

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Irene Esposito

Räumliche Verteilungsmuster von regulatorischen und
komplementfaktorpositiven Zellen in Patienten mit nicht-neoplastischer
Lymphadenopathie bei COVID

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Alexandra Mintjes

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Irene Esposito

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Nikolas Stoecklein

Zusammenfassung (deutsch)

CVID (*Common variable immunodeficiency*) beschreibt ein heterogenes Krankheitsbild mit bislang nur teilweise bekannten genetischen Ursachen. Es lässt sich durch eine Erniedrigung der klassengewechselten Plasmazellen und Gedächtnis B-Zellen charakterisieren. Bereits vor der Diagnose der CVID leiden manche Patienten unter einer Immunschwäche, welche zu einer Lymphadenopathie und folglich zu einer Lymphknoten-Biopsie führt, um Malignome ausschließen zu können. Bei Ausschluss einer Malignität, können diese Proben für weiterführende immunologische Forschung verwendet werden. Keimzentren (Germinal centers, GCs) spielen eine zentrale Rolle als Hauptursprung der klassengewechselten Plasmazellen und Gedächtnis B-Zellen. Strukturelle GC-Aberrationen können mit autoreaktiven Komplikationen bei CVID einhergehen und mit einer erhöhten IFN- γ Signatur assoziiert sein. Diese vorgelegte Arbeit ergänzt die Phänotypisierung, basierend auf einem immunhistochemischen Mehrfachfärbungsprotokoll für FoxP3-, MUM1/IRF4- und C1q-positive Immunzellen in CVID Lymphknoten, welche anhand von digitalen histologischen Präparaten von 22 Lymphknoten mit 4.543 Follikeln morphometrisch ausgewertet wurden. Die Analysen umfassen die Zelldichte und Form von Follikeln, GCs, der interfollikulären Zone, zusammen mit FoxP3-, MUM1/IRF4- und C1q-positiven Immunzellen und Granulomen.

Die Zelldichte der FoxP3-positiven Zellen wies die höchsten Werte in der interfollikulären Zone auf, ähnlich verhielt sich die Zelldichte der C1q-positiven Zellen. Die Zelldichte der MUM1-positiven Zellen zeigte hingegen keine Unterschiede zwischen Interfollikulärarealen und Follikeln bzw. GCs. Des Weiteren konnten positive Korrelationen zwischen MUM1- und C1q-positiven Zellen über das gesamte Parenchym sowie follikulär zwischen C1q- und FoxP3-positiven Zellen beobachtet werden. Zudem korrelierte eine zunehmende Unrundheit der Follikel mit der Zunahme der FoxP3-positiven Zellen innerhalb der Follikel. Mit zunehmender Größe der Follikel und GCs ist die Zelldichte der FoxP3-positiven Zellen im Parenchym gesunken und die Zelldichte der MUM1-positiven Zellen innerhalb der GCs gestiegen. Auffallend waren weiterhin einzelne C1q-MUM1-doppelpositive Zellen, die möglicherweise einer Phagozytose von plasmazytoid differenzierten Zellen durch Makrophagen entsprechen können. Dies sowie der Zusammenhang der erhobenen histomorphologischen Daten mit klinisch-funktionellen Befunden könnten zukünftig zu einer verbesserten funktionell-morphologischen Klassifikation des heterogenen Krankheitsbilds CVID führen.

Zusammenfassung (englisch)

Common variable immunodeficiency (CVID) is a heterogenous disease with only partly known genetic causes. It is characterized through a decrease in class switched immunoglobins and memory B-cells. Even prior to the established diagnosis of CVID some patients suffer from immune dysregulation, leading to lymphadenopathy with subsequent lymph node excision to exclude malignoma. In the non-malignant context, those lymph nodes allow further immunological research. Germinal centers play a very important role as the main source of class-switched plasma cells and memory B-cells. Structural aberrations can result in autoreactive complications with CVID and increased IFN- γ signatures. This research project complements the phenotyping based on a sequential multistaining protocol for immunohistochemistry for FoxP3-, MUM1/IRF4- and C1q-positive immune cells in CVID lymph nodes, which are morphometrically evaluated on digitalized histological slide sections from 22 lymph nodes comprising 4.543 follicles. Analyzed items are area density and shape of follicles, germinal centers, interfollicular areas together with FoxP3-, MUM1/IRF4-, C1q-positive immune cells and granulomas.

The density of FoxP3-positive cells could be shown to be the highest in interfollicular areas, the density of C1q-positive cells showed a similar trend. However, the density of MUM1-positive cells did not show a distinctive distribution pattern, it showed a rather homogenous distribution over all tissue types. Moreover, this study could show a positive correlation between the density of MUM1- and C1q-positive cells over the whole tissue, as well as between the follicular density of C1q- and FoxP3-positive cells. Furthermore, an increasing non-circularity of the follicles resulted in a higher density of FoxP3-positive cells inside of the follicles. With an increasing size of the follicles and germinal centers, the density of FoxP3-positive cells in the parenchyma is decreasing and the density of MUM1 positive cells in the germinal center is increasing. Remarkably were individual C1q-MUM1-doublepositive cells, that could be underlying a phagocytosis of plasmacytoid differentiated cells by macrophages. This, as well as the correlation between the histomorphological data with clinical-functional date, could potentially lead to an improved functional-morphological classification of the heterogenous symptoms of CVID.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AG	Antigen
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AK	Antikörper
BCL6	<i>B-cell lymphoma 6</i>
BMI	<i>Body mass index</i>
CD4 bzw. 8	<i>Cluster of differentiation 4 bzw. 8</i>
CD4+ bzw. 8+	CD-4 bzw. CD8-positive Zellen
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
CVID	<i>Common variable immunodeficiency</i>
Et al.	Und andere
F	Follikel
Fc-Rezeptor	<i>Fragment crystallisable-Rezeptor</i>
FFPE	<i>Formalin fixation and paraffin-embedding</i>
FoxP3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
GCs	Keimzentren
GR	Granulome
HGAL	<i>Human germinal center-associated lymphoma</i>
IF	Interfollikuläres Areal
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgM	Immunglobulin M
Inkl.	Inklusive
IRF4	Interferon-regulierender Faktor 4
MHCII	<i>Major histocompatibility complex II</i>
MRXS	<i>MIRAX Virtual Slide File</i>
MUM1	<i>Multiple Myeloma Oncogene 1</i>
n	Stichprobengröße

NFκB	<i>Nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
p	P-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit)
PA	Parenchym
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
px	Pixel
r	Korrelationskoeffizient
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
TfH-Zellen	Follikuläre T-Helferzellen
TH-Zellen	T-Helferzellen
TH1 bzw. 2	T-Helferzelle 1 bzw. 2
TH17	T-Helferzelle 17
TIFF	<i>Tagged Information File Format</i>
TIRC7	<i>T-cell immune response cDNA 7</i>
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
Treg-Zellen	Regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
µm²	Quadratmikrometer

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 DAS HUMANE IMMUNSYSTEM	1
1.1.1 Das Komplementsystem.....	2
1.1.2 T-Zell Reifung.....	2
1.1.3 B-Zellreifung	4
1.1.4 Der Ablauf einer Immunreaktion.....	5
1.2 COVID	6
1.2.1 Pathophysiologie bei COVID.....	7
1.2.2 Diagnose und Therapie	8
1.3 ZIELE DER ARBEIT	9
2. MATERIAL UND METHODEN	10
2.1 MATERIAL	10
2.1.1 Kohorte.....	10
2.1.2 Geräte und Programme.....	10
2.1.3 Materialien.....	11
2.2 METHODEN	11
2.2.1 Auswertungskriterien in den jeweiligen Färbungen.....	11
2.2.2 Transfer der Schnittdateien	12
2.2.3 Vorbereitung für die digitale pathologische Quantifikation mittels QuPath für Färbung 1	12
2.2.4 Markieren der Follikel und deren Keimzentren.....	14
2.2.5 Erstellen eines Classifiers für diverse Gewebiszonen	15
2.2.6 Auszählung der positiven Zellen mittels QuPath für Färbungen 1 und 2.....	16
2.2.7 Erheben der Daten zur Zellzahl, Flächen- und Umfangsberechnung mittels QuPath.....	19
2.2.8 Berechnen der Unrundheit	20
2.2.9 Durchführung von statistischen Tests	21
2.2.10 Artefakte durch die Schnittherstellung und Digitalisierung	22
2.2.11 Umgang mit Artefakten bei der Analyse der Präparate.....	23
3. ERGEBNISSE	24
3.1 ÜBERSICHT ÜBER EIN DIGITALE HISTOLOGISCHES PRÄPARAT	24
3.2 VISUELLE DARSTELLUNG	25
3.2.1 Visuelle Darstellung der markierten Gewebe.....	25
3.2.2 Visuelle Darstellung der markierten Follikel und Keimzentren.....	26
3.2.3 Visuelle Darstellung der Artefakte.....	28
3.3 VISUELLE DARSTELLUNG DER MARKIERTEN POSITIVEN ZELLEN.....	29
3.3.1 Positive Zellen der Färbung F1	30

3.3.2 Positive Zellen der Färbung F12	32
3.4 DESKRIPTIVE STATISTIK	36
3.4.1 Anzahl der Follikel und Keimzentren	36
3.4.2 Anzahl der FoxP3-, MUM1- und C1q-positiven Zellen.....	39
3.5 ERGEBNISSE ZU ZELLDICHTE UND ARCHITEKTUR	42
3.5.1 Die Zelldichte FoxP3 positiver Zellen ist interfollikulär am höchsten.....	42
3.5.2 Die Zelldichte MUM1 positiver Zellen ist relativ homogen verteilt	44
3.5.3 Die Zelldichte C1q positiver Zellen ist interfollikulär am höchsten.....	46
3.5.4 Die Zelldichten von MUM1 und C1q positiven Zellen korrelieren.....	48
3.5.5 Die follikuläre Zelldichte von FoxP3 und C1q positiven Zellen korreliert.....	49
3.5.6 Die Unrundheit der Follikel korreliert mit deren Keimzentren	50
3.5.7 Die Unrundheit der Follikel korreliert mit der FoxP3 Zelldichte	54
3.5.8 Die Zelldichte von FoxP3 positiven Zellen nimmt mit der mittleren Follikelfläche ab	55
3.5.9 Die Zelldichte von MUM1 positiven Zellen im Keimzentrum nimmt mit der mittleren Follikelfläche zu.....	57
4. DISKUSSION	58
4.1 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	58
4.2 VERWENDUNG VON HUMANEN SCHNITTPROBEN.....	58
4.3 AUTOIMMUNITÄT UND COVID.....	59
4.4 PLASMAZELLOUTPUT IM ZUSAMMENHANG MIT DER ARCHITEKTUR	60
4.5 DIE C1Q ZELLDICHTE KORRELIERT MIT DER MUM1 ZELLDICHTE	62
4.6 LIMITATIONEN DER MORPHOLOGISCHEN STUDIE BEZÜGLICH FUNKTIONELLER IMMUNOLOGISCHER AUSSAGEN.....	64
4.7 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	65
5. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	67

1. Einleitung

1.1 Das humane Immunsystem

Das menschliche Immunsystem kann in die angeborene, unspezifische und in die erworbene, spezifische Immunabwehr eingeteilt werden. Diese bestehen jeweils aus einer zellulären und humoralen Komponente (Sirisinha, 2011). Granulozyten, Blut- und Gewebsmakrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen, und natürliche Killerzellen bilden die zelluläre Komponente des unspezifischen Immunsystems (Murphy & Weaver, 2018). Die humorale Komponente des angeborenen Immunsystems wird durch das Komplementsystem, Lysozyme und Zytokine zusammengesetzt. Das erworbene Immunsystem wird hauptsächlich durch die lymphatischen Zellen geprägt, welche die B-Zellen und die T-Zellen umfassen (Murphy & Weaver, 2018). Zu den T-Zellen zählt man die CD4⁺ T-Helferzellen 1, 2, und 17, die folliculären T-Helferzellen, sowie die regulatorischen T-Zellen (Zhu et al., 2016) und die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (Dutta et al., 2021). B-Zellen können nach ihrer Aktivierung und Reifung zu Plasmazellen differenzieren und die humorale Komponente des spezifischen Immunsystems produzieren, die Antikörper (Yam-Puc et al., 2018). Durch das Herstellen von Antikörpern wird dem Immunsystem eine langfristige Immunität gegenüber den spezifischen Pathogenen ermöglicht, indem diese neutralisiert werden (Ali et al., 2020). Nach dem Kontakt zu Pathogenen kann auch das angeborene Immunsystem, durch die Veränderung der Funktion und Reaktionsfähigkeit, eine langfristige Immunität aufweisen (Dominguez-Andres & Netea, 2019). Zudem besteht durch die Zytokin-Achse die Möglichkeit, dass das angeborene Immunsystem das erworbene Immunsystem beeinflusst (Iwasaki & Medzhitov, 2015). Das menschliche Immunsystem wird durch weitere Faktoren beeinflusst, wie z.B. durch probiotische Mikroorganismen in dem Gastrointestinaltrakt (Maldonado Galdeano et al., 2019). Diese können über das Stimulieren von Epithelzellen eine Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen bewirken, schließlich mit einer Aktivierung von regulatorischen T-Zellen einhergehen und somit Einfluss auf das Immunsystem haben (Maldonado Galdeano et al., 2019). Umgekehrt kann eine veränderte Zusammensetzung des gastrointestinalen Mikrobioms, vor allem bei Patienten mit einer Immundysfunktion, zu einer systemischen Entzündung führen (A. Long et al., 2023). Hinsichtlich intrinsischer Faktoren haben *Genome wide association studies* (GWASs) belegen können, dass durch u.a. unterschiedliches *Splicen*, verschiedene Varianten von T-Zellen und B-Zellen existieren, welche für die Pathologie von verschiedenen Immundysfunktionen relevant sind (Lagou et al., 2018).

1.1.1 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist Teil der unspezifischen Immunabwehr und besteht aus einer Gruppe von überwiegend in der Leber gebildeten Komplementfaktoren, welche als inaktive Vorstufen in dem Blut zirkulieren (Yasmeen et al., 2020). Erfüllt werden verschiedene Aufgaben, welche von der Homöostase bis zur Abwehr von körperfremden Pathogenen reichen (Merle, Noe, et al., 2015). Die Homöostase umfasst das Beseitigen von apoptotischen Zellen und das Regulieren des Überlebens der Zellen (Merle, Noe, et al., 2015). Das Komplementsystem funktioniert durch die Wirkungsmechanismen der Chemotaxis, Opsonisierung und Lyse. Es kann über drei Wege aktiviert werden: über den alternativen Weg, den Lektin-Weg und den klassischen Weg (Merle, Church, et al., 2015; Yasmeen et al., 2020). Bei dem alternativen Weg kommt es durch bakterielle Polysaccharide zu einer Aktivierung und es muss kein Antigen-Antikörper Komplex vorliegen (Yasmeen et al., 2020). Der Lektin-Weg wird durch Mannan-bindendes Lektin eingeleitet, welches Mannan auf der Pathogenoberfläche bindet (Bohlson et al., 2014). Der klassische Weg startet mit dem Binden von C1q an den Fc-Rezeptor des Antikörpers eines Antigen-Antikörper-Komplexes (Quast et al., 2015). Diese drei Wege setzen alle eine Enzymkaskade in Gang, gleichnamige Konvertasen aktivieren weitere Komplementfaktoren durch limitierte Proteolyse. Alle drei Wege besitzen eine gemeinsame Endstrecke, welche bei dem Komplementfaktor C3 beginnt und schließlich durch die Aktivierung von C5 durch C3b einen *Membrane attack complex* (MAC) aus C5b-9 bildet (Bohlson et al., 2014). Dieser fügt Poren in die Oberfläche des Zielobjektes ein und führt schließlich zum Absterben der Zelle durch Lyse (Bohlson et al., 2014). C1q wird v.a. von Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet und kann in der Diagnostik als Biomarker dienen: wenn dieser in einer erniedrigten Konzentration vorliegt, kann es auf einen erhöhten Verbrauch z.B. im Rahmen einer autoimmunen Reaktion hinweisen (Schulz & Trendelenburg, 2022; van de Bovenkamp et al., 2021). Erhöhte Konzentrationen von C1q können auf eine verminderte T-Zell Aktivität hindeuten (van de Bovenkamp et al., 2021).

1.1.2 T-Zell Reifung

Die Reifung der in dem Knochenmark gebildeten Vorläuferzellen der T-Zellen, findet in dem Thymus statt (Dutta et al., 2021), entsprechend werden die T-Zellen dort auch als Thymozyten bezeichnet. Trotz der begrenzten Anzahl von vorliegenden Genen, entsteht

durch somatische Rekombination eine Vielfalt von Antigenrezeptoren, welche eine breit gefächerte Antwort der T-Zellen auf Pathogene ermöglicht (Abbas et al., 2021). Die verschiedenen Entwicklungsstadien von den Vorläuferzellen zu reifen T-Zellen werden durch ein unterschiedliches Expressieren von CD4, CD8 und dem T-Zell-Rezeptor (TZR) definiert, während diese aus dem Kortex in das Mark des Thymus wandern (Abbas et al., 2021). Zu Beginn liegen nur doppelt negative Thymozyten vor, welche keine der Oberflächenmoleküle CD4 oder CD8 exprimieren. Durch die VDJ-Rekombination der Gen-Abschnitte kommt es zu der Ausbildung von einem prä-TZR (Abbas et al., 2021). Dieser Rekombinationsvorgang der prä-T-Zellen unterstützt auch das Ausbilden von CD4⁺ und CD8⁺ Oberflächenmolekülen (Dutta et al., 2021). Die entstandenen T-Zellen sind somit doppelt positiv. Durch eine zusätzliche V-J-Rekombination kommt es schließlich zu dem Ausbilden von einem reifen TZR (Abbas et al., 2021). Die nun stattfindende negative Selektion beschreibt die Einleitung der Apoptose für solche T-Zellen, welche körpereigene Antigene zu stark binden, was ein großes Risiko für Autoreaktivität mit sich bringt (Savage et al., 2020). Ein gewisser Anteil dieser T-Zellen wird nicht ausselektiert, sondern differenziert zu den regulatorischen T-Zellen (Abbas et al., 2021). Anschließend erfolgt die positive Selektion mit der Zielsetzung, solche T-Zellen zu selektieren, welche MHC-Moleküle mit genügender Affinität erkennen und binden können (Abbas et al., 2021). Reife T-Zellen exprimieren jetzt entweder CD4⁺CD8⁻ oder CD8⁺CD4⁻ auf ihrer Oberfläche und wandern im Rahmen der sekundären Reifung hämatogen zu den sekundär lymphatischen Organen aus (Dutta et al., 2021). Die CD4 positiven T-Zellen beschreiben hauptsächlich die Zelllinie der T-Helferzellen und erkennen MHCI. Die CD8 positiven T-Zellen beschreiben hauptsächlich die zytotoxischen T-Zellen und erkennen MHCII (Abbas et al., 2021; Dutta et al., 2021). Gleichzeitig findet hier auch eine phänotypische Reifung statt, da die unterschiedlichen T-Zellen unterschiedliche Zytokine produzieren und somit unterschiedliche Effektorfunktionen ausüben können (Abbas et al., 2021). Die T-Helferzellen lassen sich, je nach erfolgter Differenzierung, u.a. weiter in die Untergruppen der TH1-, TH2-, TH17-, folliculäre T-Helfer- und Treg-Zellen einteilen (Savage et al., 2020; Zhu et al., 2016). Treg-Zellen spielen in dem humanen Immunsystem eine ganz wichtige Rolle, indem sie Autoimmunität durch das Hemmen von T-Zellen verhindern (Savage et al., 2020). Unterschieden wird zwischen thymischen, d.h. zentralen (tTreg-Zellen), welche die Autoimmunität verhindern und peripheren (pTreg-Zellen), die für das Tolerieren von kommensalen Pathogenen essenziell sind (Mohr et al., 2018; van der Veecken et al., 2022). Die Treg-Zellen sind durch die nukleäre Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3

gekennzeichnet (Krause et al., 2022). Durch die von den TZR ausgesendeten Signale kommt es zu der Transkription von FoxP3 und somit schließlich zu der Differenzierung der CD4-positiven T-Zellen zu Treg-Zellen (Colamatteo et al., 2020; Mertowska et al., 2022). Die Effektivität des Immunsystems wird durch das Prinzip der klonalen Expansion gewährleistet, wobei die aktivierte T-Zelle anschließend proliferiert (Kato & Kobayashi, 2021). Dasselbe Prinzip wird auch bei den aktivierten B-Zellen angewendet, jedoch kommt es hier zusätzlich auch zu Mutationen, welche optimalerweise mit einer Steigerung der Affinität der produzierten Antikörper einhergehen (Hägglöf et al., 2023; Yam-Puc et al., 2018).

1.1.3 B-Zellreifung

Die B-Zellen starten, wie die T-Zellen, ihre Entwicklung im Knochenmark, wo ihre Vorläuferzellen gebildet werden (Yam-Puc et al., 2018). Während dieses Prozesses kommt es zu einer VDJ-Rekombination, in der die Vorläuferzellen die leichten und schweren Ketten der Immunglobuline kombinieren, bis ein B-Zell-Rezeptor in Form eines IgM entsteht (Yam-Puc et al., 2018). Über die Blutbahn gelangen die naiven B-Zellen zu den sekundär lymphatischen Organen, wie z.B. den Lymphknoten (Ichii, 2014). Der folgende Reifungsprozess unterliegt vielen verschiedenen Signalproteinen, ohne welche die Differenzierung nicht möglich wäre (Pieper et al., 2013). Wenn die B-Zellen schon im extrafollikulären Bereich den Kontakt zu Antigenen bekommen, reifen diese bereits in der marginalen Zone zu Plasmazellen aus (MacLennan et al., 2003). Handelt es sich um Peptidantigene, ist darüber hinaus T-Zellhilfe mit Keimzentrumsreaktion zur Entwicklung langlebiger, klassengewechselter, antigenaffiner Plasma- und Gedächtniszellen möglich: Die B-Zellen können als follikuläre B-Zellen in die Keimzentren eindringen und durch T-Zell Interaktionen selektiert werden (Stebegg et al., 2018). Ob die B-Zellen von den follikulären T-Helferzellen selektiert werden, hängt davon ab, wie effizient diese die Antigene über ihren B-Zellrezeptor präsentieren (Victoria & Nussenzweig, 2022; Zhu et al., 2016). Nach erfolgreicher Interaktion wird die ausgewählte B-Zelle in den Zustand der klonalen Proliferation versetzt (Murphy & Weaver, 2018). Durch somatische Mutationen in den Immunglobulinen kommt es zur Affinitätsreifung in der dunklen Zone der Keimzentren, weiterhin zum Immunglobulin-Klassenwechsel durch Austausch der schweren Kette in einem kleineren Anteil der B-Zellen (Hägglöf et al., 2023; Victoria & Nussenzweig, 2022). Die B-Zellen bewegen sich dann zur hellen Zone der Keimzentren

(Stebegg et al., 2018), in welcher deren B-Zellrezeptoren affinitätsabhängig Zugang zu Antigenen auf folliculären dendritischen Zellen haben und im Erfolgsfall von den folliculären T-Helferzellen ausgewählt werden (Yam-Puc et al., 2018). Anschließend wandern die selektierten Zellen zurück in die dunkle Zone, wo sie sich erneut teilen und es ggf. zu weiteren Mutationen kommt (Hägglöf et al., 2023). Schließlich verlassen die entstandenen Tochterzellen als Antikörper-produzierende Plasmazellen oder Gedächtnis B-Zellen die Keimzentren (Yam-Puc et al., 2018). Die Reifung der B-Zellen in den Keimzentren kann durch die folliculären T-regulatorischen Zellen negativ beeinflusst und kontrolliert werden, eine ausgewogene Balance ist wichtig für ein funktionierendes Immunsystem (Stebegg et al., 2018). Durch die immunhistochemische Färbung in meiner Arbeit wurden MUM1/IRF4 positive Zellen markiert, welche mehrheitlich Plasmazellen bzw. Plasmablasten darstellen. MUM1/IRF4 gehört zu den interferon-regulierten Transkriptionsfaktoren (Heo et al., 2017) und ist wesentlicher Bestandteil der lymphoiden Zellentwicklung (Tsuboi et al., 2000), vor allem der Entwicklung der Plasmazellen (Ochiai et al., 2013; Ramos-Vara et al., 2007).

1.1.4 Der Ablauf einer Immunreaktion

Nachdem es ein Antigen durch z.B. eine defekte Hautbarriere in unseren Organismus schafft, bildet das angeborene Immunsystem die erste Reaktion (Murphy & Weaver, 2018). Über *Pattern recognition receptors* (PRRs) wie die TLRs der Makrophagen können die *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) auf der Oberfläche von Bakterien gebunden werden, was zu einer Aktivierung führt (Akar-Ghibril, 2022; Jain & Pasare, 2017). Daraufhin kommt es zu einer Zytokin- und Chemokin-Kaskade, welche wiederum neutrophile Granulozyten zu dem Entzündungsherd führen (Murphy & Weaver, 2018). Neben der Phagozytose der Bakterien durch die Makrophagen, werden diese zusätzlich durch die neutrophilen Granulozyten in intrazellulären Vesikeln neutralisiert (Murphy & Weaver, 2018). Das zeitgleich aktivierte erworbene Immunsystem braucht mehrere Tage, um reagieren zu können (Murphy & Weaver, 2018). Nach der Phagozytose der Bakterien, präsentieren die antigenpräsentierenden Zellen (APZs) u.a. Makrophagen, über MHCII deren Peptidfragmente (Murphy & Weaver, 2018). Diese können über die T-Zell-Rezeptoren der T-Helferzellen erkannt werden und diese aktivieren (Jain & Pasare, 2017). Über das Ausschütten von spezifischen Signalstoffen wie Interleukinen und Interferonen folgen weitere Ausdifferenzierungen wie TH1, TH2, TH17, folliculäre TH (T_{fh}) oder

regulatorische Zellen (Zhu et al., 2016). T_{fh}-Zellen sind für die Formation von Keimzentren verantwortlich, in welchen sie die Selektion der B-Zellen über vorhandene Affinitäten kontrollieren (Zhu et al., 2016). Die nach einem erfolgreich abgeschlossenen Selektionsverfahren entstandenen Plasmazellen sind in der Lage, Antikörper zu produzieren (Yam-Puc et al., 2018). Antikörper können durch Opsonisierung (Markierung), Neutralisierung und die Aktivierung des Komplementsystems die Immunreaktion unterstützen. Einige der aktivierten T-Zellen und B-Zellen können darüber hinaus zu Gedächtniszellen differenzieren und über eine lange Zeit bis zum erneuten Antigenkontakt inaktiv bleiben. Klassengewechselte Plasmazellen können über lange Zeiträume, bis hin zu lebenslang, konstant Antikörper bilden (Khodadadi et al., 2019), was somit die Grundlage der Immunität bildet (Cancro & Tomayko, 2021).

1.2 CVID

Die Erkrankung CVID (*Common variable immunodeficiency*) ist eine primäre Immunschwäche mit Hypogammaglobulinämie und verminderten klassengewechselten B-Gedächtniszellen. Sie tritt mit einer Häufigkeit von 1:25.000-50.000 (Ghafoor & Joseph, 2020) mit einer ausgewogenen Geschlechterverteilung auf (Gathmann et al., 2014). Sie beschreibt ein sehr heterogenes Krankheitsbild (Yazdani et al., 2020), die Altersgruppe kann vom Kindesalter bis in das Erwachsenenalter reichen, wobei es am häufigsten in einem Alter von 20 oder 30 Jahren diagnostiziert wird (Ghafoor & Joseph, 2020). Das kann unter anderem daran liegen, dass die Diagnose der Erkrankung aktuell noch nicht sehr eindeutig ist und verschleppt wird (Grześk et al., 2018). Auch die klinischen Symptome sind sehr weit gefächert. Sie können sich durch eine erhöhte Infektionsanfälligkeit v.a. der Atemwege, Autoimmunität, Enteropathien, Lymphproliferationen, Malignitäten und Allergien äußern (Andersen & Jørgensen, 2022; Emmaneel et al., 2019; Yazdani et al., 2020). Das für sich genommen unspezifische gastrointestinale Hauptsymptom der Patienten ist die Diarrhö (van Schewick et al., 2022). Dies geht u.a. mit einer verminderten Nährstoffaufnahme, einem reduzierten BMI, einer verminderten Lebensqualität und einem veränderten Mikrobiom einher (van Schewick et al., 2020), welches auch in der Diversität reduziert ist (Varricchi et al., 2021). Weiterhin können die Patienten ein Interferon-getriebenes Sprue-ähnliches Krankheitsbild mit Exazerbation bei Norovirusinfektionen aufweisen (Strohmeier et al., 2023). Anhand des klinischen Krankheitsbildes kann man bei den CVID-Patienten unterscheiden, ob das Immunsystem

überreguliert ist und in Autoimmunität resultiert, der Anteil dieser Patienten beträgt ca. 25% (Ghafoor & Joseph, 2020; Warnatz & Voll, 2012), oder unterreguliert ist. 68,1% der retrospektiv analysierten Patientendaten weisen ein Krankheitsbild ohne infektiöse Ursache auf (Ho & Cunningham-Rundles, 2020), was die Behandlung durch konventionelle Medikamente erschwert. Mittlerweile wurde auch ein Auftreten von olfaktorischen Störungen nachgewiesen (Magliulo et al., 2019). COVID Patienten haben eine erhöhte Wahrscheinlichkeit an Magenkrebs zu erkranken und zu versterben (Gullo et al., 2020).

1.2.1 Pathophysiologie bei COVID

Fehler in der B-Zell Funktion und somit auch in deren Antikörper-Produktion sind nachweisbar (Richardson et al., 2019). Es kann beispielsweise eine Störung in dem NF κ B- (Keller et al., 2016) und dem PI3K-Signalweg vorliegen (Harder et al., 2022). Zudem konnten Veränderungen in der Epigenetik beobachtet und als mögliche Ursache festgestellt werden (Rodríguez-Ubrea et al., 2022). Die Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 ist in den B-Zellen bei dem Vorliegen dieser Erkrankung erhöht (Afshar-Ghasemlou et al., 2019; Esfahani et al., 2021). Das Ausmaß der Defekte, welche in den B-Zellen vorliegen, variiert sehr stark (van Schouwenburg et al., 2022). Die Erkrankung geht mit einer reduzierten Anzahl an klassengewechselten Gedächtnis B-Zellen und Plasmazellen einher, was somit die zentrale Rolle der Keimzentren an der Pathogenese vermuten lässt (Unger et al., 2014). Des Weiteren konnten auch defekte T-Zellen als Ursache der Immunschwäche nachgewiesen werden (Schepp et al., 2017). Es können verminderte Level von Treg-Zellen und erhöhte Level von folliculären T-Helferzellen festgestellt werden (Fernando et al., 2021). Bei den CD8⁺ T-Zellen sind Zeichen der reduzierten Funktionalität durch Verlust von Oberflächenmolekülen nachweisbar, welche im Zusammenhang mit dem Entwickeln von spezifischen Symptomen gebracht worden sind (Klopperk et al., 2020, 2022). Der Ursprung ist nur in wenigen Fällen monogenetisch (Fernando et al., 2021), meist werden oligogenetische Defekte vermutet (de Valles-Ibáñez et al., 2018). Eine Mutation im TACI-Gen konnte in einer Studie mit 25% erhöht nachgewiesen werden (Erdem et al., 2019). Bei vielen Patienten konnte jedoch bislang keine genetische Ursache nachgewiesen werden (Christiansen et al., 2020).

1.2.2 Diagnose und Therapie

Die Diagnose der CVID ist aufgrund des heterogenen Krankheitsbildes erschwert und verzögert, was schwerwiegende Folgen für die Patienten haben kann (Grzešk et al., 2018). Somit kommt es häufig zuerst nach Ausschluss von eindeutig beschriebenen Erkrankungen zu der Diagnose CVID (Emmaneel et al., 2019). Biologische Marker zur Messung des oxidativen Stresses (Tanir Basaranoglu et al., 2021) und für die defekten Signalwege (Berbers et al., 2021) könnten sich in Zukunft zur besseren Klassifikation eignen. Bereits in 2008 wurde mithilfe von Durchflusszytometrie, basierend auf den unterschiedlichen Phänotypen der abnormalen B- und T-Zellen, eine weitere Einteilung der CVID-Patienten durchgeführt (Warnatz & Schlesier, 2008). Für CVID liegen Therapieoptionen vor, die diese Krankheit jedoch nicht heilen, sondern nur die Symptome lindern können (Abolhassani et al., 2013). Standard sind Immunglobulinsubstitutionen, welche zusätzlich zu einer Vermehrung der CD14+ Monozyten führen (Simón-Fuentes et al., 2022), in Kombination mit der Gabe von Antibiotika (Salzer et al., 2012). Vor allem bei Atemwegsinfekten sind die Antibiotikagaben erfolgreich, jedoch sollte hier auch die erhöhte Inzidenz von viralbedingten Infekten beachtet und somit der Einsatz von Antibiotika gezielter werden (Sperlich et al., 2018). Schwierigkeiten bereiten jedoch nicht-infektiöse Komplikationen wie z.B. die Gastroenteropathien (Salzer et al., 2012) oder die GLILD (*Granulomatous lymphocytic interstitial lung disease*) welche auch mit einer erhöhten Mortalität einhergehen (Cinetto et al., 2021). Das ist der Grund, weshalb nach alternativen Therapiemöglichkeiten geforscht wird, u.a. im Bereich der autologen und hämatogenen Stammzelltherapie. Hier konnten bereits Erfolge verzeichnet (Froehlich et al., 2020), jedoch auch große Risiken beschrieben werden (Wehr et al., 2015). Das ist der Grund warum die Stammzelltherapie zur Behandlung von CVID aktuell nicht sehr oft angewendet wird (Noor et al., 2022). Es werden Möglichkeiten gesucht, Parameter für die Patientenselektion festzulegen, um die mit der Stammzelltherapie verbundenen Risiken weitestgehend ausschließen bzw. reduzieren zu können (Wehr et al., 2015). Die Anwendung von Rituximab bei GLILD konnte mit einem relativ niedrigem Risiko Erfolge aufweisen (Pecoraro et al., 2019; Verbsky et al., 2021).

1.3 Ziele der Arbeit

Durch die Einleitung wird deutlich, dass bezüglich der Diagnostik von COVID ein großes Potential besteht, da die klinische Symptomatik unspezifisch und sehr heterogen ausfällt. Vorarbeiten konnten die zentrale Rolle der Keimzentren bei der Pathogenese nachweisen, da diese als Ursprung der klassengewechselten Plasmazellen und Gedächtnis B-Zellen dienen. Die räumliche Verteilung von Immunzellpopulationen und die Form der Keimzentren sind somit wesentlicher Bestandteil der Forschung geworden.

Diese Arbeit ergänzt die Phänotypisierung anhand immunhistochemischer Mehrfachfärbungen regulatorischer Zellen und komplementpositiver (C1q, klassischer Weg) Zellen, welche morphometrisch ausgewertet worden sind.

Die durchgeführte Analyse betrifft die:

- Zellzahl,
- Flächendichte,
- räumlichen Bezüge der Immunzellen inn- und außerhalb der Keimzentren
- Architektur der verschiedenen Kompartimente (Follikel +/- Keimzentren, Interfollikulärareale und Granulome)

2. Material und Methoden

In diesem Abschnitt werden die Materialien und Methoden, die für die Durchführung der Untersuchungen notwendig waren, aufgelistet und erläutert.

2.1 Material

Alle benötigten Materialien zur Herstellung und Digitalisierung der histologischen Präparate, sowie für deren anschließende Analyse werden unter diesem Kapitel erläutert.

2.1.1 Kohorte

Die Verwendung der Gewebeproben wurde durch ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Uniklinik Freiburg (251/13_140389, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) inkl. unterschriebener Einverständniserklärung genehmigt. Eine Kohorte von (n=22) anonymisierten Patientenlymphknoten, welche an nicht-neoplastischer COVID-assoziiertes Lymphadenopathie erkrankt sind, liegt den Untersuchungen zugrunde. Der Mittelwert der Altersverteilung der Kohorte liegt bei 32,2 Jahren, der Median liegt bei 31,5 Jahren. Die Geschlechterverteilung setzt sich aus 14 Frauen und 8 Männern zusammen.

2.1.2 Geräte und Programme

Pannoramic Digital Slide Scanner (Fa. 3DHISTECH, Budapest, Ungarn)

Microsoft Excel Version 16.74 (Fa. Microsoft, www.microsoft.com)

QuPath Version 0.3.2 (Bankhead et al., 2017)

Pannoramic Viewer.Ink. (Fa. 3DHISTECH, Budapest, Ungarn)

Python 3.7 (Python Software Foundation, 9450 SW Gemini Dr., ECM# 90772, Beaverton, USA, 2018)

Software Pannoramic Scan 150 (Fa. 3DHISTECH, Budapest, Ungarn)

2.1.3 Materialien

Die Schnitte mit immunhistochemischen Mehrfachfärbungen lagen dankenswerterweise vorab vor und wurden gemäß dem FOLGAS-Protokoll in der Arbeitsgruppe erstellt (Von Schoenfeld et al., 2022). Es wurden 44 digitalisierte Schnittpräparate ausgewertet.

- Färbung 1 (n=22):
 - IgD (braun, membranär, Mantelzone): Kaninchen, polyklonal
 - BCL6 (rot, nukleär, Keimzentrum): Maus, Klon PG-B6p
 - FoxP3 (blau, nukleär, regulatorische T-Zellen): Maus, Klon 236A/E7
- Färbung 12 (n=22):
 - MUM1 (rot, nukleär, Plasmazellen): Maus, Klon MUM1p
 - C1q (blau, zytoplasmatisch, v.a. Makrophagen): Kaninchen, polyklonal

Die digitalen Scans wurden über den Panoramic Digital Slide Scanner (3DHISTECH, Budapest, Ungarn) mit folgenden Parametern gewonnen: 20x Objektivvergrößerung, Kamera: CIS_VCC_F52U25CL, Auflösungen: Mikrometer / Pixel X: 0.221089, Mikrometer / Pixel Y: 0.221447. Originäres Dateiformat war „.mrxs“.

2.2 Methoden

In diesem Kapitel werden alle notwendigen Arbeitsschritte und deren exakte Ausführung chronologisch erläutert.

2.2.1 Auswertungskriterien in den jeweiligen Färbungen

Die Auswertungen wurden nach einer Schulung anhand von Trainingsschnitten durchgeführt. Da die Follikel und Keimzentren der COVID-Patienten stark von physiologischen Follikeln und Keimzentren abweichen, hilft es, verschiedene Farbkanäle rauszufiltern, um sich auch auf die stromlinienförmige Anordnung der B-Zellen konzentrieren zu können. Nicht in die Auswertung sind Follikel oder Keimzentren genommen worden, bei welchen Artefakte im Sinne von intrafollikulären Rissen oder Löchern mehr als 1/3 der Gesamtfläche ausmachen. Auch exkludiert wurden zu stark gefärbte oder durch die Probenentnahme verbrannte/nekrotische Follikel und Keimzentren,

welche sich primär in den Gewebsrändern finden. Zudem wurden nicht vollständig erfasste/abgeschnittene Follikel und Keimzentren ausgeschlossen.

2.2.2 Transfer der Schnittdateien

Um das Öffnen der histologischen Schnittdateien mit dem unter 2.1.2 aufgeführten Programm QuPath V 0.3.2 in der ursprünglichen Auflösung zu ermöglichen, mussten die Dateien sich auf dem Arbeitsspeicher des Laptops befinden und durften nicht über eine externe Festplatte geöffnet werden. Zum Öffnen wurde die die .mrxs Datei über das „*Drag and drop*“ Prinzip in das offene Fenster von QuPath gezogen.

2.2.3 Vorbereitung für die digitale pathologische Quantifikation mittels QuPath für Färbung 1

Um im nächsten Schritt das automatische Erkennen von Classes (Gewebe) zu ermöglichen, muss in dem Programm QuPath zunächst Hintergrundinformation hinterlegt werden. Zunächst werden Farbvektoren hinterlegt, indem man mit einem Rechteck einen Bereich auswählt und über den Pfad „*Analyze → Estimate Stainvectors*“ die Farbkanäle automatisch hinterlegen lässt. Danach können die Gewebsgrenzen über den Pfad „*Analyze → Deprecated → Simple tissue detection*“ erkannt werden. Die Werte, die in den meisten Fällen das beste Ergebnis liefern können, sind wie folgt:

- *Threshold*: 210
- *Requested pixel size*: 10 µm
- *min. area*: 2.100.000
- *max. fill area*: 3.000

Diese Werte dienen für ein grobes Markieren des Gewebes. Alle Gewebeabschnitte, welche vernarbt, verbrannt, nekrotisch oder gerissen sind, sollten entfernt werden. Zudem sollten Falten, Sinus und Detritus entfernt werden. Das Entfernen kann wahlweise über das Zuweisen der Abschnitte in die Class „*Ignore*“ und späteres Herausrechnen erfolgen, oder über ein Anpassen der Geweberänder. Letzteres hat sich als benutzerfreundlicher erweisen.

Die Geweberänder kann man anpassen, indem man die Annotation „*Tissue*“ über einen Rechtsklick entsperrt und dann mit der Tastenkombination ALT + „*Brush*“ und dem gedrückt halten des linken Mausfeldes manuell Bereiche rauslöschten kann. Der nächste Schritt umfasst das Erzeugen von Superpixeln über den Pfad „*Analyze* → *Tiles & superpixels* → *SLIC superpixel segmentation*“. Hierbei werden folgende Werte gegenüber der ursprünglichen Einstellung verändert:

- *Gaussian sigma*: 8 μm
- *Superpixel spacing*: 25 μm

Um sicherzustellen, dass dieser Schritt fehlerfrei stattgefunden hat, muss das lückenfreie Vorliegen der *SLIC Superpixel* optisch kontrolliert werden. Schließlich werden den *SLIC Superpixeln* zwei Eigenschaften hinterlegt. Als erstes wird ein Fenster über den Pfad „*Analyze* → *Calculate features* → *Add intensity features*“ geöffnet. Folgende Einstellungen werden für die „*Preferred pixel size*“ für jeweils die Werte 1, 2, 3, 4 und 6 durchgeführt: alle Kästen unter der Rubrik „*Channels/Color transforms*“ und „*Basic features*“ werden ausgewählt. Anschließend wird der Befehl „*Run*“ ausgeführt und dann unter den Optionen die „*Detections*“ ausgewählt. Als letzter Schritt werden über den Pfad „*Analyze* → *Calculate features* → *Add smoothed features*“ weitere Daten für „*Radius (FWHM)*“ die Werte 25, 50, 65, 75 hinterlegt. In der Abb.1 sieht man exemplarisch das Ergebnis, v.a. die hinterlegten Superpixel, wenn man die Schritte unter 2.2.5 durchgeführt hat.

In der folgenden Abb.1 sind die hinterlegten Superpixel deutlich sichtbar und lückenlos gestaltet. Man sieht, dass diese an die Form des Gewebes angepasst sind. Das ist besonders wichtig, um die Pixel so genau wie möglich, und nicht zu eckig, zu erstellen.

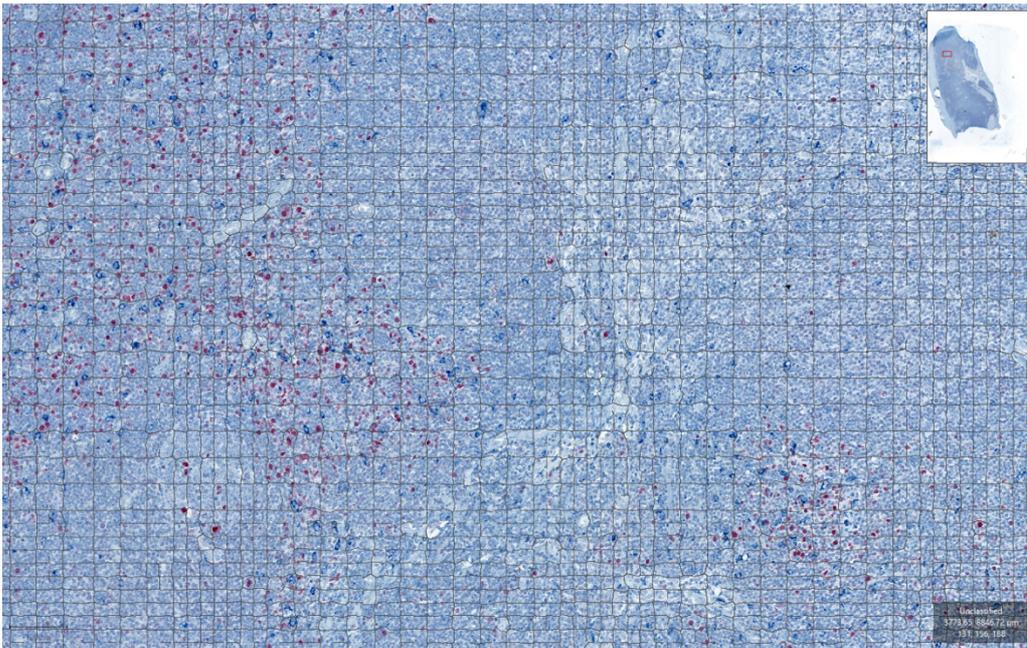


Abb. 1: **SLIC Superpixel**

2.2.4 Markieren der Follikel und deren Keimzentren

Ursprünglich war es geplant, die Follikel und Keimzentren durch einen manuell trainierten „*Object classifier*“, basierend auf einem Trainingssatz von beispielhaften Annotationen, automatisch erkennen zu lassen und anschließend die „*Annotations*“ zu erstellen. Das ist der Grund, weshalb die unter 2.2.5 beschriebenen SLIC Superpixel hinterlegt worden sind. Jedoch wies QuPath bei der Erstellung von den Gewebsgrenzen der Follikel und Keimzentren starke Ungenauigkeiten auf. Die Annotationen sind zu eckig geworden und würden somit mit einer Verfälschung der Umfangs- und schließlich auch der Rundheitswerte einhergehen. Des Weiteren konnten die Follikel nur sehr schlecht gegenüber den interfollikulären Bereichen abgegrenzt werden. Hier weist das menschliche Auge eine höhere Differenzierungseigenschaft auf. Das ist der Grund, weshalb alle Follikel und Keimzentren per Hand markiert worden sind. Somit konnte eine sehr hohe Genauigkeit erzielt werden. Durch eine gemeinsame Kontrolle jedes Follikels und Keimzentrums mit einem Facharzt für Pathologie mit spezieller Erfahrung in der Immunpathologie liegt jedem Follikel und Keimzentrum ein gemeinsamer Konsens zugrunde.

2.2.5 Erstellen eines Classifiers für diverse Gewebszonen

Die Follikel und Keimzentren müssen, wie bereits unter 2.2.6 erläutert, aufgrund mangelnder Genauigkeit der automatischen Gewebserkennung manuell markiert werden. Jedoch können alle weiteren Gewebe, wie u.a. der interfollikuläre Bereich und die Granulome automatisch zuverlässig erkannt werden. Für das Trainieren des „*Object Classifier*“ generieren wir einen Trainingssatz, indem man beispielhaft Bereiche der verschiedenen Gewebe annotiert und der entsprechenden Class zuordnet. Hierfür ist es wichtig zu verstehen, dass der „*Object Classifier*“ jedem hinterlegten Superpixel eine „*Class*“ zuordnet. Das bedeutet in der praktischen Umsetzung, dass eine separate Trainingsklasse für die Follikel als z.B. „Follikel+“ und für die Keimzentren z.B. „Keimzentrum+“ erstellt werden muss, welche als Daten für den „*Classifier*“ genutzt werden, aber nicht in die Auswertung der Follikel und Keimzentrendaten einfließen. Das wird sichergestellt, indem diese automatisch annotierten Follikel und Keimzentren vor dem Exportieren der Daten aus QuPath gelöscht werden. Wenn erfolgreich Trainingsdaten generiert worden sind, wird die Tissue Annotation über einen Doppelklick auf das Gewebe ausgewählt, bis dieses gelb angezeigt wird. Über den Pfad „*Classify* → *Object classification* → *Train object classifier*“ gelangt man zu dem hier benötigten Analysebereich. Über „*Select*“ können die Classes ausgewählt werden, die zum Training verwendet werden sollen. In diesem Falle werden alle Classes für das Trainieren des Classifiers ausgewählt, außer die Classes „Follikel“ und „Keimzentrum“. Diese händischen Annotationen sollen unverändert bleiben, auch nach der Anwendung des „*Object Classifiers*“ auf das Präparat. Über die Option „*Live update*“ kann man sich die Einteilung der Superpixel durch den „*Classifier*“ anzeigen lassen und ggf. die Genauigkeit des „*Object Classifiers*“ durch einen höheren Trainingsdatensatz erhöhen. Erst, wenn jedem SLIC Superpixel durch eine farbliche Darstellung eine Class zugeteilt worden ist, können über ein neues Fenster „*Analyze* → *Tiles & superpixels* → *Tile classifications to annotations*“ diese erkannten Gewebe in Annotationen umgewandelt werden. Hier wurden die Optionen „*All classes*“ und „*Delete existing child objects*“ ausgewählt. Die unerwünschten Annotationen, die in diesem Schritt erstellt worden sind, aber nicht in die Auswertung einfließen sollen z.B. „Follikel+“, müssen nun gelöscht werden. In Abb. 2 sieht man exemplarisch den „*Object Classifier*“ für die Färbung 1 bei Patient 2. Bei der Färbung F12 konnte dieser Schritt nicht durchgeführt werden, da eine sehr homogene Färbung des Gewebes vorliegt. Hier wurde das manuelle Annotieren der Gewebe „Granulome“ durchgeführt und die interfollikuläre Fläche,

basierend auf der Gesamtfläche des Gewebes und der einzelnen anderen Gewebeklassen errechnet.

Folglich weist jedes Präparat eine Unterteilung in folgende vier „Classes“ auf:

- Follikel (ausschließlich manuelle Markierung)
- Keimzentrum (ausschließlich manuelle Markierung)
- Interfollikulär (F1 automatisch, F12 errechnet)
- Granulome (F1 automatisch, F12 manuell)

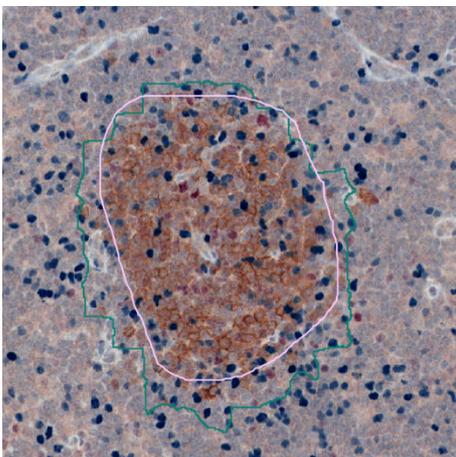


Abb. 2: **Classifier interfollikulär**

In der oben aufgeführten Abbildung kann man sehr gut erkennen, wie genau der oben beschriebene Prozess funktioniert und die Follikel gegen interfollikuläre Areale abgegrenzt werden. Grün stellt die Grenze des interfollikulären Bereichs dar, die pinke Umrandung zeigt einen manuell annotierten Follikel. Die Fläche des Follikels beträgt $33745 \mu\text{m}^2$, was die Präzision der Arbeit unterstreichen kann. Zur Überschaubarkeit wurden hier die detektierten Zellen ausgeblendet.

2.2.6 Auszählung der positiven Zellen mittels QuPath für Färbungen 1 und 12
Aufgrund der unterschiedlichen Homogenität der Färbungen F1 und F12, musste jeweils ein anderes Vorgehen für die Detektion der positiven Zellen gewählt werden. Die Färbung F1 weist ein heterogenes Färbungsmuster auf, somit ist es dem Programm mit der „*Positive cell detection*“ sehr gut möglich gewesen, die positiven Zellen gegen umliegende T-Zellen

abzugrenzen und richtig zu erkennen. Über den Pfad „Analyze → Cell detection → Positive cell detection“ öffnet sich ein Fenster, über welches diverse Modifikationen vorgenommen werden müssen. Für alle Präparate wurden ausschließlich folgende Einstellungen angepasst:

- *Optical density sum*
- *Maximum area: 80 μm^2*
- *exclude DAB*
- *Cell expansion: 3 μm .*

In einzelnen Fällen wurde, abhängig von dem Gewebsbereich, anstatt der „Optical density sum“ die Einstellung „Hematoxylin OD“ ausgewählt. Für jeden Patienten und die dazugehörigen Klassen wurden individuelle Werte für die *Threshold* ermittelt, welche optimalen Ergebnisse aufweisen konnten.

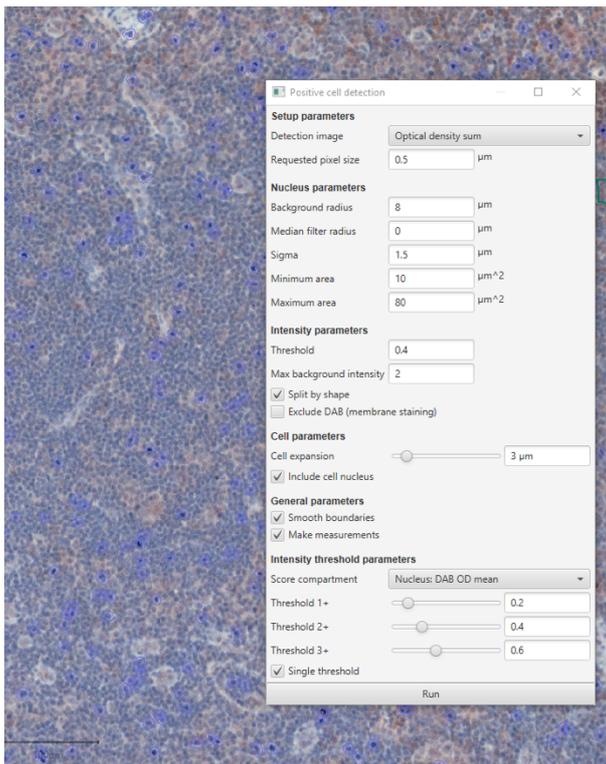


Abb. 3: **Positive cell detection**

Abbildung 3 zeigt beispielhaft das geöffnete Fenster einer „Positive cell detection“ und die Werte, die man dort einstellen kann. Die blauen umrandeten Zellen sind die richtig erkannten FoxP3 positiven Zellen.

Die Färbung F12 weist ein sehr homogenes Färbungsmuster auf, was eine „*Positive cell detection*“, wie oben beschrieben, unmöglich macht. Zudem liegen hier sehr viele Makrophagen mit z.T. zahlreichen Zellfortsätzen vor, welche über die „*Positive cell detection*“ als viele einzelne Zellen anstatt einer großen Zelle, erkannt worden sind. Das ist der Grund, warum hier gegen die „*Positive cell detection*“ und für das Vorgehen über den „*Pixel Classifier*“ entschieden wurde. Als erstes wurde ein neues Projekt in QuPath erstellt und die erwünschte unbearbeitete Datei dort importiert. Als Grundlage für den „*Pixel Classifier*“ dienen ca. 150 Trainingsdaten pro Class, indem für die MUM1 und C1q positiven Zellen und die T-Zellen in dem interfollikulären Bereich beispielhaft Zellen markiert und der entsprechenden Class zugeordnet worden sind. Über „*Classify → Pixel classification → Train pixel classifier*“ kann der „*Pixel Classifier*“ trainiert werden. Als Region wird „*Any annotation ROI*“ und als Auflösung „*Very high (0.78 $\mu\text{m}/\text{px}$)*“ ausgewählt. Die Farbkanäle und Features, welche man für den „*Pixel classifier*“ selektieren kann, wurden individuell für jedes Präparat ausgewählt. Durch das Auswählen der „*Live prediction*“ wird eine Vorschau des Classifiers ermöglicht (s. Abb. 4) und bei einem zufriedenstellenden Ergebnis gespeichert. Dieser gespeicherte „*Classifier*“ ist für jedes Präparat spezifisch und kann nicht für andere Präparate verwendet werden. Um doppelte Annotationen zu vermeiden, muss das Präparat in diesem Schritt in einem neuen Fenster geöffnet werden, ohne die hinterlegten Trainings-Annotationen. Über „*Classify → Pixel classification → Load pixel classifier*“ kann der entsprechende „*Classifier*“ ausgewählt werden. Nach dem Auswählen von „*Create objects*“, wurden in dem nächsten Schritt alle Optionen ausgewählt und die Mindestgröße der „*Detections*“ von 5 μm^2 festgelegt. Bei den nun entstandenen Detektionen ist es wichtig, die Detektionen der interfollikulären Zellen für eine bessere Übersicht zu löschen. Die übrig gebliebenen Detektionen können nun über „*File → Object data → Export as GeoJSON*“ exportiert werden und in die gewünschte Version der Zieldatei auf dem äquivalenten Weg importiert werden.

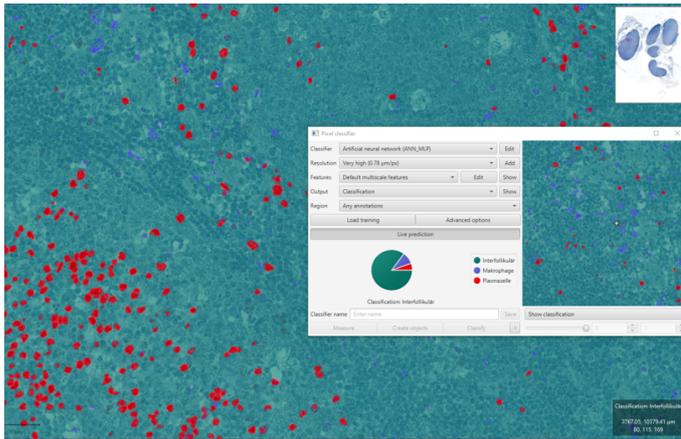


Abb. 4: **Pixel classifier Live prediction**

Die „Live prediction“ (Abb. 4) ermöglicht einen Überblick über die Genauigkeit des Pixel classifiers. Die farbliche Darstellung entspricht der Farbe, die den Classes zugeordnet worden ist. Somit sind die rot dargestellten Pixel die MUM1 positiven, die blau dargestellten die C1q positiven Zellen und die grünen Bereiche die übrigen Areale.

2.2.7 Erheben der Daten zur Zellzahl, Flächen- und Umfangsberechnung mittels QuPath

Die nach dem beschriebenen Protokoll generierten Daten, können aus QuPath für die weiteren Analysen exportiert werden. Zur Vereinfachung können alle Annotationen einer Class zu einer Übersichts-Annotation zusammengefügt werden. Somit kann die Gesamtzahl der Zellen und die totale Fläche übersichtlich abgelesen werden. Einzelne Werte zu der Fläche und zu dem Umfang der Follikel und Keimzentren, finden sich in der „Annotation measurements“ Tabelle (s. Abb. 5). Diese kann über den Befehl „Copy to clipboard“ kopiert und in das unter 2.1.2 gelistete Programm Excel eingefügt und für weiterführende Berechnung verwendet werden. Beispiele für notwendige Berechnungen sind u.a. Summen, Mittelwerte und Mediane. Der Wert der Fläche und des Umfangs sind essenziell für die Berechnung der Unrundheit der Follikel und Keimzentren. Wie in Abb. 5 ersichtlich ist, enthält die unten stehende Tabelle auch weitere Informationen, die nicht primär relevant für unsere wissenschaftliche Fragestellung sind, z.B. „ROI“. Diese sind für die Vollständigkeit trotzdem in einer Mastertabelle enthalten (s. Anhang). Zudem ist in der Abb. 5 die Spalte „Num Positive“ enthalten, welche keine Relevanz enthält, da alle gezählten Zellen unter „Num Negative“ zu finden sind.

Image	Name	Class	Parent	ROI	Centroid X μm	Centroid Y μm	Num Detections	Num Negative	Num Positive	Positive %	Num Positive per mm ²	Area μm^2	Perimeter μm
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	2522	12415.9	9	9	0	0	0	25651.7	581.7
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	3428.7	12164.1	9	9	0	0	0	26773.6	707.39
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	5773.1	15043.2	49	49	0	0	0	89904.6	1109
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	10078.6	17142.3	44	44	0	0	0	27579.6	604.6
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	2803.3	16590.3	4	4	0	0	0	47385.8	817.45
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	6223.1	16859.5	34	34	0	0	0	16897.7	489.18
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	4369.5	15733.8	6	6	0	0	0	18995.6	516.55
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	642.77	14159.1	15	15	0	0	0	41490.8	764.75
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	10754	17246.6	0	0	0	-	0	5453.6	274.16
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	4501.6	15297.5	6	6	0	0	0	13363.3	460.87
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	132.96	13073.7	27	27	0	0	0	48236.9	889.95
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	2239.7	17081.7	10	10	0	0	0	14752.5	455.17
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	2292.2	14405.2	0	0	0	-	0	28780	650.37
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	11022.2	19158.8	55	55	0	0	0	47871.1	871.99
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	2365	12014.9	7	7	0	0	0	58064.7	902.06
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	3705.6	13404.2	17	17	0	0	0	18364.9	508.59
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	1640.9	12119.8	14	14	0	0	0	55504.4	863.39
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	1007.4	16311.5	34	34	0	0	0	40910.5	737.39
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	1161.5	16139.9	7	7	0	0	0	21846.9	538.73
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	5836	16088.7	11	11	0	0	0	15378.8	472.54
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	11711.7	18930.4	144	144	0	0	0	30426.1	642.97
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	5935.3	17205.4	53	53	0	0	0	53111	853.33
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	2590.4	14856.9	10	10	0	0	0	139450.1	1364.7
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	3901.7	15056.5	0	0	0	-	0	24532.4	571.74
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	10282.6	16526.4	69	69	0	0	0	20238.2	439.06
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	1408.1	16664.8	32	32	0	0	0	59813.5	928.41
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	9861.1	17550.5	21	21	0	0	0	23003.6	567.13
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	3023.3	11785.4	50	50	0	0	0	76587.1	1055.9
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	12014.7	17446.3	123	123	0	0	0	80582.6	1066.1
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	3949.5	13333.9	1	1	0	0	0	16504.4	484.4
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	1264.5	11881.5	54	54	0	0	0	178473.3	1581.3
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	708.97	12015.5	32	32	0	0	0	82187.3	1120.4
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	3424.3	14226.4	3	3	0	0	0	117059.1	1284.1
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	5388.7	14693.8	16	16	0	0	0	32627.4	674.9
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	9917.7	18206.2	66	66	0	0	0	40596.1	756.82
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	1845.5	16881.2	20	20	0	0	0	30024.6	642.01
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	12249.8	18526	51	51	0	0	0	18802.4	502.09
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	369.63	12552.2	38	38	0	0	0	89979.2	1121.3
F1 Pat2.mnss	Follikel	Follikel	Image	Polygon	10487	18132.5	17	17	0	0	0	17314.9	489.26

Abb. 5: Annotation measurements

In der Abb. 5 kann man den Aufbau einer „Annotation measurement“ Tabelle sehr gut nachvollziehen. Hier können die Werte, wie die Fläche und der Umfang der Annotations abgelesen und anschließend kopiert werden.

2.2.8 Berechnen der Unrundheit

Wie unter 2.2.7 beschrieben, sind mit Hilfe des Programms QuPath für jeden Follikel und jedes Keimzentrum die Werte für die Fläche in μm^2 und der Umfang in μm erhoben worden. Somit lässt sich aus diesen Werten, durch die Umstellung der mathematischen Formel für Kreise, jeweils der Radius berechnen:

Berechnung des Radius durch Umformung der Formel für die Kreisfläche:

$$A = \pi r^2 \rightarrow r = \sqrt{(A/\pi)}$$

Berechnung des Radius durch Umformung der Formel für den Kreisumfang:

$$U = 2r\pi \rightarrow r = \frac{U}{2\pi}$$

Aus den durch die oben genannten Formeln ermittelten Radien, konnte somit ein Verhältnis gebildet werden, welches die Unrundheit beschreiben kann:

$$\frac{r(\text{Umfang})}{r(\text{Fläche})}$$

Als Basis gilt der Wert 1, welcher für einen perfekten Kreis stehen würde. Je höher also der Wert ist (>1), desto größer ist die vorliegende Unrundheit.

2.2.9 Durchführung von statistischen Tests

Zunächst wurden für die erhobenen Daten untereinander, anhand einer Spearman rho Korrelationskoeffizienten-analyse, Werte für Korrelationskoeffizienten erhoben. Der Spearman rho Test gibt den Rangfolgekorrelationskoeffizienten wieder und setzt keine Normalverteilung voraus. Dieser Vorgang wurde anhand eines Skriptes über das unter 2.1.2 gelistete Programm durchgeführt. Da es sich hier um biologische Daten handelt, weisen bereits Daten mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,5 eine hohe Korrelation auf. Diese Korrelationskoeffizienten wurden anhand von einem zweiseitigen T-Test auf Signifikanz geprüft. Für die Werte, bei welchen keine Korrelation vorliegt, wurde anhand von einem Mann-Whitney-U Test die Signifikanz getestet. Der Mann-Whitney-U Test ist geeignet, die Signifikanz von zwei unabhängigen Variablen zu beschreiben.

2.2.10 Artefakte durch die Schnittherstellung und Digitalisierung

Eine fehlerhaft berechnete Fläche und ein fehlerhaft berechneter Umfang durch:

- Risse innerhalb der Strukturen
- Weiße Löcher durch fehlendes Gewebe
- Abgerissenes Gewebe bei der Fixierung
- Abgeschnittenes Gewebe
- Unvollständig abgebildetes Gewebe durch die Biopsieentnahme
- Stark aufgelockertes Gewebe
- Falten durch überlagertes Gewebe
- Ungenau manuell markierte Gewebsgrenze durch erschwertes Differenzieren der Gewebsgrenzen oder durch wackeliges händisches Annotieren mit der Maus

Nicht eindeutig erkennbare Follikel und Keimzentren durch:

- Zu starke immunhistochemische Färbung = zu dunkel
- Zu schwache immunhistochemische Färbung = zu hell
- Unscharfer Scan des Gewebeschnittes
- Luftblasen
- Flecken durch den Färbungsprozess

Zur Vermeidung der genannten Artefakte beim Schneiden, Aufziehen und Eindecken der Schnittpräparate könnten etablierte 3D mikroskopische Verfahren wie Lichtscheibenmikroskopie (Girkin & Carvalho, 2018; Santi, 2011) dienen, führen jedoch ihrerseits zu einer Verzerrung des Gewebes während des Clearings und könnten zur diagnostischen Unbrauchbarkeit führen. Nicht-destruktive, labelfreie Mikroskopieverfahren wie μ CT (Alhusain & Al-Mayah, 2021; Guntoro et al., 2019) oder Synchrotronmessungen (Fernandez-Palomo et al., 2022; Peřka, 2022) sind noch im Entwicklungsstadium, könnten jedoch zukünftig eine Lösung des Problems bieten, da sie die Anwendung bereits etablierter Verfahren nicht behindern.

2.2.11 Umgang mit Artefakten bei der Analyse der Präparate

Während dieser Forschung wurde durchgehend darauf geachtet, dass man eine Balance zwischen dem Generieren von möglichst vielen Forschungsdaten und dem Ausschluss von Gewebe, welches zu stark durch Artefakte betroffen wurde, schafft. Die Ausschlusskriterien wurden im Konsens erarbeitet.

In diesen Fällen wurde Gewebe aus der Analyse ausgeschlossen:

- Unscharfer Scan (einzelne Zellen sind nicht erkennbar)
- Abgerissene, nicht vollständig abgebildete Bereiche (ausnahmslos)
- Stark aufgelockertes Gewebe
- Zu starke immunhistochemische Färbung (ein Differenzieren von Follikel und Keimzentrum ist hier nicht mehr möglich)
- Riss in Follikel oder Keimzentrum mit $> 1/3$ der Gesamtfläche
- Teilweise oder komplette Verdeckung durch Farbflecken oder Luftblasen

Ungenau markierte Kompartimente können weitestgehend ausgeschlossen werden, da sich auf die Werte der Färbung F1 beschränkt wurde, wo diese durch eigene Färbungen deutlich erkennbar waren. Zusätzlich wurde die Genauigkeit durch das manuelle Markieren und den vorliegenden gemeinsamen Konsens für jeden Follikel und jedes Keimzentrum maximal erhöht. Die Berechnung der Flächendichte für die verschiedenen zellulären Parameter erlaubt eine robustere Vergleichbarkeit der Werte bei hier stark schwankenden Absolutwerten aufgrund der unterschiedlichen Größen der histologischen Schnittpräparate.

3. Ergebnisse

In dem folgenden Abschnitt werden sämtliche Ergebnisse der unter Kapitel 2 beschriebenen Methoden beschrieben.

3.1 Übersicht über ein digitales histologisches Präparat

Die folgende Abb. 6 zeigt die anatomischen Orientierungspunkte, sowie auch diverse Artefakte auf. Dies dient zum besseren Verständnis der nachfolgenden Abbildungen.

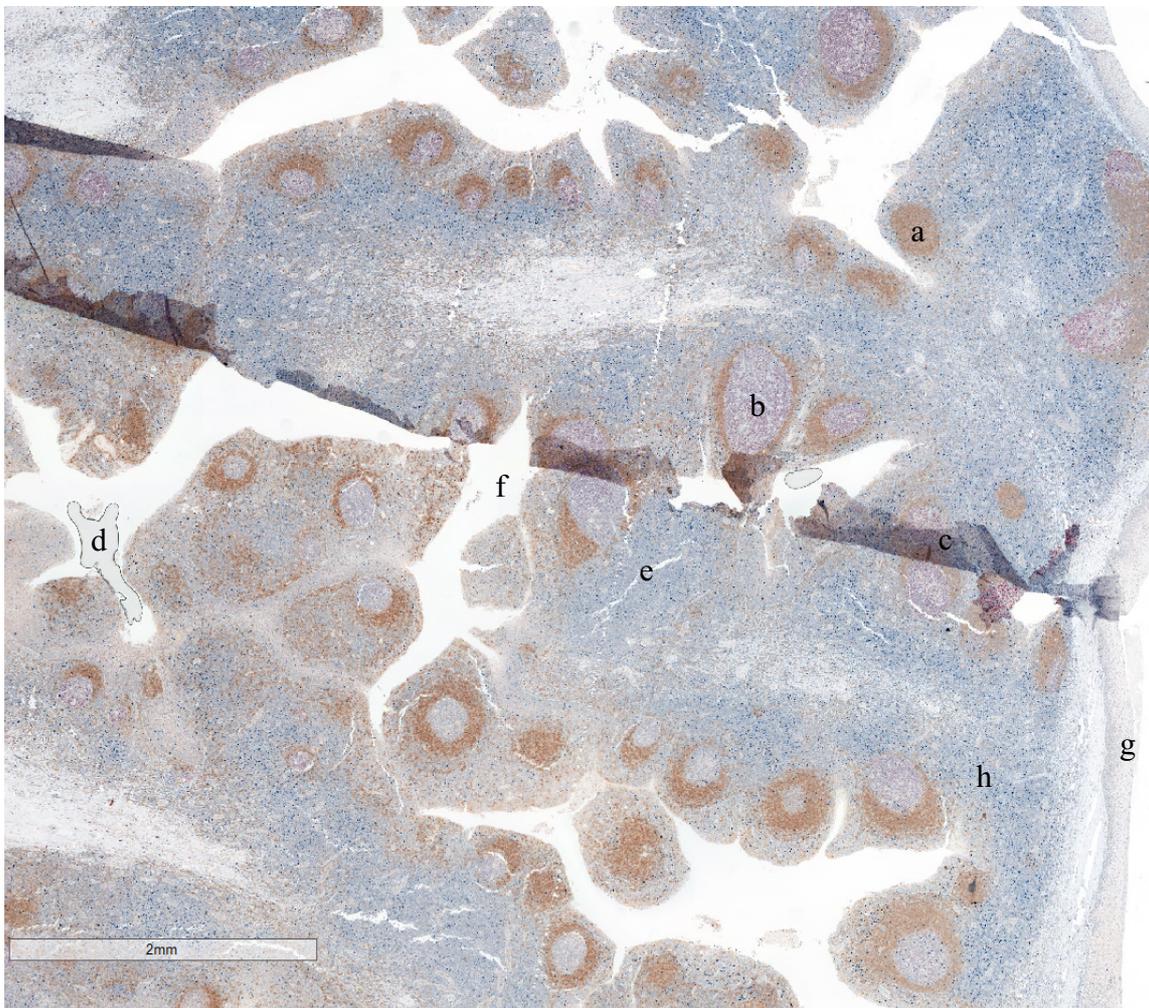


Abb. 6: Übersicht über ein sekundär lymphatisches Organ

Hier sieht man ein histologisches Präparat einer humanen Tonsille mit folgenden Strukturen: a) Follikel, b) Follikel mit Keimzentrum, c) Überlagerung von Gewebe durch einen Knick, d) Luftblase, e) Risse, f) Krypte, g) Plattenepithel, h) interfollikuläre Zone (T-Zell Region)

3.2 Visuelle Darstellung

3.2.1 Visuelle Darstellung der markierten Gewebe

Dieser Abschnitt dient zur besseren Übersicht der farblich gekennzeichneten Gewebiszonen, tabellarisch in Tabelle 2 und beispielhaft anhand der Abb. 7.

Gewebe	Farbe
Follikel	Pink
Keimzentrum	Gelb
Interfollikuläre Zone	Grün
Granulome	Braun
Gewebsgrenze	Rot

Tabelle 2: Farblegende Gewebe

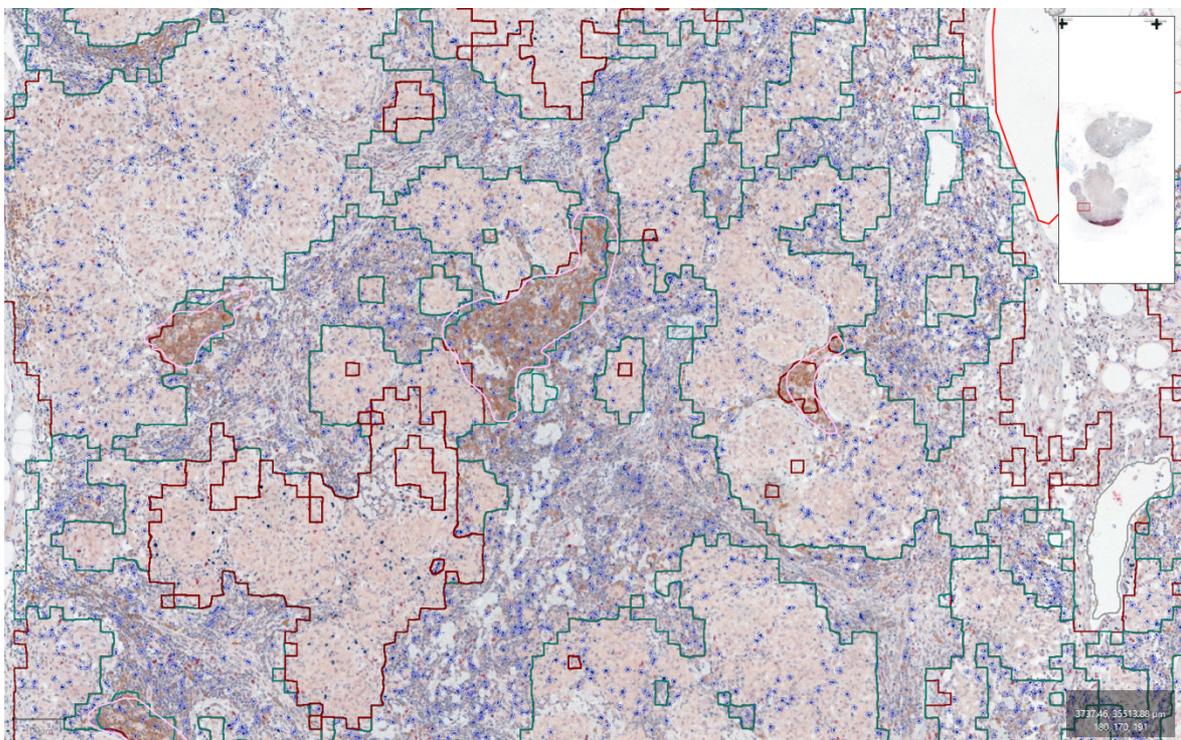


Abb. 7: Darstellung der markierten Gewebe

Anhand der oben aufgeführten Abbildung kann man die Markierung der Gewebe sehen.

3.2.2 Visuelle Darstellung der markierten Follikel und Keimzentren

In Abb. 8-9 wird exemplarisch auf die markierten Follikel und Keimzentren aus der Färbung F1 und in Abb. 10-11 aus der Färbung F12 eingegangen. Zur besseren Übersicht sind für diese Fragestellung nicht primär relevante Gewebsgrenzen ausgeblendet worden, um auf die Darstellung der Follikel und Keimzentren zu fokussieren.

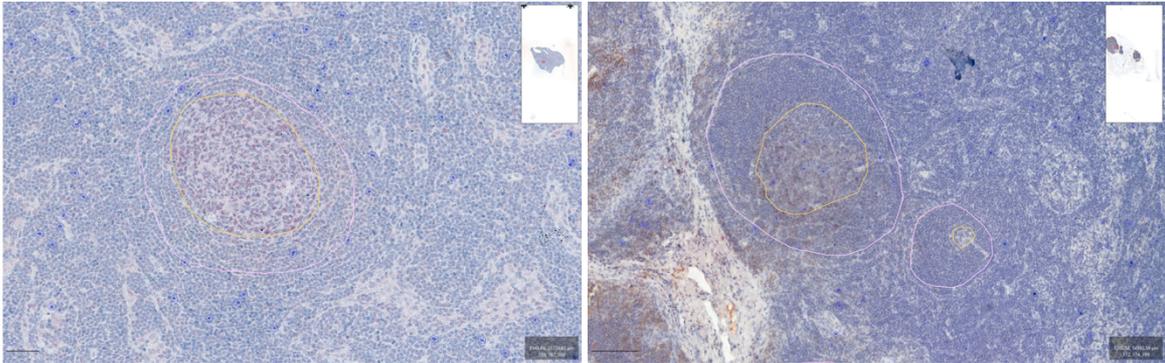


Abb. 8: **Runde Follikel mit Keimzentren F1**

In den beiden Abbildungen sieht man runde Follikel mit runden Keimzentren, umgeben von der interfollikulären Zone. Die markierten Zellen stellen die FoxP3 positiven Zellen dar.

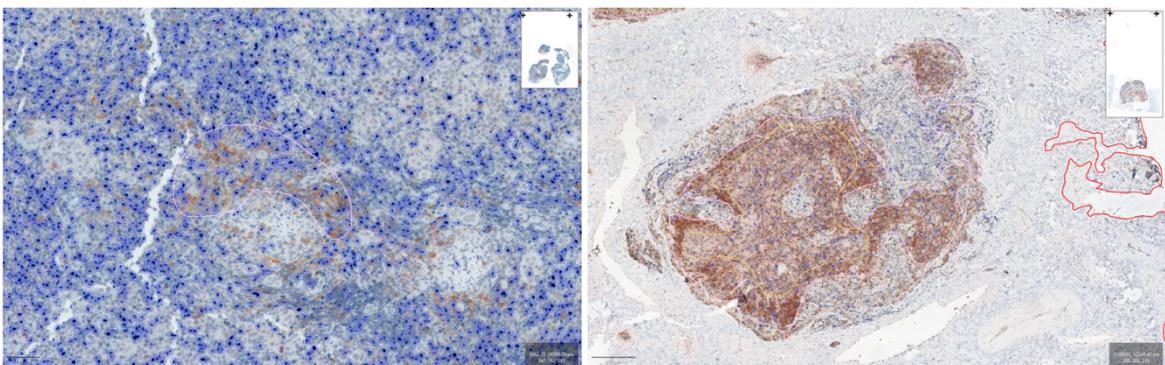


Abb. 9: **Unrunde Follikel mit und ohne Keimzentrum F1**

Die zwei Abbildungen stellen unrunde Follikel ohne (links) und mit (rechts) einem Keimzentrum dar.

Rein optisch lässt sich hier schon der Zusammenhang zwischen der Unrundheit und der Zelldichte der FoxP3 positiven Zellen feststellen. Je unrunder der Follikel ist, desto höher ist die festgestellte Dichte der FoxP3 positiven Zellen.

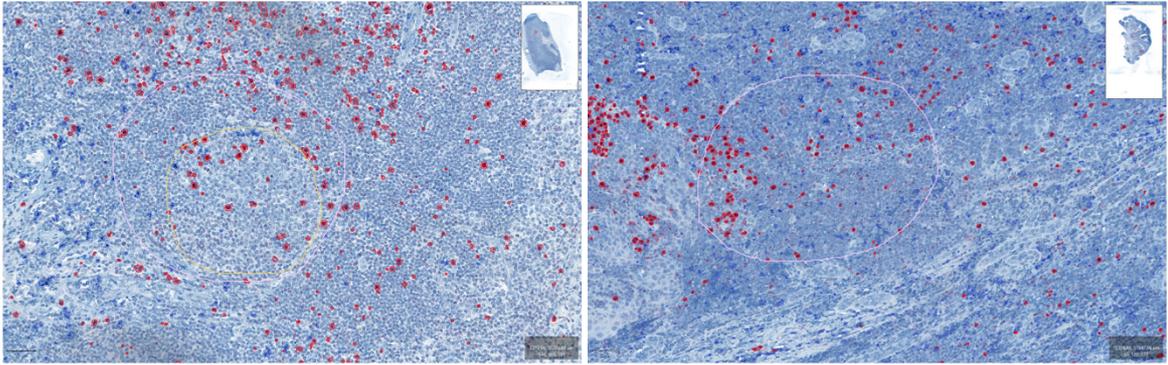


Abb. 10: **Runde Follikel mit und ohne Keimzentrum F12**

Links sieht man einen runden Follikel mit einem Keimzentrum, in der rechten Abbildung kann man kein Keimzentrum erkennen. Die MUM1 positiven Zellen wurden rot und die C1q positiven Zellen blau annotiert.

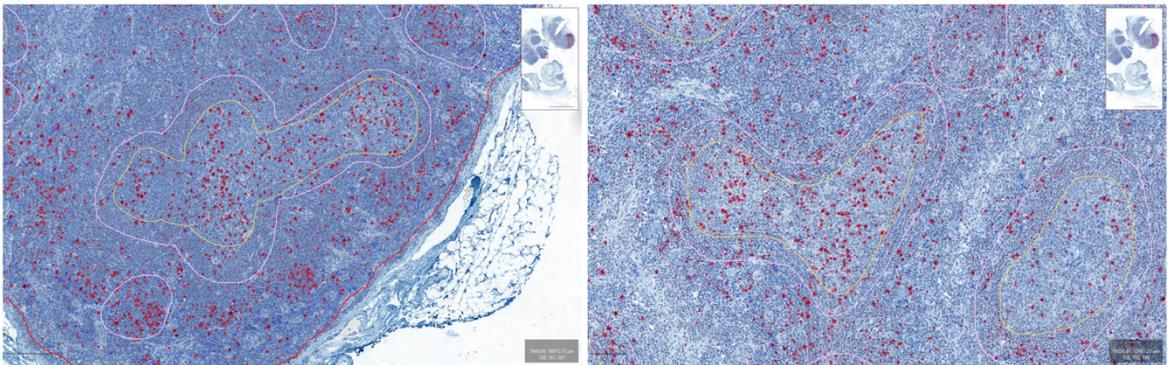


Abb. 11: **Unrunde Follikel mit und ohne Keimzentren F12**

Auf den Abbildungen kann man sowohl runde als auch unrunde Follikel erkennen, teilweise mit korrespondierend unrunder Keimzentren.

Anders als bei der Färbung F1, lässt sich bei der Färbung F12 optisch kein direkter Zusammenhang zwischen der Unrundheit und einer Zunahme der Zelldichte der MUM1 und C1q positiven Zellen feststellen. Was man bei Abb. 10-11 im Gegensatz zu Abb. 8-9 sehen kann, ist zudem die stark homogene Färbung und damit der verminderte Kontrast der Follikel gegenüber der interfollikulären Zone. Diese Eigenschaft hat das Erkennen und Abgrenzen der Follikel in der Färbung F12 initial erschwert, was durch das Ausblenden von verschiedenen Farbkanälen gelöst wurde.

3.2.3 Visuelle Darstellung der Artefakte

Abb. 12 zeigt die Ausschlusskriterien für Gewebe, insb. Follikel und Keimzentren, auf.

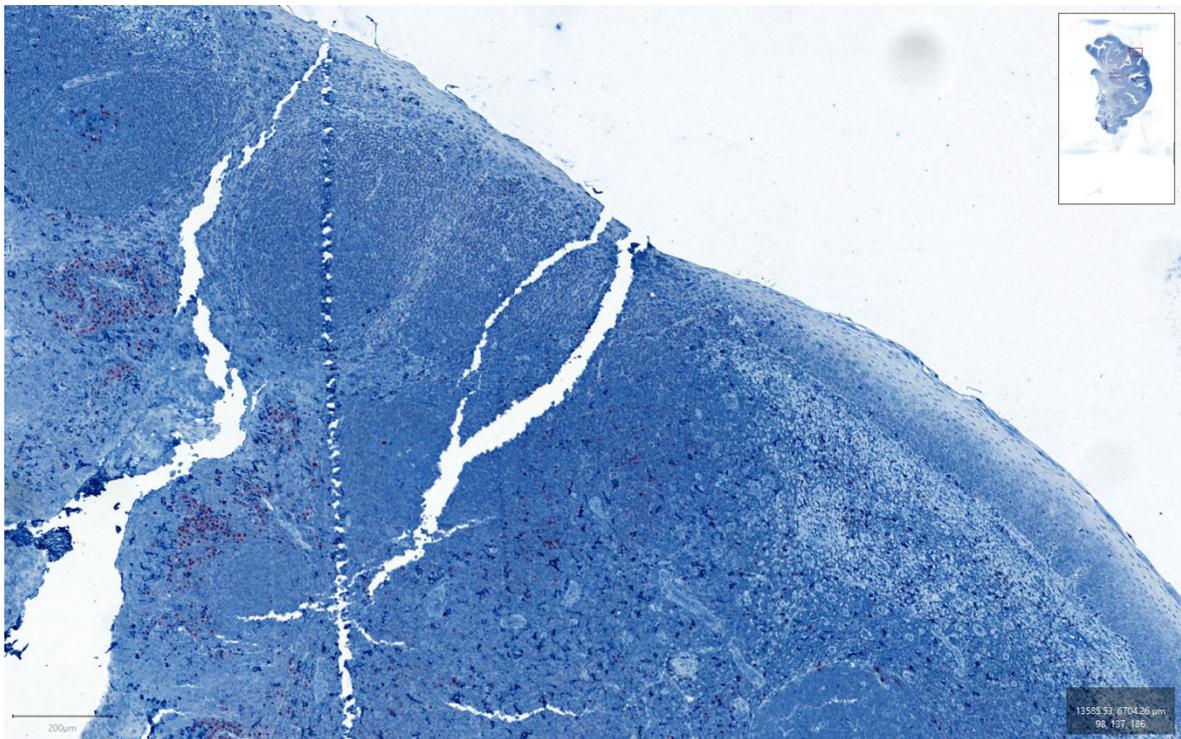


Abb. 12: **Aus der Analyse ausgeschlossene Follikel F12**

Hier werden exemplarisch Gründe für einen Ausschluss der Follikel und Keimzentren visualisiert. Follikel in diesem Ausschnitt weisen Rissartefakte und eine sehr dunkle Hintergrundfärbung auf, die wie im Inlet erkennbar zonal begrenzt ist.

Gewebzonen wurden exkludiert, wenn sie mind. 1 der folgenden Merkmale aufwiesen:

- Risse, Schnitte
- Löcher
- Falten
- Verbrennungen/Nekrosen (wie bei Kauterisation)
- Luftblasen
- Farbflecken
- Vernarbungen
- Fettgewebe

Doppeldetektionen bei einer Überschneidung von Gewebsgrenzen durch den Classifier bei Färbung F1, liegen im Durchschnitt bei 0,95% und haben somit keine Signifikanz.

3.3 Visuelle Darstellung der markierten positiven Zellen

In diesem Kapitel wird auf die immunhistochemisch markierten Zellen eingegangen. Die Folgenden Tabellen 3-4 gehen auf die farbliche Markierung der positiven Zellen der zwei Färbungen ein. Die farbliche Markierung durch das Programm QuPath entspricht der farblichen Markierung der Zellen durch die immunhistochemische Färbung. Anschließend werden in Kapitel 3.3.1 und in Kapitel 3.3.2 pro Färbung die positiven Zellen für jedes Gewebe dargestellt. Dies erfolgt, indem derselbe Ausschnitt von demselben histologischen Präparat einmal mit den markierten Zellen (links) direkt gegen denselben Ausschnitt ohne die markierten Zellen (rechts) gestellt wird. Hier war nicht nur das Erkennen der positiven Zellen wichtiger Bestandteil, sondern auch das Verhindern falsch-positiver Zellen.

Färbung 1

Positive Zelle	Farbe
FoxP3	Blau

Tabelle 3: Farblegende positive Zellen F1

Färbung 12

Positive Zelle	Farbe
MUM1	Rot
C1q	Blau

Tabelle 4: Farblegende positive Zellen F12

3.3.1 Positive Zellen der Färbung F1

An den folgenden Abb. 13-18 wird die sehr heterogene Färbung deutlich, welche sowohl das Anwenden des „*Object Classifiers*“, wie unter 2.2.5 beschrieben, als auch das Anwenden der „*Positive cell detection*“, wie unter 2.2.6 beschrieben, erleichtert hat.

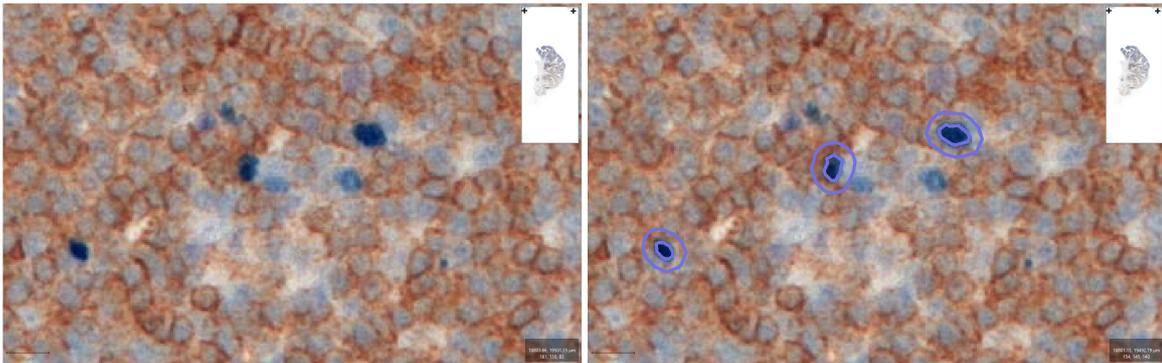


Abb. 13: **FoxP3 positive Zellen im Follikel**

Die Abbildungen verdeutlichen, welche Zellen in den folliculären Arealen positiv gezählt worden sind. Zudem wird deutlich, welche Zellen zwar blau gefärbt wurden, aber nicht stark genug reagiert haben, um in die Analyse mit aufgenommen zu werden.

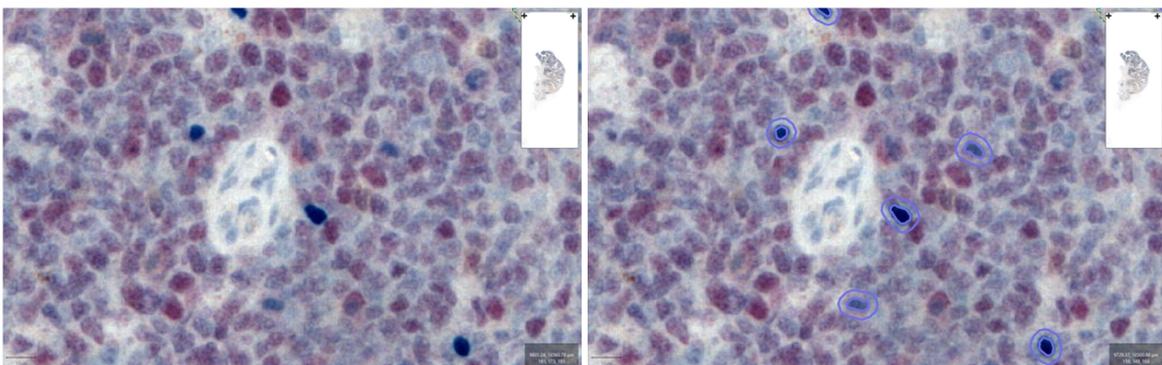


Abb. 14: **FoxP3 positive Zellen im Keimzentrum**

Diese Abbildungen zeigen, welche Zellen in dem Bereich der Keimzentren positiv gezählt worden sind.

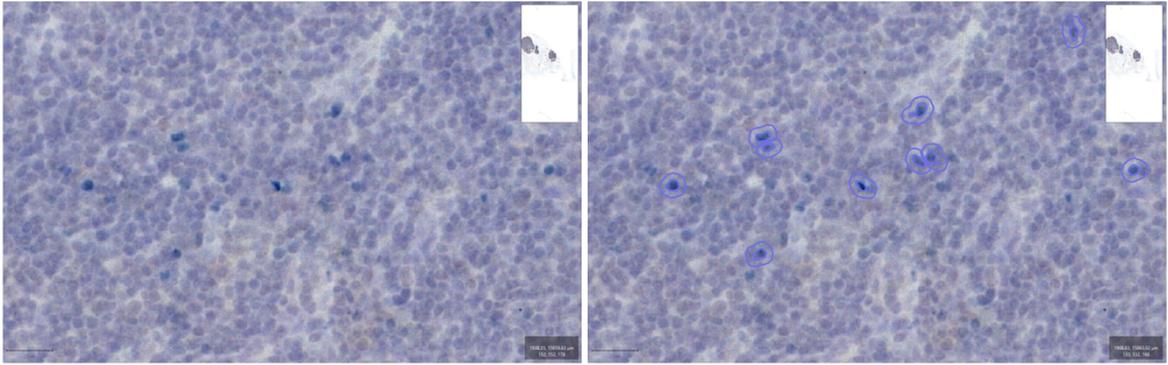
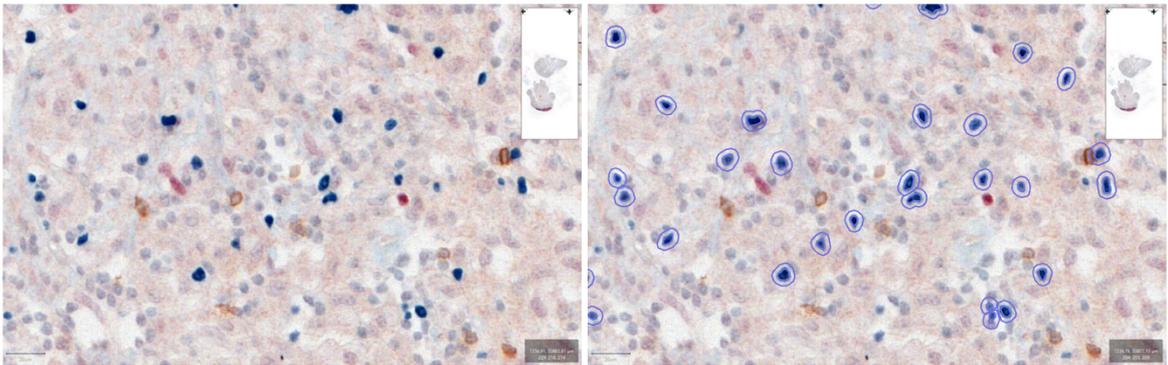


Abb. 15: **FoxP3 positive Zellen in der interfollikulären Zone**

Diese Abbildungen zeigen, welche Zellen in den interfollikulären Bereichen positiv gezählt worden sind.



Ab. 16: **FoxP3 positive Zellen in Granulomen**

Diese Abbildungen zeigen, welche Zellen in den Bereichen der Granulome positiv gezählt worden sind.

Während der Zählung der positiven Zellen konnte bereits vermutet werden, dass die Anzahl der positiven Zellen in den Keimzentren und Follikeln sehr geschwankt hat, je nach Form. Auch war auffällig, dass die Anzahl der positiven Zellen für jedes Präparat unterschiedlich hoch war.

3.3.2 Positive Zellen der Färbung F12

Im Gegensatz zu der unter 3.3.1 dargestellten Färbung F1, welche sehr heterogen ist, wird die strukturelle Homogenität der Färbung F12 anhand der Abb. 17-22 deutlich. Wie unter dem Abschnitt 2.2.5 und 2.2.6 erläutert, hat dies die Anwendung des „*Object classifiers*“ und der „*Positive cell detection*“ unmöglich gemacht.

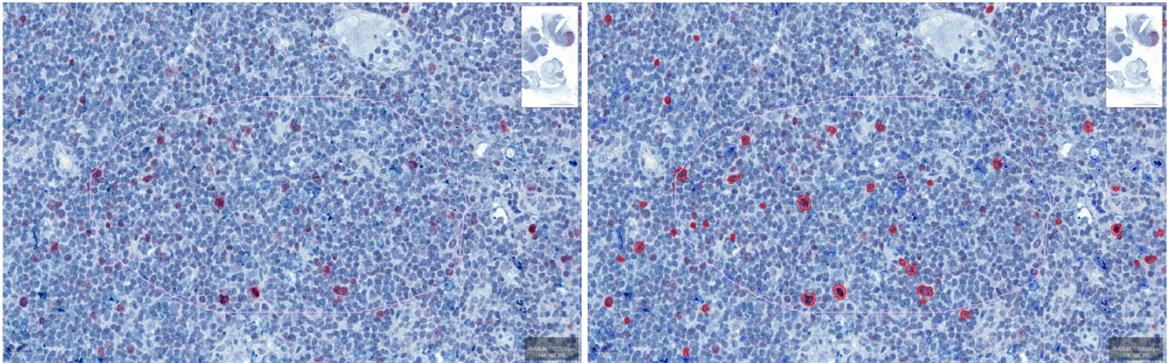


Abb. 17: **MUM1 und C1q positive Zellen im Follikel**

Diese Abbildungen zeigen, welche Zellen innerhalb der Follikel positiv gezählt worden sind. Zudem wird deutlich, welche Zellen zwar gefärbt wurden, aber nicht stark genug reagiert haben, um in die Analyse mit aufgenommen zu werden.

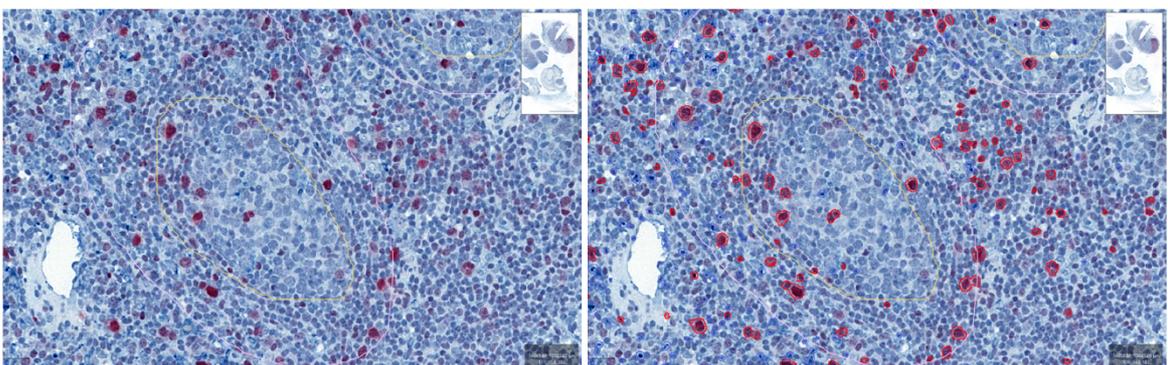


Abb. 18: **MUM1 und C1q positive Zellen im Keimzentrum**

Diese Abbildungen zeigen, welche Zellen innerhalb der Keimzentren positiv gezählt worden sind.

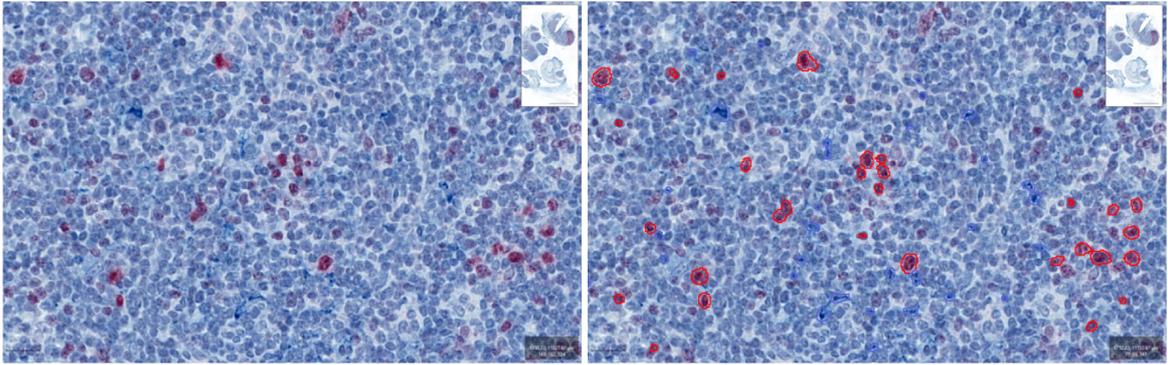


Abb. 19: **MUM1 und C1q positive Zellen in der interfollikulären Zone**

Diese Abbildungen zeigen, welche Zellen innerhalb der interfollikulären Zone positiv gezählt worden sind.

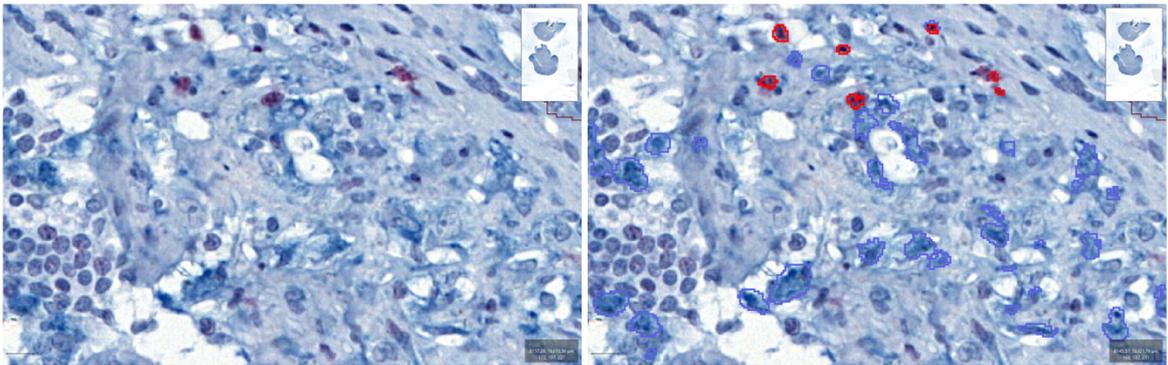


Abb. 20: **MUM1 und C1q positive Zellen in Granulomen**

Diese Abbildungen zeigen, welche Zellen innerhalb von Granulomen positiv gezählt worden sind.

C1q positive Strukturen von unter $5 \mu\text{m}^2$ wurden nicht gezählt. Rein optisch handelt es sich bei den C1q positiven Zellen fast ausschließlich um Makrophagen. Das vermehrte Auftreten von Riesenzellmakrophagen ist hier zu erkennen, welche sich stark verzweigen und verästeln.

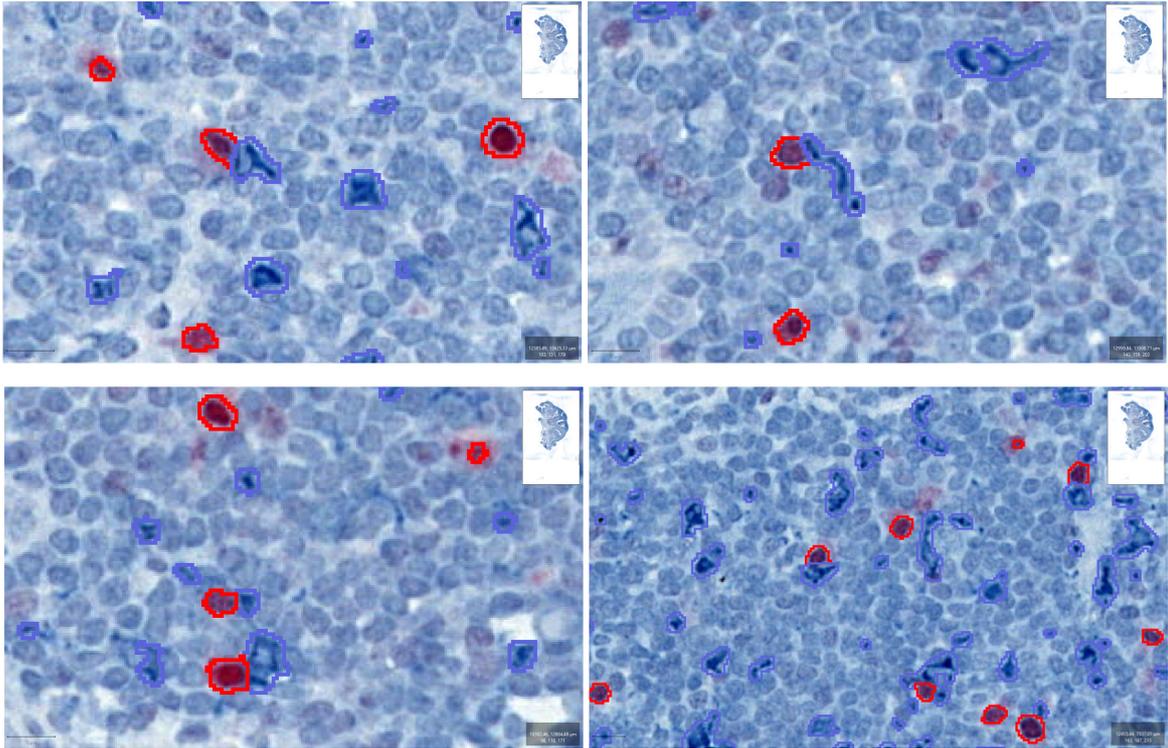


Abb. 21: C1q positive Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu MUM1 positiven Zellen

Eine weitere Besonderheit bei der Färbung F12 wird in der Abb. 21 hervorgehoben. Jeweils zentral im Bild befindet sich eine C1q positive Zelle (dunkelblau) in direkter Nachbarschaft zu einer MUM1 positiven Zelle (rot).

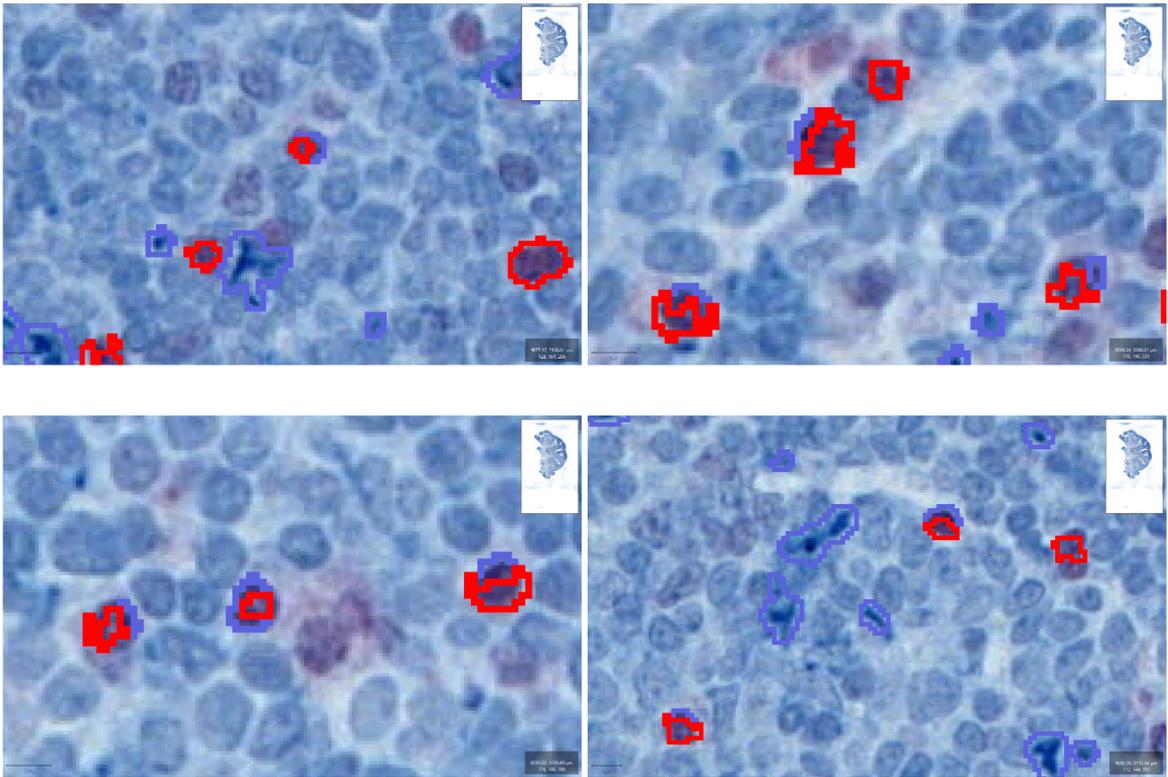


Abb. 22: **Doppelt positive Zellen Färbung F12 (hier rot und dunkelblau markiert)**

In Abb. 22 wurden positive Zellen von dem hochauflösenden „*Pixel classifier*“ nicht nur einer, sondern zwei Gewebeklassen zugeordnet, entsprechend MUM1-C1q-doppeltpositiven Zellen.

3.4 Deskriptive Statistik

In diesem Abschnitt werden durch die deskriptive Statistik die erhobenen und errechneten Daten dargestellt und erläutert.

3.4.1 Anzahl der Follikel und Keimzentren

Es wurden insgesamt zwei Färbungen mit jeweils 22 histologischen Präparaten ausgewertet.

Patient	Anzahl Follikel	Anzahl Keimzentren
Pat 1	25	0
Pat 2	61	30
Pat 4	70	3
Pat 5	263	112
Pat 6	125	63
Pat 7	112	58
Pat 8	225	176
Pat 9	160	82
Pat 10	283	166
Pat 12	0	0
Pat 13	249	178
Pat 16	63	27
Pat 17	373	221
Pat 18	214	148
Pat 19	54	6
Pat 21	48	37
Pat 22	43	16
Pat 23	34	19
Pat 24	138	3
Pat 28	28	10
Pat 29	19	19
Pat 30	175	95
Summe	2762	1469

Tabelle 5: Anzahl der Follikel und Keimzentren F1

Patient	Anzahl Follikel	Anzahl Keimzentren
Pat 1	30	0
Pat 2	77	27
Pat 4	0	0
Pat 5	111	19
Pat 6	37	4
Pat 7	52	33
Pat 8	194	118
Pat 9	101	41
Pat 10	174	114
Pat 12	0	0
Pat 13	216	146
Pat 16	31	17
Pat 17	238	159
Pat 18	115	80
Pat 19	71	16
Pat 21	59	16
Pat 22	21	5
Pat 23	37	0
Pat 24	70	1
Pat 28	22	4
Pat 29	9	7
Pat 30	116	47
Summe	1781	854

Tabelle 6: **Anzahl der Follikel und Keimzentren F12**

Bei der Betrachtung der Tabellen 5 und 6 wird die unterschiedliche Anzahl an Follikeln und Keimzentren bei denselben Patienten, für die unterschiedlichen Färbungen deutlich. Färbung F12 bot durch eine deutlich homogenere Färbung mit weniger Architekturinformation als F1 eine höhere Anfälligkeit gegenüber Artefakten und einer hohen Zahl an falsch-positiven Zellen in diesen Bereichen (s. Abb. 23). Deswegen wurden diese Bereiche inkl. der Follikel und Keimzentren ausgeschlossen, was insgesamt zu weniger Auswertungsfläche in Färbung 12 führte. Patient 12 weist initial bereits weder Keimzentren noch Follikel oder Granulome auf, hier liegt nur interfollikuläres Gewebe vor.

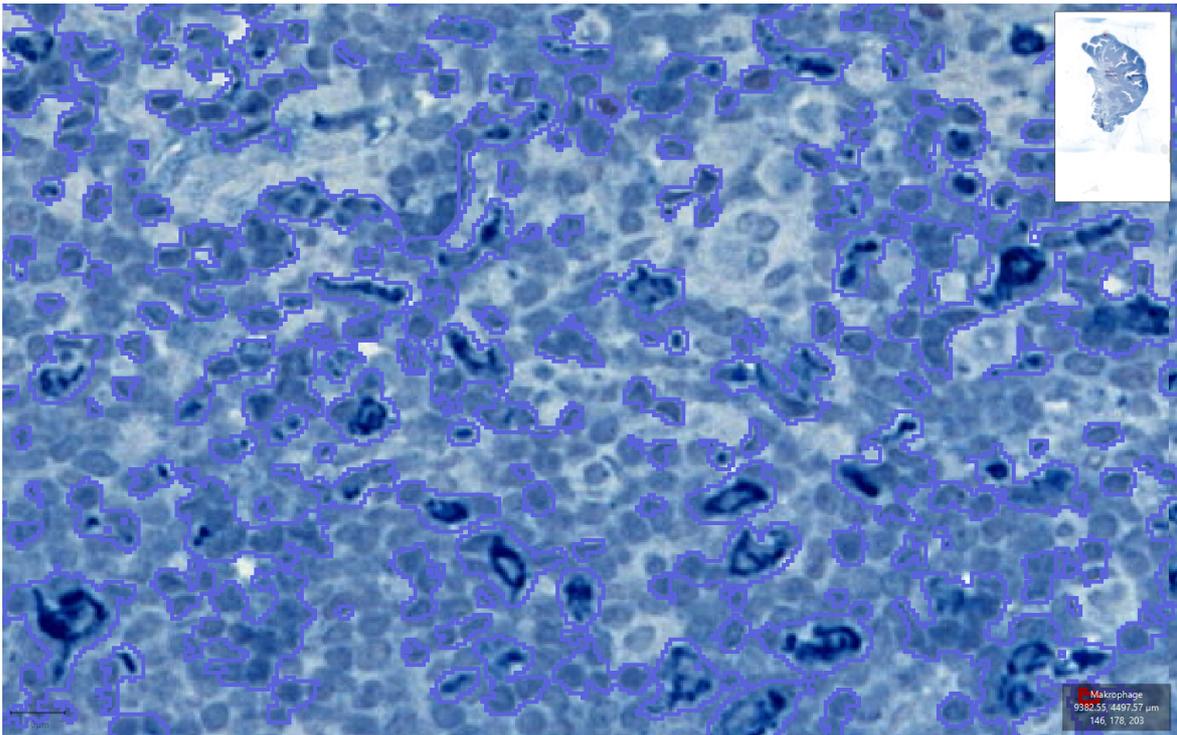


Abb. 23: **Bereich mit falsch-positiven Zellen**

In dieser Abbildung ist beispielhaft ein aus der Wertung ausgeschlossener Bereich dargestellt. Hier liegt ein Bereich mit zahlreich falsch-positiven Detektionen durch intensive Hämalaun-Hintergrundfärbung vor. Neben den C1q positiven Zellen (dunkelblau) wurden vermehrt Ansammlungen von C1q-negativen Lymphozyten (hellblau) fälschlich als positiv detektiert.

3.4.2 Anzahl der FoxP3-, MUM1- und C1q-positiven Zellen

In Tabelle 7-9 werden die Daten zu der Zellzahl von FoxP3, MUM1 und C1q, bezogen auf die verschiedenen Kompartimente (Interfollikulär, Follikel, Keimzentrum, Granulom) dargestellt.

Zellanzahl FoxP3					
Patient	Parenchym	Interfollikulär	Follikel	Keimzentrum	Granulom
Pat 1	6403	6018	385	0	0
Pat 2	31060	28920	2010	130	0
Pat 4	65555	44647	2191	3	18714
Pat 5	152625	143264	8938	423	0
Pat 6	17681	11218	5570	893	0
Pat 7	74436	65014	7334	2088	0
Pat 8	48802	42173	6004	625	0
Pat 9	135338	124513	10182	643	0
Pat 10	77874	64021	9333	1530	2990
Pat 12	151	151	0	0	0
Pat 13	82738	60012	17647	5079	0
Pat 16	6803	6045	672	86	0
Pat 17	71781	60356	10603	822	0
Pat 18	55213	46045	7640	1528	0
Pat 19	6952	6173	777	2	0
Pat 21	34918	33720	1064	134	0
Pat 22	16821	15573	1120	128	0
Pat 23	14412	12999	1245	168	0
Pat 24	203185	196044	7096	45	0
Pat 28	52552	50024	2329	199	0
Pat 29	10519	8889	861	769	0
Pat 30	66490	60151	5759	580	0
Summe	1232309	1085970	108760	15875	21704

Tabelle 7: Anzahl der FoxP3 positiven Zellen in Abhängigkeit der Kompartimente

Zellanzahl MUM1					
Patient	Parenchym	Interfollikulär	Follikel	Keimzentrum	Granulom
Pat 1	1554	1433	121	0	0
Pat 2	8275	7524	560	191	0
Pat 4	1216	476	0	0	740
Pat 5	32680	25989	6203	473	15
Pat 6	2439	2010	376	53	0
Pat 7	17288	12117	3851	1301	19
Pat 8	58434	37376	14117	6918	23
Pat 9	6389	4316	1933	140	0
Pat 10	28219	14181	5526	8512	0
Pat 12	122	122	0	0	0
Pat 13	51353	13016	9754	28583	0
Pat 16	2783	1522	610	651	0
Pat 17	35619	24274	6367	4978	0
Pat 18	22712	11756	6800	4156	0
Pat 19	4100	3040	1002	58	0
Pat 21	5443	4943	373	127	0
Pat 22	2763	2585	111	67	0
Pat 23	3770	2842	928	0	0
Pat 24	19781	18059	1714	8	0
Pat 28	15857	15235	580	42	0
Pat 29	5143	2741	1272	1130	0
Pat 30	22331	17670	3763	898	0
Summe	348271	223227	65961	58286	797

Tabelle 8: Anzahl der MUM1 positiven Zellen in Abhängigkeit der Kompartimente

In Tabelle 8 wird deutlich, dass die Anzahl der MUM1 positiven Zellen insgesamt deutlich geringer ist als die Anzahl der FoxP3 positiven Zellen (ca. – 72%) und als die Anzahl der C1q positiven Zellen (ca. – 60%). Auch hier befindet sich der größte Anteil der Zellen in der interfollikulären Zone mit ca. 64%.

Zellanzahl C1q					
Patient	Parenchym	Interfollikulär	Follikel	Keimzentrum	Granulom
Pat 1	9218	8483	735	0	0
Pat 2	16819	15159	1508	152	0
Pat 4	14358	3511	0	0	10847
Pat 5	104972	95885	8618	235	234
Pat 6	34647	31112	3432	103	0
Pat 7	45375	39113	3594	1787	881
Pat 8	65865	57040	6679	1558	588
Pat 9	43123	36205	6228	690	0
Pat 10	72541	58702	11724	2115	0
Pat 12	523	523	0	0	0
Pat 13	52772	36242	9838	6692	0
Pat 16	3589	2387	1031	171	0
Pat 17	145910	125189	15687	5034	0
Pat 18	53736	36485	12856	4395	0
Pat 19	19760	15625	3914	221	0
Pat 21	16310	15084	1189	37	0
Pat 22	18257	17881	366	10	0
Pat 23	6772	4763	2009	0	0
Pat 24	69298	67007	2289	2	0
Pat 28	24965	24057	867	41	0
Pat 29	8226	6251	1342	633	0
Pat 30	45243	40152	4729	362	0
Summe	872279	736856	98635	24238	12550

Tabelle 9: Anzahl der C1q positiven Zellen in Abhängigkeit der Kompartimente

In Tabelle 9 wird deutlich, dass der Anteil der C1q positiven Zellen, welche sich in der interfollikulären Zone befinden, mit ca. 84% einen ähnlich hohen Prozentsatz aufweist wie die FoxP3 positiven Zellen. Die Unterschiede im Vorhandensein von Granulomen zwischen den beiden Färbungen (F1 n=2 vs. F12 n=4) liegen in unterschiedlichen Schnittebenen. Die Daten haben als absolute Werte bei n=22 Lymphknoten aufgrund der hohen Varianz eine begrenzte Aussagekraft. Die unter Abschnitt 3.4.3 erhobenen Zelldichten weisen eine geringere Varianz auf und wurden ebenfalls bezogen auf die Kompartimente untersucht.

3.5 Ergebnisse zu Zelldichte und Architektur

In dem folgenden Kapitel folgt die graphische Darstellung der erhobenen Daten, sowie die Korrelation dieser Daten, insofern eine Signifikanz vorliegt. Die jeweils relevante deskriptive Statistik folgt im Anschluss an das Diagramm. Für die graphische Darstellung wurden alle Lymphknoten einbezogen (n=22). Die einzigen Ausnahmen stellen Abb. 28 und Abb. 31 dar, hier wurden nur n=21 Patienten erfasst. Zudem ist hervorzuheben, dass die Werte, welche genau 0 entsprechen, bedeuten, dass das entsprechende Kompartiment in dem Patienten nicht vorliegt und somit auch keine Zellen gezählt werden konnten.

3.5.1 Die Zelldichte FoxP3 positiver Zellen ist interfollikulär am höchsten

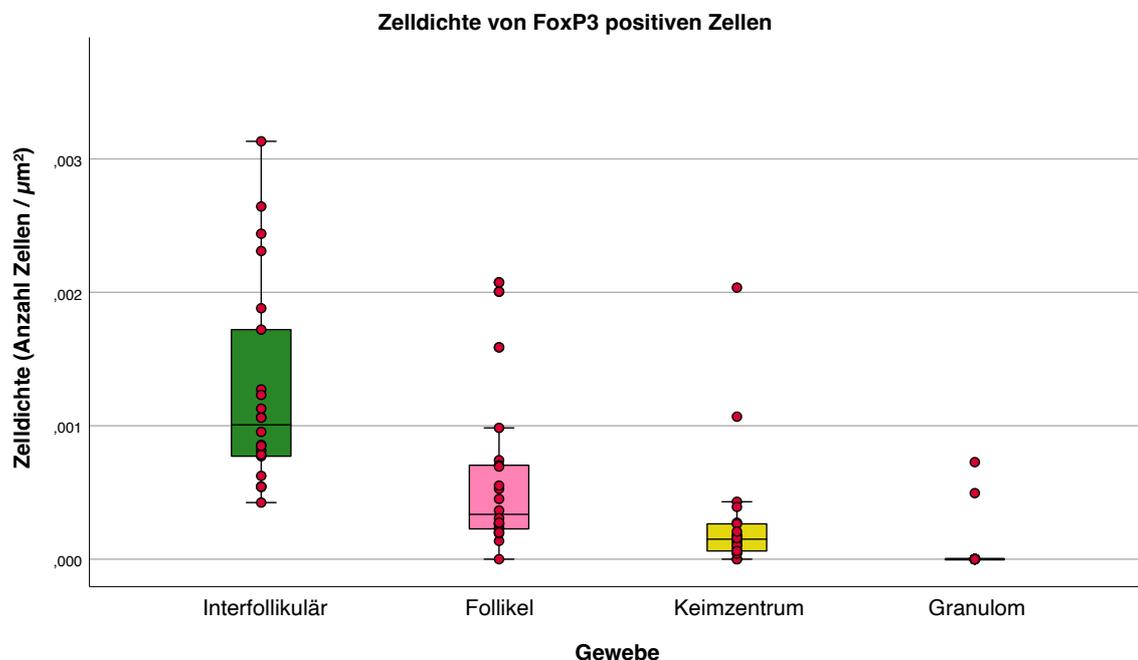


Abb. 24: **Bee-/Boxplot der Zelldichte von FoxP3 positiven Zellen in Abhängigkeit der Kompartimente (n=22)**

Abb. 24 beschreibt die Zelldichte von FoxP3 positiven Zellen, eingeteilt nach dem Kompartiment, in welchem die Zellen detektiert worden sind. Die Zelldichte der FoxP3 positiven Zellen ist in der interfollikulären Zone signifikant höher als innerhalb der Follikel, Keimzentren oder Granulome ($p < 0,001$). Die höchste Zelldichte der FoxP3 positiven Zellen, über alle Kompartimente betrachtet, beträgt 0.00313202 (Zellen / μm^2) innerhalb der interfollikulären Zone und die niedrigste Zelldichte beträgt $4.1102\text{E-}05$ (Zellen / μm^2) in den Keimzentren.

Zelldichte FoxP3					
Patient	Parenchym	Interfollikulär	Follikel	Keimzentrum	Granulom
Pat 1	0.00214441	0.00243937	0.000742	0	0
Pat 2	0.00097462	0.00106607	0.00070409	0.00027331	0
Pat 4	0.00102809	0.00188092	0.00098407	0.0001234	0.00049508
Pat 5	0.00111331	0.00127227	0.00036502	0.00016311	0
Pat 6	0.00039656	0.00042445	0.00030678	0.00018061	0
Pat 7	0.00153985	0.00172099	0.00069433	0.00043031	0
Pat 8	0.00073659	0.00106017	0.00022679	5.6143E-05	0
Pat 9	0.00293147	0.00313202	0.00158787	0.000392	0
Pat 10	0.00060288	0.000813	0.00020152	0.00010181	0.00072742
Pat 12	0.00077176	0.00077176	0	0	0
Pat 13	0.00060613	0.00085696	0.00026548	0.00014079	0
Pat 16	0.00042281	0.00054086	0.00013678	7.3321E-05	0
Pat 17	0.0005901	0.00078315	0.00023788	5.0117E-05	0
Pat 18	0.00071507	0.00095389	0.00026398	0.00010353	0
Pat 19	0.00049158	0.00054558	0.00027479	4.1102E-05	0
Pat 21	0.0005165	0.00054293	0.00019356	6.157E-05	0
Pat 22	0.00082191	0.00084907	0.00052719	0.00017221	0
Pat 23	0.00112455	0.00123128	0.00055123	0.00015929	0
Pat 24	0.00261515	0.00264365	0.00200523	0.00203575	0
Pat 28	0.00230706	0.00230992	0.00207465	0.00106818	0
Pat 29	0.00056724	0.00062426	0.00020001	0.00026475	0
Pat 30	0.00100639	0.00112828	0.00045147	0.00020728	0

Tabelle 10: Zelldichte FoxP3 (Anzahl der positiven Zellen pro μm^2) in Abhängigkeit der Kompartimente

In der Tabelle 10 sieht man, dass die höchste Dichte der FoxP3 positiven Zellen in der interfollikulären Zone vorliegt.

3.5.2 Die Zelldichte MUM1 positiver Zellen ist relativ homogen verteilt

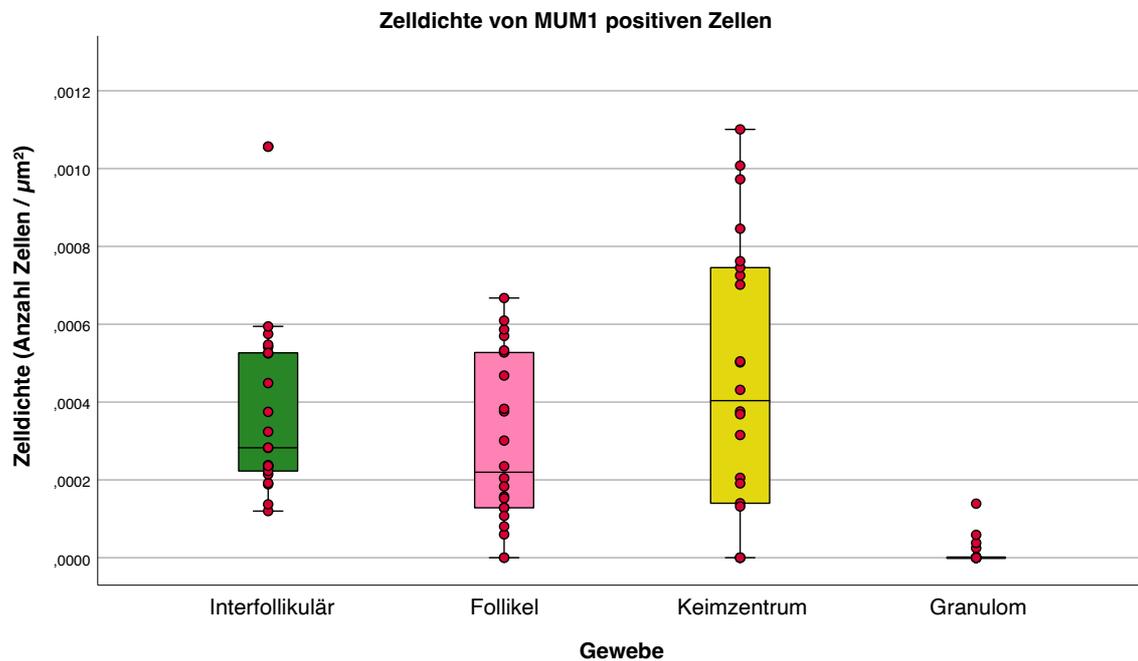


Abb. 25: Bee-/Boxplot der Zelldichte von MUM1 positiven Zellen in Abhängigkeit der Kompartimente (n=22)

Abb. 25 beschreibt die Zelldichte von MUM1 positiven Zellen, eingeteilt nach dem Kompartiment, indem die Zellen detektiert worden sind. Anders als bei der Abb.24, welche die Zelldichte der FoxP3 positiven Zellen beschreibt, kann hier kein signifikantes Verteilungsmuster abhängig von den unterschiedlichen Kompartimenten festgestellt werden.

Zelldichte MUM1					
Patient	Parenchym	Interfollikulär	Follikel	Keimzentrum	Granulom
Pat 1	0.00018205	0.00018865	0.00012873	0	0
Pat 2	0.00029972	0.00032374	0.00012821	0.00043137	0
Pat 4	0.00017331	0.0002821	0	0	0.00013887
Pat 5	0.00025499	0.00023401	0.00037599	0.00100751	2.4741E-05
Pat 6	0.00012026	0.00011982	0.00010726	0.00020522	0
Pat 7	0.00050463	0.00044875	0.00056989	0.00050187	3.801E-05
Pat 8	0.00060726	0.00054118	0.00052736	0.00072517	5.8707E-05
Pat 9	0.00022091	0.00019183	0.00030099	0.00013992	0
Pat 10	0.00027852	0.00021424	0.00015732	0.00070164	0
Pat 12	0.00052489	0.00052489	0	0	0
Pat 13	0.00043132	0.00023551	0.0001529	0.0008455	0
Pat 16	0.00029678	0.00023811	0.00020434	0.00074552	0
Pat 17	0.0002478	0.00022274	0.00018314	0.0003759	0
Pat 18	0.00057874	0.00054748	0.00038264	0.00050468	0
Pat 19	0.00027322	0.00028298	0.00023501	0.00031537	0
Pat 21	0.00012878	0.00013714	5.9931E-05	0.00019095	0
Pat 22	0.00022392	0.0002359	8.0382E-05	0.00013168	0
Pat 23	0.00056401	0.00057497	0.00053289	0	0
Pat 24	0.00038704	0.00037477	0.00058659	0.00110076	0
Pat 28	0.00059845	0.00059447	0.00066733	0.00036874	0
Pat 29	0.00109847	0.0010564	0.00060939	0.00097249	0
Pat 30	0.00053678	0.00052648	0.00046809	0.00076209	0

Tabelle 11: Zelldichte MUM1 (Anzahl der positiven Zellen pro μm^2) in Abhängigkeit der Kompartimente

In der Tabelle 11 zeigt sich, dass die MUM1 positiven Zellen keinen primären Fokus bei der Ausprägung der Zelldichte in Bezug auf der Lokalisation im Gewebe aufweisen, die Verteilung ist somit homogen.

3.5.3 Die Zelldichte C1q positiver Zellen ist interfollikulär am höchsten

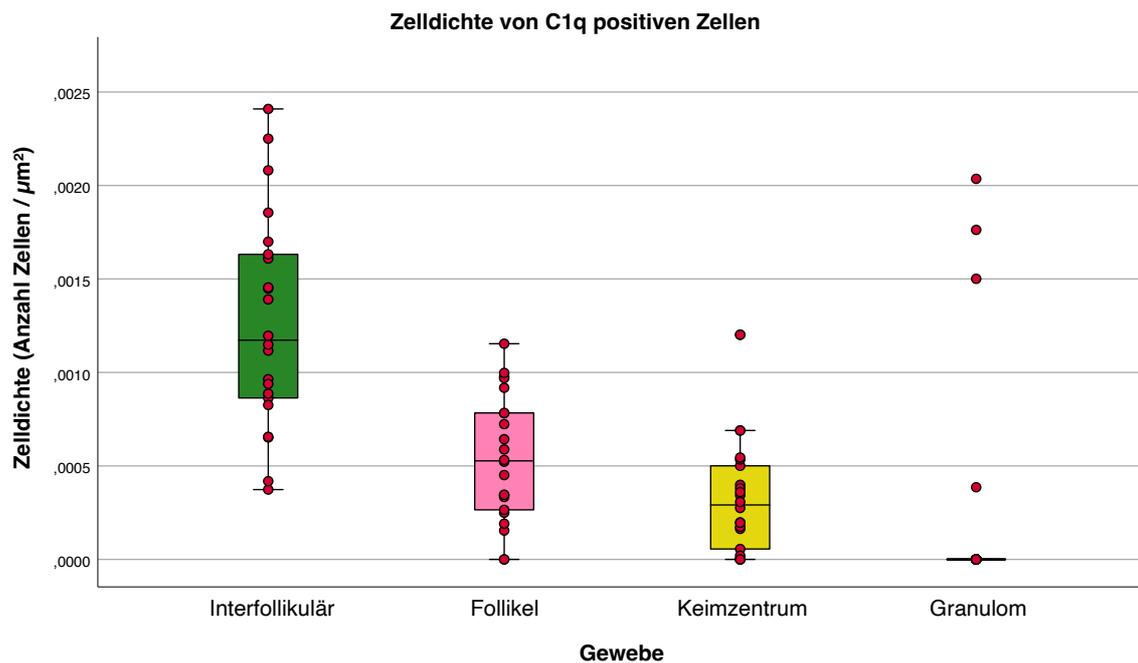


Abb. 26: Bee-/Boxplot der Zelldichte C1q positiver Zellen in Abhängigkeit der Kompartimente (n=22)

In der oben ausgeführten Abbildung 26 wird die Zelldichte von C1q positiven Zellen innerhalb der Kompartimente beschrieben. Die Zelldichte der C1q positiven Zellen ist in der interfollikulären Zone signifikant höher als innerhalb von Follikeln, Keimzentren oder Granulomen ($p < 0,002$). Die höchste Zelldichte der C1q positiven Zellen, über alle Kompartimente betrachtet, beträgt 0.00240917 (Zellen / μm^2) innerhalb der interfollikulären Zone und die niedrigste Zelldichte beträgt 1.9653E-05 (Zellen / μm^2) in den Keimzentren. Die Verteilung der Zelldichte der C1q positiven Zellen verhält sich ähnlich zu der unter 3.5.1 beschriebenen Zelldichte der FoxP3 positiven Zellen. In beiden Fällen befindet sich die höchste Zelldichte in der interfollikulären Zone und die niedrigste Zelldichte in den Keimzentren. Dieses Verhältnis wird unter 3.5.5 genauer untersucht. Jedoch ist die durchschnittliche Zelldichte der C1q positiven Zellen in den Granulomen deutlich höher.

Zelldichte C1q					
Patient	Parenchym	Interfollikulär	Follikel	Keimzentrum	Granulom
Pat 1	0.0010799	0.00111677	0.00078196	0	0
Pat 2	0.00060919	0.00065225	0.00034526	0.00034329	0
Pat 4	0.00204639	0.00208079	0	0	0.0020355
Pat 5	0.00081905	0.00086337	0.00052238	0.00050056	0.00038595
Pat 6	0.00170841	0.00185467	0.00097907	0.00039883	0
Pat 7	0.00132447	0.00144854	0.00053186	0.00068934	0.00176245
Pat 8	0.00068449	0.0008259	0.0002495	0.00016332	0.00150086
Pat 9	0.00149106	0.0016092	0.00096976	0.00068959	0
Pat 10	0.00071599	0.00088686	0.00033377	0.00017434	0
Pat 12	0.00225014	0.00225014	0	0	0
Pat 13	0.00044324	0.00065577	0.00015422	0.00019795	0
Pat 16	0.00038274	0.00037344	0.00034537	0.00019583	0
Pat 17	0.00101508	0.00114877	0.00045123	0.00038013	0
Pat 18	0.00136928	0.00169913	0.00072342	0.0005337	0
Pat 19	0.00131678	0.00145447	0.000918	0.00120167	0
Pat 21	0.00038589	0.00041851	0.00019104	5.5631E-05	0
Pat 22	0.0014796	0.00163174	0.00026504	1.9653E-05	0
Pat 23	0.00101313	0.00096362	0.00115365	0	0
Pat 24	0.00135589	0.00139057	0.00078337	0.00027519	0
Pat 28	0.00094219	0.00093871	0.00099754	0.00035996	0
Pat 29	0.00175695	0.00240917	0.00064293	0.00054477	0
Pat 30	0.00108752	0.00119632	0.00058825	0.00030721	0

Tabelle 12: Zelldichte C1q (Anzahl der positiven Zellen pro μm^2) in Abhängigkeit der Kompartimente

Äquivalent zu der FoxP3 Zelldichte, ist auch die C1q Zelldichte in der interfollikulären Zone am höchsten.

3.5.4 Die Zelldichten von MUM1 und C1q positiven Zellen korrelieren

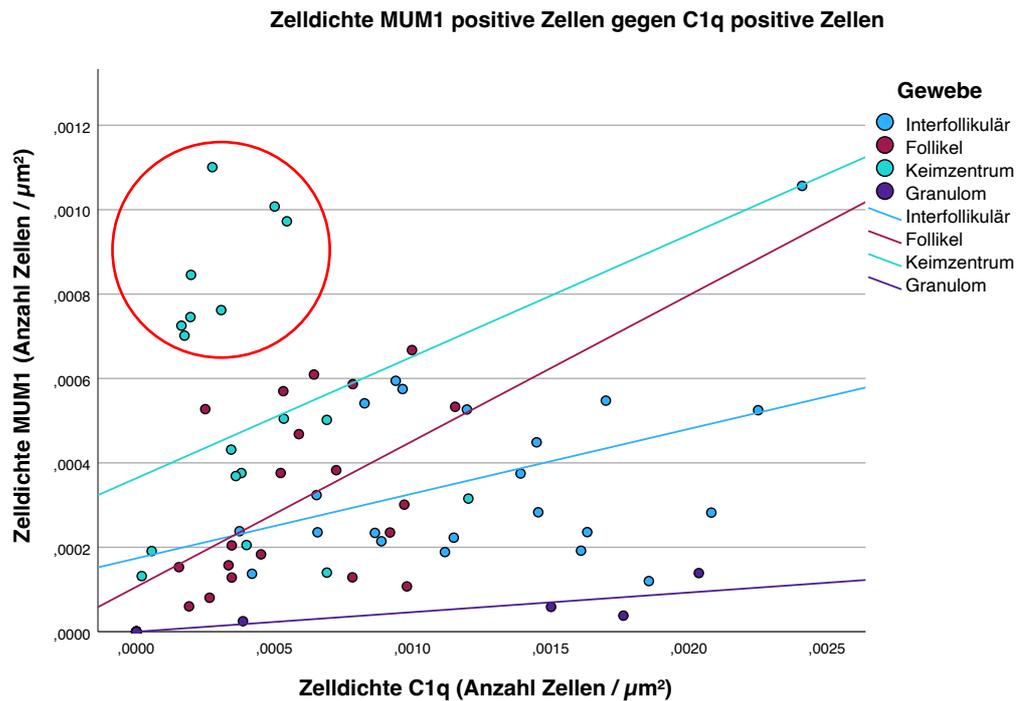


Abb. 27: Scatterplot der Zelldichte von MUM1 positiven Zellen gegen C1q positiven Zellen (n=22) mit jeweiligen Regressionslinien. Kreisförmige Markierung um den Cluster mit hoher MUM1 Zelldichte im Keimzentrum.

In der oben aufgeführten Abbildung kann man die Korrelation zwischen der Zelldichte der MUM1 positiven Zellen und den C1q positiven Zellen sehen. Die Unterteilung der Daten ist erneut nach den Kompartimenten erfolgt. Es zeigt sich, dass generell eine positive Korrelation zwischen den MUM1 und C1q positiven Zellen vorliegt, welche je nach Kompartiment unterschiedlich stark ausfällt (IF $r=0,204$, $p=0,363$; F $r=0,601$, $p=0,003$; GCs $r=0,429$, $p=0,046$; GR $r=0,998$, $p=1,661$). Auffällig war, dass die Daten für die Keimzentren einen Cluster gebildet haben (s. roter Kreis in Abb. 27). Das deutet darauf hin, dass sich zwei Patientengruppen identifizieren lassen. Nach Korrelationsanalyse der Daten ließ sich feststellen, dass die Lymphknoten aus der mit dem roten Kreis markierten Gruppe eine höhere durchschnittliche Fläche der einzelnen Follikel und Keimzentren haben. Für die Granulome wurden alle n=22 Lymphknoten in die Analyse einbezogen, jedoch liegen nur n=4 Werte für Lymphknoten mit Granulomen vor. Das ist der Grund, warum sich die restlichen n=18 Lymphknoten auf dem Wert 0 überlagern.

3.5.5 Die folliculäre Zelldichte von FoxP3 und C1q positiven Zellen korreliert

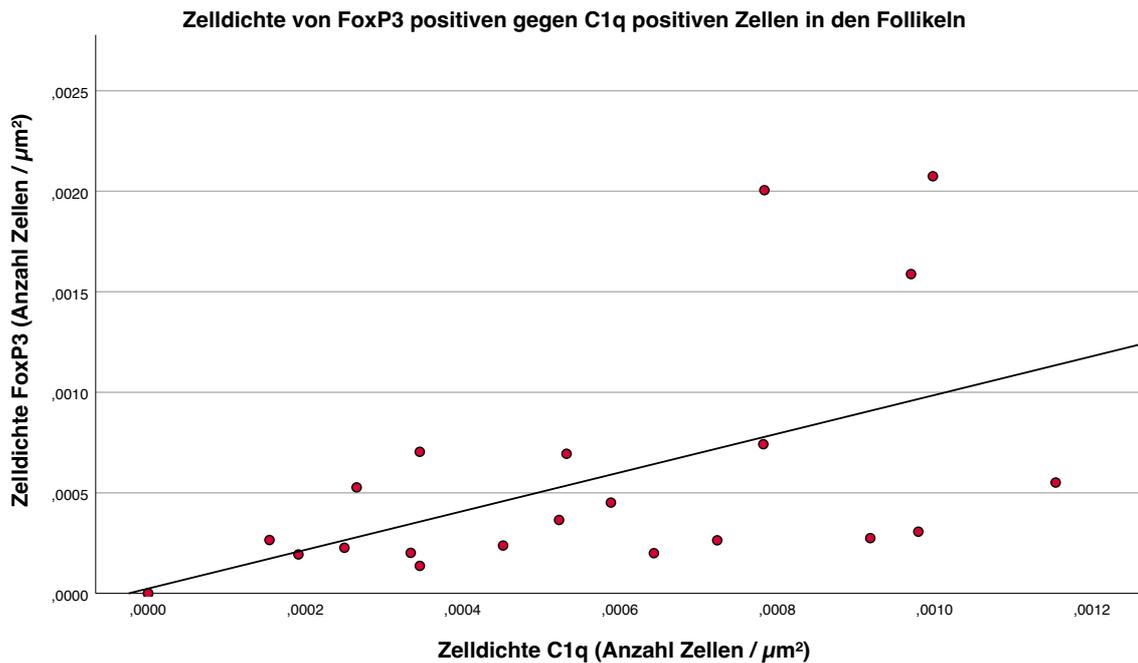


Abb. 28: Scatterplot der Zelldichte von FoxP3 gegen C1q positiven Zellen in den Follikeln (n=21)

Die oben geführte Abbildung beschreibt die Korrelation zwischen der Zelldichte von FoxP3 positiven Zellen aus der Färbung F1 und der Zelldichte von C1q positiven Zellen aus der Färbung F12. Hier wurden die Daten aller Lymphknoten, bis auf Patient 4 eingeschlossen (n=21). Patient 4 wurde aus der Analyse entfernt, da dieser in der ersten Färbung wenige Follikel aufweist, diese jedoch bedingt durch Artefakte aus der zweiten Färbung entfernt werden mussten. Somit liegen keine Werte für die Zelldichte C1q positiver Zellen für Patient 4 vor. Bereits unter Abschnitt 3.5.1 und 3.5.3 konnte man ein ähnliches Verhalten der beiden positiven Zellen bemerken. Die Korrelationskoeffizienten haben gezeigt, dass v.a. innerhalb der Follikel ein starker Zusammenhang besteht. In dem Scatterplot kann man anhand der Trendlinie eine positive Korrelation erkennen ($r=0,473$, $p=0,026$).

3.5.6 Die Unrundheit der Follikel korreliert mit deren Keimzentren

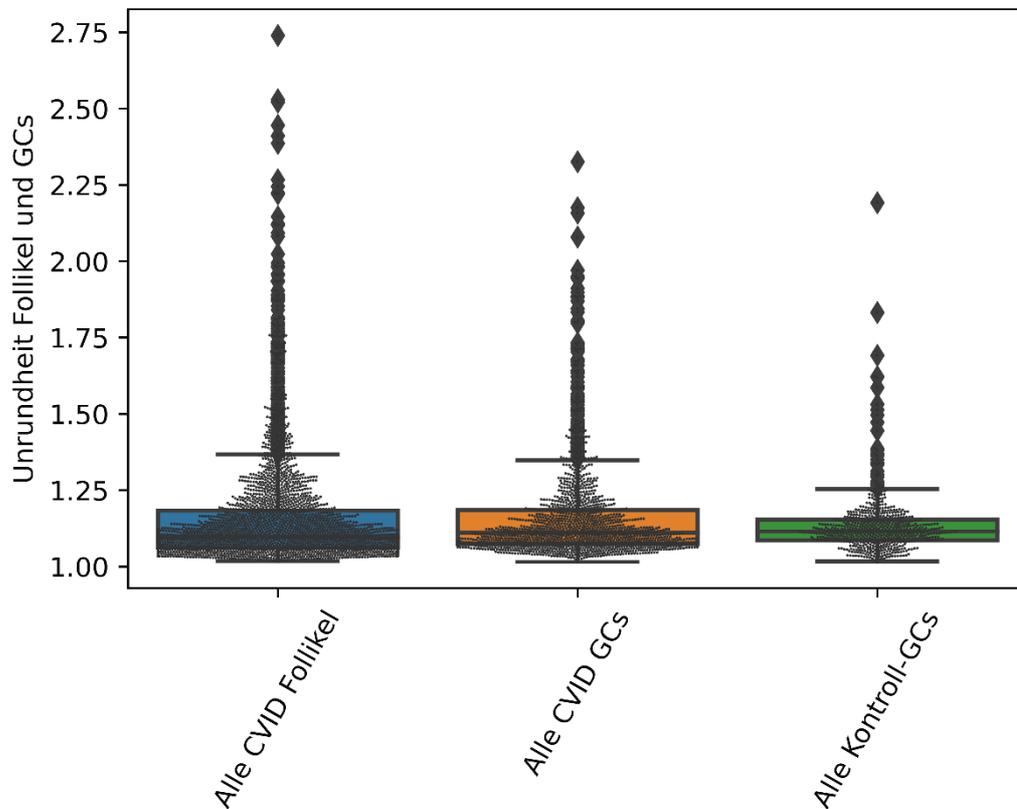


Abb. 29: **Bee-/Boxplot der Unrundheit einzelner Follikel und Keimzentren von COVID-Lymphknoten und der Kontrollgruppe, Kohorte von Unger et. al, 2014 (Follikel n=2761, Keimzentren n=1469; Kontroll-Keimzentren n=648)**

In der oben aufgeführten Abbildung wird deutlich, dass der größte Anteil der Follikel und Keimzentren von CVID-Lymphknoten unrund gestaltet ist. Jedoch wird auch ersichtlich, dass bei der Kontrollgruppe vereinzelt unrunde Keimzentren vorliegen können. Diese beschränken sich jedoch einzelne Ausreißer.

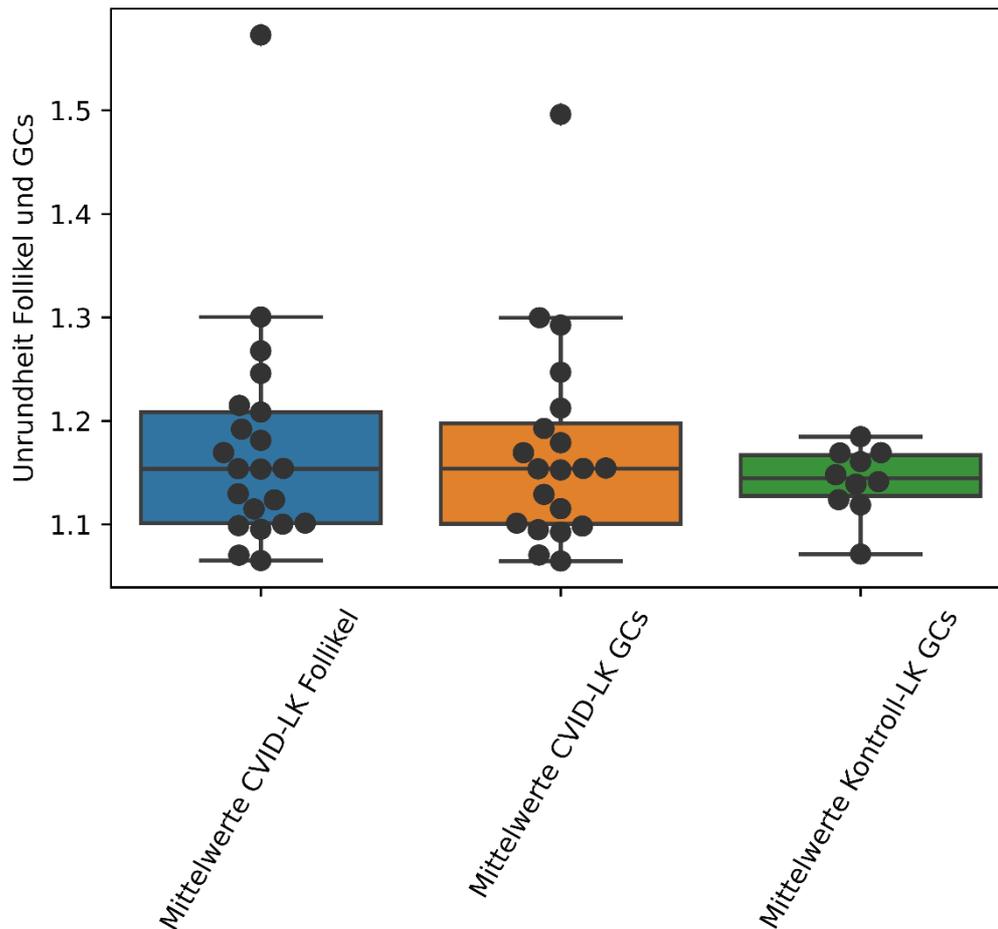


Abb. 30: Bee-/Boxplot der mittleren Unrundheit von Follikeln und Keimzentren pro Lymphknoten (n=21 für Follikel, n=20 für Keimzentren; Kontroll-Keimzentren n=10)

In der Abb. 30 wird die mittlere Unrundheit der Follikel und der Keimzentren pro Lymphknoten dargestellt. Zudem bewegen sich die erhobenen Mittelwerte der Follikel und auch der Keimzentren alle in einem Bereich zwischen 1,06 und 1,3. Die einberechneten Keimzentren aus der Kontrollkohorte von (Unger et al., 2014) sind im Vergleich im Mittel runder. Für die Follikel gibt es einen starken Ausreißer mit 1,57 und für die Keimzentren mit 1,5. Wie bereits unter Abschnitt 2.2.8 erklärt, würde ein Wert von 1 einen perfekten Kreis beschreiben.

	Follikel		Keimzentrum	
Patient	Unrundheit Mittelwert	Unrundheit Median	Unrundheit Mittelwert	Unrundheit Median
Pat 1	1.21490833	1.15927353	0	0
Pat 2	1.06506594	1.05720305	1.06462468	1.05720305
Pat 4	1.57277331	1.51510674	1.4960322	1.45140564
Pat 5	1.16939431	1.12204256	1.16926559	1.12195017
Pat 6	1.30038255	1.21606882	1.29969187	1.21389704
Pat 7	1.20849551	1.15729226	1.21227328	1.16345869
Pat 8	1.19193561	1.12270858	1.19270244	1.12296813
Pat 9	1.15338869	1.11454405	1.15365055	1.11454405
Pat 10	1.11491859	1.08283625	1.11517213	1.08304358
Pat 12	0	0	0	0
Pat 13	1.1540907	1.11671364	1.15406186	1.11671364
Pat 16	1.09880902	1.08342626	1.09835045	1.08342626
Pat 17	1.10122582	1.07556488	1.10118484	1.07556488
Pat 18	1.15378128	1.11766234	1.15441377	1.1174136
Pat 19	1.12956402	1.08670464	1.15260546	1.0938283
Pat 21	1.07024476	1.06059938	1.07036055	1.05983743
Pat 22	1.24583962	1.17820315	1.24697928	1.17820315
Pat 23	1.18117764	1.1175438	1.17887059	1.1082368
Pat 24	1.26761308	1.18589816	1.2925177	1.15091348
Pat 28	1.09529835	1.07808417	1.09483696	1.07656934
Pat 29	1.12368163	1.1064433	1.12898486	1.1064433
Pat 30	1.10024239	1.0643818	1.092568	1.06368436

Tabelle 13: **Unrundheiten von Follikeln und Keimzentren F1**

Die Unrundheit wird anhand der Werte aus Färbung F1 berechnet. Zum einen sind die Gewebsgrenzen der Follikel und Keimzentren durch die Hervorhebung in der BCL6 und IgD-Färbung deutlich besser zu erkennen. Des Weiteren mussten weniger Follikel und Keimzentren der Färbung F1 aus der Analyse ausgeschlossen werden, da insgesamt weniger Artefakte vorlagen. In der Tabelle 13 zeigt sich, dass sich die Unrundheit von Follikel und korrespondierendem Keimzentrum ähnlich verhalten.

	Alle CVID Follikel	Mittelwerte CVID-LK Follikel	Alle CVID GCs	Mittelwerte CVID-LK GCs	Alle Kontroll- GCs	Mittelwerte Kontroll- LK GCs
n	2761	21	1469	20	648	10
Mittel	1.160	1.177	1.159	1.173	1.131	1.143
StAbw	0.177	0.111	0.148	0.101	0.092	0.033
Min	1.018	1.065	1.015	1.065	1.017	1.071
5%	1.036	1.070	1.044	1.070	1.040	1.093
10%	1.043	1.095	1.055	1.090	1.054	1.114
15%	1.049	1.099	1.062	1.094	1.065	1.121
20%	1.055	1.100	1.068	1.098	1.080	1.123
25%	1.061	1.101	1.074	1.100	1.086	1.128
30%	1.068	1.115	1.080	1.111	1.092	1.134
35%	1.073	1.124	1.086	1.124	1.098	1.139
40%	1.080	1.130	1.093	1.143	1.105	1.140
45%	1.088	1.153	1.102	1.153	1.110	1.142
50%	1.097	1.154	1.111	1.154	1.115	1.145
55%	1.109	1.154	1.121	1.154	1.122	1.148
60%	1.122	1.169	1.130	1.160	1.129	1.153
65%	1.137	1.181	1.149	1.173	1.136	1.159
70%	1.157	1.192	1.163	1.183	1.144	1.163
75%	1.184	1.208	1.185	1.198	1.153	1.167
80%	1.220	1.215	1.211	1.219	1.166	1.169
85%	1.275	1.246	1.252	1.254	1.179	1.169
90%	1.353	1.268	1.322	1.293	1.199	1.171
95%	1.513	1.300	1.442	1.310	1.250	1.178
Max	2.739	1.573	2.326	1.496	2.192	1.185

Tabelle 14: Unrundheiten von Follikeln und Keimzentren der CVID-Lymphknoten und der Keimzentren der Kontrollgruppe, Kohorte von Unger et. al, 2014

In der Tabelle 14 sind die der Abb. 29 zugrunde liegenden Daten der Kohorte von Unger et. al, 2014, aufgeführt. Farblich hervorgehoben sind die Werte, welche jeweils über der 95% Perzentile der Kontroll-Unrundheit liegen. Die Mittelwerte sind hier rot markiert, die Einzelwerte orange.

3.5.7 Die Unrundheit der Follikel korreliert mit der FoxP3 Zelldichte

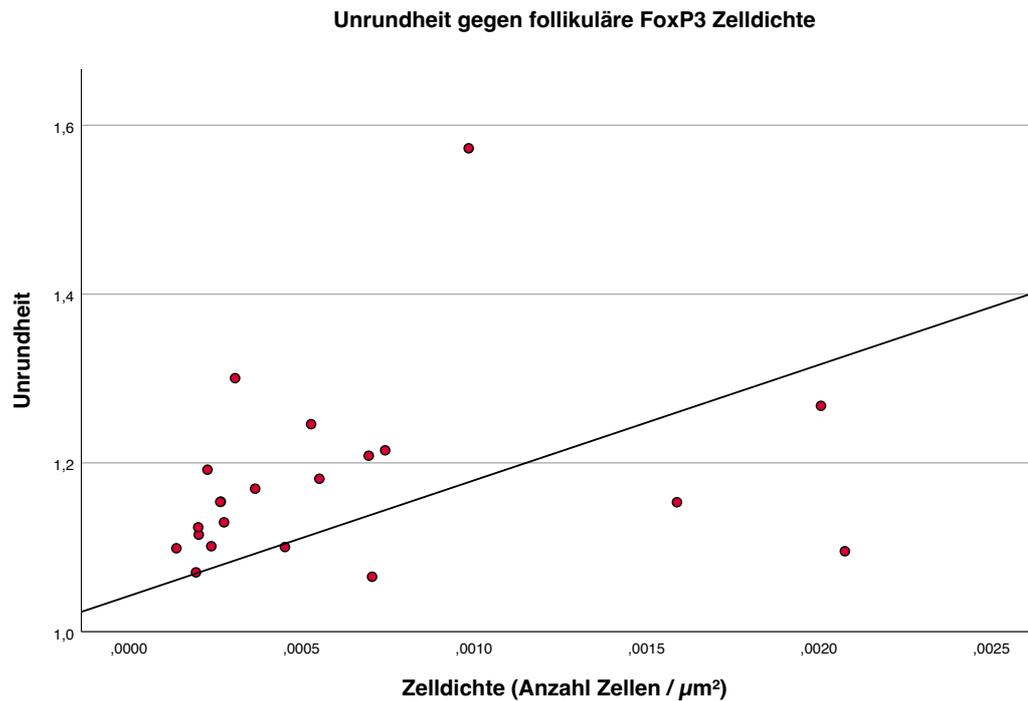


Abb. 31: Scatterplot mit Trendlinie der Unrundheit gegen die FoxP3 Zelldichte in Follikeln (=21)

Die oben aufgeführte Abbildung zeigt die Beziehung zwischen der Unrundheit der Follikel, erhoben als Mittelwert, und der Zelldichte der FoxP3 positiven Zellen. Für diese Abbildung wurden für eine bessere Übersichtlichkeit nur die Daten von $n=21$ Lymphknoten mit einbezogen, da ein Lymphknoten keine Follikel aufweist. Anhand von diesem Diagramm kann man die positive Korrelation zwischen der Unrundheit und der Zunahme der Zelldichte von FoxP3 positiven Zellen erkennen ($r=0,439$, $p=0,041$).

3.5.8 Die Zelldichte von FoxP3 positiven Zellen nimmt mit der mittleren Follikelfläche ab

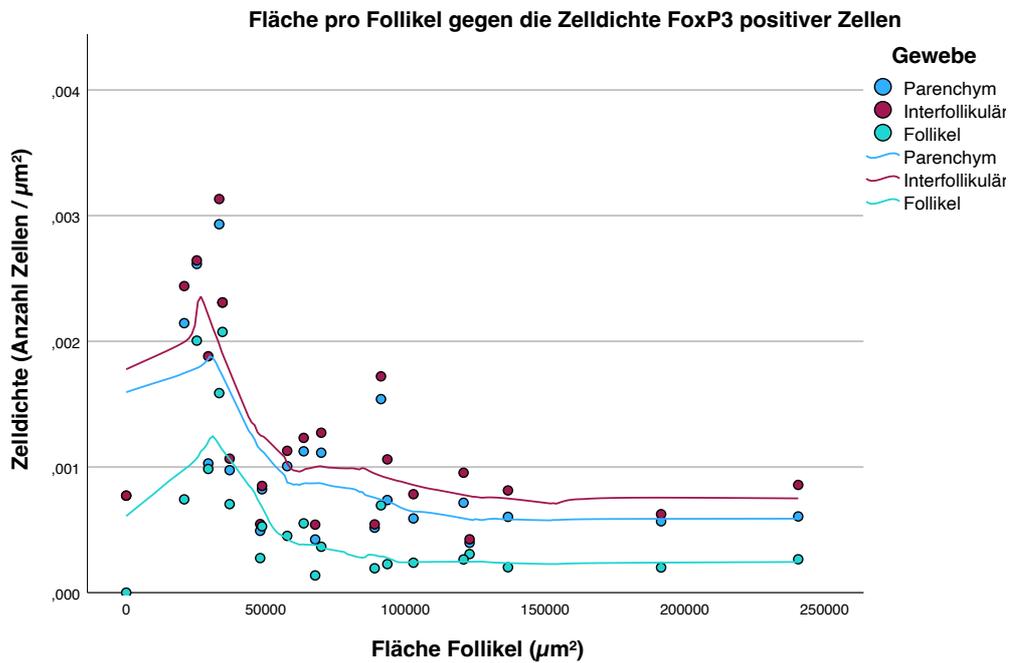


Abb. 32: Scatterplot der mittleren Follikelfläche gegen die Zelldichte FoxP3 positiver Zellen (n=22)

Die Abb. 32 beschreibt die Verteilung der mittleren Follikelfläche gegen die follikuläre Zelldichte der FoxP3 positiven Zellen. Insgesamt liegen negative Korrelationen vor (PA $r=-0,605$, $p=0,003$; IF $r=-0,512$, $p=0,015$; F $r=-0,53$, $p=0,011$). Die Betrachtung des Scatterplots zeigt darüber hinaus, dass die Trendlinie am Anfang steigt, und es ab einer Fläche von ca. $30000 \mu\text{m}^2$ zu einer Trendumkehr kommt, die dann die meisten Werte umfasst. Ab dieser Größe liegt eine starke negative Korrelation vor bis zu einer Fläche von ca. $100000 \mu\text{m}^2$, ab hier liegt ein neutrales Verhältnis vor. Der Verteilungsverlauf lässt daher einen nicht-monotonen Bezug zwischen der mittleren Follikelfläche und der follikulären Zelldichte FoxP3 positiver Zellen zu.

	Follikel		Keimzentrum	
Patient	Fläche Mittelwert (μm^2)	Fläche Median (μm^2)	Fläche Mittelwert (μm^2)	Fläche Median (μm^2)
Pat 1	20754.844	17000.7	0	0
Pat 2	37004.21	26841	36338.4698	26166.45
Pat 4	29353.5438	23927.3	16000.8	13573.05
Pat 5	69791.6115	33629.2	70140.8095	33268.9
Pat 6	122877.165	46920.9	124459.822	46920.9
Pat 7	91172.6763	39975	91620.1018	38427.4
Pat 8	93444.398	41078.9	93444.8545	41078.9
Pat 9	33270.1263	19751.8	33275.6909	20115.4
Pat 10	136619.007	80320	136772.757	80320
Pat 12	0	0	0	0
Pat 13	240492.412	89634	240260.044	89634
Pat 16	67625.79	57570.4	67826.043	57570.4
Pat 17	102782.918	74616.8	102654.41	74260.7
Pat 18	120719.756	68890.95	121814.193	69456.3
Pat 19	47937.9	37693.25	51687.628	44604.1
Pat 21	88901.7845	50337.15	91722.8892	51028.7
Pat 22	48606.372	27937.5	48614.1816	26492.1
Pat 23	63514.5327	33075.2	63688.7863	32966.2
Pat 24	25254.2755	16040.2	31914.8143	25794.25
Pat 28	34444.7368	20628.25	32377.9375	20628.25
Pat 29	191421.564	178928.1	189722.553	173549.95
Pat 30	57607.9419	43492.55	57566.9316	43577.2

Tabelle 15: **Durchschnittliche Fläche der Follikel und Keimzentren F1**

In der Tabelle 15 sind die Werte für die durchschnittliche Fläche, die ein Follikel oder Keimzentrum patientenspezifisch aufweist, angegeben. Es liegt jeweils der Mittelwert und der Median für die erhobenen Daten vor.

3.5.9 Die Zelldichte von MUM1 positiven Zellen im Keimzentrum nimmt mit der mittleren Follikelfläche zu

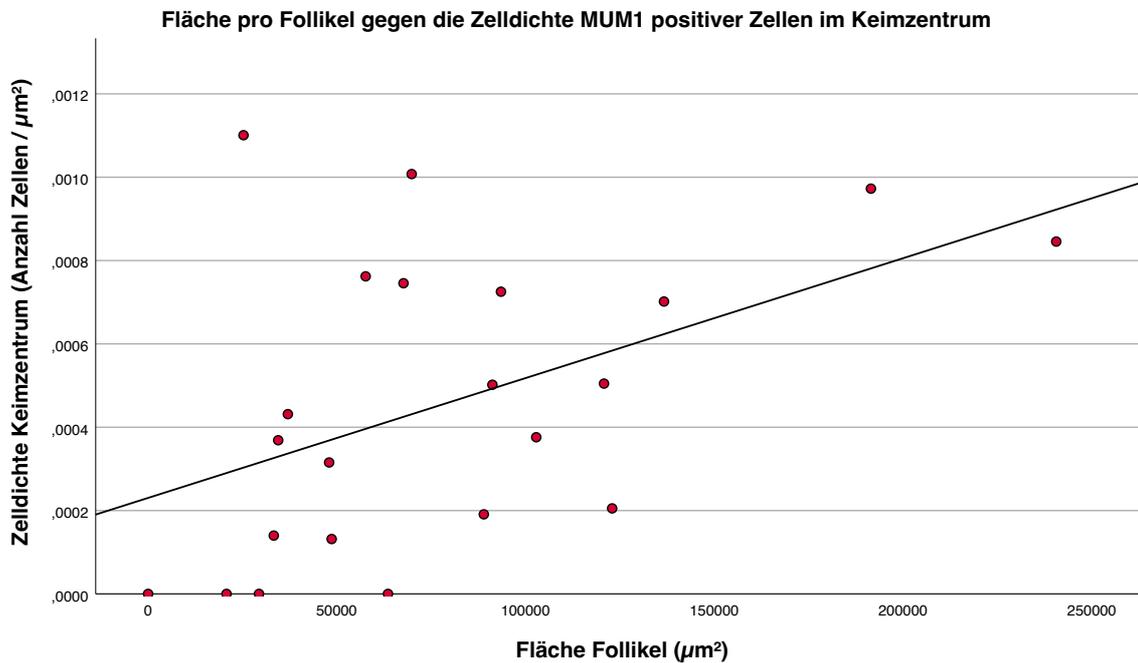


Abb. 33: Scatterplot der mittleren Follikelfläche gegen die Zelldichte MUM1 positiver Zellen im Keimzentrum (n=22)

Die oben aufgeführte Abbildung beschreibt das Verhältnis von der mittleren Follikelfläche zu der Zelldichte der MUM1 positiven Zellen im Keimzentrum. Anhand der Trendlinie wird die positive Korrelation verdeutlicht ($r=0,484$, $p=0,022$). Für die vier Werte, für die die Follikelzelldichte der MUM1 positiven Zellen genau 0 betragen, liegen keine Daten vor, da diese Patienten ($n=4$) keine Keimzentren aufgewiesen haben ($n=2$) oder diese von der Auswertung exkludiert werden mussten ($n=2$).

4. Diskussion

In dem folgenden Kapitel erfolgt die Interpretation der Ergebnisse im Zusammenhang mit dem aktuellen Kenntnisstand der wissenschaftlichen Forschung. Zudem wird der abschließende Ausblick die Chancen und Möglichkeiten der weiteren Forschung erläutern.

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Zelldichte der FoxP3 und C1q positiven Zellen ist für beide positiven Zellgruppen interfollikulär am höchsten. Die MUM1 positiven Zellen weisen jedoch eine von den Kompartimenten unabhängige, homogene Verteilung auf. Es konnten innerhalb aller Kompartimente positive Korrelationen der Zelldichten der MUM1- und C1q- positiven Zellen untereinander nachgewiesen werden, insbesondere jedoch innerhalb der Follikel und Keimzentren. Zudem besteht eine positive Korrelation innerhalb der Follikel von der Zelldichte FoxP3 positiver Zellen mit der Zelldichte C1q positiver Zellen. Des Weiteren konnten Zusammenhänge zwischen der steigenden Unrundheit der Follikel und der erhöhten Zelldichte von FoxP3 positiven Zellen nachgewiesen werden. Mit zunehmender Größe der Follikel mit oder ohne GCs ist die Zelldichte der FoxP3-positiven Zellen im Parenchym, follikulär und interfollikulär gesunken. Die Zelldichte der MUM1-positiven Zellen innerhalb der GCs ist mit zunehmender Größe der Follikel und GCs höher. Zusätzlich konnte eine räumliche Nähe von C1q- und MUM1-positiven Zellen beobachtet werden, in manchen Fällen bis hin zum vollständigen Umschließen der MUM1- durch die C1q-positive Zelle.

4.2 Verwendung von humanen Schnittproben

Dieser Arbeit liegen histologische Präparate von humanen Lymphknoten zugrunde. Für das weitere Verständnis der heterogenen Erkrankung COVID ist dies unverzichtbar. Es liegen bereits Studien an Mausmodellen vor, die zu dem Ergebnis gekommen sind, dass tierische Modelle für die Erklärung einer Erkrankung mit einem so vielfältigem Phänotyp an ihre Grenzen kommen (Varricchi et al., 2021). In dieser Forschung besteht somit nicht nur die Möglichkeit immunhistologische Trends herauszufinden, sondern auch in späteren Untersuchungen diese Daten mit den funktionellen und klinischen Daten der Kohorte zu verbinden und zu interpretieren, um mögliche diagnostische Parameter zu identifizieren.

4.3 Autoimmunität und CVID

Bereits während der manuellen Annotation der Follikel und deren korrespondierender Keimzentren ist aufgefallen, dass diese nicht regelrecht rund geformt sind. Bei der mathematischen Auswertung der erhobenen Daten hat sich gezeigt, dass bei allen Patientenlymphknoten (n=22) unrunde Follikel und Keimzentren vorliegen, z.T. mit stark unrunder Ausreißern. Vorliegende Studien konnten bereits nachweisen, dass die gemessene Unrundheit der Follikel und deren korrespondierender Keimzentren als Merkmal für CVID dienen kann (Unger et al., 2014) und zusätzlich auch für das Vorhandensein begleitender Autoimmunität als Indiz dient (Romberg et al., 2019; Unger et al., 2014). Die Studie von Romberg et al. aus dem Jahr 2019, hat das Krankheitsbild der CVID Patienten weiter in das Vorliegen oder Fehlen einer Autoimmunität differenziert und potenzielle histologische Differenzierungskriterien festgelegt. Patienten, bei denen eine Autoimmunität nachgewiesen werden konnte, besaßen unrunde und hyperplastische Keimzentren. Bei dem Anteil der Patienten, die keine autoimmune Störung aufgewiesen haben, waren die Keimzentren jeweils deutlich kleiner aber nicht auffällig unrunder. Zum Vergleich wurden zusätzlich im weiteren Verlauf des Experiments, Lymphknoten einer Gruppe ohne Immunsystemstörungen mit einer bakteriellen Infektion untersucht. Diese haben wie erwartet eine Hyperplasie der Keimzentren aufweisen können, jedoch waren diese im Gegensatz zu den CVID Patienten mit Autoimmunität regelrecht geformt. Somit kann nach Romberg et al. die Unrundheit mit dem zusätzlichen Auftreten von Hyperplasien als diagnostisches Merkmal einer Untergruppe der CVID-Erkrankten dienen, wofür auch die Ergebnisse von Unger et al. 2014 sprechen.

Die erhobenen Daten, welche dieser Dissertation zugrunde liegen, konnten zusätzlich zeigen, dass mit der Zunahme der durchschnittlichen Follikel- oder Keimzentrumgröße die Zelldichte der FoxP3 positiven Zellen im Parenchym, interfollikulär und follikulär abnimmt. In dem Zusammenhang dieser Forschung bedeutet eine Zunahme der Follikel- oder Keimzentrumgröße eine Hyperplasie. Diese Erkenntnis korreliert mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Romberg et al., 2019, welche eine Reduktion der regulatorischen T-Zellen in den Blutproben der CVID Patienten feststellen konnten. Diese Reduktion war noch stärker bei Patienten mit einer vorliegenden Autoimmunität und der somit einhergehenden Hyperplasie der Keimzentren, was die in unseren Forschungen festgestellte Korrelation unterstützt. Zusätzlich konnte in meiner Arbeit nachgewiesen werden, dass eine positive Korrelation zwischen der Unrundheit und der Zelldichte der FoxP3 positiven Zellen

innerhalb der Follikel vorliegt. In der Arbeit von Romberg et al. 2019 wurden keine FoxP3 positiven Zellen im Lymphknoten gemessen, daher könnte die verminderte Zahl an FoxP3 positiven Zellen im Blut evtl. einem vermehrten Pooling in den Follikeln entsprechen. Da unrunde Keimzentren das Vorhandensein einer Autoimmunität unterstreichen (Romberg et al., 2019; Unger et al., 2014), könnte die erhöhte follikuläre Zelldichte FoxP3 positiver Zellen die Reaktion des Immunsystems darstellen, durch eine Hochregulierung der regulatorischen T-Zellen eine Abschwächung der zu starken Immunreaktion zu bewirken. Durch unsere Forschungsergebnisse könnte postuliert werden, dass die regulatorischen T-Zellen in die Follikel, an den Ort der möglichen Entstehung der Autoimmunität wandern, um diese aktiv zu unterdrücken. Diese Beobachtungen lassen eine Entwicklung der Autoimmunität unter CVID erwarten, welche in verschiedenen Stadien mit verschiedenen Merkmalen und Phänotypen einhergeht. Man könnte somit durch die Beobachtungen von Romberg et al. 2019, die Autoimmunitäten der CVID Lymphadenopathien nach histologischem Erscheinungsbild weiter unterteilen: Autoimmunität und Unrundheit, Autoimmunität und Hyperplasie, oder das Vorhandensein beider Phänomene. Es lässt sich vermuten, dass je nach Entwicklungsstadium der Autoimmunität jeweils einer der vorliegenden Eigenschaften der Follikelstruktur für die Pathogenese der CVID dominant verantwortlich ist. Abschließend sind je nach Eigenschaft unterschiedliche Trends zu beobachten und somit ggf. eine weitere Unterteilung der CVID Kohorte notwendig. Um die Autoimmunität als beeinflussenden Faktor für die Form der Keimzentren und die räumliche Verteilung der FoxP3 positiven Zellen besser zu verstehen, sind weitere Untersuchungen notwendig, welche die histologischen Merkmale mit den funktionellen und klinischen Daten inkl. Durchflusszytometrie auf potenzielle Korrelationen inkl. nicht-monotoner Bezüge untersuchen.

4.4 Plasmazelloutput im Zusammenhang mit der Architektur

Anhand von Korrelationsanalysen konnte eine positive Korrelation zwischen der durchschnittlichen Fläche pro Keimzentrum und der Zelldichte der MUM1 positiven Zellen festgestellt werden. Die zunehmende Größe der Fläche der Keimzentren steht für eine Hyperplasie. Physiologischer Weise würde diese Hyperplasie in der vermehrten Reifung der B-Zellen zu Plasmazellen resultieren, da als Konsequenz der größeren Fläche die dort vorhandenen B-Zellen und follikulären T-Helferzellen vermehrt vorliegen würden und mehr Interaktionen durchführen könnten. Bei den CVID Patienten ist jedoch genau das Gegenteil

der Fall, diese weisen erniedrigte Konzentrationen von Gedächtnis B-Zellen und Antikörpern auf, was dadurch zunächst paradox erscheint. Bereits in der Studie von Unger et al., welche 2014 durchgeführt worden ist, wurde eine Hyperplasie der Keimzentren in allen Lymphknoten der 10 untersuchten Patienten festgestellt. Die histologischen Präparate wurden u.a. mikroskopisch auf strukturelle Aberrationen untersucht und anschließend wurde nach der Digitalisierung die Unrundheit quantifiziert. Zusätzlich wurden Blutproben entnommen. Es konnte beobachtet werden, dass die meisten klassengewechselten Plasmazellen sich innerhalb der Keimzentren befinden. Somit wurde die Hypothese aufgestellt, dass die verminderte Anzahl von Plasmazellen vermutlich an der erschwerten Migration aus dem Keimzentrum, anstatt an deren Bildung liegt. Die beobachtete Hyperplasie würde in diesem Zusammenhang eine Zunahme der Keimzentrumsfläche durch nicht-migrationsfähige B-Zellen bedeuten und nicht, wie vermutet, eine Kompensation des Immunsystems widerspiegeln. Nur wenn die B-Zellen nach erfolgreicher Interaktion mit den T-Zellen wieder das Keimzentrum verlassen können, können diese ihre vollständige Funktion in dem Immunsystem ausüben und körperfremde Pathogene neutralisieren (Hägglöf et al., 2023). Eine ausbleibende Migration würde in einem Immundefizit resultieren. Anhand der Daten meiner Arbeit, wurde eine homogene Verteilung der MUM1 positiven Zellen nachgewiesen. Dies würde somit gegen die von Unger et al., 2014 aufgestellte Hypothese sprechen und eine andere zugrundeliegende Pathophysiologie vermuten lassen. Allerdings wäre dies nur dann möglich, wenn die MUM1-positiven Zellen ausschließlich die Plasmazellen darstellen würden. Es ist jedoch auch möglich, dass CD8+ T-Zellen IRF4 (MUM1) exprimieren (Nayar et al., 2014) und sich somit in der Anzahl der MUM1 positiven Zellen wiederfinden würden. Ein Vorkommen von CD8+ Zellen könnte vermuten lassen, dass der erschwerte Output der Plasmazellen mit fehlender humoraler Antigenelimination zu einer erhöhten Aktivität der zellulären Immunität führt. Zytotoxische T-Zellen üben in dem Immunsystem die Funktion der Lyse von infizierten Zellen aus (Murphy & Weaver, 2018). Die MUM1 positiven Zellen können des Weiteren IgM+, IgG+, IgA+ und IgD+ Zellen umfassen. Bei den IgM+ Zellen würde es sich um eine T-Zell unabhängige Stimulation der B-Zellen handeln, wobei somit keine T-B-Zell Interaktion in den Keimzentren vorausgesetzt wäre (Murphy & Weaver, 2018). Zusätzlich können auch bestimmte dendritische Zellen IRF4 (MUM1) exprimieren (Hilligan et al., 2020). Diese Punkte unterstreichen, dass um eine genauere Aussage bezüglich des gestörten Plasmazelloutputs treffen zu können, die verschiedenen MUM1 positiven Zellen somit weiter unterteilt werden und separat identifizierbar sein müssen.

4.5 Die C1q Zelldichte korreliert mit der MUM1 Zelldichte

Unter Abschnitt 3.3.2 wurde die Beobachtung beschrieben, dass manche C1q und MUM1 Zellen sehr nahe beieinanderliegen, teils auch doppelt positive Zellen (C1q und MUM1) vorliegen. In einigen Schnitten konnte sogar das Umfassen der MUM1 positiven Zellen durch C1q positive Zellen festgehalten werden. Diese festgestellte räumliche Nähe der C1q- und MUM1-positiven Zellen, lässt eine Phagozytose oder Stimulation der MUM1- durch die C1q-positiven Zellen in Frage kommen. Makrophagen üben physiologischer Weise nicht nur das Phagozytieren von fremden Pathogenen aus, sondern auch die *Clearance* von apoptotischen körpereigenen Zellen und sorgen somit für eine intakte Zellhomöostase (Murphy & Weaver, 2018). Im Keimzentrum sind die Sternhimmelmakrophagen, welche C1q-negativ sind, für die Phagozytose und *Clearance* insbesondere von apoptotischen B-Zellen zuständig. Die Phagozytose apoptotischer B-Zellen durch Sternhimmelmakrophagen in den Keimzentren ist essenziell für die Prävention der Entstehung von Autoimmunitäten (Grootveld et al., 2023). Die in meiner Arbeit C1q-positiv markierten Zellen können dendritische Zellen oder andere Makrophagenpopulationen darstellen, diese sind hauptsächlich für die Bereiche außerhalb der Keimzentren zuständig. Die Expression von C1q beschreibt den Phänotyp M2 der Makrophagen, welcher speziell für die Phagozytose von apoptotischen Zellen verantwortlich ist (Bohlsón et al., 2014; Galvan et al., 2012). Dass sich C1q positive Makrophagen innerhalb der Keimzentren detektieren lassen, ist somit unphysiologisch und eine für die Pathogenese der COVID interessante Beobachtung. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass das Expressieren von bestimmten Oberflächenmolekülen das Vorliegen von nicht-funktionellen B-Zellen bedingt und mit einer Inhibition der T-B-Zell Interaktion einhergehen kann (Meyer et al., 2021). Bei diesen Varianten der B-Zellen wurde vermehrt die Apoptose eingeleitet (Meyer et al., 2021). Apoptotische B-Zellen können wiederum die Reifung und Aktivierung von Sternhimmelmakrophagen stimulieren und diese zur *Clearance* der apoptotischen B-Zellen in das Keimzentrum bewegen (Grootveld et al., 2023). Das lässt die Frage aufkommen, ob evtl. apoptotische B-Zellen oder Plasmazellen endozytiert werden, ggf. zusätzlich durch nicht-ortsansässige Makrophagen aufgrund eines erhöhten Vorkommens von apoptotischen B-Zellen oder einer verminderten Funktionalität der Sternhimmelmakrophagen. Dieser Aspekt kann in weiteren Forschungen adressiert werden. Hierbei sollte z.B. auch nach kleineren MUM1 positiven Partikeln innerhalb von Phagolysosomen gefahndet werden.

Da die Zelldichten der C1q und MUM1 positiven Zellen positiv korrelieren, unterstützt dies die oben beschriebene Hypothese zusätzlich. C1q Expression in Makrophagen geht mit der reduzierten Fähigkeit, eine inflammatorische TH1- und TH17-Immunreaktion auszulösen, und mit der Förderung der regulatorischen T-Zell Population einher (Castellano et al., 2007; van de Bovenkamp et al., 2021), was durch die positive Korrelation zwischen C1q und FoxP3 positiven Zellen unterstützt wird. Diese Gruppe von Makrophagen ist zudem nicht vollständig in der Lage, pro-inflammatorische Zytokine auszuschütten (Bohlsón et al., 2014), was essenziell für das Aktivieren des erworbenen Immunsystems ist. Das könnte erklären, warum der Shift zu dem überwiegend vorliegenden M2-Phänotyp der Makrophagen mit einer gestörten T-B-Zell Interaktion einhergehen könnte und möglicherweise Ausdruck eines erhöhten suppressiven Bedarfs zellulärer Immunantworten ist.

Auf der anderen Seite ist jedoch auch eine Stimulation der B-Zellen durch die C1q-positiven Zellen zur Initiierung einer Plasmazellantwort denkbar. Somit wären die hier markierten C1q positiven Zellen nicht primär für die Phagozytose der MUM1-positiven Zellen verantwortlich. Es könnte sein, dass die bei COVID vermindert stattfindende T-Zell-abhängige Stimulation der B-Zellen z.T. durch die Makrophagen übernommen werden könnte, was u.a. für die sekundäre Immunschwäche *Acquired Immunodeficiency Syndrom* (AIDS) im Fall von Hodgkin-Lymphomen beschrieben wurde (Hartmann et al., 2013). Zentraler Aspekt dieser Beobachtung wäre die Stimulation der Keimzentrums-B-Zellen, was durch die auch in meiner Arbeit beobachteten intrafollikulären C1q positiven Makrophagen möglich wäre. Jedoch findet dieses Phänomen physiologischerweise v.a. außerhalb der Keimzentren i.S. einer extrafollikulären B-Zell Aktivierung statt. Da bei COVID-Patienten ein Mangel an Antikörpern besteht, böte der diskutierte Mechanismus einer makrophagengetriebenen B-Zellantwort die Möglichkeit einer T-zellunabhängigen Teilkompensation, gegen die Ursache des Mangels bei der Antikörperproduktion zu arbeiten.

Auf Seiten der zellulären Immunität gibt es wiederum CD8⁺ T-Zellen, welche durch MUM1 positiv gefärbt werden (Huang et al., 2017). Bereits in der Studie von Unger et al., 2014, wurden vermehrt CD8⁺ T-Zellen in den Keimzentren von COVID Patienten nachgewiesen. Hierbei könnte es zu einer C1q-abhängigen Stimulation der CD8⁺ Zellen gekommen sein. Weitere Aspekte, die in dem Zusammenhang mit dem Auftreten von CD8⁺ T-Zellen gebracht worden sind, sind die Inhibition von T_{fh}-Zellen (Kim et al., 2010) und die

Förderung der Immunglobulin-Produktion (Quigley et al., 2007). Hier könnte dies ein Indiz dafür sein, dass diese die schwachen Outputs der Keimzentren an Plasmazellen und somit schließlich an Immunglobulinen kompensieren und evtl. funktionell in eine ähnliche Richtung wie die B-Zellen gehen, indem sie einen positiv verstärkenden Einfluss auf die humorale Antwort des Immunsystems auslösen. Die positive Korrelation der C1q- und FoxP3-positiven Zellen innerhalb der Follikel könnte andererseits eine Regulation der gesteigerten zellulären Stimulation des Immunsystems durch die C1q-positiven Zellen bedeuten. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die CD8+ T-Zellen, welche MUM1-positiv gefärbt worden sind, Makrophagen akquirieren und schließlich aktivieren (Nishimura et al., 2009). Um diesbezüglich eine definitive Aussage treffen zu können und die Möglichkeiten der zugrundeliegenden Beobachtung einzugrenzen, wären weiterführende funktionelle Forschungen essenziell.

4.6 Limitationen der morphologischen Studie bezüglich funktioneller immunologischer Aussagen

Bei dem dieser Forschung zugrunde liegenden Gewebe handelt es sich um FFPE (*Formalin fixation and paraffin-embedding*) Gewebe. Für die Diagnostik in der Pathologie stellt dies den Standard dar, um Gewebe zu fixieren (Amatori & Fanelli, 2022). Jedoch bringt dieses Verfahren der Gewebeaufbereitung gewisse Limitationen bei der Analyse der Präparate, v.a. hinsichtlich der nicht mehr nachvollziehbaren Zellmotilität, mit sich. Die FFPE-Schnitte stellen lediglich starre Momentaufnahmen einer Pathogenese dar. B-Zellen beispielsweise durchlaufen im Keimzentrum während ihrer Reifung und Affinitätssteigerung mehrere Zyklen des Wiedereintritts in die dunkle Zone aus der hellen Zone (Z. Long et al., 2022). Diese Wanderungsbewegung ist essenziell für die Funktionalität der Zellen und deren Rolle in dem menschlichen Immunsystem, wie unter Abschnitt 1.1.3 bereits erläutert worden ist. Eine gestörte Wanderungsbewegung und/oder räumlich gestörte Proliferation könnte unrunde Keimzentren zur Folge haben. In dieser Studie kann nicht beurteilt werden, ob die Unrundheit der Follikel und Keimzentren durch eine gestörte Zellmotilität zwischen der dunklen und hellen Zone bedingt ist oder es sich andernfalls sogar um unzureichende Kompensationsmechanismen handeln könnte. Eine Möglichkeit, mit der Limitation der starren Momentaufnahme umzugehen, wäre das zusätzliche Erheben der Werte von Zellmarkern, welche hinsichtlich der Motilität Expressionsunterschiede aufweisen. Ein

solcher Biomarker von Interesse könnte HGAL (*Human germinal center-associated lymphoma*) sein. Dies ist ein Protein, welches mit der Zellmotilität der sich in den Keimzentren befindlichen B-Zellen assoziiert worden ist (Jiang et al., 2021). Der Effekt von HGAL auf die Motilität der B-Zellen ist hemmend, indem es mit den Aktin- und Myosinmolekülen interagiert und somit die physiologische Interaktion dieser Moleküle behindert (Lu et al., 2011). Eine Färbung dieses Zellmarkers z.B. gemeinsam mit weiteren B- und T-Zellmarkern inkl. FoxP3 könnte über Abstandsmessungen zur Identifikation von Zell-Zellinteraktionen führen, die Einfluss auf die Motilität innerhalb der Keimzentren nehmen könnten. Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die Beobachtungen dieser Forschungsarbeit weitere Aspekte hinsichtlich der Pathogenese aufkommen lassen und somit Gegenstand für zukünftige Forschungen bieten können.

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

CVID ist eine sehr heterogene Erkrankung, deren Pathogenese bis heute unvollständig verstanden ist (Stand Juli 2023). Viele Patienten leiden unter einer fehlenden oder falschen Diagnose, welche die richtige Therapie zumindest verzögert. Selbst wenn die Diagnose der Erkrankung CVID gestellt worden ist, erschwert das vielfältige Krankheitsbild die Auswahl der Therapie. Die Analyse von histologischen Schnittbildern erweist großes Potential, was die erleichterte, und somit beschleunigte Diagnosestellung anhand unter Malignitätsverdacht entnommener Lymphknoten betrifft. Unrunde Follikel und Keimzentren oder das zusätzliche Vorliegen einer Hyperplasie der Keimzentren, können auf CVID hinweisen. Die Verifikation kann dann anhand immunhistochemischer Untersuchungen der verschiedenen Immunglobulinklassen und der Empfehlung weiterer serologischer und durchflusszytometrischer Untersuchungen erfolgen. Zusätzlich könnte man zukünftig möglicherweise zur verbesserten Klassifikation die nachweisbare Endozytose/Interaktion durch die Makrophagen hinzuziehen, zumal nicht bei jedem Patienten MUM1-C1q-doppelt positive Zellen vorliegen. Zum einen ist die genaue Analyse der Plasmazellen interessant, ob dort Moleküle exprimiert werden, welche die Endozytose durch die Makrophagen einleiten oder eine Opsonisierung erfolgt ist. Des Weiteren ist es interessant, ob bei den Makrophagen strukturelle Veränderungen vorliegen, welche ein fehlerhaftes Erkennen von fremd und körpereigen erklären. Bis jetzt liegen noch keine Studien vor, welche die Rolle von C1q positiven Makrophagen in der Entstehung oder Entwicklung der Erkrankung erforschen. Zusätzlich wäre die funktionelle Untersuchung

einer möglichen Stimulation der MUM1- durch die C1q-positiven Zellen ebenfalls zu diskutieren. Es besteht die Möglichkeit, dass die C1q-positiven Makrophagen eine wichtige Rolle in der fehlerhaften Interaktion des Immunsystems bei COVID besitzen.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2021). *Cellular and Molecular Immunology* (10th Aufl.). Elsevier - OHCE.
<https://bookshelf.health.elsevier.com/books/9780323757515>
- Abolhassani, H., Sagvand, B. T., Shokuhfar, T., Mirminachi, B., Rezaei, N., & Aghamohammadi, A. (2013). A review on guidelines for management and treatment of common variable immunodeficiency. *Expert Review of Clinical Immunology*, *9*(6), 561–575. <https://doi.org/10.1586/eci.13.30>
- Afshar-Ghasemlou, S., Esmail, N., Sherkat, R., Yazdani, R., Abbasi-Rad, F., Ganjalikhani-Hakemi, M., & Rezaei, A. (2019). Increased IRF4 expression in isolated B cells from common variable immunodeficiency (CVID) patients. *Allergologia et Immunopathologia*, *47*(1), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2018.09.005>
- Akar-Ghibril, N. (2022). Defects of the Innate Immune System and Related Immune Deficiencies. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, *63*, 36–54.
<https://doi.org/10.1007/s12016-021-08885-y>
- Alhusain, M., & Al-Mayah, A. (2021). Three dimensional imaging of reinforcement corrosion using micro-computed tomography: Literature review. *Construction and Building Materials*, *284*:122813. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2021.122813>
- Ali, M. G., Zhang, Z., Gao, Q., Pan, M., Rowan, E. G., & Zhang, J. (2020). Recent advances in therapeutic applications of neutralizing antibodies for virus infections: an overview. *Immunologic Research*, *68*(6), 325–339. <https://doi.org/10.1007/s12026-020-09159-z>
- Amatori, S., & Fanelli, M. (2022). The Current State of Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) from FFPE Tissues. In *International Journal of Molecular Sciences* (Bd. 23, Nummer 3, S. 1103). <https://doi.org/10.3390/ijms23031103>
- Andersen, I. M., & Jørgensen, S. F. (2022). Gut inflammation in CVID: causes and consequences. *Expert Review of Clinical Immunology*, *18*(1), 31–45.
<https://doi.org/10.1080/1744666X.2021.2008241>
- Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernández, J. A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., Dunne, P. D., McQuaid, S., Gray, R. T., Murray, L. J., Coleman, H. G., James, J. A., Salto-

- Tellez, M., & Hamilton, P. W. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*, *7*:16878(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
- Berbers, R. M., Drylewicz, J., Ellerbroek, P. M., van Montfrans, J. M., Dalm, V. A. S. H., van Hagen, P. M., Keller, B., Warnatz, K., van de Ven, A., van Laar, J. M., Nierkens, S., & Leavis, H. L. (2021). Targeted Proteomics Reveals Inflammatory Pathways that Classify Immune Dysregulation in Common Variable Immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology*, *41*(2), 362–373. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00908-1>
- Bohlsón, S. S., O’Conner, S. D., Hulsebus, H. J., Ho, M. M., & Fraser, D. A. (2014). Complement, C1Q, and C1q-related molecules regulate macrophage polarization. *Frontiers in Immunology*, *5*:402. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00402>
- Cancro, M. P., & Tomayko, M. M. (2021). Memory B cells and plasma cells: The differentiative continuum of humoral immunity. *Immunological Reviews*, *303*(1), 72–82. <https://doi.org/10.1111/imr.13016>
- Castellano, G., Woltman, A. M., Schlagwein, N., Xu, W., Schena, F. P., Daha, M. R., & van Kooten, C. (2007). Immune modulation of human dendritic cells by complement. *European Journal of Immunology*, *37*(19), 2803–2811.
<https://doi.org/10.1002/eji.200636845>
- Christiansen, M., Offersen, R., Jensen, J. M. B., Petersen, M. S., Larsen, C. S., & Mogensen, T. H. (2020). Identification of Novel Genetic Variants in CVID Patients With Autoimmunity, Autoinflammation, or Malignancy. *Frontiers in Immunology*, *10*:3022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03022>
- Cinetto, F., Scarpa, R., Carrabba, M., Firinu, D., Lougaris, V., Buso, H., Garzi, G., Gianese, S., Soccodato, V., Punziano, A., Lagnese, G., Tessarin, G., Costanzo, G., Landini, N., Vio, S., Bondioni, M. P., Consonni, D., Marasco, C., Del Giacco, S., ... Milito, C. (2021). Granulomatous Lymphocytic Interstitial Lung Disease (GLILD) in Common Variable Immunodeficiency (CVID): A Multicenter Retrospective Study of Patients From Italian PID Referral Centers. *Frontiers in Immunology*, *12*:627423.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.627423>
- Colamatteo, A., Carbone, F., Bruzzaniti, S., Galgani, M., Fusco, C., Maniscalco, G. T., Di

- Rella, F., de Candia, P., & De Rosa, V. (2020). Molecular Mechanisms Controlling Foxp3 Expression in Health and Autoimmunity: From Epigenetic to Post-translational Regulation. *Frontiers in Immunology*, *10*:3136.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03136>
- de Valles-Ibáñez, G., Esteve-Solé, A., Piquer, M., Azucena González-Navarro, E., Hernandez-Rodriguez, J., Laayouni, H., González-Roca, E., Plaza-Martin, A. M., Deyà-Martínez, Á., Martín-Nalda, A., Martínez-Gallo, M., García-Prat, M., del Pino-Molina, L., Cuscó, I., Codina-Solà, M., Batlle-Masó, L., Solís-Moruno, M., Marquès-Bonet, T., Bosch, E., ... Casals, F. (2018). Evaluating the genetics of common variable immunodeficiency: Monogenetic model and beyond. *Frontiers in Immunology*, *9*:636. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00636>
- Dominguez-Andres, J., & Netea, M. G. (2019). Long-term reprogramming of the innate immune system. *Journal of Leukocyte Biology*, *105*(2), 329–338.
<https://doi.org/10.1002/JLB.MR0318-104R>
- Dutta, A., Venkataganesh, H., & Love, P. E. (2021). New insights into epigenetic regulation of T cell differentiation. *Cells*, *10*:3459.
<https://doi.org/10.3390/cells10123459>
- Emmaneel, A., Bogaert, D. J., Van Gassen, S., Tavernier, S. J., Dullaers, M., Haerynck, F., & Saeys, Y. (2019). A computational pipeline for the diagnosis of CVID patients. *Frontiers in Immunology*, *10*:2009. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02009>
- Erdem, S. B., Gulez, N., Genel, F., Karaman, S., & Nacaroglu, H. T. (2019). Characteristics of the patients followed with the diagnosis of common variable immunodeficiency and the complications. *Central European Journal of Immunology*, *44*(2), 119–126. <https://doi.org/10.5114/ceji.2019.87060>
- Esfahani, Z. H., Yazdani, R., Shahkarami, S., Babaha, F., Abolhassani, H., Sadr, M., Pourfathollah, A. A., & Aghamohammadi, A. (2021). Evaluation of MicroRNA-125b-5p and Transcription Factors BLIMP1 and IRF4 Expression in Unsolved Common Variable Immunodeficiency Patients. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, *20*(6), 700–710. <https://doi.org/10.18502/ijaai.v20i6.8021>
- Fernandez-Palomo, C., Nikitaki, Z., Djonov, V., Georgakilas, A. G., & Martin, O. A.

- (2022). Non-Targeted Effects of Synchrotron Radiation: Lessons from Experiments at the Australian and European Synchrotrons. *Applied Sciences (Switzerland)*, *12*:2079. <https://doi.org/10.3390/app12042079>
- Fernando, S. L., Jang, H. S. I., & Li, J. (2021). The Immune Dysregulation of Common Variable Immunodeficiency Disorders. *Immunology Letters*, *230*. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.12.002>
- Froehlich, M., Schwaneck, E. C., Gernert, M., Gadeholt, O., Strunz, P. P., Morbach, H., Tony, H. P., & Schmalzing, M. (2020). Autologous Stem Cell Transplantation in Common Variable Immunodeficiency: A Case of Successful Treatment of Severe Refractory Autoimmune Encephalitis. *Frontiers in Immunology*, *11*:1317. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01317>
- Galvan, M. D., Foreman, D. B., Zeng, E., Tan, J. C., & Bohlsion, S. S. (2012). Complement Component C1q Regulates Macrophage Expression of Mer Tyrosine Kinase To Promote Clearance of Apoptotic Cells. *The Journal of Immunology*, *188*(8), 3716–3723. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102920>
- Gathmann, B., Mahlaoui, N., Gérard, L., Oksenhendler, E., Warnatz, K., Schulze, I., Kindle, G., Kuijpers, T. W., Van Beem, R. T., Guzman, D., Workman, S., Soler-Palacín, P., De Gracia, J., Witte, T., Schmidt, R. E., Litzman, J., Hlavackova, E., Thon, V., Borte, M., ... Grimbacher, B. (2014). Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *134*(1), 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.12.1077>
- Ghafoor, A., & Joseph, S. M. (2020). Making a Diagnosis of Common Variable Immunodeficiency: A Review. *Cureus*, *12*(1):e671. <https://doi.org/10.7759/cureus.6711>
- Girkin, J. M., & Carvalho, M. T. (2018). The light-sheet microscopy revolution. *Journal of Optics (United Kingdom)*, *20*:053002. <https://doi.org/10.1088/2040-8986/aab58a>
- Grootveld, A. K., Kyaw, W., Panova, V., Lau, A. W. Y., Ashwin, E., Seuzaret, G., Dhenni, R., Bhattacharyya, N. D., Khoo, W. H., Biro, M., Mitra, T., Meyer-Hermann, M., Bertolino, P., Tanaka, M., Hume, D. A., Croucher, P. I., Brink, R., Nguyen, A., Bannard, O., & Phan, T. G. (2023). Apoptotic cell fragments locally activate tingible

body macrophages in the germinal center. *Cell*, 186(6), 1144-1161.e18.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.02.004>

Grześk, E., Dąbrowska, A., Urbańczyk, A., Ewertowska, M., Tejza, B., Grześk, G., Wysocki, M., & Kołtan, S. (2018). Common variable immunodeficiency disorders – Diseases with many faces. *Pediatrics Polska*, 93(2), 186–191.
<https://doi.org/10.5114/polp.2018.76254>

Gullo, I., Costa, C., Silva, S. L., Ferreira, C., Motta, A., Silva, S. P., Ferreira, R. D., Rosmaninho, P., Faria, E., Costa, J. T. da, Câmara, R., Gonçalves, G., Santos-Antunes, J., Oliveira, C., Machado, J. C., Carneiro, F., & Sousa, A. E. (2020). The Dysfunctional Immune System in Common Variable Immunodeficiency Increases the Susceptibility to Gastric Cancer. *Cells*, 9(6):1496.
<https://doi.org/10.3390/cells9061498>

Guntoro, P. I., Ghorbani, Y., Koch, P. H., & Rosenkranz, J. (2019). X-ray microcomputed tomography (μ ct) for mineral characterization: A review of data analysis methods. *Minerals*, 9:183(3). <https://doi.org/10.3390/min9030183>

Hägglöf, T., Cipolla, M., Loewe, M., Chen, S. T., Mesin, L., Hartweg, H., ElTanbouly, M. A., Cho, A., Gazumyan, A., Ramos, V., Stamatatos, L., Oliveira, T. Y., Nussenzweig, M. C., & Viant, C. (2023). Continuous germinal center invasion contributes to the diversity of the immune response. *Cell*, 186(1), 147-161.e15.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.032>

Harder, I., Münchhalfen, M., Andrieux, G., Boerries, M., Grimbacher, B., Eibel, H., Maccari, M. E., Ehl, S., Wienands, J., Jellusova, J., Warnatz, K., & Keller, B. (2022). Dysregulated PI3K Signaling in B Cells of COVID Patients. *Cells*, 11(3):464.
<https://doi.org/10.3390/cells11030464>

Hartmann, S., Jakobus, C., Rengstl, B., Döring, C., Newrzela, S., Brodt, H. R., Wolf, T., & Hansmann, M. L. (2013). Spindle-shaped CD163+ rosetting macrophages replace CD4 + T-cells in HIV-related classical Hodgkin lymphoma. *Modern Pathology*, 26(5), 648–657. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.217>

Heo, M. H., Park, H. Y., Ko, Y. H., Kim, W. S., & Kim, S. J. (2017). IRF4/MUM1 expression is associated with poor survival outcomes in patients with peripheral T-cell

- lymphoma. *Journal of Cancer*, 8(6), 1018–1024. <https://doi.org/10.7150/jca.17358>
- Hilligan, K. L., Tang, S. C., Hyde, E. J., Roussel, E., Mayer, J. U., Yang, J., Wakelin, K. A., Schmidt, A. J., Connor, L. M., Sher, A., MacDonald, A. S., & Ronchese, F. (2020). Dermal IRF4+ dendritic cells and monocytes license CD4+ T helper cells to distinct cytokine profiles. *Nature Communications*, 11:5637(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19463-9>
- Ho, H. E., & Cunningham-Rundles, C. (2020). Non-infectious Complications of Common Variable Immunodeficiency: Updated Clinical Spectrum, Sequelae, and Insights to Pathogenesis. *Frontiers in Immunology*, 11:149. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00149>
- Huang, S., Shen, Y., Pham, D., Jiang, L., Wang, Z., Kaplan, M. H., Zhang, G., & Sun, J. (2017). IRF4 Modulates CD8+ T Cell Sensitivity to IL-2 Family Cytokines. *ImmunoHorizons*, 1(6), 92–100. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1700020>
- Ichii, M. (2014). Early B lymphocyte development: Similarities and differences in human and mouse. *World Journal of Stem Cells*, 6(4), 421–431. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i4.421>
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, 16(4), 343–353. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>
- Jain, A., & Pasare, C. (2017). Innate Control of Adaptive Immunity: Beyond the Three-Signal Paradigm. *The Journal of Immunology*, 198(10), 3791–3800. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1602000>
- Jiang, X., Lu, X. Q., Gentles, A. J., Zhao, D., Wander, S. A., Zhang, Y., Natkunam, Y., Slingerland, J., Reis, I. M., Rabinovich, B., Abdulreda, M. H., Moy, V. T., & Lossos, I. S. (2021). HGAL inhibits lymphoma dissemination by interacting with multiple cytoskeletal proteins. *Blood Advances*, 5(23), 5072–5085. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004304>
- Kato, T., & Kobayashi, T. J. (2021). Understanding adaptive immune system as reinforcement learning. *Physical Review Research*, 3(1):3222. <https://doi.org/10.1103/PhysRevResearch.3.013222>

- Keller, B., Cseresnyes, Z., Stumpf, I., Wehr, C., Fliegau, M., Bulashevskaya, A., Usadel, S., Grimbacher, B., Rizzi, M., Eibel, H., Niesner, R., & Warnatz, K. (2016). Disturbed canonical NF- κ B signaling in B cells of COVID patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *Epub(0)*.
- Khodadadi, L., Cheng, Q., Radbruch, A., & Hiepe, F. (2019). The maintenance of memory plasma cells. *Frontiers in Immunology*, *10*:72, 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.0072>
- Kim, H. J., Verbinnen, B., Tang, X., Lu, L., & Cantor, H. (2010). Inhibition of follicular T-helper cells by CD8 + regulatory T cells is essential for self tolerance. *Nature*, *467*(7313), 328–332. <https://doi.org/10.1038/nature09370>
- Klopper, A., Friedmann, D., Schlaak, A. E., Unger, S., Parackova, Z., Goldacker, S., Sediva, A., Bengsch, B., & Warnatz, K. (2022). Distinct CD8 T Cell Populations with Differential Exhaustion Profiles Associate with Secondary Complications in Common Variable Immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology*, *42*(6), 1254–1269.
<https://doi.org/10.1007/s10875-022-01291-9>
- Klopper, A., Unger, S., Friedmann, D., Seidl, M., Zoldan, K., Pfeiffer, J., Hausmann, O., Benes, V., Andrieux, G., Boettler, T., Sediva, A., Bengsch, B., & Warnatz, K. (2020). Exhausted phenotype of follicular CD8 T cells in COVID. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *146*(4), 912-915.e13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.02.025>
- Krause, N., Mengwasser, J., Phithak, E., Beato, F., Appis, M., Milford, E. L., Pratschke, J., Sauer, I., Kuehl, A., Vogel, A., Goodyear, M., Hammerich, L., Tacke, F., Haas, J. F., Müller, T., & Utku, N. (2022). Immune Regulatory 1 Cells: A Novel and Potent Subset of Human T Regulatory Cells. *Frontiers in Immunology*, *12*:790775.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.790775>
- Lagou, V., Garcia-Perez, J. E., Smets, I., Van Horebeek, L., Vandebergh, M., Chen, L., Mallants, K., Prezzemolo, T., Hilven, K., Humblet-Baron, S., Moisse, M., Van Damme, P., Boeckxstaens, G., Bowness, P., Dubois, B., Dooley, J., Liston, A., & Goris, A. (2018). Genetic Architecture of Adaptive Immune System Identifies Key Immune Regulators. *Cell Reports*, *25*(3), 798-810.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.048>

- Long, A., Kleiner, A., & Looney, R. J. (2023). Immune dysregulation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *151*(1), 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.11.001>
- Long, Z., Phillips, B., Radtke, D., Meyer-Hermann, M., & Bannard, O. (2022). Competition for refueling rather than cyclic reentry initiation evident in germinal centers. *Science Immunology*, *7*(69). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abm0775>
- Lu, X., Kazmierczak, K., Jiang, X., Jones, M., Watt, J., Helfman, D. M., Moore, J. R., Szczesna-Cordary, D., & Lossos, I. S. (2011). Germinal center-specific protein human germinal center associated lymphoma directly interacts with both myosin and actin and increases the binding of myosin to actin. *FEBS Journal*, *278*(11), 1922–1931. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08109.x>
- MacLennan, I. C. M., Toellner, K. M., Cunningham, A. F., Serre, K., Sze, D. M. Y., Zúñiga, E., Cook, M. C., & Vinuesa, C. G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunological Reviews*, *194*(1), 8–18. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00058.x>
- Magliulo, G., Iannella, G., Ciofalo, A., Angeletti, D., Pulvirenti, F., & Quinti, I. (2019). The olfactory function in patients with common variable immunodeficiency. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, *136*(6), 429–434. <https://doi.org/10.1016/j.anorl.2018.02.003>
- Maldonado Galdeano, C., Cazorla, S. I., Lemme Dumit, J. M., Vélez, E., & Perdigón, G. (2019). Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *74*(2), 115–124. <https://doi.org/10.1159/000496426>
- Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V., & Roumenina, L. T. (2015). Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. *Frontiers in Immunology*, *6*:262. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00262>
- Merle, N. S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., & Roumenina, L. T. (2015). Complement system part II: Role in immunity. *Frontiers in Immunology*, *6*:257. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00257>
- Mertowska, P., Mertowski, S., Podgajna, M., & Grywalska, E. (2022). The Importance of the Transcription Factor Foxp3 in the Development of Primary Immunodeficiencies. *Journal of Clinical Medicine*, *11*(4):947. <https://doi.org/10.3390/jcm11040947>

- Meyer, S. J., Steffensen, M., Acs, A., Weisenburger, T., Wadewitz, C., Winkler, T. H., & Nitschke, L. (2021). CD22 Controls Germinal Center B Cell Receptor Signaling, Which Influences Plasma Cell and Memory B Cell Output. *The Journal of Immunology*, 207(4), 1018–1032. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100132>
- Mohr, A., Malhotra, R., Mayer, G., Gorochov, G., & Miyara, M. (2018). Human FOXP3+ T regulatory cell heterogeneity. *Clinical and Translational Immunology*, 7(1):e1005. <https://doi.org/10.1002/cti2.1005>
- Murphy, K., & Weaver, C. (2018). Grundbegriffe der Immunologie. In *Janeway Immunologie* (S. 3–46). Springer Spektrum. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4_1
- Nayar, R., Schutten, E., Bautista, B., Daniels, K., Prince, A. L., Enos, M., Brehm, M. A., Swain, S. L., Welsh, R. M., & Berg, L. J. (2014). Graded Levels of IRF4 Regulate CD8+ T Cell Differentiation and Expansion, but Not Attrition, in Response to Acute Virus Infection. *The Journal of Immunology*, 192(12), 5881–5893. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303187>
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T., & Nagai, R. (2009). CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Medicine*, 15(8), 914–920. <https://doi.org/10.1038/nm.1964>
- Noor, N., Ghori, M., Molani, R. A., & Ibrahim, M. N. (2022). Suspected Pediatric-Onset Common Variable Immune Deficiency (CVID) in a Seven-Year-Old Female With Pulmonary Manifestations. *Cureus*, 14(9):e297. <https://doi.org/10.7759/cureus.29703>
- Ochiai, K., Maienschein-Cline, M., Simonetti, G., Chen, J., Rosenthal, R., Brink, R., Chong, A. S., Klein, U., Dinner, A. R., Singh, H., & Sciammas, R. (2013). Transcriptional Regulation of Germinal Center B and Plasma Cell Fates by Dynamical Control of IRF4. *Immunity*, 38(5), 918–929. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.009>
- Pecoraro, A., Crescenzi, L., Galdiero, M. R., Marone, G., Rivellese, F., Rossi, F. W., De Paulis, A., Genovese, A., & Spadaro, G. (2019). Immunosuppressive therapy with

rituximab in common variable immunodeficiency. *Clinical and Molecular Allergy*, 17:9. <https://doi.org/10.1186/s12948-019-0113-3>

Peřka, J. B. (2022). Synchrotron Radiation in Biology and Medicine. *Acta Physica Polonica A*, 141(1). <https://doi.org/10.12693/APHYSPOLA.141.3>

Pieper, K., Grimbacher, B., & Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(4), 959–971. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>

Quast, I., Keller, C. W., Maurer, M. A., Giddens, J. P., Tackenberg, B., Wang, L. X., Münz, C., Nimmerjahn, F., Dalakas, M. C., & Lünemann, J. D. (2015). Sialylation of IgG Fc domain impairs complement-dependent cytotoxicity. *Journal of Clinical Investigation*, 125(11), 4160–4170. <https://doi.org/10.1172/JCI82695>

Quigley, M. F., Gonzalez, V. D., Granath, A., Andersson, J., & Sandberg, J. K. (2007). CXCR5+ CCR7- CD8 T cells are early effector memory cells that infiltrate tonsil B cell follicles. *European Journal of Immunology*, 37(12), 3352–3362. <https://doi.org/10.1002/eji.200636746>

Ramos-Vara, J. A., Miller, M. A., & Valli, V. E. O. (2007). Immunohistochemical detection of multiple myeloma 1/interferon regulatory factor 4 (MUM1/IRF-4) in canine plasmacytoma: Comparison with CD79a and CD20. *Veterinary Pathology*, 44(6), 875–884. <https://doi.org/10.1354/vp.44-6-875>

Richardson, C. T., Slack, M. A., Dhillon, G., Marcus, C. Z., Barnard, J., Palanichamy, A., Sanz, I., Looney, R. J., & Anolik, J. H. (2019). Failure of B Cell Tolerance in CVID. *Frontiers in Immunology*, 10:2881. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02881>

Rodríguez-Ubreva, J., Arutyunyan, A., Bonder, M. J., Del Pino-Molina, L., Clark, S. J., de la Calle-Fabregat, C., Garcia-Alonso, L., Handfield, L. F., Ciudad, L., Andrés-León, E., Krueger, F., Català-Moll, F., Rodríguez-Cortez, V. C., Polanski, K., Mamanova, L., van Dongen, S., Kiselev, V. Y., Martínez-Saavedra, M. T., Heyn, H., ... Ballestar, E. (2022). Single-cell Atlas of common variable immunodeficiency shows germinal center-associated epigenetic dysregulation in B-cell responses. *Nature Communications*, 13:1779. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29450-x>

Romberg, N., Le Coz, C., Glauzy, S., Schickel, J. N., Trofa, M., Nolan, B. E., Paessler, M.,

- Xu, M. L., Lambert, M. P., Lakhani, S. A., Khokha, M. K., Jyonouchi, S., Heimall, J., Takach, P., Maglione, P. J., Catanzaro, J., Hsu, F. I., Sullivan, K. E., Cunningham-Rundles, C., & Meffre, E. (2019). Patients with common variable immunodeficiency with autoimmune cytopenias exhibit hyperplastic yet inefficient germinal center responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *143*(1), 258–265.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.06.012>
- Salzer, U., Warnatz, K., & Peter, H. H. (2012). Common variable immunodeficiency - an update. *Arthritis Research and Therapy*, *14*:223. <https://doi.org/10.1186/ar4032>
- Santi, P. A. (2011). Light sheet fluorescence microscopy: A review. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *59*(2), 129–138.
<https://doi.org/10.1369/0022155410394857>
- Savage, P. A., Klawon, D. E. J., & Miller, C. H. (2020). Regulatory T Cell Development. *Annual Review of Immunology*, *38*, 421–453. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-100219-020937>
- Schepp, J., Chou, J., Skrabl-Baumgartner, A., Arkwright, P. D., Engelhardt, K. R., Hambleton, S., Morio, T., Röther, E., Warnatz, K., Geha, R., & Grimbacher, B. (2017). 14 years after discovery: Clinical follow-up on 15 patients with inducible co-stimulator deficiency. *Frontiers in Immunology*, *8*:964.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00964>
- Schulz, K., & Trendelenburg, M. (2022). C1q as a target molecule to treat human disease: What do mouse studies teach us? *Frontiers in Immunology*, *13*:958273.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.958273>
- Simón-Fuentes, M., Sánchez-Ramón, S., Fernández-Paredes, L., Alonso, B., Guevara-Hoyer, K., Vega, M. A., Corbí, A. L., & Domínguez-Soto, Á. (2022). Intravenous Immunoglobulins Promote an Expansion of Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in COVID Patients. *Journal of Clinical Immunology*, *42*(5), 1093–1105.
<https://doi.org/10.1007/s10875-022-01277-7>
- Sirisinha, S. (2011). Insight into the mechanisms regulating immunohomeostasis in health and disease. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, *29*(1).
- Sperlich, J. M., Grimbacher, B., Workman, S., Haque, T., Seneviratne, S. L., Burns, S. O.,

- Reiser, V., Vach, W., Hurst, J. R., & Lowe, D. M. (2018). Respiratory Infections and Antibiotic Usage in Common Variable Immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, *6*(1), 159-168.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.jaip.2017.05.024>
- Stebegg, M., Kumar, S. D., Silva-Cayetano, A., Fonseca, V. R., Linterman, M. A., & Graca, L. (2018). Regulation of the germinal center response. *Frontiers in Immunology*, *9*:2469. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02469>
- Strohmeier, V., Andrieux, G., Unger, S., Pascual-Reguant, A., Klocperk, A., Seidl, M., Marques, O. C., Eckert, M., Gräwe, K., Shabani, M., von Spee-Mayer, C., Friedmann, D., Harder, I., Gutenberger, S., Keller, B., Proietti, M., Bulashevskaya, A., Grimbacher, B., Provaznik, J., ... Warnatz, K. (2023). Interferon-Driven Immune Dysregulation in Common Variable Immunodeficiency–Associated Villous Atrophy and Norovirus Infection. *Journal of Clinical Immunology*, *43*(2), 371–390.
<https://doi.org/10.1007/s10875-022-01379-2>
- Tanir Basaranoglu, S., Cekic, S., Kirhan, E., Dirican, M., & Kilic, S. S. (2021). Oxidative stress in common variable immunodeficiency. *European Journal of Inflammation*, *19*:1-8. <https://doi.org/10.1177/20587392211002411>
- Tsuboi, K., Iida, S., Inagaki, H., Kato, M., Hayami, Y., Hanamura, I., Miura, K., Harada, S., Kikuchi, M., Komatsu, H., Banno, S., Wakita, A., Nakamura, S., Eimoto, T., & Ueda, R. (2000). MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies. *Leukemia*, *14*(3), 449–456. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401696>
- Unger, S., Seidl, M., Schmitt-Graeff, A., Böhm, J., Schrenk, K., Wehr, C., Goldacker, S., Dräger, R., Gärtner, B. C., Fisch, P., Werner, M., & Warnatz, K. (2014). Ill-Defined Germinal Centers and Severely Reduced Plasma Cells are Histological Hallmarks of Lymphadenopathy in Patients with Common Variable Immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology*, *34*(6), 615–626. <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0052-1>
- van de Bovenkamp, F. S., Dijkstra, D. J., van Kooten, C., Gelderman, K. A., & Trouw, L. A. (2021). Circulating C1q levels in health and disease, more than just a biomarker. *Molecular Immunology*, *140*, 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.10.010>
- van der Veecken, J., Campbell, C., Pritykin, Y., Schizas, M., Verter, J., Hu, W., Wang, Z.

- M., Matheis, F., Mucida, D., Charbonnier, L. M., Chatila, T. A., & Rudensky, A. Y. (2022). Genetic tracing reveals transcription factor Foxp3-dependent and Foxp3-independent functionality of peripherally induced Treg cells. *Immunity*, *55*(7), 1173-1184.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.05.010>
- van Schewick, C. M., Lowe, D. M., Burns, S. O., Workman, S., Symes, A., Guzman, D., Moreira, F., Watkins, J., Clark, I., & Grimbacher, B. (2022). Bowel Histology of CVID Patients Reveals Distinct Patterns of Mucosal Inflammation. *Journal of Clinical Immunology*, *42*(1). <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01104-5>
- van Schewick, C. M., Nöltner, C., Abel, S., Burns, S. O., Workman, S., Symes, A., Guzman, D., Proietti, M., Bulashevskaya, A., Moreira, F., Soetedjo, V., Lowe, D. M., & Grimbacher, B. (2020). Altered Microbiota, Impaired Quality of Life, Malabsorption, Infection, and Inflammation in CVID Patients With Diarrhoea. *Frontiers in Immunology*, *11*:1654. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01654>
- van Schouwenburg, P., Unger, S., Payne, K. J., Kaiser, F. M. P., Pico-Knijnenburg, I., Pfeiffer, J., Hausmann, O., Friedmann, D., Erbel, M., Seidl, M., van Zessen, D., Stubbs, A. P., van der Burg, M., & Warnatz, K. (2022). Deciphering imprints of impaired memory B-cell maturation in germinal centers of three patients with common variable immunodeficiency. *Frontiers in Immunology*, *13*:959002. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.959002>
- Varricchi, G., Poto, R., Ianiro, G., Punziano, A., Marone, G., Gasbarrini, A., & Spadaro, G. (2021). Gut Microbiome and Common Variable Immunodeficiency: Few Certainties and Many Outstanding Questions. *Frontiers in Immunology*, *12*:712915. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.712915>
- Verbsky, J. W., Hintermeyer, M. K., Simpson, P. M., Feng, M., Barbeau, J., Rao, N., Cool, C. D., Sosa-Lozano, L. A., Baruah, D., Hammelev, E., Busalacchi, A., Rymaszewski, A., Woodliff, J., Chen, S., Bausch-Jurken, M., & Routes, J. M. (2021). Rituximab and antimetabolite treatment of granulomatous and lymphocytic interstitial lung disease in common variable immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *147*(2), 704-712.e17. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.07.021>
- Victoria, G. D., & Nussenzweig, M. C. (2022). Germinal Centers. *Annual Review of Immunology*, *40*:413-442. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-120419-022408>

- Von Schoenfeld, A., Bronsert, P., Poc, M., Fuller, A., Filby, A., Kraft, S., Kurowski, K., Sörensen, K., Huber, J., Pfeiffer, J., Proietti, M., Stehl, V., Werner, M., & Seidl, M. (2022). Multiple immunostainings with different epitope retrievals—the folgas protocol. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*:223. <https://doi.org/10.3390/ijms23010223>
- Warnatz, K., & Schlesier, M. (2008). Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, *74B*(5), 261–271. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20432>
- Warnatz, K., & Voll, R. E. (2012). Pathogenesis of autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Frontiers in Immunology*, *3*:210. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00210>
- Wehr, C., Gennery, A. R., Lindemans, C., Schulz, A., Hoenig, M., Marks, R., Recher, M., Gruhn, B., Holbro, A., Heijnen, I., Meyer, D., Grigoleit, G., Einsele, H., Baumann, U., Witte, T., Sykora, K. W., Goldacker, S., Regairaz, L., Aksoylar, S., ... Rizzi, M. (2015). Multicenter experience in hematopoietic stem cell transplantation for serious complications of common variable immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *135*(4), 988-997.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.029>
- Yam-Puc, J. C., Toellner, K. M., Zhang, L., & Zhang, Y. (2018). Role of B-cell receptors for B-cell development and antigen-induced differentiation. *F1000Research*, *7*:429. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13567.1>
- Yasmeen, F., Seo, H., Javaid, N., Kim, M. S., & Choi, S. (2020). Therapeutic interventions into innate immune diseases by means of Aptamers. *Pharmaceutics*, *12*:955. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12100955>
- Yazdani, R., Habibi, S., Sharifi, L., Azizi, G., Abolhassani, H., Olbrich, P., & Aghamohammadi, A. (2020). Common variable immunodeficiency: Epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, classification, and management. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, *30*(1), 14–34. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0388>
- Zhu, Y., Zou, L., & Liu, Y. C. (2016). T follicular helper cells, T follicular regulatory cells and autoimmunity. *International Immunology*, *28*(4), 173–179.

<https://doi.org/10.1093/intimm/dxv079>