³ Daraus lässt sich ableiten, dass Zellproliferation sowie Zellüberleben und der MAPK-Signalweg umgekehrt miteinander korrelieren.⁸⁹ Möglicherweise lassen sich hierdurch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse erklären, dass in den Versuchen unter Nährstoffmangelbedingungen vor allem bei einer der untersuchten klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (L-428) die Zellen durch agonistische PD-L1-Interaktion – mutmaßlich durch den Einfluss von PBMCs beziehungsweise direkt durch den Einfluss von löslichem PD-1 – auch nach 72 Stunden weiter proliferierten, während die Zellzahl der basalen Zellen ohne Einflussfaktor bereits wieder abgenommen hat (Abbildung 6 – rechts, Abbildung 8 – Mitte).

Darüber hinaus konnte das Team um Jalali et al. zeigen, dass am Hodgkin-Lymphom erkrankte Patienten ein signifikant erhöhtes Serumlevel von löslichem PD-1 aufweisen.⁸⁹ Für andere Krebserkrankungen ist die prognostische Relevanz des löslichen PD-1-Levels im Blut bereits bekannt.⁹⁴ Unter Anbetracht der Erkenntnisse zur bidirektionalen Signaltransduktion über die PD-1/PD-L1-Interaktion und dass nicht nur der Zellmembran-gebundene PD-1-Rezeptor sondern auch löslicher PD-1 die Signaltransduktion in den PD-L1-tragenden Zellen auslösen kann, lassen sich die prognostischen Auswirkungen von löslichem PD-1 im Blutkreislauf der Patienten genauer verstehen.

5.5. Die Blockade der PD-1/PD-L1-Interaktion durch Nivolumab kann den Effekt der PD-1/PD-L1-Interaktion auf die Proliferation der HRS-Zellen aufheben

Am Ende dieser Arbeit ist untersucht worden, inwieweit der stimulierende Effekt von löslichem PD-1 – also die Auswirkungen der PD-1/PD-L1-Interaktion – auf die HRS-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms durch die Zugabe des Wirkstoffs Nivolumab – einem Anti-PD-1-Antikörper – aufgehoben werden. Die Ergebnisse der dafür durchgeführten Versuchsreihen zeigten für die hierzu untersuchte Zelllinie (L-428), dass die durch den Einfluss von löslichem PD-1 hervorgerufene Proliferationsstimulation durch die Kombination mit Nivolumab aufgehoben wird (Abbildung 7, Abbildung 8 - unten). Dementsprechend kann der

Wirkstoff Nivolumab hier die Auswirkungen der PD-1/PD-L1-Interaktion auf die Proliferation der HRS-Zellen unterbinden.

Immuncheckpoint-Inhibitoren wie der Anti-PD-1-Antikörper Nivolumab sind mittlerweile bereits seit einiger Zeit klinisch etabliert und haben Einzug in die Leitlinie der Therapie des klassischen Hodgkin-Lymphoms erhalten.⁵ Trotz der bereits vielfach bewiesenen klinischen Therapieeffektivität dieser Wirkstoffe⁶⁵⁻⁷¹, scheint der implizierte Wirkmechanismus der Unterbindung der Unterdrückung einer Antitumor-Immunantwort und damit der Zuordnung dieser Therapiemodalität zur Immuntherapie nicht der alleinige therapeutische Effekt einer PD-1/PD-L1-Blockade zu sein. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, trägt die Unterbindung einer Proliferationsstimulation vermittelt durch die PD-1/PD-L1-Interaktion in der PD-L1-tragenden HRS-Zelle möglicherweise zusätzlich zur Wirkung und Effektivität des Anti-PD-1-Antikörpers Nivolumab bei. Auch andere Arbeiten, wie die aus dem Team um Jalali et al. konnten diese Annahme bereits bestätigen.⁸⁹ Hierdurch ändert beziehungsweise erweitert sich das Verständnis dieser therapeutisch bedeutsamen Zielstruktur.

5.6. Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien

Die in dieser Arbeit erhobenen Erkenntnisse konnten nicht immer für alle vier untersuchten klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien gezeigt werden. So sind im Rahmen der Fragestellung dieser Arbeit besonders die Ergebnisse einer der vier untersuchten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (L-428) hervorzuheben. Dies kann dadurch zu begründen sein, dass, obwohl es sich bei allen Zelllinien um HRS-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms handelt, Unterschiede in der Zellbiologie der Tumorzellen vorhanden sind. Die Tumorentstehung ist im Allgemeinen ein hoch komplexer Ablauf, bei dem viele verschiedene Faktoren eine Einflussrolle spielen. So kommt es nicht nur in unterschiedlichen Tumorentitäten, sondern selbst in der gleichen Tumorentität in verschiedenen Patienten (inter-Tumor-Heterogenität) sowie sogar im Tumorgewebe eines einzelnen Patienten (intra-Tumor-Heterogenität) zu Unterschieden in der Zellbiologie der einzelnen Tumorzellen.⁹⁵ Eine solche Heterogenität innerhalb des Tumorgewebes spielt in fast allen Tumorentitäten eine Rolle und ist ein Aspekt, der vor allem in der zielgerichteten Tumorthherapie zu berücksichtigen ist. So hat sich bereits in den letzten Jahren zunehmend und wird sich voraussichtlich auch zukünftig eine immer komplexer werdende, die Tumorbilogie berücksichtigende Klassifikation von Tumorentitäten etablieren, um die Therapie und damit das Therapieergebnis bestmöglich an die vorherrschende molekulare Zellbiologie der Tumorzellen anzupassen.⁹⁶

Zusätzlich ist bei der Betrachtung der Ergebnisse der klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinie KM-H2 in dieser Arbeit zu berücksichtigen, dass sich im Dotplot-Diagramm der Durchflusszytometrie dieser Zelllinie anders als bei den anderen drei untersuchten klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (L-428, L-540 und L-1236) zwei Zellpopulationen – eine entsprechend der Zellgröße und Granularität analog zu den anderen Zelllinien zu erwartenden Zellpopulation und eine weitere, etwas diffuser verteilte Zellpopulation mit höherer Zellgröße und Granularität – gezeigt haben (Abbildung 2).

5.7. Limitationen

Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse sind – wie bei allen wissenschaftlichen Arbeiten – kritisch zu hinterfragen. In der vorliegenden Arbeit sind lediglich vier Zelllinien des klassischen Hodgkin-Lymphoms untersucht worden. Zudem zeigten sich zwischen den einzelnen Zelllinien die bereits hervorgehobenen Unterschiede in den erzielten Ergebnissen. Darüber hinaus stellt der in dieser Arbeit vorgestellte Versuchsaufbau eine starke Vereinfachung der *in vivo* tatsächlich vorherrschenden, komplexen Bedingungen dar. Es wurde sich lediglich auf die Auswirkungen der PD-1/PD-L1-Interaktion der HRS-Zellen fokussiert. Ebenso ist nicht eindeutig verifizierbar, dass der Einfluss der PBMCs auf die HRS-Zellen sicher auf die PD-

1/PD-L1-Interaktion zurückzuführen ist. Auch mögliche weitere Einflussfaktoren wie andere Zell-Zell-Interaktionen oder andere in der Tumorumgebung vorhandenen Zytokine und Einflussfaktoren wurden in den Versuchsreihen dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Zudem beruht eine Grundannahme dieser Arbeit darauf, dass eine erfolgreiche spezifische Antitumor-Immunantwort nur durch CD8⁺-zytotoxische T-Zellen sowie mit dem Vorhandensein von MHC-I-Komplexen auf den Tumorzellen erfolgen kann. Möglicherweise bestehen *in vivo* bisher noch unbekannte Mechanismen einer Antitumor-Immunantwort, die MHC-I-unabhängig ablaufen und so den Therapieerfolg von Anti-PD-1-Antikörpern erklären können. Eine Möglichkeit stellt hier unter anderem eine MHC-II-abhängige Antitumor-Immunantwort durch CD4⁺-Helfer-T-Zellen dar. So konnte in einer Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von MHC-II-Molekülen auf der Oberfläche von HRS-Zellen den Therapieerfolg des Anti-PD-1-Antikörpers Nivolumab positiv beeinflusst.⁹⁷ Eine weitere mögliche Erklärung des Therapieerfolges von Immuncheckpoint-Inhibitoren wie Nivolumab könnte – wie in der Einleitung dieser Arbeit bereits beschrieben – in der Rolle der NK-Zellen bei der Erkennung und Elimination von Zellen mit fehlenden MHC-I-Komplexen begründet sein. Solche möglichen Effekte von PD-1/PD-L1-Blockern sind in dieser Arbeit nicht abgebildet.

5.8. Fazit und Ausblick

Die Anpassung von Tumorzellen wie den HRS-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms an die vorherrschenden Umgebungsbedingungen des Körpers sowie die Sicherstellung von Überleben und Vermehrung stellen einen für die Entstehung und Progression maligner Neoplasien unabdingbaren Prozess dar. Eine solche kritische Anpassung ist die Überexpression des Liganden PD-L1 auf der Zelloberfläche. Die Bindung von PD-L1 an den PD-1-Rezeptor auf aktivierten CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen führt zur Herunterregulierung der T-Zell-Aktivierung und damit zur Umgehung einer erfolgreichen Immunreaktion gegen die Tumorzelle.⁵⁷

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit aufzeigen konnten, kann das pro-inflammatorische Zytokin IFN- γ scheinbar zu einer verstärkten PD-L1-Expression auf der Oberfläche der HRS-Zellen führen. IFN- γ ist im Tumormilieu ubiquitär vorhanden und spielt physiologischerweise eine wichtige Rolle als Mediator bei der Antitumor-Immunreaktion des Körpers.^{91,92} Die HRS-Zellen sind so angepasst an die im Gewebe herrschenden Umgebungsbedingungen, dass sie nicht nur die körpereigene Immunreaktion gegen sie umgehen können, sondern zusätzlich einen eigenen Nutzen aus den Abwehrmechanismen des Immunsystems gewinnen können.

Darüber hinaus konnten die Ergebnisse dieser Arbeit – im Einklang mit den Ergebnissen weiterer Arbeiten wie beispielsweise aus dem Team um Jalali et al.⁸⁹ – aufzeigen, dass die Herunterregulierung der T-Zell-Aktivierung möglicherweise nicht die alleinige Auswirkung der PD-1/PD-L1-Interaktion darstellt. Es scheint vielmehr eine bidirektionale Signaltransduktion zu bestehen, die ebenfalls direkte Auswirkungen in der PD-L1-tragenden HRS-Zelle bewirkt. Eine retrograde Signalkaskade über den Liganden PD-L1 kann demnach zu einer Stimulation der Proliferation sowie Sicherung des Überlebens der HRS-Zellen führen.⁸⁹

Solche Erkenntnisse über die molekulopathologischen Vorgänge in den Tumorzellen sowie über die Interaktion mit der Tumorumgebung und mit dem Immunsystem des Körpers sind entscheidend für ein immer genaueres Verständnis der Tumorbilogie. Ebenso bieten solche kritischen Anpassungen von Tumorzellen – wie die PD-1/PD-L1-Interaktion – effektive Zielstrukturen für eine zielgerichtete Krebstherapie. Die zielgerichtete pharmakologische Tumorbehandlung stellt einen Wendepunkt in der Onkologie dar. Die herkömmlichen Zytostatika- und Radiotherapie-basierten Behandlungsregime wirken ungezielt und sind mit erheblichen, die Lebensqualität einschränkenden, teilweise lebensbedrohlichen direkten und langzeitigen Nebenwirkungen verbunden.⁷⁹ Durch zielgerichtete Therapien können die Nebenwirkungen drastisch reduziert werden. In Bezug auf das klassische Hodgkin-Lymphom ist die Reduktion von (Langzeit-) Nebenwirkungen der Behandlung aufgrund des häufig jungen

Betroffenenalters von besonderer Relevanz.^{8,9} Zudem bieten nebenwirkungsarme Therapieregime auch für Patienten im höheren Alter eine Therapieoption, wenn Zytostatika-basierte Therapien aufgrund des Nebenwirkungsprofils nicht mehr in Frage kommen.

Die PD-1/PD-L1-Interaktion stellt den zielgerichteten pharmakologischen Angriffspunkt von bereits seit einiger Zeit klinisch etablierten Immuncheckpoint-Inhibitoren wie dem Anti-PD-1-Antikörper Nivolumab dar.^{65-67,71} Der Therapieerfolg wird dadurch erklärt, dass durch die Blockade der PD-1/PD-L1-Interaktion die Umgehung der Antitumor-Immunreaktion verhindert wird und so wieder eine erfolgreiche spezifische Immunreaktion durch CD8⁺-zytotoxische T-Zellen gegen die Tumorzellen stattfinden kann. Durch die Erkenntnis einer möglichen bidirektionalen Signaltransduktion und den damit verbundenen Auswirkungen auf die PD-L1-tragenden HRS-Zellen kann die klinische Effektivität von Wirkstoffen wie Nivolumab zukünftig näher definiert und besser verstanden werden. So trägt die Unterbindung der PD-L1-induzierten Effekte in den HRS-Zellen durch Nivolumab möglicherweise zur Wirkung bei und erklärt die klinische Effektivität auch in den Situationen, in denen MHC-I-Komplexe auf den HRS-Zellen deutlich unterexprimiert sind oder gänzlich fehlen und somit eine spezifische Antitumor-Immunreaktion durch CD8⁺-zytotoxische T-Zellen unwahrscheinlich ist.

Für die Entwicklung und Weiterentwicklung von neuen, zielgerichteten, effektiven und nebenwirkungsärmeren Therapiemöglichkeiten ist ein genaues Verständnis der molekularen Tumorbilogie und deren molekularpathologischen Veränderungen essenziell. Der intrazelluläre Signalweg der PD-1/PD-L1-Signaltransduktion und damit die Ursache für die Auswirkungen der PD-1/PD-L1-Interaktion auf die HRS-Zellen könnte Gegenstand weiterführender Forschungsarbeiten sein. So kann nicht nur das Verständnis dieser bedeutenden Rezeptor-Liganden-Interaktion immer weiter verstanden werden, sondern eventuell bieten sich hierdurch auch weitere Ansatzpunkte für eine Verbesserung und Ausweitung der zielgerichteten Therapiemöglichkeiten.

Um die intrazellulären Mechanismen durch die PD-1/PD-L1-Interaktion und die in der PD-L1-tragenden Zelle ausgelöste Signalkaskade genauer zu beschreiben sowie um die *in vitro* erhobenen Ergebnisse auf die *in vivo* tatsächlich vorherrschenden Gegebenheiten zu übertragen, ist weiterführende Forschung notwendig. So könnte man den Liganden PD-L1 selbst näher in seiner molekularen Struktur untersuchen und die extrazellulären Domänen der PD-1-Bindungsstellen sowie die intrazellulären Domänen zur Auslösung einer Signalkasakde genauer charakterisieren. Auch ließe sich durch Analyse der Gen- und Proteinexpression nach PD-1/PD-L1-Bindung im Vergleich zur Gen- und Proteinexpression vor der PD-1/PD-L1-Bindung der intrazelluläre PD-L1-Signalweg mit den daran beteiligten Strukturen genauer

beschreiben. Zur Übertragung der Forschungsergebnisse auf die Gegebenheiten *in vivo* könnten Tierversuche durchgeführt werden, die die Auswirkungen durch die PD-1/PD-L1-Interaktion im tatsächlichen Tumorgewebe sowie die Auswirkungen durch Blockade dieser Interaktion *in vivo* darstellen. Durch ein genaueres Verständnis der PD-1/PD-L1-Interaktion sowie des dadurch ausgelösten Signalweges könnten weiterführend neue zielgerichtete Therapiemöglichkeiten untersucht werden, die eine Behandlung mit Anti-PD-1-Antikörpern ergänzen oder ersetzen könnten. Letztendlich zeigt sich das große Potenzial der Tumorforschung zum genaueren Verständnis der Tumorbiologie und dessen molekulopathologischen Veränderungen sowie der daraus abgeleiteten Entwicklung und Etablierung zielgerichteter Therapiemöglichkeiten.

6. Literaturverzeichnis

1. Hodgkin T. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chir Trans* 1832; **17**: 68-114.
2. Sternberg C. Über eine eigenartige, unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. *Zeitschrift für Heilkunde* 1898.
3. Reed D. On the pathological changes in Hodgkin's disease with special reference to its relation to tuberculosis. *John Hopkins Hospital Reports* 1902.
4. Engert A, Younes A. Hodgkin Lymphoma: Springer; 2020.
5. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) dDKeVDudDK. S3-Leitlinie - Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Hodgkin Lymphoms bei erwachsenen Patienten; Langversion 3.2; AWMF Registernummer: 018/029 OL. 2022. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hodgkin-lymphom> (Zuletzt abgerufen am 23.02.2025).
6. Momotow J, Borchmann S, Eichenauer DA, Engert A, Sasse S. Hodgkin Lymphoma-Review on Pathogenesis, Diagnosis, Current and Future Treatment Approaches for Adult Patients. *J Clin Med* 2021; **10**(5).
7. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer* 2021.
8. Correa P, O'Connor GT. Epidemiologic patterns of Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1971; **8**(2): 192-201.
9. Thomas RK, Re D, Zander T, Wolf J, Diehl V. Epidemiology and etiology of Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2002; **13 Suppl 4**: 147-52.
10. Küppers R, Klein U, Schwering I, et al. Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. *Journal of Clinical Investigation* 2003; **111**(4): 529-37.
11. Cohen JL. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000; **343**(7): 481-92.
12. Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 1998; **9**(3): 395-404.
13. Rosdahl N, Larsen SO, Clemmesen J. Hodgkin's disease in patients with previous infectious mononucleosis: 30 years' experience. *Br Med J* 1974; **2**(5913): 253-6.
14. Bichel J. The alcohol-intolerance syndrome in Hodgkin's disease. *Acta Med Scand* 1959; **164**(2): 105-12.
15. Ebstein W. Das chronische Rückfallfieber, eine neue Infektionskrankheit. *Berl Klin Wochenschr* 1887.
16. Pel P. Pseudoleukämie oder chronisches Rückfallfieber? *Berl Klin Wochenschr* 1887.
17. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022; **36**(7): 1720-48.

18. Borchmann P, Plutschow A, Kobe C, et al. PET-guided omission of radiotherapy in early-stage unfavourable Hodgkin lymphoma (GHSG HD17): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2021; **22**(2): 223-34.
19. Borchmann P, Ferdinandus J, Schneider G, et al. Assessing the efficacy and tolerability of PET-guided BrECADD versus eBEACOPP in advanced-stage, classical Hodgkin lymphoma (HD21): a randomised, multicentre, parallel, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2024; **404**(10450): 341-52.
20. Herrera AF, LeBlanc M, Castellino SM, et al. Nivolumab+AVD in Advanced-Stage Classic Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* 2024; **391**(15): 1379-89.
21. Michael Fuchs PB, Richard Greil, Felicitas Hitz, Ralph Naumann, Stephanie Sasse. onkopedia - Hodgkin Lymphom. 2023. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/hodgkin-lymphom> (Zuletzt abgerufen am 23.02.2025).
22. Noone A, Howlader N, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975-2015. National Cancer Institute; 2018.
23. Kuppers R, Hansmann ML. The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; **37**(3): 511-7.
24. Kuppers R, Rajewsky K, Zhao M, et al. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**(23): 10962-6.
25. Kuppers R, Rajewsky K. The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol* 1998; **16**: 471-93.
26. Schwering I, Brauninger A, Klein U, et al. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; **101**(4): 1505-12.
27. Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, et al. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 1997; **100**(12): 2961-9.
28. Jardin F. NFkB Pathway and Hodgkin Lymphoma. *Biomedicines* 2022; **10**(9).
29. Cabannes E, Khan G, Aillet F, Jarrett RF, Hay RT. Mutations in the IκBa gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IκappaBα. *Oncogene* 1999; **18**(20): 3063-70.
30. Schmitz R, Hansmann ML, Bohle V, et al. TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med* 2009; **206**(5): 981-9.
31. Barth TF, Martin-Subero JI, Joos S, et al. Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; **101**(9): 3681-6.
32. Mosialos G, Birkenbach M, Yalamanchili R, VanArsdale T, Ware C, Kieff E. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 1995; **80**(3): 389-99.

33. Cochet O, Frelin C, Peyron JF, Imbert V. Constitutive activation of STAT proteins in the HDLM-2 and L540 Hodgkin lymphoma-derived cell lines supports cell survival. *Cell Signal* 2006; **18**(4): 449-55.
34. Weniger MA, Melzner I, Menz CK, et al. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene* 2006; **25**(18): 2679-84.
35. Gunawardana J, Chan FC, Telenius A, et al. Recurrent somatic mutations of PTPN1 in primary mediastinal B cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Nat Genet* 2014; **46**(4): 329-35.
36. Green MR, Monti S, Rodig SJ, et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2010; **116**(17): 3268-77.
37. van den Berg A, Visser L, Poppema S. High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 1999; **154**(6): 1685-91.
38. Kapp U, Yeh WC, Patterson B, et al. Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med* 1999; **189**(12): 1939-46.
39. Aldinucci D, Poletto D, Gloghini A, et al. Expression of functional interleukin-3 receptors on Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol* 2002; **160**(2): 585-96.
40. Cattaruzza L, Gloghini A, Olivo K, et al. Functional coexpression of Interleukin (IL)-7 and its receptor (IL-7R) on Hodgkin and Reed-Sternberg cells: Involvement of IL-7 in tumor cell growth and microenvironmental interactions of Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 2009; **125**(5): 1092-101.
41. Pinto A, Aldinucci D, Gloghini A, et al. Human eosinophils express functional CD30 ligand and stimulate proliferation of a Hodgkin's disease cell line. *Blood* 1996; **88**(9): 3299-305.
42. Molin D, Fischer M, Xiang Z, et al. Mast cells express functional CD30 ligand and are the predominant CD30L-positive cells in Hodgkin's disease. *Br J Haematol* 2001; **114**(3): 616-23.
43. Gruss HJ, Ulrich D, Braddy S, Armitage RJ, Dower SK. Recombinant CD30 ligand and CD40 ligand share common biological activities on Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Eur J Immunol* 1995; **25**(7): 2083-9.
44. Poppema S, Visser L. Absence of HLA class I expression by Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol* 1994; **145**(1): 37-41.
45. Reichel J, Chadburn A, Rubinstein PG, et al. Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood* 2015; **125**(7): 1061-72.
46. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 2001; **1**(3): 220-8.
47. Hsu PL, Hsu SM. Production of tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin by cells of Hodgkin's neoplastic cell lines HDLM-1 and KM-H2. *Am J Pathol* 1989; **135**(4): 735-45.
48. Herbst H, Foss H, Samol J, et al. Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. *Blood* 1996.

49. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004; **103**(5): 1755-62.
50. Juszczynski P, Ouyang J, Monti S, et al. The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(32): 13134-9.
51. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992; **11**(11): 3887-95.
52. Dorfman DM, Brown JA, Shahsafaei A, Freeman GJ. Programmed death-1 (PD-1) is a marker of germinal center-associated T cells and angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2006; **30**(7): 802-10.
53. Lee SJ, Jang BC, Lee SW, et al. Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS Lett* 2006; **580**(3): 755-62.
54. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008; **26**: 677-704.
55. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 2010; **236**: 219-42.
56. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999; **11**(2): 141-51.
57. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000; **192**(7): 1027-34.
58. Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, et al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett* 2004; **574**(1-3): 37-41.
59. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 2004; **173**(2): 945-54.
60. Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev* 2009; **229**(1): 114-25.
61. Green MR, Rodig S, Juszczynski P, et al. Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2012; **18**(6): 1611-8.
62. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**(19): 12293-7.
63. Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, et al. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2008; **111**(6): 3220-4.

64. Roemer MG, Advani RH, Ligon AH, et al. PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. *J Clin Oncol* 2016; **34**(23): 2690-7.
65. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2015; **372**(4): 311-9.
66. Younes A, Santoro A, Shipp M, et al. Nivolumab for classical Hodgkin's lymphoma after failure of both autologous stem-cell transplantation and brentuximab vedotin: a multicentre, multicohort, single-arm phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; **17**(9): 1283-94.
67. Armand P, Engert A, Younes A, et al. Nivolumab for Relapsed/Refractory Classic Hodgkin Lymphoma After Failure of Autologous Hematopoietic Cell Transplantation: Extended Follow-Up of the Multicohort Single-Arm Phase II CheckMate 205 Trial. *J Clin Oncol* 2018; **36**(14): 1428-39.
68. Armand P, Shipp MA, Ribrag V, et al. Programmed Death-1 Blockade With Pembrolizumab in Patients With Classical Hodgkin Lymphoma After Brentuximab Vedotin Failure. *J Clin Oncol* 2016; **34**(31): 3733-9.
69. Chen R, Zinzani PL, Fanale MA, et al. Phase II Study of the Efficacy and Safety of Pembrolizumab for Relapsed/Refractory Classic Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol* 2017; **35**(19): 2125-32.
70. Chen R, Zinzani PL, Lee HJ, et al. Pembrolizumab in relapsed or refractory Hodgkin lymphoma: 2-year follow-up of KEYNOTE-087. *Blood* 2019; **134**(14): 1144-53.
71. Advani RH, Moskowitz AJ, Bartlett NL, et al. Brentuximab vedotin in combination with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin lymphoma: 3-year study results. *Blood* 2021; **138**(6): 427-38.
72. Roemer MG, Advani RH, Redd RA, et al. Classical Hodgkin Lymphoma with Reduced beta2M/MHC Class I Expression Is Associated with Inferior Outcome Independent of 9p24.1 Status. *Cancer Immunol Res* 2016; **4**(11): 910-6.
73. Wu SY, Fu T, Jiang YZ, Shao ZM. Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Mol Cancer* 2020; **19**(1): 120.
74. Kärre K. Role of Target Histocompatibility Antigens in Regulation of Natural Killer Activity. A Reevaluation and a Hypothesis. In: Herbermann RB, Callewaert DM, eds. Mechanisms of NK Cell mediated Cytotoxicity. Orlando: Academic Press; 1985: S. 81-91.
75. Vari F, Arpon D, Keane C, et al. Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL. *Blood* 2018; **131**(16): 1809-19.
76. Rothe A, Sasse S, Topp MS, et al. A phase 1 study of the bispecific anti-CD30/CD16A antibody construct AFM13 in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood* 2015; **125**(26): 4024-31.
77. Bartlett NL, Herrera AF, Domingo-Domenech E, et al. A phase 1b study of AFM13 in combination with pembrolizumab in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood* 2020; **136**(21): 2401-9.
78. Reinert KS, Kessler J, Sauer M, et al. Rescue of impaired NK cell activity in Hodgkin lymphoma with bispecific antibodies in vitro and in patients. *Mol Ther* 2013; **21**(4): 895-903.

79. Ng AK. Late complications after treatment for Hodgkin lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep* 2008; **3**(3): 119-25.
80. Schaadt M, Fonatsch C, Kirchner H, Diehl V. Establishment of a malignant, Epstein-Barr-virus (EBV)-negative cell-line from the pleura effusion of a patient with Hodgkin's disease. *Blut* 1979; **38**(2): 185-90.
81. Schaadt M, Diehl V, Stein H, Fonatsch C, Kirchner HH. Two neoplastic cell lines with unique features derived from Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1980; **26**(6): 723-31.
82. Diehl V, Kirchner HH, Schaadt M, et al. Hodgkin's disease: establishment and characterization of four in vitro cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 1981; **101**(1): 111-24.
83. Wolf J, Kapp U, Bohlen H, et al. Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells. *Blood* 1996; **87**(8): 3418-28.
84. Kanzler H, Hansmann ML, Kapp U, et al. Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed- Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient. *Blood* 1996; **87**(8): 3429-36.
85. Kamesaki H, Fukuhara S, Tatsumi E, et al. Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease. *Blood* 1986; **68**(1): 285-92.
86. Greer LF, 3rd, Szalay AA. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence* 2002; **17**(1): 43-74.
87. Drexler HG, Pommerenke C, Eberth S, Nagel S. Hodgkin lymphoma cell lines: to separate the wheat from the chaff. *Biol Chem* 2018; **399**(6): 511-23.
88. Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; **8**(8): 793-800.
89. Jalali S, Price-Troska T, Bothun C, et al. Reverse signaling via PD-L1 supports malignant cell growth and survival in classical Hodgkin lymphoma. *Blood Cancer J* 2019; **9**(3): 22.
90. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep* 2017; **19**(6): 1189-201.
91. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**(11): 836-48.
92. Kalvakolanu DV, Borden EC. An overview of the interferon system: signal transduction and mechanisms of action. *Cancer Invest* 1996; **14**(1): 25-53.
93. Liu X, Wu X, Cao S, et al. B7-H1 antibodies lose antitumor activity due to activation of p38 MAPK that leads to apoptosis of tumor-reactive CD8(+) T cells. *Sci Rep* 2016; **6**: 36722.
94. Kruger S, Legenstein ML, Rosgen V, et al. Serum levels of soluble programmed death protein 1 (sPD-1) and soluble programmed death ligand 1 (sPD-L1) in advanced pancreatic cancer. *Oncoimmunology* 2017; **6**(5): e1310358.
95. Gilson P, Merlin JL, Harle A. Deciphering Tumour Heterogeneity: From Tissue to Liquid Biopsy. *Cancers (Basel)* 2022; **14**(6).

96. Maley CC, Aktipis A, Graham TA, et al. Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms. *Nat Rev Cancer* 2017; **17**(10): 605-19.
97. Roemer MGM, Redd RA, Cader FZ, et al. Major Histocompatibility Complex Class II and Programmed Death Ligand 1 Expression Predict Outcome After Programmed Death 1 Blockade in Classic Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol* 2018; **36**(10): 942-50.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Empfohlene Erstlinienbehandlung des klassischen Hodgkin-Lymphoms ²¹	19
Abbildung 2: Dotplot-Diagramme der Hodgkin-Lymphom-Zelllinien in der Durchflusszytometrie	42
Abbildung 3: Histogramme der durchflusszytometrischen Versuche.....	43
Abbildung 4: Basale PD-L1-Expression	44
Abbildung 5: PD-L1-Expression nach Stimulation mit IFN- γ	44
Abbildung 6: Zellproliferation unter dem Einfluss von PBMCs und von löslichem PD-1	47
Abbildung 7: Zellproliferation unter dem Einfluss von löslichem PD-1 und von löslichem PD-1 + Nivolumab	48
Abbildung 8: Überblick über die Proliferationsveränderungen der Zelllinie L-428.....	50
Abbildung 9: Schematische Darstellung einer bidirektionalen PD-1/PD-L1-Interaktion	56

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ann-Arbor-Klassifikation ⁵	16
Tabelle 2: Risikogruppen nach der German Hodgkin Study Group (GHSG) ⁵	17
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien	30
Tabelle 4: Verwendete humane Zytokine, Antikörper und Antikörper-Derivate	30
Tabelle 5: Verwendete Medikamente	31
Tabelle 6: Verwendetes Equipment.....	31
Tabelle 7: Verwendetes Zubehör.....	31
Tabelle 8: Verwendete Software.....	32
Tabelle 9: Verwendete Hodgkin-Lymphom-Zelllinien	32
Tabelle 10: Verwendete PBMCs.....	33
Tabelle 11: Verwendete Medien und Puffer.....	33
Tabelle 12: Überblick über die statistische Auswertung der Proliferationsversuche der Zelllinie L-428.....	51