

Automatische PD-L1 Quantifizierung mittels künstlicher Intelligenz und einer 15-Marker BLEACH&STAIN Immunhistochemie in 3.098 humanen Karzinomen

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktorgrades der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften im
Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

Vorgelegt von
Elena Bady
aus Wuppertal

Hamburg 2022

Vorsitzender der Prüfungskommission:

Herr Prof. Dr. Thomas Oertner

Mitglied der Prüfungskommission:

Herr Prof. Dr. Guido Sauter

1. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission:

Herr Prof. Dr. Markus Glatzel

2. Gutachter:

Herr Prof. Dr. Ronald Simon

Tag der Disputation: 06.01.2023

Für Marek, Sibylle und Johannes

1. Einleitung	1
1.1. Die Rolle der Immuncheckpoint-Proteine im gesunden Immunsystem.....	3
1.2. Die Rolle der Immuncheckpoint-Proteine im neoplastischen Gewebe.....	6
1.3. Immuncheckpoint-Therapie.....	8
1.4. Immunhistochemischer Nachweis von PD-L1 im Tumorgewebe.....	10
1.5. Künstliche Intelligenz in der Pathologie.....	16
1.6. Prognoserelevanz von PD-L1 beim Mammakarzinom.....	21
1.7. Ziele der Forschung im Bereich der Einzelzellerkennung und Marker-Quantifizierung.....	21
1.8. Zielsetzung der Dissertation.....	23
2. Material und Methoden	24
2.1. Gewebemikroarray-Technik.....	24
2.2. Patientenmaterial.....	25
2.3. <i>in vivo</i> -Experimente in C57BL/J6- und BALB/c-Mäusen	27
2.4. Zellkultur	29
2.5. Hybridomtechnologie	34
2.6. Western-Blot-Analyse.....	36
2.7. Plasmid Expressionsanalyse	39
2.8. Immunhistochemische Färbungen	42
2.9. BLEACH&STAIN-Framework.....	46
2.10. Einsatz von künstlicher Intelligenz zur Bildanalyse	47
2.11. Statistische Analysen	52
3. Ergebnisse	54
3.1. BLEACH&STAIN-Validierung.....	54
3.3. Auswertung der Antikörperherstellung.....	58
3.4. Deep Learning-basierte Struktur für die automatische PD-L1-Quantifizierung.....	60
3.5. Dichte der Marker-positiven Zellen und prozentualer Anteil der Immuncheckpoints innerhalb 44 Entitäten	62
3.6. Gruppierung von Tumoren basierend auf dem PD-L1-Status und der Quantität inflammatorischer Zellen	64
3.7. Lokalisationsabhängige Analyse der Expression PD-L1-Immunphänotypen	72
3.8. Untersuchungsergebnisse der sechs Gruppen in verschiedenen Entitäten	76
3.9. Brustkrebsprognose	77
4. Diskussion	82
4.1. BLEACH&STAIN.....	82
4.2. Antikörperaustestung.....	85

4.3.	Analyse mittels künstlicher Intelligenz	87
4.4.	Lokalisationsabhängige PD-L1-Expressionen	90
4.5.	PD-L1-Expression in 44 Karzinom-Entitäten und Prognoserelevanz im Brustkrebs.....	91
5.	Zusammenfassung.....	93
6.	Abbildungsverzeichnis.....	95
7.	Tabellenverzeichnis	96
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	97
9.	Literaturverzeichnis.....	99
10.	Anhang	110
10.5.	Western Blot Ergebnisse.....	110
10.6.	Tierversuchsantrag	111
10.7.	Score Sheet Tierversuch	113
11.	Eidesstattliche Versicherung	117
12.	Danksagung.....	118

1. Einleitung

Maligne Tumorerkrankungen stehen (nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen) an zweiter Stelle der häufigsten Todesursachen weltweit¹. Die Therapie maligner Tumore basiert auf der Kombination von chirurgischer Intervention, systemischer Chemotherapie und Radiatio². Dabei gehen gerade unspezifische Therapieansätze mit weitreichenden Nebenwirkungen einher: So wirkt die systemische Verabreichung von Chemotherapie gleichermaßen auf alle proliferierenden Zellen des Körpers ein, ohne dabei zwischen gesunden und malignen Zellen zu unterscheiden. Ein Schwerpunkt der modernen Krebsforschung besteht darin, Zielproteine des Tumors therapeutisch nutzbar zu machen, die ausschließlich oder überwiegend in den malignen Zellen vorkommen, um Nebenwirkungen in gesunden Körperzellen zu reduzieren³. Daher versteht man unter individualisierter Krebstherapie, die bei jedem Patienten individuellen Veränderungen im Tumor oder im Tumormikromilieu zu identifizieren und im Anschluss therapeutisch zunutze zu machen.

Ein vielversprechender Ansatz der Krebsforschung ist die Immuntherapie. Hierbei wird die durch den Tumor gehemmte oder bisher ausbleibende Anti-Tumor-Immunreaktion therapeutisch reaktiviert und so das Immunsystem aktiv als Krebstherapie eingesetzt⁴. Das einfachste Beispiel für die Immuntherapie stammt aus dem 19. Jahrhundert: William B. Coley induzierte einem 21-jährigen Sarkom-Patienten eine Bakterien-Mischung aus *Streptococcus pyogenes* und *Bacillus prodigiosus* und konnte mit Erfolg feststellen, dass sein Patient eine komplette Remission des Tumors erlangte⁵. Diese Art der Immuntherapie findet auch heute noch Anwendung bei Patienten mit nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen⁶. In den letzten Jahren zeigte eine neue Generation von Immuntherapien eine wahre Erfolgsgeschichte bei fortgeschrittenen, metastasierten oder therapierefraktären Tumorentitäten: Das Interesse liegt hierbei bei den Oberflächen-Rezeptoren und -Liganden der Immun- und Tumorzellen – den sogenannten Checkpoints des Immunsystems. Die Aktivierung dieser Immuncheckpoints geht mit einer Immunantwort-modulierenden Signaltransduktion einher⁷, wodurch die Aktivität des Immunsystems reguliert und in Waage gehalten wird. Durch bestimmte Checkpoint-Inhibitoren können diese Rezeptoren blockiert werden, um somit die Bremse des Immunsystems, durch die Maskierung des Tumors für die Immunzellen, wieder zu lösen. Was in der Theorie sofort einleuchtet, lässt in der Praxis jedoch noch zu wünschen übrig: Auch wenn die Errungenschaft der Checkpoint-Therapie

unbestritten ein großer Erfolg ist, bleibt bei 2/3 der Patienten das Ansprechen auf die Therapie aus⁸⁻¹⁰. Auch die Nebenwirkungen dieser Therapieform sind nicht außer Acht zu lassen, denn ein Immunsystem, dessen Bremsen gelöst wurden, richtet sich auch gegen den eigenen Körper. Eine der dringendsten Herausforderungen ist es daher, Faktoren zu identifizieren, die eine Vorhersage des Therapieansprechens erlauben. Hierbei sind die Charakterisierung der Umgebung des Tumors mit seinen interagierenden Zellen und das Verständnis dieser Interaktion eine der wichtigsten Aufgaben moderner Krebsforschung¹¹⁻¹³.

1.1. Die Rolle der Immuncheckpunkt-Proteine im gesunden Immunsystem

Das PD1-PD-L1-System.

In den 1990er Jahren entdeckte der Nobelpreisträger Prof. Tasaku Honjo eines der bisher wichtigsten bekannten Immuncheckpoint-Rezeptoren. Das „Programmed cell death-Protein 1“ (PD-1; CD279) wurde nach seiner Fähigkeit benannt, in zytotoxischen T-Zellen eine Apoptose auszulösen (Cancer Immunotherapy (Second Edition), 2013). Weil PD-1 ausschließlich auf bestimmten Immunzellen, vor allem aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Monozyten, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen exprimiert wird (Čataković et al., 2017), wurde schnell klar, dass es als „molekularer Schalter“ zur Kontrolle der Aktivität dieser Immunzellen dient^{14,15}. Während einer Immunreaktion, beispielsweise induziert durch eine Virusinfektion, kommt es zu einer raschen Aktivierung großer Mengen von T-Lymphozyten, die das PD-1-Protein exprimieren¹⁶. Um die Immunreaktion zu regulieren und einer überschießenden Immunreaktion entgegenzuwirken, bedarf es eines Partners (Liganden), der an PD-1 bindet und so in der Immunzelle eine Signalkaskade auslöst, die letztlich die Aktivität der Zelle vermindert und sogar bis hin zur Apoptose führen kann¹⁷⁻¹⁹. Dieser Ligand wird als PD-L1 (PD-Ligand 1) bezeichnet und ebenfalls auf zahlreichen Typen von Immunzellen, vor allem den sogenannten antigenpräsentierenden Zellen (Monozyten, dendritische Zellen, Makrophagen, B-Zellen) exprimiert. Mit fortschreitender Immunreaktion erhöht sich die Dichte der Immunzellen immer weiter, bis es zum Kontakt von PD-L1 und PD-1 kommt. Die Bindung von PD-L1 an PD-1 führt zur Phosphorylierung von Tyrosinmotiven der zytoplasmatischen Domäne des PD-1-Rezeptors. Durch diesen Vorgang werden Phosphatasen, wie zum Beispiel SHP2, rekrutiert, was folglich zu einer Inaktivierung verschiedener Signalkaskaden führt, die für die Aktivität der Zelle notwendig sind. Ein prominentes Beispiel ist der PI3K/Akt-Signalweg, welcher zur Aktivierung verschiedener Proteine für die Zellproliferation und die Zytokinproduktion unerlässlich ist²⁰ (Abbildung 1).

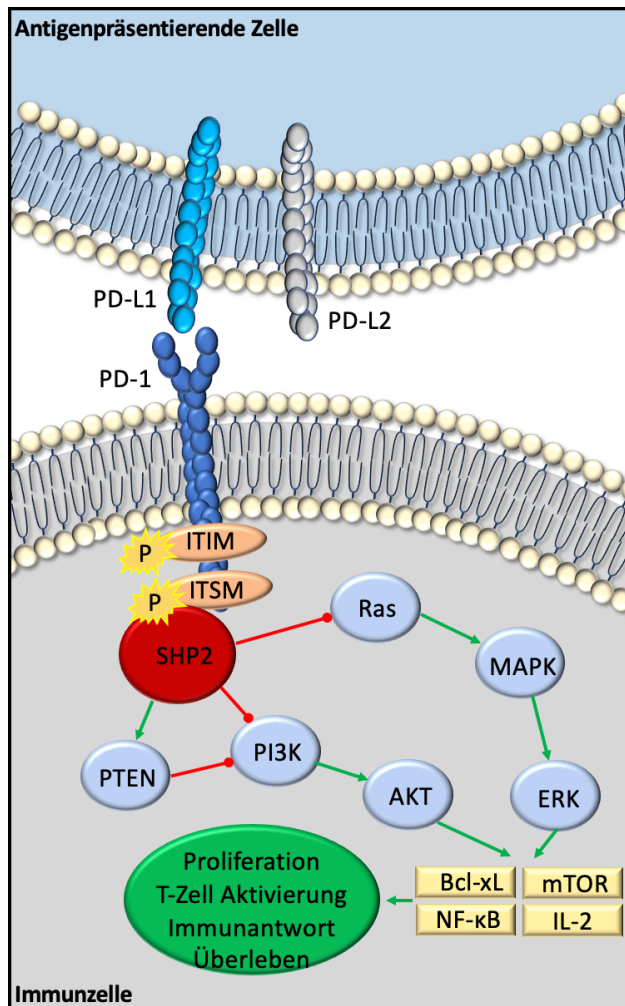


Abbildung 1: PD-1/PD-L1-Signalweg.

Die Darstellung des PD-1/PD-L1-Systems beschreibt die Signalweiterleitung innerhalb der Immunzelle nach der Bindung von PD-L1 der Antigenpräsentierenden Zelle an PD-1 der Immunzelle.

Weitere Immuncheckpoint-Systeme.

PD-1/PD-L1 ist nur eines von vielen Rezeptor-Liganden-Systemen, die zur Regulierung der Immunaktivität an unterschiedlicher Stelle beitragen (Abbildung 2). Im Gegensatz zu naiven T-Zellen, die noch nicht auf ein Antigen konditioniert sind, können T-Effektorzellen bestimmte Funktionen ausführen, sobald sie auf ihr spezifisches Antigen auf der Oberfläche einer anderen Zielzelle treffen (Janeway Immunology, 2018). Sie können jedoch nur Peptidantigene erkennen und mit ihnen interagieren, die von MHC (Major Histocompatibility Complex)-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen gezeigt werden. Das bedeutet auch, dass normalerweise alle T-Effektorzellen nicht mit dem Krankheitserreger selbst, sondern nur mit körpereigenen Zellen agieren²¹. Im Falle des PD-1/PD-L1/PD-L2-Systems agiert PD-1 als Rezeptor auf T-Effektorzellen, die Expression von PD-L2 wird bei einer akuten Entzündung auf

antigenpräsentierenden Zellen induziert, wohingegen PD-L1 auf unterschiedlichen Zellen grundlegend exprimiert wird²⁰. Die Liganden, in dem Fall PD-L1 und PD-L2, regulieren somit die Signaltransduktion und die damit einhergehende Inhibition der Immunantwort mit der Bindung an den regulierten Rezeptor PD-1. Wenn nun der Tumor PD-L1 auf seiner Oberfläche exprimiert, übernimmt er die regulierende Funktion–und inhibiert die Immunantwort und somit seine eigene Zerstörung durch das Immunsystem. So zeichnet CTLA-4/CD80 als Immuncheckpoint ein weiteres inhibitorisches System aus, wie auch weitere immunsuppressive Checkpoints wie TIM-3 und CD112R. Für die Regulierung der T-Zell-Aktivierung wird ein Gleichgewicht mittels aktivierender Rezeptoren wie OX40, CD27 und HVEM hergestellt, um eine Homöostase im natürlichen Organismus aufrechtzuerhalten. Das Interesse der Forschung liegt also bei den Rezeptoren (z. B.: PD-1) oder den Liganden (z. B.: PD-L1) auf der Oberfläche von Immunzellen oder des Tumors, der Aktivierung oder Inhibition dieser „Immuncheckpoints“, welche mit einer Immunantwort modulierenden Signaltransduktion einhergehen⁷.

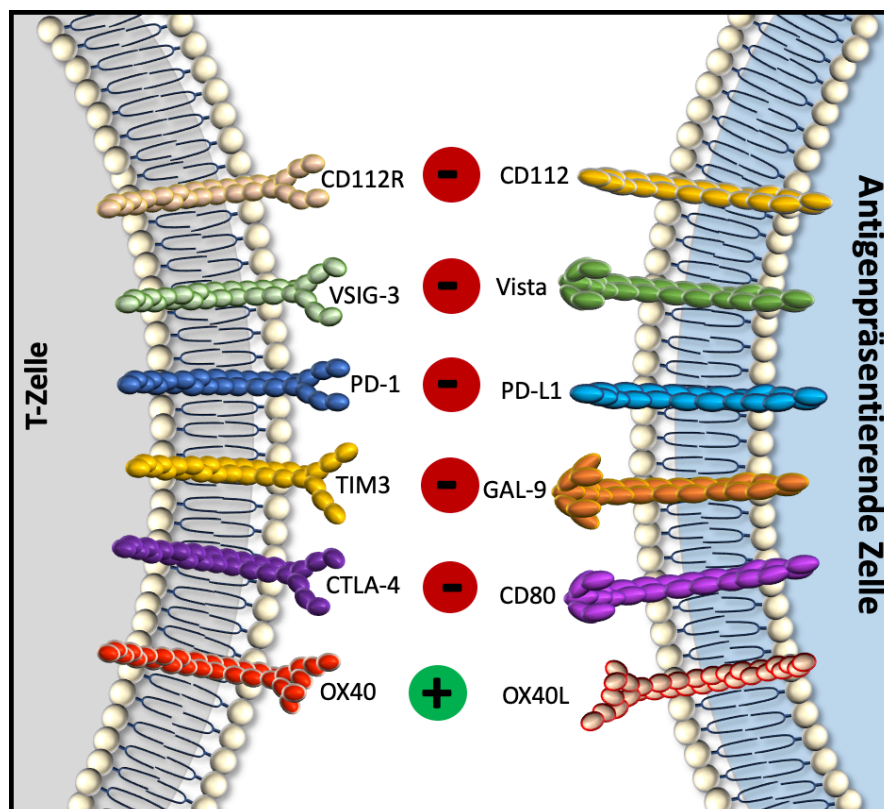


Abbildung 2: Auswahl an T-Zell-aktivierenden und inhibierenden Immuncheckpoint-Rezeptoren

Die verschiedenen Rezeptor-Liganden-Systeme zeigen die jeweilige negative oder positive Regulierung der Immunaktivität.

1.2. Die Rolle der Immuncheckpunkt-Proteine im neoplastischen Gewebe

Das Tumormikromilieu beschreibt das Zusammenspiel zwischen den Tumorzellen und den umgebenden Zellen, wie Leukozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Adipozyten, neuroendokrinen Zellen und weiteren Strukturproteinen²². Unter den Leukozyten spielen die CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen eine entscheidende Rolle, da sie bei der Erkennung tumorspezifischer Antigene Perforin und Granzyme ausschütten, um Tumorzellen zu eliminieren²³. Tumorzellen nutzen Immuncheckpoint-Rezeptoren, um sich der Kontrolle des Immunsystems zu entziehen, indem sie PD-L1 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Die T-Zellen werden folglich durch die Interaktion von PD-1 mit dem Tumor inaktiviert, anstatt die Tumorerstörung einzuleiten.

PD-L1 Expression auf Tumorzellen.

PD-L1 wird in vielen verschiedenen Tumorentitäten, wie den malignen Melanomen, nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom und Ovarialkarzinom, als Immunschuttschild gegenüber der Zerstörung durch zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten genutzt²⁴. Bislang wurde PD-L1 schon in mehr als 2.800 Studien auf seine Expression in verschiedensten Tumorentitäten untersucht. Zum ersten Mal wurde PD-L1 im Jahr 2000 auf malignen Zellen festgestellt²⁵. In einer Studie der Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurde 2021 die PD-L1-Expression in 11.838 Patientenproben mit 118 Tumorentitäten mittels Immunhistochemie untersucht. Der Schwellenwert der PD-L1-Positivität wurde auf 10 % festgelegt. Die Ergebnisse zeigten eine PD-L1-Positivität in 85 von 118 Tumorentitäten. Dabei zeigten einige Entitäten eine PD-L1-Positivität von mehr als 50 %: Thymom (100 %), Hodgkin-Lymphom (93 %), anaplastisches Schilddrüsenkarzinom (76 %), Kaposi-Sarkom (71 %), Sarkomatoides Urothelkarzinom (71 %), Kleinzelliges Karzinom des Penis (67 %), Zervixkarzinom (65 %), Mundkrebs (61 %), Lunge (53 %) und Pharynx (50 %) (Tabelle 1). Bei einer klinischen Studie zur Testung des PD-L1-Inhibitors Nivolumab wurde 2014 außerdem eine PD-L1-Expression in 90 % der Nierenzellkarzinome festgestellt (Tauben et al., 2014). Diese Ergebnisse werden von einer früheren Studie von O'Malley et al. unterstützt, in der die PD-L1-Expression in verschiedenen Tumorentitäten von über 60.000 Patienten mittels Immunhistochemie untersucht wurde. Hier wurde der Schwellenwert der PD-L1-exprimierenden Tumorzellen auf 1 % festgelegt. O'Malleys Ergebnisse waren außerdem schon vergleichbar mit einer früheren

Studie von Patel et al. 2015: Die niedrigste PD-L1 Expression (33 %) wurde beim kolorektalen Karzinom gefunden, gefolgt vom Prostatakarzinom mit 37 %, dem Neuroendokrinen Karzinom (38 %) und dem Ovarialkarzinom (39 %). Eine hohe PD-L1-Expression von über 50 % wurde bei der Mycosis fungoides mit 52 % PD-L1-Positivität gefunden. Ebenfalls wurde eine hohe PD-L1-Expression beim Thymom (44 %), Bronchialkarzinom (37 %) und Sarkom (34 %) entdeckt. Anhand dieser Studie war zu erkennen, dass der Differenzierungsgrad von Tumoren eine Rolle bei der PD-L1-Expression auf Tumoren spielt, da eine 15 % signifikant höhere PD-L1-Expression auf schlecht differenzierten Adenokarzinomen zu erkennen war²⁶. PD-L1 variiert also in seiner Expressionsrate dabei sowohl zwischen als auch innerhalb der einzelnen Entitäten, aber zeigt auch, dass PD-L1 auf fast jedem Tumortyp exprimiert wird (Tabelle 1) und somit Entitäten-unabhängig ist.

Tabelle 1: PD-L1-Expression in humanen Tumoren²⁷.

Tumorentität (n)	Gesamt TMA (n)	analysierbar (n)	PD-L1 ⁺ Tumorzellen	
			negativ (%)	positiv (%)
Tumore der Haut (6)	334	290	84,2	15,8
Kopf-Hals-Karzinome (6)	413	349	73,4	26,6
Tumore der Lung, Pleura und Thymus (6)	436	284	58,8	41,2
Tumore des weiblichen Genitaltrakts (13)	1226	975	81,4	18,6
Tumore der Brust (5)	1652	1356	92,1	7,9
Tumore des Verdauungstrakts (15)	3472	2621	85,0	15,0
Tumore des Harnwegs (11)	3197	2526	71,2	13,5
Tumore der männlichen Genitalien (10)	1376	1069	70,7	6,2
Tumore des endokrinen Organs (16)	511	413	87,5	12,5
Tumore des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes (9)	79	78	94,2	5,8
Tumore der Weichteile und Knochen (21)	1088	927	140,3	21,2

1.3. Immuncheckpoint-Therapie

Viele Tumorentitäten zeigen eine Expression von PD-L1 auf Tumor- und/oder Immunzellen, was bedeutet, dass PD-L1 ein wichtiger Angriffspunkt für Krebstherapien darstellt.

In über 80 % der klinischen Studien für die Zulassung von Immuncheckpoint-Therapien wurde bisher die PD-L1-Expression auf verschiedenen Tumoren getestet und es konnte gezeigt werden, dass die Immuncheckpoint-Therapien die Anti-Tumor-Immunreaktion erfolgreich rehabilitieren können²⁸. Bei 30 % der Zulassungsstudien wurde festgestellt, dass ein gutes Ansprechen auf die Therapie mit einer hohen PD-L1-Expressionsrate einherging. Ein Beispiel dafür ist die Studie von Taube et al. über die Wirkungsweise des PD-1-Inhibitors Nivolumab: Bei einer Anzahl von 68 Tumoren über 5 Entitäten wurde herausgefunden, dass sich das Ansprechen auf die Therapie um 33 % erhöht, wenn die Tumore unterschiedlicher Entitäten eine PD-L1-Positivität aufweisen²⁹. Trotz der flächendeckenden Expressionsrate von PD-L1 über die verschiedenen Tumorentitäten scheint das Ansprechen auf Immuncheckpoint-Therapien unterschiedlich zu sein: In einer Phase-I-Studie wurden 93 Patienten mit unterschiedlichen refraktären, soliden Tumoren auf das Ansprechen auf Nivolumab untersucht. Hier wurde herausgefunden, dass in weit fortgeschrittenen Tumoren von Patienten mit wenig Hoffnung auf ein Ansprechen auf konventionelle Therapien gezeigt werden konnte, dass eine anti-PD-1-Antikörpertherapie mit Nivolumab sehr wirkungsvoll sein kann³⁰. Topalian et al. konnten zwei Jahre später bestätigen, dass Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, einem Nierenzellkarzinom und mit malignen Melanomen sehr wirksam auf dieses Medikament reagierten³¹. Die Erkenntnisse über Nivolumab legten den Grundstein für die FDA-Zulassung im Jahr 2014³², da hier sogar ein Therapieerfolg bei Patienten resultierte, die zuvor an einer anti-CTLA-4-Antikörpertherapie und/oder BRAF-Inhibitoren gescheitert waren^{33,34}. Nach dem ersten Erfolg eines Ansprechens auf anti-PD-1-Immuntherapien folgten weitere Studien in verschiedenen Tumorentitäten, die einen positiven Verlauf zeigten. Dazu gehörte das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom^{35,36}, das Hodgkin-Lymphom^{37,38}, das Nierenzellkarzinom³¹, Kopf- und Halskarzinome^{39,40}, Mikrosatelliten-instabile solide Tumore⁴¹, Harnblasenkarzinome⁴², Ösophagus/Magen-Karzinome⁴³, Hepathozelluläre Tumore⁴⁴ und Merkelzellkarzinome⁴⁵, welche alle bis zum Jahr 2018 von der FDA zugelassen wurden.

Bei der Ansprechrare soliden Tumore auf Immuncheckpoint-Inhibitoren spielt das mutationsgetriebene, dynamische Verlängern oder der Verlust von kurzen repetitiven

Sequenzen der DNA (Mikrosatelliten) – die sogenannte Mikrosatelliteninstabilität (MSI) – eine entscheidende Rolle (Yamamoto and Imai, 2015). Eine hohe Mikrosatelliteninstabilität (MSI-h) ist beispielsweise im Kolorektalen, Endometrium-, und Magenkarzinom am stärksten vorhanden (Anteil von 10 – 30 %) ⁴⁶⁻⁴⁸.

Die hohe Ansprechrate (53 %) bei PD-1-positiven Tumoren wurde bei 12 verschiedenen Tumorentitäten bestätigt ^{40,43}. Des Weiteren ist ein Rückgang von MSIh-Tumoren assoziiert mit einer geringen Dichte von CD8⁺-T-Zellen, z. B. im Osteosarkom, Schilddrüsen- und Prostatakarzinom ⁴⁹. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass so genannte Neoantigene, Antigene die von Krebszellen produziert werden, durch Mutationen des Tumors entstehen können ⁵⁰. Diese Neoantigene werden vom Körper als fremd angesehen und können dadurch auch nicht von den durch die Immuntherapie aktivierten CD8⁺-T-Zellen erkannt werden ⁵¹.

Durch Immuncheckpoint-Therapien hat sich das Nebenwirkungsrisiko für den Patienten von einem Drittel bei der üblichen Chemotherapie durch die Zulassung der anti-PD-L1-Therapien, wie Pembrolizumab und Nivolumab, um 61 % verringert und liegt nun bei einem absoluten Risiko von 12.9 % ⁵². Die Nebenwirkungen einer anti-PD-1- oder anti-PD-L1-Therapie äußern sich als autoimmune Entzündungen, die in allen Organen des Körpers auftreten können und als „Immune related adverse events“ (irAEs) bekannt sind. Häufig treten solche Entzündungen als Hautausschlag oder Juckreiz und Durchfallerkrankungen auf, aber es zeigt sich auch, dass Patienten mit Nebenwirkungen eine höhere Ansprechrate auf die Medikamente aufweisen ⁵²⁻⁵⁴. Diese Erkenntnis lässt sich dadurch erklären, dass das Immunsystem nicht nur für die Autoimmunreaktion aktiv ist, sondern dass die Reaktivierung des Immunsystems gegen Tumorantigene als Surrogat für die Immunsystemaktivierung gegen körpereigene Strukturen gesehen werden kann ⁵⁵.

1.4. Immunhistochemischer Nachweis von PD-L1 im Tumorgewebe

In der Diagnostik der Pathologie wird routinemäßig das zu untersuchende Gewebe in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE)⁵⁶. Der Nachweis des PD-L1-Proteins erfolgt durch Immunhistochemie (IHC). IHC ist eine Methode, die es ermöglicht, bestimmte Antigene in einem Gewebsschnitt sichtbar zu machen. Um die Proteine zu detektieren, werden bestimmte Oberflächenproteine (Epitope) mit einem Antikörper kovalent gebunden. An diesen primären Antikörper bindet wiederum ein sekundärer Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist, welches bei Zugabe eines Substrats eine Farbreaktion auslöst und anschließend in der klassischen Hellfeld-Immunhistochemie unter dem Mikroskop detektiert werden kann⁵⁷. Durch dieses Verfahren wird PD-L1 auf zellulärer Ebene sichtbar gemacht. Das Expressionsniveau wird unter dem Mikroskop beurteilt. Eine Besonderheit der PD-L1-Immunhistochemie ist, dass die Intensität der Immunfärbung von PD-L1 praktisch keine Rolle spielt. Ein einheitliches Verfahren für die Quantifizierung der PD-L1-Expression auf Tumorzellen existiert bislang nicht, vielmehr werden für verschiedene Tumortypen unterschiedliche Kriterien definiert (siehe Tabelle 2). Es gibt dementsprechend eine Vielzahl an unterschiedlichen kommerziellen PD-L1 – immunhistochemische Testkits, von denen zwei die Zulassung durch die U.S. Food and Drug Administration (FDA) erhalten haben^{12,58}. Der Schwellenwert der PD-L1-positiven Tumorzellen reicht auch bei anderen bekannten Studien von $\geq 1\%$ PD-L1-positiven Tumor- oder Immunzellen³⁶ bis hin zu $\geq 50\%$ PD-L1-Positivität in der Membran von Tumorzellen⁵⁹. Eine Metaanalyse von Lu. et al. über 56 Studien verschiedener Assay-Anwendungen zeigte eine genauere Aussagekraft (höhere AUC) mit der Anwendung von Multiplex-Fluoreszenz Immunhistochemie verglichen mit manuellen Auswertemethoden (PD-L1-Immunhistochemie, Tumor mutational Burden, Genexpressionsprofiling) ($p < 0.05$)⁶⁰. Die mangelnde Standardisierbarkeit der PD-L1-Quantifizierung könnte durch die fortlaufende Forschung zu einer einheitlichen automatischen Auswertung des PD-L1-Expressionsstatus führe⁶¹. In einer Studie von Camp et al. wurde mittels einer automatischen quantitativen Analyse (AQUA) durch Immunfluoreszenz die In-Situ-Expression von Proteinen einheitlich bestimmt⁶². Neben der Expression von PD-L1 auf Tumorzellen spielt aber auch die Expression auf den antigenpräsentierenden Immunzellen im Tumormikromilieu eine große Rolle.

FDA zugelassene PD-L1 Assays für die Immunhistochemie.

In der klinischen Diagnostik wird zwischen zwei voneinander unabhängigen Testungen zur Entscheidungsfindung der Therapie unterschieden: Die fakultative „Complementary-Diagnostik“, welche eine Entscheidung des therapeutischen Prozesses festlegt, und die „Companion-Diagnostik“, die von der FDA zugelassen ist und der Risikostratifizierung der Patienten dient⁶³. Bei der PD-L1-Quantifizierung im FFPE-Gewebe sind zurzeit die vier Assays Dako 28-8, Dako 22C3, Ventana SP263 und Ventana SP142 in unabhängigen Studien geprüft und von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen worden⁶⁴⁻⁶⁷. Diese vier Assays sind auf die jeweilige Therapie der Studie abgestimmt und verwenden somit auch ihre individuellen Antikörper, evaluierten Zelltypen, Schwellenwerte (Cut-offs) und Quantifizierungsalgorithmen, die sich untereinander unterscheiden, weshalb auf die jeweilige Interpretation des Herstellers zu achten ist (Tabelle 2).

Verschiedene Scores für die Ermittlung von Tumortypen.

Für die Quantifizierung von PD-L1 werden in der Diagnostik verschiedene Scoring-Systeme angewandt, welche auf einem prozentualen Anteil von PD-L1 auf verschiedenen Zelltypen basieren, um Aufschluss darüber zu geben, ob die PD-L1-Expressionsrate für eine Checkpoint-Therapie geeignet ist. Der Tumor Proportion Score (TPS) definiert den prozentualen Anteil von PD-L1-positiven Tumorzellen, wie es bei den beiden Assays der Firma Dako angewendet wird (Tabelle 1). Bei einem weiteren Assay, Ventana SP142, wird der prozentuale Anteil der PD-L1-positiven Immunzellen als Quantifizierung verwendet, den wir im Weiteren dieser Studie als „Macrophage Proportion Score – MPS“ benennen werden. Ein weiteres Assay (Dako 22C3) verwendet zur PD-L1-Quantifizierung die Kombination aus PD-L1-positiven Tumorzellen und Immunzellen (Combined Positive Score; CPS): Bei einer Mindestzellzahl von 100 Zellen wird hier die Anzahl der Tumor- und Immunzellen durch die der Tumorzellen geteilt und mit dem Faktor 100 multipliziert²⁶. Wie in Tabelle 2 zu erkennen ist, wurde das SP142-Assay von Ventana speziell für PD-L1-positive Immunzellen entworfen, was ein Grund dafür sein könnte, dass deutliche Unterschiede, wie beispielsweise eine signifikant niedrigere Rate an positiven PD-L1-Zellen zwischen SP142 und den weiteren drei Assays zu erkennen waren⁶⁸. Eine Vielzahl von Studien zeigte bei den drei anderen Assays eine hohe Genauigkeit und Übereinstimmung bei der Detektierung von PD-L1-positiven Tumorzellen^{26,69-71}. Die Quantifizierung von PD-L1- und anderen Biomarkern kann von vielen unterschiedlichen Faktoren abhängig sein, auf die im Folgenden eingegangen wird.

Tabelle 2: FDA-zugelassene Companion-Assays für PD-L1

Assay	Zielprotein	Cutoff	Evaluiertes Zelltyp	Tumortyp	Therapie
Dako 22C3	PD-1	≥ 1%	TZ	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	Pembrolizumab
	PD-1	CPS ≥ 1%	TZ+IZ	Kopf- und Halstumore	Pembrolizumab
	PD-1	CPS ≥ 1%	TZ+IZ	Tumore des Magens/ Gastroösophagealen Übergangs	Pembrolizumab
	PD-1	CPS ≥ 1%	TZ+IZ	Zervixkarzinom	Pembrolizumab
	PD-1	CPS ≥ 10%	TZ+IZ	Urothelkarzinom	Pembrolizumab
	PD-1	CPS ≥ 10%	TZ+IZ	Ösophaguskarzinom	Pembrolizumab
Dako 28-8	PD-1	≥ 1%	TZ	Malignes Melanom	Nivolumab
	PD-1	≥ 1%	TZ	Kopf- und Halstumore	Nivolumab
	PD-1	≥ 1%	TZ	Urothelkarzinom	Nivolumab
	PD-1	≥ 1%	TZ	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	Nivolumab
Ventana SP142	PD-L1	≥ 1%	IZ	Triple-negatives Mammakarzinom	Atezolizumab
	PD-L1	≥ 5%	IZ	Urothelkarzinom	Atezolizumab
	PD-L1	≥ 50% TZ/ ≥ 10% IZ	TZ+IZ	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	Atezolizumab
Ventana SP263	PD-L1	≥ 50% TZ/ ≥ 25% IZ	TZ+IZ	Urothelkarzinom	Durvalumab

Herausforderungen bei der Auswertung von IHC Färbungen.

Die präzise Analyse von PD-L1 mittels Immunhistochemie ist von vielen Faktoren abhängig⁷²: Hier spielen präanalytische Variablen, wie zum Beispiel die Art der Fixierung⁷³ und die Zeit zwischen Entnahme und Fixierung des Gewebes, eine Rolle, denn je älter das Gewebe, desto schlechter ist die molekulare Qualität⁷⁴. Hinzu kommt eine mögliche unterschiedliche Qualität der Antikörper^{75,76}, was die Färbequalität beeinflussen könnte, sowie eine hohe Interobserver-Variabilität der Pathologen^{77,78}. Außerdem spielt auch die Heterogenität des Tumors eine entscheidende Rolle in der Unterscheidung von Zellkompartimenten in der Tumormasse⁷⁹. Necchi et al. konnten in einer Studie nachweisen, dass eine Veränderung des Gewebes von Patienten einer Therapiebehandlung die Proteinexpression und somit die immunhistochemischen Analysen beeinträchtigen können⁸⁰. Wie schon erwähnt, sind auch bei den einzelnen PD-L1-Assays Unterschiede in dem PD-L1-Expressionsverhältnis zwischen

den Antikörpern zu erkennen. Bei einer Vergleichsstudie der vier FDA-zugelassenen PD-L1-Assays wurden 39 nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome von erfahrenen Pathologen anhand der unterschiedlichen Cutoffs von PD-L1-positiven Tumor- und Immunzellen ausgewertet. Hierbei wurde deutlich, dass der prozentuale Anteil von PD-L1-positiven Zellen bei dem Ventana SP142-Antikörper geringer war als bei Dako 22C3, Dako 22-8 und Ventana SP263⁸¹. PD-L1 ist jedoch bekannt dafür, dass die Expression generell eine erhöhte Heterogenität innerhalb des Tumors aufweist⁸²⁻⁸⁴, was einerseits an der Regulation des Tumormikromilieus liegt⁸⁵, aber auch an PD-L1-regulierenden Onkogenen wie dem Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), dem Kirsten Rat Sarcoma Virus (KRAS) und der anaplastischen Lymphomkinase (ALK)⁸⁶. Ein weiterer Anhaltspunkt einer möglichen Fehlerquelle ist die des Pathologen als Interobserver des Gewebsschnittes⁸⁷. Das Untersuchen und Beurteilen von PD-L1-positiven Tumor- und Immunzellen liegt einer jahrelangen Erfahrung zugrunde und ist besonders bei Immunzellen eine große Herausforderung⁸⁸. Die Forschung versucht, diese Fehlerquellen immer weiter zu umgehen, indem zum Beispiel nicht-invasive Methoden erforscht werden: Es konnte nachgewiesen werden, dass eine PD-L1-Expression auf Tumorzellen, der Milz und Lymphknoten mittels Positronen-Emissions-Tomographie möglich ist⁸⁹. Verschiedene Biomarker *in situ* zu detektieren und voneinander zu unterscheiden, wird durch die Methode der Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie möglich gemacht.

Analyse von PD-L1 mittels Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie.

Neben der Hellfeld-Immunhistochemie, hat auch die Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie einen immer größeren Stellenwert in der Tumordiagnostik der Pathologie gewonnen⁹⁰. Während die Hellfeld-Immunhistochemie lediglich die Analyse eines einzelnen Markers je Experiment erlaubt, bietet die Multiplex-Fluoreszenz-Analyse einen enormen Vorteil, da sie es möglich macht, mehrere Marker auf einer Einzelzelle innerhalb eines Gewebsschnittes (d. h. *in-situ*) im selben Experiment zu detektieren. Bei der Hellfeld-Immunhistochemie ist es lediglich möglich, auf mehreren konsekutiv geschnittenen Gewebssproben die Zellen nacheinander mit verschiedenen Markern zu färben. Für die Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie werden Fluorochrome eingesetzt, die zur Detektion der Antikörperbindung an einem Epitop dienen. Bei der Multiplex-Fluoreszenz-Methode greift das Prinzip der Stokes-Verschiebung, welches besagt, dass diese Fluoreszenzfarbstoffe durch eine bestimmte Wellenlänge des Lichts angeregt werden und

dadurch eine längere Wellenlänge emittieren (George Gabriel Stokes, 1852). Durch ein Fluoreszenzmikroskop können diese emittierten Photonen der individuellen Fluorochrome schließlich getrennt als monochromatisches Bild digitalisiert werden. Durch diese Färbemethode können Raumstrukturen durch Zell-Zell-Kontakte innerhalb des Gewebes sichtbar gemacht werden, die bei konsekutiven Gewebsschnitten im Hellfeld nicht detektiert werden könnten. Die Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie ermöglicht eine genaue Messung des Expressionslevels einzelner Marker, die Ermittlung der Färbung im Nukleus oder der Membran der Zelle. Durch die Zellerkennung und Markierung der DNA im Zellkern durch den Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) lassen sich die einzelnen Zellen exakt voneinander abgrenzen. Koexpressionen von verschiedenen Biomarkern auf einer einzelnen Zelle werden somit erkennbar und können mit geeigneten Bildanalyse- und Visualisierungsprogrammen, wie zum Beispiel Visiopharm® oder HALO®, ausgewertet werden.

Herausforderungen der Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie.

Eine räumliche PD-L1-Bestimmung im Tumormikromilieu wird bisher meist durch eine konventionelle Hellfeld-Immunhistochemie durchgeführt, obwohl diese im Vergleich zur Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie eine geringere Vorhersagekraft und Genauigkeit einzelner Marker aufweist⁶⁰. Daher ist eine reproduzierbare und automatisierte, zelltypspezifische und räumliche Markerbestimmung im Tumormikromilieu von aktuellem Interesse. Aktuelle Studien mit Multiplex-immunhistochemischer Verwendung sind typischerweise auf eine kleine Anzahl an Biomarkern beschränkt, bilden nur kleine, vorausgewählte Bereiche des Gewebes ab, oder analysieren eine geringe Patientenkohorte. Beispiele hierfür sind die Studien von Sánchez et al und Giraldo et. Al, in denen an Kollektiven von 16 - 26 Tumoren nur bis zu 6 Marker analysiert wurden oder die Studie von Goltsev et al, bei der 30 unterschiedliche Marker auf kleinen 15 mm x 15 mm-Geweben untersucht wurden. Insgesamt sind die derzeitigen Multiplex-Fluoreszenz-immunhistochemischen Ansätze eher für die detaillierte Analyse einiger kleiner Gewebeareale als für die Untersuchung großer diagnostischer Gewebeproben in der Routineanwendung geeignet. Breit verfügbare Routineanwendungen zur Patientenversorgung fehlen bislang. Die Gründe hierfür sind vielfältig: Zum einen gibt es keine klar etablierten Markerpanel für bestimmte klinische Fragestellungen, die eine industrielle Fertigung rechtfertigen würden. Zum anderen

sind die üblichen Reagenzien und Vorgehensweisen zum Bleichen von TMA-Spots und Großschnitte für mehrere aufeinanderfolgende Färbung sehr gewebeschädigend. Außerdem ist die erforderliche Hardware (Fluoreszenz-Scanner) teuer, langsam und wenig standardisiert und meist nur für die Untersuchung einzelner weniger Gewebe ausgelegt⁹¹⁻⁹³. Auch die Software zur Bildanalyse ist nicht standardisiert. Zwar wächst die Zahl kommerzieller Anbieter von Bildanalysetools stetig, aber jedes Tool hat seine eigenen Vor- und Nachteile, sodass viele Anwender auf Kombinationen von Programmen oder Eigenentwicklungen setzen. Jede neue Methode steht vor der Herausforderung, wird aber im heutigen Zeitalter insbesondere durch eine rasche Entwicklung der Computertechnologie, wie Grafikkarten und Rechenleistung, unterstützt. Die komplexen Schritte der digitalen Bildanalyse mit mehreren verschachtelten „Datenebenen“ sowie die Notwendigkeit, Strukturen, Zelltypen und Zusammenhänge im Gewebe automatisch zu erkennen und abzugrenzen, schaffen ein optimales Anwendungsfeld für die noch relativ neue Anwendung von künstlicher Intelligenz in der medizinischen Diagnostik.

1.5. Künstliche Intelligenz in der Pathologie

Viele Studien haben in den vorherigen Jahren gezeigt, dass die Auswertung durch den Pathologen durch geeignete Auswertalgorithmen zumindest unterstützt werden können^{87,94}. Im Folgenden wird das Einsetzen von künstlicher Intelligenz in der Tumorforschung weiter beschrieben.

Maschinelles Lernen vs. Deep Learning.

Seit dem letzten Jahrzehnt ist die künstliche Intelligenz (KI) aufgrund ihrer Fähigkeit, viele mühsame und oft relativ monotone Aufgaben effektiv zu automatisieren, immer mehr in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Dies wurde zu Anfang meist mit maschinellern Lernen (ML) und in den letzten Jahren immer mehr mit Deep Learning (DL) erreicht. Beide Vorgehensweisen basieren auf einer großen - oft sogar riesigen - Ansammlung von Daten, welche, mit Beschriftungen versehen (es werden z. B. nicht nur Bilder bereitgestellt, sondern auch die Information, was in jedem einzelnen Bild zu sehen ist), einem Algorithmus gegeben werden. Dieser Algorithmus - die KI - nutzt dann diese Ansammlung von Daten und versucht (mittels einer oft sehr komplizierten mathematischen Formel), die korrekte Beschriftung für jeden einzelnen Datenpunkt auszurechnen; er gibt also eine Prognose für jeden Datenpunkt

ab. All diese Prognosen werden dann mit den eigentlichen Beschriftungen verglichen und je mehr sie von den korrekten Beschriftungen abweichen, desto stärker verändert der Algorithmus Werte in der Formel, sodass er beim nächsten Mal bessere Prognosen abgeben wird. Dieser Prozess wird so oft wiederholt, bis die KI in der Lage ist, neuen Daten akkurate Beschriftungen zu geben, was dazu führt, dass diese Aufgabe automatisiert werden kann.

Der Unterschied zwischen maschinellern Lernen und Deep Learning besteht darin, wie viele Informationen der KI im Vorhinein über die Daten gegeben werden. Beim ML wird dem Algorithmus "gesagt", auf welche Eigenschaften der Daten er achten soll, um die Prognose auszurechnen. Dies erfordert oft einiges an Arbeit, da die Daten erst einmal genau analysiert werden müssen, damit überhaupt bestimmt werden kann, was wichtige Eigenschaften sind (was, zum Beispiel, unterscheidet einen Hund von einer Katze in einem Bild? Sind es die Ohren oder die Form der Nase? Was ist mit Hunden, die Ohren haben, die denen von Katzen ähneln?). Beim DL werden der KI meist keine zusätzlichen Informationen gegeben. Der Algorithmus muss also, durch intensives Anpassen der Werte in einer sehr komplizierten Formel, selber herausfinden, welche die ausschlaggebenden Eigenschaften der Daten sind, um die Beschriftungen so akkurat wie möglich voraussagen zu können. Dies führt allerdings dazu, dass man leider nicht in der Lage ist, genau zu bestimmen, was diese Eigenschaften nun sind - der Algorithmus hat sie errechnet und benutzt diese, um erfolgreiche Prognosen zu erstellen, aber es ist nicht möglich, die Beweggründe hinter einer Entscheidung zu verstehen. Insgesamt hat sich herausgestellt, dass DL oft bessere Ergebnisse erzielt als ML.

Seit dem letzten Jahrzehnt ist die künstliche Intelligenz immer mehr in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Sie setzt sich mit der Automatisierung intelligenter Verhaltensweisen und dem maschinellen Lernen (ML) auseinander, bei der ein bestimmter Algorithmus intelligente Vorhersagen, basierend auf einem Satz von Millionen einzigartiger vom Menschen erhobener Datenpunkte als Sammlung von mathematischen Methoden der Mustererkennung, durchführt⁹⁵. Unterschiedlich erkannte Ähnlichkeiten zwischen Datensätzen werden ermittelt, trainiert und wiedergegeben. Ein Teilbereich des maschinellen Lernens ist die Methode des Deep Learnings (DL), die für das Lernen intelligenter Vorhersagen ein neuronales Faltungsnetzwerk nutzt, um die vorhandenen Datensätze zu analysieren und von der mathematischen Logik des maschinellen Lernens teils abweicht⁹⁶ (Abbildung 3).

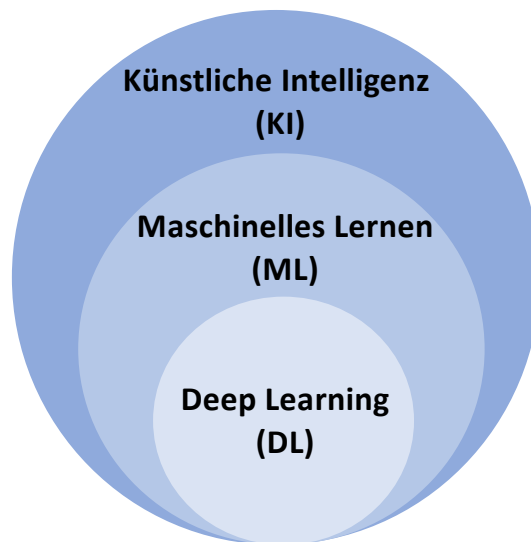


Abbildung 3: Einordnung der verschiedenen Begriffe der künstlichen Intelligenz

Die künstliche Intelligenz beinhaltet das maschinelle Lernen (eigenständiges Lernen von Maschinen um die erlernten Muster für datenbasierte, intelligenten Entscheidungen einzusetzen) und das Deep-Learning (Das Erlernen von Datendarstellungen /-zusammenfassungen mit mehreren Abstraktionsebenen).

Eine Reihe von Dimensionen (z. B. Hund oder Katze) dient hierbei als sogenannter „Eingabe-Vektor“ und stellt die erste Schicht des Deep Learnings dar. Über Neuronen werden weitere Schichten erweitert oder reduziert und der Lerneffekt über Gewichtungen der einzelnen Knotenpunkte gesteuert (z. B.: Rasse des Hundes/der Katze), bis der Algorithmus die Dimensionen erkennt und wiedergeben kann (z. B.: das Bild zeigt einen Dackel). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in einem solchen neuronalen Faltungsnetzwerk die Lokalisationszusammenhänge der Pixel eines Bildes als Input erhalten und durch Netzknotenpunkte in einer nächsten Ebene verarbeitet werden, ohne den Lokalisationskontext des Anfangsbildes zu verlieren^{97,98} (Abbildung 4).

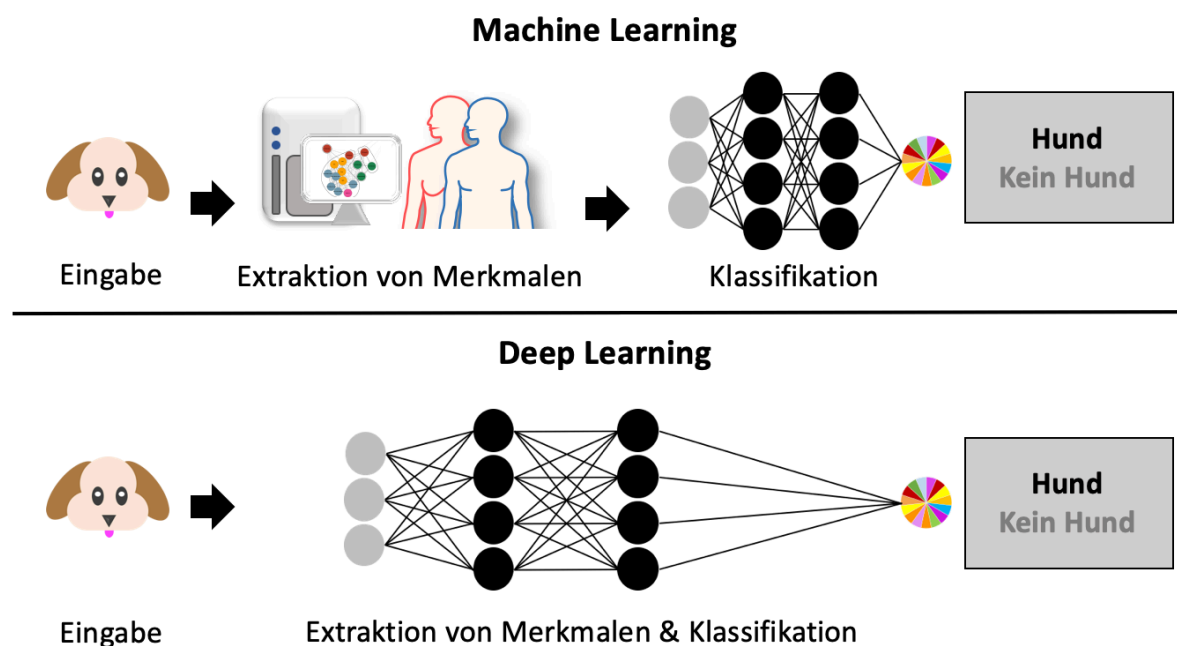


Abbildung 4: Maschinelles vs. Deep Learning

Der größte Unterschied zwischen Maschinell- und Deep Learning liegt in der Extraktion und Klassifikation von Merkmalen. Die Strukturen des neuronalen Netzwerks beim Deep Learning ähneln die des menschlichen Gehirns. Das tiefe Lernen läuft über mehrere verborgenen Schichten und Ebenen ab.

Anwendungsbereiche der künstlichen Intelligenz in der Klinik.

Die Nutzung von Deep Learning-basierten Algorithmen hat in den letzten Jahren in vielen Bereichen der Medizin an Bedeutung gewonnen, um unterschiedliche Fragestellungen der klinischen Forschung zu beantworten. Erste Anwendungen finden sich bei Disziplinen, in denen Bildgebung eine zentrale Rolle spielt, z. B. der Pathologie, Radiologie, Dermatologie und Ophthalmologie, um Krankheitsklassifikationen zu verbessern und präzise und akkurate Bildgebungen zu trainieren, um folglich diagnostische Aussagen für den einzelnen Patienten treffen zu können⁹⁹⁻¹⁰³. Bislang sind diese Ansätze aber eher der Forschung vorgehalten, wenn auch mit hohem Potential für zukünftige Routine-Applikationen. So zeigen sich erste Erfolge bei der Anwendung von Deep Learning-basierten Algorithmen bei Pneumonie-Patienten, verursacht durch Corona Virus Disease 2019 (COVID-19). Bei der Computertomografie des Brustbereichs konnte durch einen bestimmten Input von Daten und der Abfolge des Trainings zwischen einer üblichen Pneumonie und einer Pneumonie resultierend aus einer COVID-19-Erkrankung unterschieden werden¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. In der Pathologie dient die künstliche Intelligenz wiederum der Reduzierung von Fehlerquellen in der klinischen Diagnostik, Klassifizierung von Krankheitsbildern und Biomarker-Analytik¹⁰⁷. Studien haben gezeigt, dass Deep Learning-basierte Algorithmen Tumore in histopathologischen Bildern akkurat erkennen können^{108,109}. Das Ziel ist die Generalisierung einer vollständigen Automatisierung der klinischen Diagnostik, um die Arbeit geschulter Pathologen zu unterstützen¹¹⁰. In Zukunft könnten neuronale Faltungsnetzwerke unter anderem in der klinischen Diagnostik für die Gradierung von Prostatakrebs genutzt werden. Der Gleason Score wird in der Pathologie verwendet, um den Grad von Prostatakrebs zu bestimmen¹¹¹. Die klassische Methode der manuellen Gleason-Gradierung ist selbst bei erfahrenen Pathologen mit einer hohen Interobservervarianz verbunden (LIT). Zudem müssen Dutzende von Gewebeschnitten je Patient analysiert werden. Hier könnten Deep Learning-basierte Algorithmen unterstützen, indem sie relevante Gleason Muster erkennen, vorselektieren und dem Pathologen zur abschließenden Entscheidung vorlegen¹¹².

1.6. Prognoserelevanz von PD-L1 beim Mammakarzinom

Brustkrebs ist die häufigste tumorbedingte Todesursache bei Frauen weltweit¹¹³. Mit 17 % liegt diese Tumorentität in Deutschland noch vor dem Lungenkarzinom (16 %) und Darmkrebs (10 %). Mammakarzinome werden in den westlichen Ländern meist früh entdeckt, trotzdem kam es 2018 zu 69.900 Neuerkrankungen sowie 18.591 Sterbefällen bei Frauen (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2018). Das Mammakarzinom teilt man in der Medizin in unterschiedliche Oberflächenmolekül-Subgruppen ein, was maßgeblich für eine entsprechende Behandlungstherapie ist¹¹⁴. In der Brustkrebsforschung zählt PD-L1 zu den Biomarkern, die eine hohe Relevanz für die Prognose nachweisen und auch schon außerhalb von Studien eingesetzt werden, bislang aber mit extremen Prognoseunterschieden zwischen den indolenten und den hoch aggressiven Tumoren¹¹⁵. Bei den hoch aggressiven Tumoren (meist die Gruppe der Triple negativen) existiert bereits eine etablierte PD-L1-Bestimmung¹¹⁶. Die Ergebnisse von Studien zur PD-L1-Expression und deren Prognoserelevanz im Mammakarzinom gehen auseinander und es ist immer noch unklar, ob PD-L1 beim Brustkrebs eine gute oder schlechte Prognose für den Patienten hat^{117,118}. Fraglich ist, ob eine weitere- oder andere Einteilung der Brustkrebspatienten zu anderen Prognoseabschätzungen und Therapieeinteilungen führen könnte.

1.7. Ziele der Forschung im Bereich der Einzelzellerkennung und Marker-Quantifizierung

Das Potential der künstlichen Intelligenz zur Erkennung von Mustern wird besonders deutlich, wenn es um die Analyse von hochkomplexen Bildern geht, mit denen das menschliche Auge praktisch überfordert ist. Zu dieser Kategorie zählt die Multiplex-Immunhistochemie. Hier addieren sich die Anforderungen zur Erkennung von Mustern im Gewebe (Tumor, Stroma, Blutgefäße, Muskulatur, Nerven, Immunzellen) mit den Anforderungen zur Unterscheidung mehrerer molekularer Marker. Zur Verbesserung der Vorhersage des Therapieansprechens von Anti-PD-1/PD-L1/CTLA-4-Immun-Checkpoint-Therapien ist das Verständnis der räumlichen Interaktion von Tumor- und Immunzellen im Tumormikromilieu unerlässlich. Zudem müssen die verschiedenen Typen von Immunzellen unterschieden werden, ihre jeweilige Populationsgröße sowie ihr jeweiliger Aktivierungszustand. Mittels geeigneter Antikörper, die eine Analyse der Zelltypdifferenzierung verbessern, einer angepassten Färbetechnik und einer automatischen, digitalen Bildanalyse, könnten Zell-Zell-Interaktionen im Tumormikromilieu besser

verstanden werden. Obwohl die von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen Biomarker (PD-L1-Assays) die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens auf die Behandlung erhöhen, sprachen 62 - 78 % der PD-L1⁺-Patienten bei verschiedenen Tumorentitäten nicht auf die durchgeführte Behandlung an^{8-10,119,120}. Dies war entweder auf die schlechte Reproduzierbarkeit der manuellen PD-L1-Bewertung durch Pathologen (Interobserver-Variabilität ⁶⁸, oder auf eine mögliche anderweitige Rolle von PD-L1 im komplexen Tumormikromilieu zurückzuführen, welches durch das Zusammenspiel zwischen Tumorzellen und den angrenzenden Immunzellen, Stroma- und extrazellulären Komponenten gekennzeichnet ist¹²¹. Das räumliche Zusammenspiel dieser zellulären Komponenten und die Expressionsstärke der Immuncheckpoints reguliert die bereits bestehende Anti-Tumor-Immunreaktion¹²¹ und steuert damit die Reaktion auf die Immuncheckpoint-Blockade¹²²⁻¹²⁴. Es ist zu hoffen, dass Zustände definiert werden können, die mit einem Ansprechen oder Nicht-Ansprechen der bestehenden anti-PD-L1- Therapien einhergehen, oder dass sich Erkenntnisse für neue Therapien gegen weitere Immuncheckpoint-Moleküle in Fällen, in denen die anti-PD-1-Therapie erfolglos bleibt, ergeben.

Ziel der Forschung ist es, eine exakte Einzelzellerkennung und die Abgrenzung zu benachbarten Zellen darzustellen, um Interaktionen und Lokalisationen im Netzwerk zu identifizieren und zu verstehen. Außerdem ist es erstrebenswert, die Anwendung geeigneter Antikörper zur Zielproteinlokalisierung in Großschnitten für die Diagnostik sowie 6 x 6 mm-TMAs für die Forschung zu optimieren. Hierbei ist es wichtig, geeignete Antikörper mit einer nachgewiesenen Spezifität für das native Zielprotein zu finden, die keine Mängel in Formalin-fixiertem Gewebe aufweisen¹²⁵⁻¹²⁷. Zu diesen nicht akzeptierten Schwächen gehören unter anderem eine fehlende Färbung des Zielproteins, ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis von Färbung zum Hintergrund, eine unspezifische Färbung anderer Proteine im Gewebe, sowie eine Kreuzreaktivität der Antikörper^{125,126}. Ein weiteres Ziel wäre, so viele Antikörper wie möglich gleichzeitig auf einem einzigen Gewebsschnitt zu nutzen, um einerseits den Patienten zu entlasten, indem man so wenig Gewebeproben wie möglich entnehmen muss, andererseits um das Interaktionsnetzwerk der Biomarker zu maximieren, da durch die Limitation der Antikörper-Wirtsspezies und der Fluorochrome bislang die simultane Nutzung der Antikörper begrenzt ist¹²⁸. Durch diese Studie haben wir eine erfolgreiche Methode entwickelt, um 15 Marker simultan auf kleinen 6 x 6 mm-Biopsien mittels Multiplex-

Fluoreszenz-Immunhistochemie zu färben und anschließend durch einen Deep Learning-Algorithmus automatisch auszuwerten, um lokalisationsabhängige Interaktionen im Tumormikromilieu auf der Basis von PD-L1 zu erfassen und zu analysieren.

1.8. Zielsetzung der Dissertation

Das Ziel dieser Studie war die Entwicklung eines Multiplex-Immunhistochemie-Verfahrens zur automatisierten Analyse und Visualisierung der komplexen Protein-Interaktionen des Tumormikromilieus. Dazu sollte zunächst ein Protokoll für die gleichzeitige Immunfärbung möglichst vieler Antikörper an Formalin-fixierten Gewebeschnitten entwickelt werden. Im zweiten Schritt sollte die Markererkennung und -Auswertung mit Hilfe von Deep Learning zur digitalen Bildanalyse adaptiert werden, um eine möglichst vollständig automatisierte Auswertung und Darstellung der Antikörperfärbungen zu erreichen. Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit des Färbe- und Analyseverfahrens sollten anschließend bestehende Tumor-Gewebemikroarrays analysiert werden. Dabei sollten zunächst die Ergebnisse einer konventionellen Hellfeld-Färbung einzelner Marker den Ergebnissen der automatischen Multiplex-Analyse der entsprechenden Proteine gegenübergestellt werden. Abschließend sollte das Verfahren angewendet werden, um den prognostischen Wert verschiedener Immunmarker an einem großen Kollektiv von Mammakarzinom zu evaluieren.

2. Material und Methoden

2.1. Gewebemikroarray-Technik

Die Technik des Gewebemikroarrays (Tissue Microarray, TMA), welche im Jahre 1998 von Kononen, J. et. al. entwickelt wurde, ermöglicht es, auf einem einzigen Objektträger bis zu 600 Patienten simultan zu untersuchen¹²⁹. In dieser Studie wurde eine bereits bestehende und von Blessin et al charakterisierte TMA Kohorte verwendet¹³⁰: Hierbei handelt es sich um 16 TMA-Blöcke, bestehend aus je 36 - 552 Tumorgewebeproben. Für die Herstellung eines TMAs wurden zunächst die verschiedenen Tumorgewebeproben unterschiedlicher Patienten in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden aus jedem Spenderblock (Donor) Proben mit einem Durchmesser von 0,6 mm mit einer Hohlnadel entnommen und auf einem Empfängerparaffinblock (Rezipient) mit vorgestanzten Löchern (Koordinaten) angeordnet. Für verschiedene Fragestellungen werden in der Forschung unterschiedlich große Gewebeproben gestantzt: Für einen Kontrollzelllinien-TMA (Validierung von Antikörpern auf transfizierten Zellen) werden 2 mm Stanzen auf dem TMA angeordnet, und um das Mikrotumormilieu weitläufig zu untersuchen, werden oft auch 4 µm Stanzen verwendet (Microenvironment- Tissue Microarray, ME-TMA)¹³¹. Für die Immunhistochemie wurden anschließend 2 mm dünne Schnitte aus dem Empfängerparaffinblock mittels eines Mikrotoms zugeschnitten und auf einem Objektträger fixiert. Um die Patienten zu pseudonymisieren bzw. anonymisieren, wurde jeder Patient einer Koordinate zugeordnet (Abbildung 5), mit einer Patientenidentifikationsnummer versetzt und in einem Datenfile den zugehörigen klinischen Daten zugeordnet.

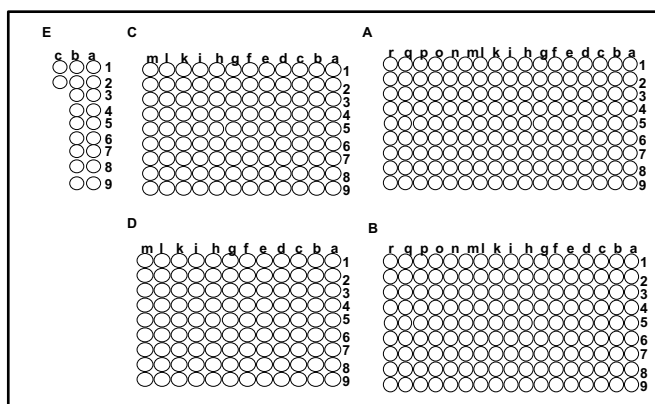


Abbildung 5: Anordnung des Gewebes auf einem TMA

Ein Tissue-Mikroarray (TMA) beinhaltet mehr als 500 Patientenproben, welche in verschiedene Sektoren angeordnet sind (A-E).

2.2. Patientenmaterial

Die Versuche dieser Studie wurden unter Verwendung von Gewebemikroarrays (Tissue Microarray, TMA) mit Gewebeproben eines Durchmessers von 0,6 mm² aus insgesamt 3.536 Primärtumoren von 44 verschiedenen Karzinom-Entitäten durchgeführt. Die Primärtumore stammen von Patienten, die im Zeitraum von 1993 und 2019 am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf und am Klinikum Osnabrück operiert wurden. Bei keinem der Patienten wurde während der Behandlung eine Immuncheckpoint-Therapie angewendet. Zu dem in dieser Studie verwendeten Gewebe zählten Tumore des Colons, der Blase, des Ovars und Endometrium, der Lunge, der weiblichen Brust und der Niere. Von 3.109 unterschiedlichen Tumoren lagen histopathologische Informationen über den Grad des Tumors, des pathologischen Tumorstadiums (pT) und des Nodalstadiums (pN) vor. Zusätzlich waren klinische Verlaufsdaten von insgesamt 682 Brustkrebspatienten mit einem Median von 43 Monaten (95 % Konfidenzintervall: 40 - 45 Monate) verfügbar (Tabelle 2). Die Verwendung des archivierten diagnostischen Gewebes für die Herstellung von TMAs und deren späteren Analyse, sowie die Analyse der Patientendaten zu Forschungszecken, wurden durch die örtlichen Gesetze (HmbKHG, §12) und durch die örtliche Ethikkommission (Ethikkommission Hamburg, WF-049/09, 25. Januar 2010) genehmigt. Alle Ausführungen wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

Tabelle 3: TMA-Kohorte der PD-L1 15+1-Studie

Patients characteristics	No. of patients (%)
	Total study cohort on TMA (n=3536)
Follow-up - no. Breast cancer (%)	682 (19.3%)
Median (95% confidence interval)	43 (40-45)
Sex	
Male	890 (25.2%)
Female	918 (26%)
Missing data	1728 (48.9%)
pT stage - no. (%)	
pT1	1079 (30.5%)
pT2	974 (27.5%)
pT3-4	1056 (29.9%)
Missing data	427 (12.1%)
pN stage - no. (%)	
pN-	1208 (34.2%)
pN+	1131 (32%)
Missing data	1197 (33.9%)
Grade - no. (%)	
1	271 (7.7%)
2	1262 (35.7%)
3	877 (24.8%)
Missing data	1126 (31.8%)
Tumorentities - no. (%)	
Acinar cell carcinoma of the pancreas	5 (0.1%)
Adenocarcinoma of the colon	286 (8.1%)
Adenocarcinoma of the esophagus	65 (1.8%)
Adenocarcinoma of the lung	29 (0.8%)
Adenocarcinoma of the prostate	338 (29.6%)
Adrenal cortical carcinoma	21 (0.6%)
Anaplastic thyroid carcinoma	24 (0.7%)
Basal cell carcinoma	50 (1.4%)
Cholangiocarcinoma	19 (0.5%)
Chromophobe renal cell carcinoma	39 (1.1%)
Clear cell carcinoma of the ovary	24 (0.7%)
Clear cell renal cell carcinoma	33 (0.9%)
Ductal adenocarcinoma of the pancreas	17 (0.5%)
Endometrial serous carcinoma	23 (0.7%)
Endometrioid carcinoma of the ovary	50 (1.4%)
Endometrioid endometrial carcinoma	40 (1.1%)
Follicular thyroid carcinoma	25 (0.7%)
Gastric adenocarcinoma, diffuse type	57 (1.6%)
Hepatocellular carcinoma	41 (1.2%)
Invasive breast carcinoma of no special type	1056 (29.9%)
Lobular carcinoma of the breast	176 (5%)
Medullary carcinoma of the breast	17 (0.5%)
Medullary thyroid carcinoma	1 (0%)
Mucinous carcinoma of the breast	27 (0.8%)
Mucinous carcinoma of the ovary	32 (0.9%)
Oral squamous cell carcinoma (floor of the mouth)	99 (2.8%)
Pancreatic/Ampullary adenocarcinoma	14 (0.4%)
Papillary renal cell carcinoma	33 (0.9%)
Papillary thyroid carcinoma	22 (0.6%)
Serous carcinoma of the ovary	167 (4.7%)
Small cell neuroendocrine carcinoma of the bladder	1 (0%)
Small cell neuroendocrine carcinoma of the prostate	1 (0%)
Squamous cell carcinoma of the anal canal	62 (1.8%)
Squamous cell carcinoma of the cervix	101 (2.9%)
Squamous cell carcinoma of the esophagus	62 (1.8%)
Squamous cell carcinoma of the larynx	57 (1.6%)
Squamous cell carcinoma of the lung	12 (0.3%)
Squamous cell carcinoma of the penis	75 (2.1%)
Squamous cell carcinoma of the pharynx	54 (1.5%)
Squamous cell carcinoma of the skin	75 (2.1%)
Squamous cell carcinoma of the vagina	48 (1.4%)
Squamous cell carcinoma of the vulva	107 (3%)
Tubular carcinoma of the breast	11 (0.3%)
Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	39 (1.1%)

2.3. *in vivo*-Experimente in C57BL/J6- und BALB/c-Mäusen

Für die Herstellung des FOXP3-Antikörpers wurden 16 Mäuse der Linie BALB/c (Charles River, Balb/cAnNcrI_2017, #4882) verwendet. Die Maus stellt durch ihre geringe Größe, die hohe Reproduzierbarkeit und der einfachen Haltung ein ideales Versuchstier für diese Studie dar. Besonders der hier verwendete BALB/c-Mausstamm zeigt in unterschiedlichen Tiermodellen eine erhöhte CD4⁺-Helfer-T-Zellen-Produktion und histologische Veränderungen (Nagayama et al 2002, Chen et al. 2003, Kita-furuyama et al 2003, Seetharamaiah & Land 2006, Zhao et al 2011.). Weibliche und männliche Mäuse im Alter von 6 - 10 Wochen wurden 2-fach immunisiert. Die Mäuse wurden mit jeweils 4 - 5 Wurfgeschwistern in Käfigen gehalten mit dem uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum*. Diese Käfige wurden jede Woche gesäubert, und rote Häuschen zum Unterschlupf sowie Taschentücher für den Nestbau wurden den Tieren bereitgestellt. Des Weiteren wurden die Wasserflaschen alle 2 Wochen gewechselt. Die Käfige (Tecniplast, 1264C Eurostandard Typ II, 267 x 207 x 140 mm) wurden in einem Labor-Tierregal mit transparenten Plastiktüren zum Lärm- und Schmutzschutz gelagert. Das Tierversuchshaus bietet einen stabilen Luftzufluss, eine konstante Temperatur von 21 °C, eine Luftfeuchtigkeit von ~ 55 % und einen 12-Stunden-Tag-/Nacht-Zyklus mit Beginn des Tages um 6:30 Uhr. Jede Maus des Experiments wurde jeden Tag anhand des Score Sheets kontrolliert (Score Sheet siehe Anlage 8.3.). Nach Ankunft bestellter Mäuse wurden diese für 2 Wochen aus allen Experimenten ferngehalten, um sich an das neue Umfeld zu gewöhnen und anzupassen. Die Durchführung der Experimente und Nutzung von Adjuvantien und Reagenzien sowie deren genauen Mengenangaben wurden im Tierversuchsantrag zum Schutz der Tiere anhand der 3R-Regeln festgelegt und genehmigt (Tierversuchsleitung: Prof. Dr. Ronald Simon, Stellvertretende Tierversuchsleitung: Elena Bady).

Intraperitoneale und subkutane Immunisierung der Maus.

Die Aufnahme der Injektionslösung des Körpers der Maus sinkt je nach Injektionsmethode: Intravenös > intraperitoneal > intramuskulär > subkutan > oral. Durch den erhöhten Aufwand bei einer intravenösen und intramuskulären Injektion und der gering zugelassenen Injektionsmenge pro Körpergewicht wurde in dieser Studie eine Kombination von intraperitoneal und subkutaner Injektion verwendet.

Aus dem humanen Forkhead-box-Protein P3 (FOXP3) -Volllängenprotein wurden 5 unterschiedliche Peptidabschnitte synthetisch hergestellt, die die Eigenschaften einer hohen Polarität aufwiesen, hydrophobe Eigenschaften besaßen und ein ausgeglichenes Säure-Basen-Verhältnis zeigten (Peps4LS GmbH, Heidelberg, Deutschland). Diese Peptide wurden vereinigt und gepaart mit Ovalbumin für die Immunisierung genutzt. 25 µg des Peptids wurden mit 15 µL CpG Oligonukleotide, 250 µL inkomplettem Freudschem Adjuvant (Sigma-Aldrich, #F5506-10X10ML/143508) gemischt und mit dest. H₂O auf ein finales Volumen von ~ 400 µL aufgefüllt. Das inkomplette Freudsche Adjuvant ist eine zähe, ölige Substanz und ruft eine Depotabgabe des Wirkstoffs im Tier hervor. Vor der ersten Injektion wurden daher alle Mäuse nacheinander mit einer Mischung aus Kohlenstoffdioxid und Sauerstoff für ca. 3 Minuten narkotisiert, bis der Herzschlag sichtbar reduziert und das Tier beruhigt wurde. Jeweils 200 µL der vorbereiteten Lösung wurden anschließend intraperitoneal und subkutan in die Nackenfalte der Mäuse injiziert. Diese Vorgehensweise wurde nach 2 Monaten, ohne Zugabe des Adjuvants, wiederholt um eine verstärkte Reaktion des Immunsystems hervorzurufen. Diese letzte Immunisierung wurde 3 Tage vor der Tötung des Tieres durchgeführt.

Entnahme von Blut und Milz.

Die in der Milz enthaltenen Plasmidzellen wurden für die Hybridomherstellung benötigt, um Zellen zu generieren, die die Eigenschaften von Plasmidzellen (Antikörperproduktion) und Krebszellen (unendliche Reproduktion) verbinden. Die im Blutplasma enthaltenen Antikörper wurden als Positivkontrolle für die ELISA-Austestung verwendet. Für die Entnahme von Herzblut wurden die Mäuse mittels Kohlenstoffdioxid langsam und schonend eingeschläfert. Anschließend wurde die Maus auf eine mit Aluminiumfolie bedeckte Korkplatte gelegt. Alle Vitalzeichen wurden durch das Zwicken mit einer Pinzette in den Zeh-Zwischenräumen und am Schwanz geprüft. Alle vier Pfoten wurden mit Hilfe von Stecknadeln auf der Korkplatte

fixiert und das Fell wurde mit 70 % Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde ein axialer Schnitt durch die Oberhaut und abdominale Haut gemacht, um das Brustbein freizulegen. Das Sternum wurde vorsichtig mit der Pinzette gehalten, um die Rippen vom Diaphragma zu lösen. Das Herz wurde mit einer Injektionsnadel punktiert (Sterican® Größe 18, G 26 x 1"/ø 0,45 x 25 mm), um 400 µL Blut in einem Eppendorf-Gefäß zu sammeln. Das Herzblut wurde anschließend für 5 min bei 1.000 x g zentrifugiert, um die im Plasma enthaltenen Antikörper von den Erythrozyten zu trennen.

2.4. Zellkultur

Eukaryotische Zelllinien.

HeLa-Zellen sind humane epitheliale Zellen eines Zervixkarzinoms, welche adherent wachsen und somit eine geeignete Zelllinie mit einfacher Handhabung für Experimente in der Zellkultur darstellen. HeLa- Zellen entstanden aus einem Zervixkarzinom der Afroamerikanerin Henrietta Lacks, die im Jahr 1951 den Folgen ihrer Tumorerkrankung erlag. Diese Zelllinie ist ideal für transiente sowie stabile Transfektionen, die zur Expression rekombinanter Proteine führen. Somit ermöglichen sie es, eine Reihe von zellbiologischen Fragestellungen in der Onkologie zu erforschen.

Herstellung von Kontrollzelllinien.

Für die Validierung der verwendeten Antikörper wurden Kontrollzelllinien erzeugt, die das Zielprotein exprimieren. Die transfizierten Zellen wurden nach 24 Stunden geerntet, bei 1.000 x g für 5 Minuten zentrifugiert und in Agarose stabilisiert. Die Zellen wurden über Nacht in 4 % gepuffertem Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Als Positivkontrolle wurden nicht-transfizierte HeLa-Zellen vorbereitet. Die Zellproben wurden ausgestanzt und neben den Prostatagewebeproben auf dem Objektträger angeordnet.

Auftauen von kryokonservierten Zellen und Kultivierung.

Bei Zellkulturexperimenten ist eine schonende und sterile Handhabung der Zellen essenziell, um das Zellwachstum zu maximieren und eine Kontamination zu vermeiden. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert, um einen Seneszenzstopp und eine nicht-mikrobielle Kontamination zu gewährleisten. Für die Experimente wurden die Zellen langsam in einem

Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in Wachstumsmedium kultiviert. HeLa-Zellen wurden in basischem DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Life Technologies GmbH, #41966052/187655) kultiviert, das mit 10 % hitzeinaktiviertem und gefiltertem fetalem Kälberserum (FCS, Gibco, #10082-147) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S, Capricorn, #PS-B) angereichert war. Schließlich wurden die Zellen in 25- oder 75-cm²-Flaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet.

Passagieren und Aussähen von Zellen.

Um die Zellkultur rein zu halten, ist eine bestimmte Abfolge des Erntens und Aussähens der Zellen nötig. Eine zu hohe Passage kann zu einem Verlust einiger Eigenschaften der Zelle führen. Medien, Trypsin 1/5 (Invitrogen, #25200-072) und PBS 1x (Phosphate-buffered Saline, Capricorn, #PBS-2A) wurden für mindestens 30 min bei 37 °C vorgewärmt. Die Arbeitsfläche wurde sorgfältig mit 70 %igem Ethanol gereinigt und mit UV-Licht für 40 min bestrahlt, um die Sterilität unter der Werkbank zu gewährleisten. Das verbrauchte Medium wurde aus den Zellkulturflaschen abgesaugt, die Zellen wurden vorsichtig mit 1x PBS gewaschen und dann mit Accutase (Sigma-Aldrich, #A6964-500ML) für 5 min in den Brutschrank gestellt, um sie abzulösen. Die Zellen wurden durch Klopfen mit der Handfläche an der Flaschenseite und Auf- und Abpipettieren des Mediums effizient vom Flaschenboden gelöst. Anschließend wurden 20 µl der Zellen in einem Cellometer-Spectrum-Image-Cytometry-System gezählt (Nexcelom Products). Die entsprechende Anzahl von Zellen wurde in einer neuen Flasche mit frischem Medium gegeben und alle 3 - 4 Tage bei einer Konfluenz von 90 % im Verhältnis 1/6 in einer T75-Flasche oder im Verhältnis 1/10 in einer T25-Flasche aufgeteilt. 150 x 10 mm-beschichtete Gewebekulturschalen für sensible, adherente Zellen (Sarstedt, #83.3903.300) wurden mit 20 ml vorgewärmter DMEM mit Serum befüllt. 300.000 Zellen pro Kulturschale wurden in 10 Schalen mit Medium gegeben und 1 Tag lang bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet. Je Passage der Zellen erreichten sie eine Konfluenz von 70 - 90 %.

Transiente Transfektion von Zellen.

Für die Herstellung von Kontrollzelllinien wurde der Vektor mit dem Zielgen und einem Cytomegalovirus (CMV)-Promotor für die Transfektion verwendet. Die transiente Transfektion ermöglicht ein nicht stabiles, aber schnelles Einschleusen des Zielgens in die Zelle. 300.000 HeLa-Zellen wurden auf 150-mm-Kulturplatten ausgesät. Für die Transfektion wurde ein Vektor (pcDNA3) verwendet, der das Zielmolekül FOXP3 unter dem CMV-Promotor exprimiert (FOXP3 cDNA ORF Clone, Human, untagged, Cat: HG11652-UT, Sinobiological, Abbildung 6). Die Transfektion wurde mit JetPEI durchgeführt, welches aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaft Mizellen um die DNA bildet. Dies unterstützt den Transfer der Plasmid-DNA in die Zelle und ermöglicht die Expression von cDNAs unter Kontrolle des entsprechenden Promotors im Expressionsvektor.

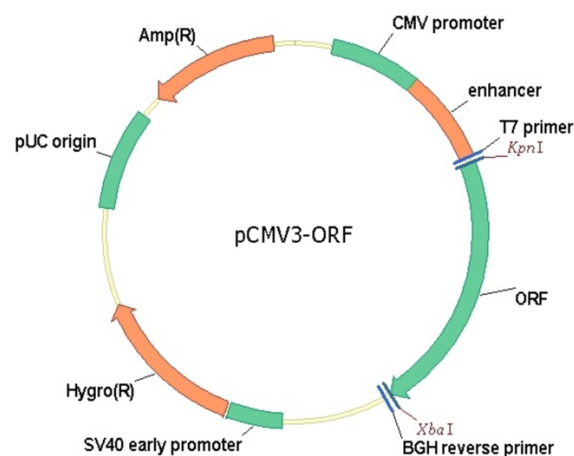


Abbildung 6: Aufbau eines FOXP3-Expressionsvektors (<https://www.sinobiological.com>).

FOXP3 cDNA ORF-Klon, human, untagged. Amp(R): Ampicillin-Resistenz (*E.coli*), CMV promoter: Cytomegalovirus-Promoter, Sequenzierungs-Primer: T7 Primer: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3', BGH Primer: 5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3', Restriktionsenzyme: KpnI + XbaI (6.1kb + 1.3kb), ORF: Open reading frame, SV40 early promoter: Simian-Virus 40 Promotor.

40 µl JetPEI (1 µg/µl, Polyplus Transfection, #101-40N) und 15 µg-Vektor-DNA, jeweils verdünnt in 1.000 µl-NaCl, wurden zunächst getrennt für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden JetPEI und Vektor-DNA gemischt und für weitere 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5 %-CO₂ inkubiert. Schließlich wurden die Zellen mit frischem DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S gewaschen. Nach einer Expressionszeit von 24 bis 48 Stunden wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und für die weitere Bearbeitung geerntet,

entweder für Immunhistochemie, Western Blot oder Real-Time-PCR. CDNA-Expressionsplasmide wurden bei 5.000 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Um die DNA zu lösen, wurde 100 µL steriles H₂O hinzugefügt und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert. Die Probe wurde vorsichtig durch Vortexen gemischt und kurz bei 5.000 x g zentrifugiert. Jedes Reagenzgefäß enthielt 10 µg lyophilisiertes Plasmid. Die Plasmide wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

Transformation in E. coli mittels Hitzeschock.

Um eine ausreichende Menge an Plasmid-DNA für die Transfektion zu erhalten, wurden Bakterienkulturen angelegt. Für die Transformation wurden zirkulierende Plasmide in E. coli-Bakterien eingebracht, um sie dort zu vervielfältigen. CDNA-Klon-Expressionsplasmid-Fläschchen (SinoBiological/Origene) wurden bei 5.000 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. 100 µL steriles H₂O wurden hinzugefügt, um die DNA aufzulösen, und 10 min bei RT inkubiert. Die Reagenzröhrchen wurden kurz geschüttelt und bei weniger als 5.000 x g zentrifugiert. Jedes Röhrchen mit cDNA-Klon enthält 10 µg lyophilisiertes Plasmid. Die Plasmide wurden anschließend bei -20 °C gelagert. Für den weiteren Vorgang wurde das resuspendierte cDNA-Plasmid im Verhältnis 1:10 mit H₂O_{dest.} verdünnt und 3 µl des Plasmids wurden in ein Fläschchen mit One Shot TOP10 chemisch kompetenten E. coli gegeben und vorsichtig gemischt. Die Röhrchen wurden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 30 sek bei 42 °C ohne Schütteln hitzeschockbehandelt. Daraufhin wurden sie für 2 min auf Eis gestellt. 700 µL RT-Lysepuffermedium wurden in die Röhrchen gegeben und 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Schließlich wurden 50 µL der Bakterienkultur, die die jeweilige cDNA enthielt, auf eine vorgewärmte Selektivplatte mit jeweils Kanamycin oder Ampicillin verteilt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie mit einer Pipettenspitze ohne Filter entnommen und in einem Erlenmeyerkolben mit 150 ml Lysepuffermedium und entweder Kanamycin oder Ampicillin überführt. Der Kolben wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Isolation der cDNA aus E.coli.

Um die cDNA-Konstrukte aus den E.coli-Bakterien zu isolieren, wurde eine DNA-Midipräparation mittels des Quiagen Plasmid Plus Maxi Kits durchgeführt. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte auf der Grundlage des Protokolls des Aufreinigungskits von Macherey-Nagel. Die Bakterienkultur wurde durch Zentrifugieren bei 4 °C und 6.000 x g für 15 min geerntet. Um das Bakterienpellet zu resuspendieren, wurde der Überstand entfernt und 8 ml S1-Puffer wurden zum Pellet gegeben. Dann wurden 8 ml S2 Puffer zugegeben und die Emulsion durch eine Schwenkbewegung des Gefäßes vorsichtig gemischt, bis das Lysat zähflüssig wurde und sich blau färbte. Das Lysat wurde 3 Minuten lang bei RT inkubiert. 8 ml S3-Puffer wurden zum Lysat gegeben und durch 5-maliges Umdrehen gemischt, bis das Lysat farblos erschien. Das Zelllysate wurde 10 Minuten lang bei 15.000 x g zentrifugiert. Zum Äquilibrieren der Säule wurden 2,5 mL Puffer N2 zugegeben. Das Lysat wurde durch ein gefaltetes Filterpapier auf die Säule gegeben und anschließend mit Ethanol gereinigt. Die Lösung wurde 10 min bei 1.000 x g zentrifugiert und das Pellet wurde getrocknet, um die Ethanolreste zu entfernen. Im Anschluss wurde das Pellet in 150 µl H₂O_{dest.} gelöst und der DNA-Gehalt gemessen.

Das Nanodrop-Spektrophotometer ND-1000 wurde zur Quantifizierung und Qualifizierung der DNA-Proben verwendet. Dadurch werden Probenverunreinigungen identifiziert und korrigierte Konzentrationswerte erhalten, indem der Absorptionsbeitrag der DNA-Probe vom ursprünglichen Ergebnis abgezogen wird. Das Gerät wurde mit 2 µl der Lösung, in der die DNA gelöst war (H₂O_{dest.}), geleert. Von jeder Probe wurden 2 µl mit dem Programm ND-1000V3.2.1 gemessen und protokolliert.

2.5. Hybridomtechnologie

Fusion von Milz- und Tumorzellen.

Für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern einer Hybridom-Zellkultur wurden antikörperproduzierende B-Zellen aus der Milz der Maus und Ag8-Myelomzellen miteinander fusioniert, um die Eigenschaften des unendlichen Zellwachstums und die Antikörperproduktion miteinander zu vereinen. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen auf einer UV-bestrahlten Werkbank durchgeführt. Ag8-Zellen wurden aufgetaut, das Pellet wurde gewaschen und zentrifugiert. Die Zellen wurden in RPMI-1640-Medium kultiviert und jeden zweiten Tag beobachtet; außerdem wurde das Medium bei Bedarf gewechselt. Die Zellen wurden geteilt, wenn sie eine Konfluenz von 90 - 100 % erreichten. Für die Präparation der B-Zellen aus der Milz wurden 20 ml RPMI 1640 in eine neue Petrischale gegeben. Die frisch entnommene Milz wurde mit sterilem PBS gewaschen, um unsterile Partikel aus Mäusehaaren zu entfernen. Die Milz wurde mit einer Schere zerschnitten und durch ein steriles Teesieb mit einem Kolben aus einer Spritze zerrieben. Das Medium, einschließlich der Zellen, wurde aufgefangen und erneut abgesiebt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Cellometer AutoT4 (Nexcelom) gezählt und ein Verhältnis von 1:3 zwischen Ag8 und Milzzellen bestimmt. Das Zellgemisch wurde 3 Minuten lang in einem 50-ml-Falcon ruhen gelassen und dann 7 min lang bei 560 x g bei 20 °C/68 °F zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 1 ml PEG1500 zugegeben und mit einem Glasstab gemischt. Das Reagenzgefäß wurde auf ein Gestell gesetzt, welches 1,5 min lang manuell geschwenkt wurde. Während des Schwenkens wurden 100 µL RPMI 1640-Medium gemäß Tabelle 4 hinzugegeben:

Tabelle 4: Zeitabstand der Zugabe von RPMI 1640-Medium

Zeitabstand	1 min alle 20 sec	1 min alle 15 sec	1 min alle 10 sec	1 min alle 5 sec
Zugabe von 100µl RPMI 1640:	3x/min	4x/min	6x/min	12x/min

Im Anschluss wurden 40 ml HAT-Medium der Mischung hinzugefügt und jeweils 200 µl auf 96-Well-Platten verteilt. Das verwendete Medium enthält Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT). Aminopterin blockiert ein Enzym des De-Novo-Signalweges, das den Zelltod von nicht fusionierten Myelomzellen unterstützt. Plasmazellen enthalten das Enzym HGPRT,

welches den Salvage signaling pathway fördert, der zur Produktion von Nukleotiden und zum Überleben der Zellen führt. Während der Tage überleben die antikörperproduzierenden, unsterblichen Hybridomzellen und es werden Klone produziert. Die Platten wurden in einem Inkubator bei 37 °C/98,6 °F und 5 % CO₂-Luftfeuchtigkeit gelagert und jeden zweiten Tag beobachtet.

Hybridomzellkultivierung und Handhabung.

Da es bei der Fusion von zwei verschiedenen Zellarten nicht nur zu der gewünschten Hybridomzelllinie kommt, sondern auch non-Producer-Zellen (nicht-immunogen) entstehen können, war eine saubere und geregelte Handhabung und Pflege der Zellen sowie bestimmtes Medium für den Ausschluss von Tumorzellen nötig. Die Hybridomazellen wurden eine Woche lang im Brutschrank verwahrt, damit sich die Zellen an die neuen Bedingungen gewöhnen und wachsen konnten. Das Medium (HAT-Medium) wurde jede Woche gewechselt. Nach zwei Wochen wurde der erste ELISA durchgeführt (Protokoll siehe unten), um die antikörperbildende Funktion der Hybridomazellen zu überprüfen. Der Überstand der positiven Zellen wurde mittels Immunhistochemie auf Gewebemikroarrays (TMAs) getestet. Nach drei Tagen wurde ein zweiter ELISA durchgeführt, um erneut zu prüfen, ob die Zellen positiv für den jeweiligen Antikörper waren. Die Hybridomazellen wurden 7 Tage vor der ersten Subklonierung im Brutschrank inkubiert. Die Klone der positiven Zellen wurden gesammelt und in eine frische 96-Well-Platte übertragen, welche HAT-Medium und 10 % Hybridomzellzusatz für ein besseres Zellwachstum enthielt. Die Zellen wurden auf 1 Zelle/Klon pro Vertiefung aufgeteilt und ruhten 1 - 2 Wochen lang, um zu wachsen. Nach 14 Tagen wurde ein ELISA durchgeführt, um die Qualität der Antikörper zu überprüfen. Wenn die IHC auf dem TMA eine gute Bindung und einen reduzierten oder gar keinen Hintergrund zeigte, wurde der Klon wachsen gelassen und abgetrennt, und die Proben wurden zur Sicherung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA.

Um die abgesonderten Antikörper im Medium der Hybridomzellen auf ihre monoklonale Bindung zum Antigen zu testen, wurde ein ELISA durchgeführt. Die 96-Well-Platten wurden an Tag 1 zunächst mit Avidin beschichtet (1:100 Avidin in Carbonatpuffer) und für 3 Tage bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten gewaschen, mit dem jeweiligen Peptid (In Carbonatpuffer gelöst und verdünnt) benetzt und für 40 min inkubiert. Die Platten wurden erneut gewaschen und mit fetalem Kälberserum (FCS) für 3 h inkubiert und anschließend ausgeklopft. Diese waren nun für den weiteren Gebrauch vorbereitet oder wurden für eine spätere Fortführung bei -20 °C eingefroren. Die benetzten 96-Well-Platten wurden nun mit 40 µl FCS und 10 µl des jeweiligen Hybridomüberstands benetzt. Nach einer Inkubation von 30 min wurden diese gewaschen und für ca. 2 min mit je 150 µl ChemLuminate-HRP PicoDetect (AppliChem) inkubiert. Durch den Farbumschlag von farblos zu blau ist optisch schon zu erkennen, welche Wells ein positives Signal erhalten werden. Der Antikörpergehalt wurde mit einem BioTek (Agilent) detektiert. Alle positiven Wells wurden im weiteren Verlauf erneut auf Platten aufgeteilt und hochgezogen.

2.6. Western-Blot-Analyse

Mittels der Western Blot Analyse wurde die Qualität der eigens-hergestellten- und der kommerziellen Antikörper nachgewiesen. Bei dieser Methode handelt es sich um ein zweistufiges Verfahren, das mit der Auftrennung denaturierter Proteine durch Gelelektrophorese mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese beginnt. Nach der Größentrennung werden die Proteine von dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen um sie dann mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen. Sekundäre Antikörper, die mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt sind, werden schließlich zur Markierung der primären Antikörper verwendet. Die Peroxidase-induzierte Chemilumineszenz wird zur Visualisierung der Protein-Antikörper-Komplexe verwendet.

Herstellung von Zelllysats.

Die Petrischale mit den transfizierten Zellen wurde auf Eis gelegt, einmal mit kaltem 1 x PBS gewaschen und 150 µl Lysepuffer hinzugefügt (Je nach Größe des Zellpellets). Die Zellen wurden mit einem Zellschaber ausgekratzt und in ein vorgekühltes 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach 30 min Ruhezeit wurden die Zellen zweimal mit einem Mörtersstab gequetscht, sodass die Zellwand vom Zellinneren gelöst wurde. Nach 10 Minuten auf Eis wurden die Zellen 5 Minuten lang bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Schließlich wurden 5 µl Lysat mit 45 µl 1 x PBS für die Qubit-Messung gemischt, und 75 µl Lysat wurden zu 37,5 µl 4 x Laemmli für die Western-Blot-Analyse hinzugefügt. Das restliche Lysat wurde in ein neues Röhrchen überführt und bei -80 °C gelagert. Die Western-Blot-Probe wurde 5 Minuten lang bei 99 °C erhitzt und zusammen mit der Qubit-Probe bei -20 °C gelagert.

Qubit-Proteinmessung.

Um die Proteinmenge des Zelllysats zu bestimmen, um die exakt gleiche Menge auf die SDS-Polyacrylamidgele aufzutragen, wurde eine Proteinmessung mittels des Qubit-Fluorometers anhand des Herstellerprotokolls durchgeführt (Fisherscientific). Das Qubit-Fluorometer bedient sich unterschiedlicher Fluorophore, die bei einer selektiven Bindung an das Protein fluoreszieren. Anders als bei der traditionellen UV-Absorption wird eine Kontamination der Probe durch Salze, freie Nukleotide oder Ähnlichem nicht verfälscht.

SDS-Polyacrylamidgele.

Die Proben wurden mit der Technik der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt. Die Proteinproben wurden aufgetaut und bei 99 °C für 5 Minuten auf einem Schüttler gekocht. Für dieses Experiment wurden Mini-PROTEAN® Precast Gele (Biorad) verwendet. Die Gelkammern wurden mit PageRuler Prestained Ladder, der berechneten Anzahl von Proben und 1 x-Laemmli-Puffer in die leeren Kammern beladen. Der Gelelektrophoresebehälter wurde mit 1 x-Elektrophoresepuffer (3,03 g/l Tris-Base, 14,4 g/l Glycin, 1 g/l SDS) befüllt, und die Elektrophorese wurde bei 70 V, 0,3 A und 300 W für 10 min gestartet, um jede Probe sanft zu adaptieren. Sobald die Banden sich gesammelt hatten, wurde die Spannung auf 200 V erhöht und das Gel für 1,5 h bei 4 °C gelagert (Tabelle 5).

Tabelle 5: SDS-PAGE Protokoll für den Lauf von 2 Gelen

	Zeit (min)	Volt	Ampere	Watt
Start	0	200.0	0.3	300
Ende	95	200.0	0.17	34

Semi-dry Blot.

Das Gel wurde anschließend auf eine PVDF-Nitrocellulosemembran gelegt und zwischen 2 *Whatman*-Papiere geklemmt. In einem Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell-Gerät (Biorad) wurden die Proteine nun für 2 min bei 2 Ampere auf die Membran übertragen. Zum Blockieren wurde filtrierte Kuhmilch (1 x TBS/T, angereichert mit 10 % Milchpulver) verwendet, um Signale aufgrund unspezifischer Bindung von Antikörpern auf der Membran zu reduzieren. Die primären Antikörper wurden bei einem Verhältnis von 1:1.000 in 7 ml 5 %iger Blockierungslösung verdünnt und mit den PVDF-Membranen 3 Stunden lang bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Die Mischung aus primären Antikörpern und Blockierungslösung konnte bei einer Lagerung von -20 °C bis zu sechsmal wiederverwendet werden. Die Membranen wurden dreimal für 10 min gründlich mit 1 x TBS/T gewaschen. Die Sekundärantikörper wurden frisch in 5 %iger Milch in einer geringeren Verdünnung verdünnt und 90 min lang bei Raumtemperatur auf die Membranen aufgetragen. Die Membranen wurden dreimal für 10 min mit 1 x TBS/T gewaschen und konnten bei 4 °C für mehrere Tage gelagert werden.

Um neue Antikörper aufzutragen, wurden alte bindende Antikörper mit Western-Blot-Stripping-Puffer von den Membranen entfernt. Die Membranen wurden 10 min lang mit TBS/T gewaschen. Die Membranen wurden mit Stripping-Puffer versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Stripping-Puffer wurde entfernt, und die Blots wurden 10 Minuten lang in TBS/T gewaschen. Nach 30-minütiger Inkubation in Blockierungs-Lösung wurde der Proteinnachweis wie oben beschrieben durchgeführt.

Für den Proteinnachweis wurden die PVDF-Membranen 2 min lang mit ChemLuminate-HRP PicoDetect (AppliChem) inkubiert. Das ChemLuminat wurde verworfen und die Membranen wurden in eine UV-Detektionskammer (Biorad) für den radiographischen Proteinnachweis gelegt.

2.7. Plasmid Expressionsanalyse

Für den Nachweis der erfolgreichen Transfektion des Zielgens für die Kontrollzelllinie wurde eine quantitative und qualitative RNA-Bestimmung durchgeführt. Die real-time quantitative Reversen-Transkriptase-PCR wurde genutzt, um Genexpressionsanalysen der Kontrollzelllinien auf RNA-Ebene in Echtzeit durchzuführen. Die herkömmliche PCR-Methode dient dazu, um in vitro die DNA zu vervielfältigen, wohingegen die quantitative Reverse-Transkriptase-PCR zusätzlich eine genaue Quantifizierung spezifischer Nukleinsäuresequenzen während der Amplifikation durch Fluoreszenz-Messungen ermöglicht.

RNA-Isolierung.

Zunächst wurde die RNA aus dem Zellkern isoliert und aufgereinigt. Dazu wurden 4×10^6 -HeLa Zellen in einer Zellkulturplatte auf Eis gelegt und mit kalten PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber entnommen und bei $1.000 \times g$ für 4 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 400 μ l Lysepuffer resuspendiert, auf eine DNA-bindende Säule aufgetragen und anschließend für 1 min bei $15.000 \times g$ zentrifugiert. Die Gesamt-RNA wurde daraufhin mit 400 μ l 70 %-Ethanol vermengt, auf eine RNA-bindende Säule übertragen und bei $10.000 \times g$ für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 500 μ l Waschpuffer (W1) für 15 sek bei $10.000 \times g$ gereinigt und danach erneut mit 600 μ l des zweiten Waschpuffers (W2) gespült und zentrifugiert. Um die Gesamt-RNA zu eluieren, wurde 50 μ l auf die Säule gegeben und bei $5.000 \times g$ für 1 min zentrifugiert. Die RNA wurde für den weiteren Gebrauch auf Eis gelegt oder bei -80°C gelagert. Die Quantität und Qualität wurde mittels des NanoDrop-Spektrometers ermittelt. Hierbei wird die Konzentration der RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und entspricht bei einer Absorptionseinheit (A260-Einheit) 40 μ g RNA/ml. Die Qualität der RNA wird über den Quotienten A260/280 ermittelt und ist als reine Probe anzusehen, wenn der Wert bei ≥ 1.8 liegt.

cDNA-Synthese mit Hilfe von quantitativer Reverser Transkription.

Um aus der RNA die komplementäre DNA (cDNA) herzustellen, wurde zunächst 1 µg RNA in ein PCR-Mikroreaktionsgefäß mit 25 µl RNase-freiem H₂O gegeben. Nach Zugabe von 25 µl Mastermix (Tabelle 3) wurde der Thermocycler mit dem entsprechenden Programm gestartet (Tabelle 4). Die cDNA wurde anschließend in 150 µl Nuklease-freiem H₂O aufgelöst, um eine Konzentration von 5 ng/µl zu erlangen.

Tabelle 6: Komponenten für die cDNA-Herstellung pro Reaktion

Komponenten	Volumen pro Reaktion
dNTPs Mix (100 mM)	2.00 µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase (50 U/ µL)	2.50 µl
Nuklease-freies H ₂ O	8.00 µl
Random-Primer (10 x)	5.00 µl
Reverse Transkriptionspuffer (10 x)	5.00 µl
RNase Inhibitor (20 U/ µL)	2.50 µl
Gesamtvolumen	24.50 µl

Tabelle 7: Programmeinstellungen der Reversen Transkriptase

Einstellungen	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3
Temperatur	25°C	37°C	85°C
Zeit	10 min	120 min	5 sek

Amplifikation von cDNA-Fragmenten (Taqman Primer).

Für die Amplifikation wurden TaqMan™-Sonden (Life Technologies) sowie das 7900HT Fast-Real-Time-PCR-System und das Programm SDS 2.0 (Applied Biosystems) verwendet. Die TaqMan™-Sonden enthalten an einem Sequenzende (5') einen Fluoreszenzfarbstoff und am anderen Ende (3') einen *Quencher*, der zur Unterdrückung des Fluoreszenzfarbstoffs dient. Durch die 5' - 3'-Endonukleasenaktivität der Taq-Polymerase wird während der Amplifikation der sogenannte *Quencher* vom Reporter getrennt und der Fluoreszenzfarbstoff wird freigesetzt. Pro PCR-Zyklus steigt nun die Konzentration der Fluoreszenz proportional zum PCR-Produkt an. Sobald die Emission des Farbstoffs das Hintergrundrauschen übersteigt, ist der Schwellenwert erreicht. Bei jedem Versuch wurden ubiquitäre Housekeeping-Gene als Referenz mitgemessen.

Ein Mastermix aus 1,5 µl TaqManTM-Sonde (FOXP3, Mm00475162_m1; ACTB, Hs01060665_g1, ThermoFisher), 8,5 µl RNase-freiem H₂O und 15 µl TaqManTM Fast Advanced PCR Master Mix (#4444556, ThermoFisher) wurde zuvor hergestellt. MicroAmpTM Fast Optical 96-Reaction Plates wurden anhand der Produktbeschreibung mit jeweils 5 µl der cDNA-Probe, 1:4 verdünnt mit H₂O_{dest.}, und 25 µl Mastermix benetzt. Die PCR wurde in dem 7900HT Fast-Real-Time-PCR-Gerät gestartet. Hierbei wird zunächst die *Taq*-Polymerase bei 95 °C für 10 min aktiviert. Danach erfolgten 40 Zyklen, welche die Primerhybridisierung für 1 min bei 60 °C und die Denaturierung der DNA für 5 sek bei 95 °C beinhalteten.

Die Auswertung der quantitativen PCR erfolgte mittels der Software SDS 2.0. Hier wurde die ermittelte mRNA-Kopiezahl, bezogen auf 10⁴ mRNA-Kopienzahlen des Referenzgens Actin β (*ACTB*), normalisiert und virtuell errechnet.

2.8. Immunhistochemische Färbungen

Zur Identifizierung einer lokalisationspezifischen Beziehung von Leukozyten, Tumorzellen und Gefäße im Tumormikromilieu haben wir die BLEACH&STAIN-15-Marker-Multiplex-Fluoreszenz-Methode entwickelt. Im Folgenden wird die Methode der Immunhistochemie im Hellfeld sowie die der Multiplex-Fluoreszenz und dem hier mit inbegriffenem Prinzip der Färbung durch Opal-Fluorophore im Detail beschrieben.

Hellfeld-Immunohistochemie (hIHC).

Die Proben auf dem Objektträger wurden zunächst über Nacht bei 60 °C im Brutschrank inkubiert, um sie zu entparaffinieren. Anschließend wurden diese für 3 x 10 min in Xylol inkubiert und eine absteigende Alkoholreihe durchgeführt (99 %-, 96 %-, 80 %-H₂O_{dest.}). Das Gewebe wurde für 1,5 h bei 2 bar und 121 °C autoklaviert. Nach einer ersten Waschung der Schnitte mit TBS/T-Puffer für 5 min wurden diese mit Peroxidase für 10 min blockiert und der erste Antikörper aufgetragen. Für jeden Antikörper wurde die optimale Verdünnung und pH-Wert zuvor gemäß der Internationalen Arbeitsgruppe für die Validierung von Antikörpern (IWGAV) ausgetestet^{132,133}. Die Gewebeschnitte wurden für 1 h bei 37 °C im Brutschrank mit dem primären Antikörper inkubiert, anschließend für 2 x 5 min mit TBS/T-Puffer gewaschen und mit dem jeweiligen sekundären Antikörper für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach erneutem Waschen 2 x 5 min mit TBS/T-Puffer wurden die Proben für 10 min mit 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) gefärbt, einem Chromogen, welches bei einer Reaktion mit Peroxidase eine braune Färbung hervorruft. Zuletzt wurde eine Hematoxylin-Färbung durchgeführt, um eine Visualisierung des Zellkerns (blau) darzustellen. Die Schnitte wurden für 5 min mit Leitungswasser gebläut, um das überschüssige Hämatoxylin zu entfernen und mittels Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe gefolgt von Xylol fixiert. Nach dem Eindecken der Schnitte mit Eindeckfolie, durch das Eindeckgerät Tissue-Tek Film der Firma Sakura, waren die Schnitte bereit für weitere Untersuchungen unter dem Mikroskop.

PD-L1-Antikörpervalidierung in der Hellfeld-Färbung.

Aufgrund der vielen von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen PD-L1-Antikörper wurden Vergleichsexperimente von 4 vorausgewählten Antikörpern durchgeführt (Tabelle 9). Dazu wurden die vier PD-L1-Antikörper MSVA-711R, Cell Signaling Technology E1L3N, Roche SP142, und Roche SP263 auf verschiedenen Normalgeweben gefärbt, um die PD-L1-Expression zu vergleichen. Um die Spezifität und Sensitivität der Antikörper zu ermitteln, wurde ein Konsens-Set aus Tumoren mit einer eindeutigen PD-L1-Expression sowie einer deutlichen PD-L1-Negativität aus einem Tissue Microarray (TMA) mit 352 hochgradigen Blasenkarzinomen identifiziert. 4 konsekutive Schnitte des TMAs wurden anschließend mit jeweils einem Antikörper gefärbt und mittels eines Deep Learning-Algorithmus für die Zellerkennung und der PD-L1-Antikörpererkennung automatisch detektiert und mittels digitaler Bildanalyse ausgewertet. Die immunhistochemische Färbung des Antikörpers MSVA 711-R zeigte zu den drei anderen gefärbten TMAs eine Übereinstimmung der PD-L1-Positivität bei 96 Patienten (Tumoren). 188 Tumore zeigten eine vergleichbare PD-L1-Negativität zu den 3 Antikörpern E1L3N, SP142 und SP263. Die Färbung von E1L3N zeigt eine Übereinstimmung von 93 PD-L1-positiven und 199 PD-L1-negativen Patientenproben zu den drei anderen Antikörpern. Des Weiteren wies der Antikörper SP142 eine einheitliche Färbung der PD-L1-Expression (n = 102) sowie der PD-L1-negativen Tumore (n=200) zu den Antikörpern MSVA-711R, E1L3N und SP263 auf. Der vierte Antikörper SP263 zeigte eine Übereinstimmung der PD-L1-positiven (n = 98) und negativen (n = 192) Tumore zu den Antikörpern MSVA-711R, E1L3N und SP142 auf.

Tabelle 8: Auswahl der FDA-zugelassenen PD-L1-Antikörper

Antikörper Zielgen	Kennung	pH Wert	Verdünnung	Färbeposition	Opal Fluorophor
PD-L1	MSVA, Klon: MSVA-711R Cat#: 29126-RBM10-P	9.0	1:450	2	570
PD-L1	CellSignaling, Klon: E1L3N Cat#: #13684	9.0	1:200	2	570
PD-L1	Ventana/Roche, Klon: SP142 Cat#: 741-4860	9.0	RTU	2	570
PD-L1	Ventana/Roche, Klon: SP263 Cat#: 741-4905	9.0	RTU	2	570

Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie.

Um, im Gegensatz zu konsekutiven Untersuchung von verschiedenen Antikörpern im Hellfeld, multiple Antikörper simultan auf derselben Zelle zu untersuchen, wurde die Methode der Multiplex-Fluoreszenz-immunhistochemie verwendet (Tabelle 8). Hierzu wurden Gewebeschnitte von 4 µm Dicke für die Färbung angefertigt. Im Brutschrank wurde das Paraffin über Nacht bei 60 °C vom Gewebe entfernt. Um die Proteine des Gewebes zu demaskieren, wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert. Anschließend wurde das Gewebe für 10 min in 10 %igem Formalin inkubiert, erneut mit H₂O_{dest.} gespült und die Küvette mit dem für den jeweiligen Antikörper ermittelten Puffer befüllt und das Gewebe wurde für 1,5 h bei 2 bar und 121 °C autoklaviert. In den folgenden immunhistochemischen Färbevorgängen wurden die Gewebeschnitte jeweils mit 3 verschiedenen primären Antikörpern gefärbt und anschließend durch eine Gegenfärbung mit Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ergänzt. Die Verdünnungen des Antikörpers wurden vor jeder Färbung individuell ermittelt und folglich für ein 300 µl Endvolumen berechnet und mit einem „Antibody Diluent Block“ (Blockierungs-Puffer) angesetzt, um die endogene Peroxidase-Aktivität und somit eine unspezifische Bindung der Proteine mit dem Wasserstoffperoxid und die dadurch resultierende Hintergrundfärbung so gering wie möglich zu halten. Die Gewebeproben wurden 10 min in Blockierungs-Puffer in einer Feuchtkammer inkubiert. Anschließend wurde der Blockierungs-Puffer entfernt, 300 µl des verdünnten Antikörpers aufgetragen und 30 min in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschgang mit TBS/T-Puffer für 3 x 2 min, wurden die Schnitte für 10 min mit Meerrettichperoxidase (Horseradishperoxidase, HRP) inkubiert und anschließend wieder mit TBS/T-Puffer für 3 x 2 min gespült. Die Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie bietet unterschiedliche Techniken an, unter anderem die der Tyramide Signal Amplification (TSA). Durch das Verfahren dieser Opal-Signalverstärkung während der Multiplex-Fluoreszenz-immunhistochemischen Färbung ist es möglich, den Farbstoff wieder vom Gewebe zu entfernen und das Gewebe neu zu färben. Somit wird weniger Probematerial vom Patienten gebraucht, und das Gewebe kann mehrfach verwendet und auf unterschiedliche Weise analysiert werden. Das jeweilige Fluorophor-Opal (Akoya Bioscience) wurde in DMSO anhand der Produktbeschreibung verdünnt. Diese wurden anschließend bei einer 1:100-Verdünnung mit Amplification Diluent (Akoya Bioscience) auf das Gewebe aufgetragen und für 10 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach einer Spülung mit TBS/T-Puffer für 3 x 2 min wurde das Gewebe in pH 6-, pH

9-Puffer in der Mikrowelle bei 1.000 Watt für 5 min zum Kochen gebracht. Anschließend wurden die Proben bei 1.000 Watt für 5 min und weiteren 270 Watt für 5 min erhitzt. Diese Schritte wurden für alle benötigten Opale wiederholt (Tabelle 8). Die Zellkerne des Gewebes wurden mit DAPI gegengefärbt und mit Deckgläsern eingedeckt.

Tabelle 9: Liste der verwendeten Antikörper, pH-Werte, Verdünnungen und Opal-Fluorophore für die Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie

Antikörper Zielgen	Kennung	pH Wert	Verdünnung	Färbeposition	Opal Fluorophor	BLEACH&STAIN
CD68	DAKO, Klon: PG-M1 Cat#: IR613	6.0	RTU	1	520	Zyklus 1
PD-L1	MSVA, Klon: MSVA-711R Cat#: 29126-RBM10-P	9.0	1:450	2	570	Zyklus 1
PD-1	Abcam, Klon: EPR4877(2) Cat#: ab137132	9.0	1:150	3	650	Zyklus 1
CTLA-4	MSVA, Klon: CTLA4/6864R Cat#: 1493-RBM6-P0	9.0	1:50	4	520	Zyklus 2
CD11c	Abcam, Klon: EP1347Y Cat#: ab52632	9.0	1:450	5	570	Zyklus 2
CD163	Leica, Klon: M130/2164 Cat#: 9332-MSM4-P1	9.0	1:100	6	650	Zyklus 2
PanCK	MSVA, Klon: PAN-CK/4999R Cat#: RBMP514999-P	9.0	1:300	7, 3	520, 650	Zyklus 3
CD3	DAKO, Klon: CD3 Cat#: IR503	6.0	RTU	8	570	Zyklus 3
iNOS	Abcam, Cat#: ab15323	9.0	1:50	9	650	Zyklus 3
FOXP3	BioLegend, Klon: 206D Cat#: 320102	9.0	1:25	10	520	Zyklus 4
CD8	DAKO, Klon: C8/144B Cat#: IR623	6.0	RTU	11	570	Zyklus 4
CD4	DAKO, Klon: 4B12 Cat#: IR649	6.0	RTU	12	650	Zyklus 4
Ki67	MSVA, Klon: MKI67/6517R Cat#: 4288-RBM24-P1	9.0	1:50	13	520	Zyklus 5
CD31	MSVA, Klon: MSVA-031M Cat#: P16284	9.0	1:800	14	570	Zyklus 5
CD20	MSVA, Klon: IGEL/1497R Cat#: 931-RBM7-P1	9.0	1:150	15	650	Zyklus 5
(MSVA: MS Validated Antibodies GmbH, UKE: Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf, RTU: ready to use)						

2.9. BLEACH&STAIN-Framework

Um sequentiell 3+1-Marker-Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie-Färbungen auf dem gleichen Schnitt durchführen zu können, muss die vorherige Färbung vollständig und schonend von dem Gewebe entfernt werden bzw. die Restintensität der Fluorochrome bis auf das Hintergrundniveau abgesenkt werden. Die besondere Herausforderung liegt bei einem effizienten Bleichverfahren bei einer minimalen Gewebeschädigung, sodass viele weitere Färberunden ermöglicht werden können. Das in dieser Arbeit entwickelte BLEACH&STAIN-Verfahren vereint die komplette, gewebeschonende und schnelle Entfernung der gebundenen Antikörper, in dem das Gewebe auf 4 °C gekühlt, in Hydrogen-Peroxid inkubiert und mit 1.600 W bestrahlt wird. Hierzu wurde das Gewebe vor der ersten Färbung auf beschichtete Objektträger mit besonders guter Haftung aufgetragen (X-TRA-SLIDES, Leica Biosystems). Um die Deckgläser nach der ersten Färbung schonend zu entfernen, wurden die Objektträger über Nacht in Puffer (pH 7) gelegt. Wasserstoffperoxid wurde vor jedem Experiment frisch angesetzt. Eine Glaswanne wurde mit Reflektor-Folie beklebt, um den Effekt des Bleichens durch die Lichtstrahlung zu verstärken. Die Glaswanne wurde in einen Behälter mit Wasser und Eis gestellt (4 – 5 °C). Die Objektträger wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gespült, in die Glaswanne gelegt und mit H_2O_2 bedeckt. Eine 1.600-Watt-Lampe wurde ca. 60 cm von der Glaswanne entfernt angebracht und die Objektträger für 4 h gebleicht. Hierbei wurde das H_2O_2 stündlich durch frisches H_2O_2 getauscht (Abbildung 7). Die Emission des Antikörpers wurde nach 4 h unter dem Mikroskop gemessen, und bei einer Emission von 150 nm wurde das Experiment gestoppt, um das Gewebe zu schonen. Die Objektträger wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gespült und in der Mikrowelle für eine erneute Färbung behandelt.

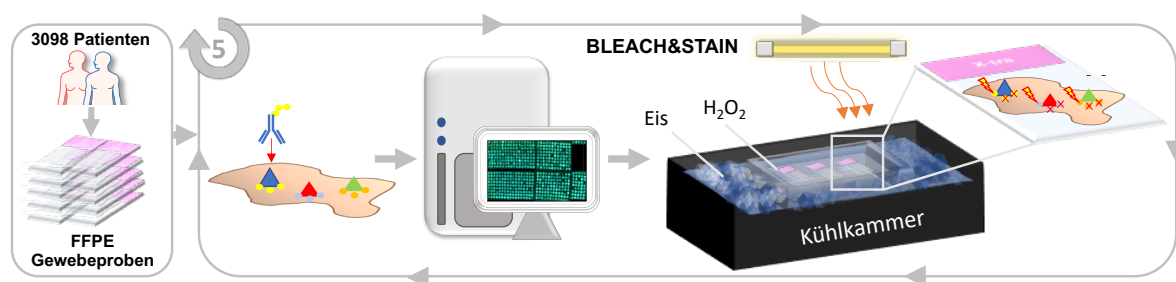


Abbildung 7: Darstellung der BLEACH&STAIN-Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie-Technologie.

(A) Die BLEACH&STAIN-Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie-Technologie ermöglicht einen hohen Durchsatz von 15 Biomarkern bei mehr als 3.000 Gewebeproben in weniger als einer Woche. Der Bleichprozess zwischen den einzelnen Zyklen ist ein Zusammenspiel von dem Bleichen mit Licht, Wasserstoffperoxid-Inkubation und Kühlung zur optimalen Gewebekonservierung.

2.10. Einsatz von künstlicher Intelligenz zur Bildanalyse

Die Analyse der digitalisierten TMAs wurde mit dem zuvor trainierten Deep Learning-basierten Faltungsnetzwerk für die Zellerkennung, Zellsegmentierung und Intensitätsmessung sowie Intensitätsverarbeitung der verwendeten Fluorophore im Bereich 0 - 255, also einem kontinuierlichen Wert für die Fluoreszenzsignalstärke durchgeführt (Abbildung 8A + C). Außerdem konnte mit diesen Daten der Zell-Zell-Abstand und eine darauffolgende Zell-Zell-Interaktionsanalyse unter Verwendung der Python-Version 3.8¹³⁴, der R-Version 3.6.1 (The R foundation)¹³⁵ und dem Visiopharm-Softwarepaket (Hoersholm, Dänemark) durchgeführt werden (Abbildung 8B). Die Intensität jedes einzelnen Fluorochroms wurde als Rohintensität für die einzelnen Zellen erfasst und anhand von Referenzzelllinien für die Immun-Checkpoints PD-L1, PD-1 und CTLA-4 normalisiert¹³¹.

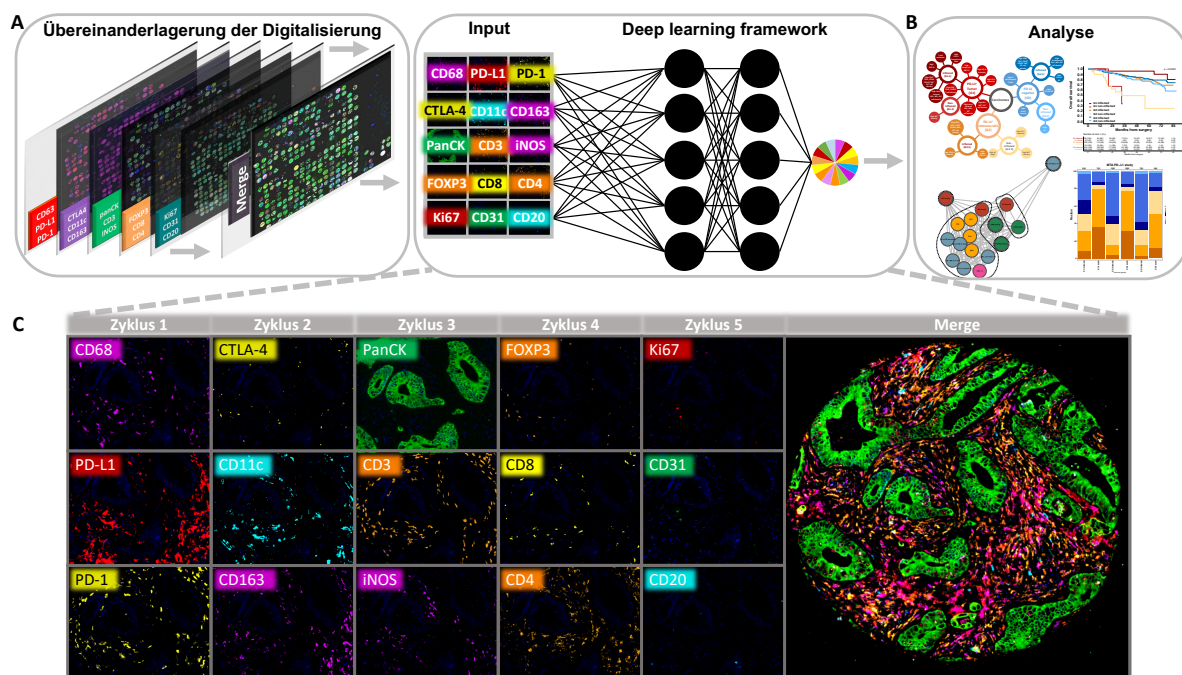


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Deep Learning-basierten Einsatzes von künstlicher Intelligenz zur Bildanalyse.

Ein auf Deep Learning-basierender Framework für die Bildanalyse ermöglicht die Interpretation der gefärbten Objektträger zur Untersuchung der biologisch relevanten räumlichen Anordnung. Die Digitalisierungen der einzelnen Färbezyklen werden übereinandergelegt (A), um anschließend den Marker-Input mit Hilfe eines Deep Learning-Frameworks zu Trainieren. Die in dieser Studie verwendeten Biomarker pro Zyklus sind in C abgebildet. Der Marker-Output der künstlichen Intelligenz wird letztendlich zur Analyse der Daten verwendet (B).

Trainingsaufbau der Deep Learning-basierten künstlichen Intelligenz mittels eines U-Net-Faltungsnetzwerks.

Die Marker-Positivität von PD-L1, PD-1, CTLA-4, panCK, CD68, CD163, CD11c, iNOS, CD3, CD8, CD4, FOXP3, CD20, Ki67 und CD31 wurde jeweils von einem Deep Learning-System (U-Net) bestimmt. Dieses Faltungsnetzwerk klassifizierte die Marker-Positivität auf der Grundlage mehrerer Parameter, die vom neuronalen Faltungsnetzwerk innerhalb der Trainingsmenge identifiziert wurden, wie dem Intensitätsniveau, der Verteilung der Markerintensität über die Zelle und die jeweilige Zellform. Die einzelnen Schwellenwerte wurden verwendet, um den ersten Trainingssatz zu markieren (Abbildung 9B), der bei Bedarf manuell korrigiert und zum Trainieren "provisorischer" Deep Learning-Systeme verwendet wurde, um den Trainingssatz kontinuierlich zu erweitern und die Genauigkeit des Deep Learning-Systems zu verbessern¹³⁶. Das endgültige Deep Learning-System (U-Net) für die Zelltyp-Identifizierung wurde auf 800 bis 2.500 Gewebeproben von mehr als 30 verschiedenen Karzinom-Entitäten (Abbildung 9D)) unter Verwendung der Deep Learning-Frameworks Keras und Tensorflow (in Python-Version 3.87) und des Visiopharm-Softwarepakets (Hoersholm, Dänemark) trainiert.

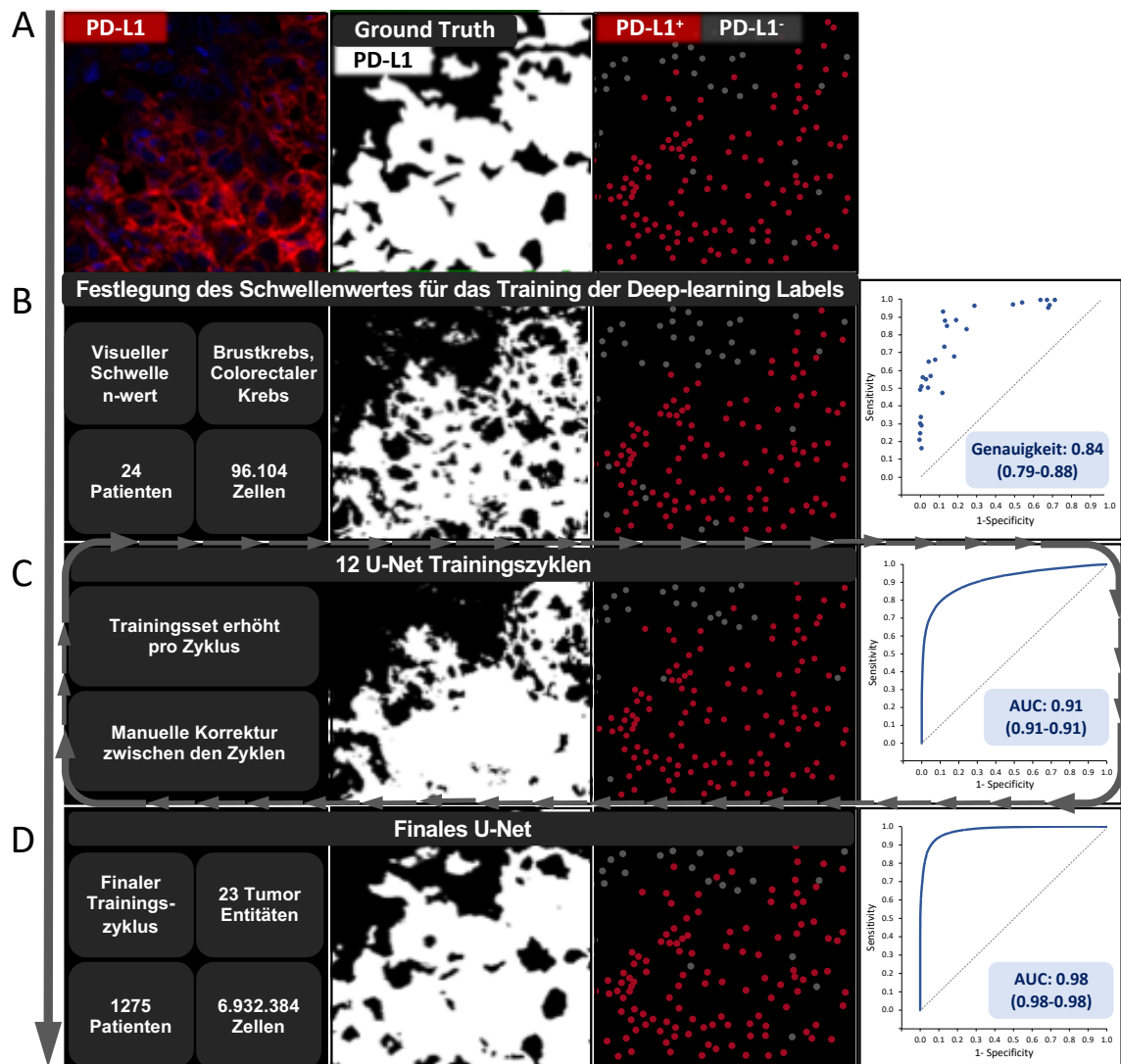


Abbildung 9: Trainingszyklus der künstlichen Intelligenz am Beispiel von PD-L1

Der „Ground Truth“ des Fluoreszenz-Signals wurde manuell annotiert, um einen Validierungssatz aus 90.321 Zellen ($n = 30$) zu erstellen, der zur Validierung der Klassifizierungsansätze verwendet wurde (B-D). (B) Die Annotationen des Trainings für den ersten Zyklus des U-Net (C) wurden mithilfe von Schwellenwerten erstellt. Die Genauigkeit der Schwellenwertbildung ist hier dargestellt (95 % Konfidenzintervalle in Klammern). (C) Die Leistungsfähigkeit und Genauigkeit des U-Net-Deep Learning-Frameworks nach dem ersten Trainingszyklus (ROC-Analyse mit AUC-Schätzungen (einschließlich 95 % Konfidenzintervalle) für die Validierungsmenge).

Maschinelles Lernen vs. Deep Learning - Zell-Segmentierung

Für die Validierung der Verwendung von künstlicher Intelligenz wurden verschiedene Algorithmen des maschinellen Lernens und des Deep Learnings verglichen. Dabei wurden zunächst 3635 Zellen einer CD8-, CD20- und FOXP3-Fluoreszenz-Immunfärbung manuell ausgezählt. Anschließend wurden diese Bereiche mit vier verschiedenen zellbasierten Algorithmen des maschinellen Lernens (Schwellenwert, K-Means, Bayesian, Decision Forest) und U-Net-Deep Learning-Algorithmus ausgezählt. Schlussendlich wurden die Werte der künstlichen Intelligenz mit den manuell ausgezählten Zellen verglichen und die Fehlerquote errechnet, wobei eine deutlich geringere Fehlerquote bei dem Deep Learning-basierten Algorithmus zu erkennen war (Abbildung 10).

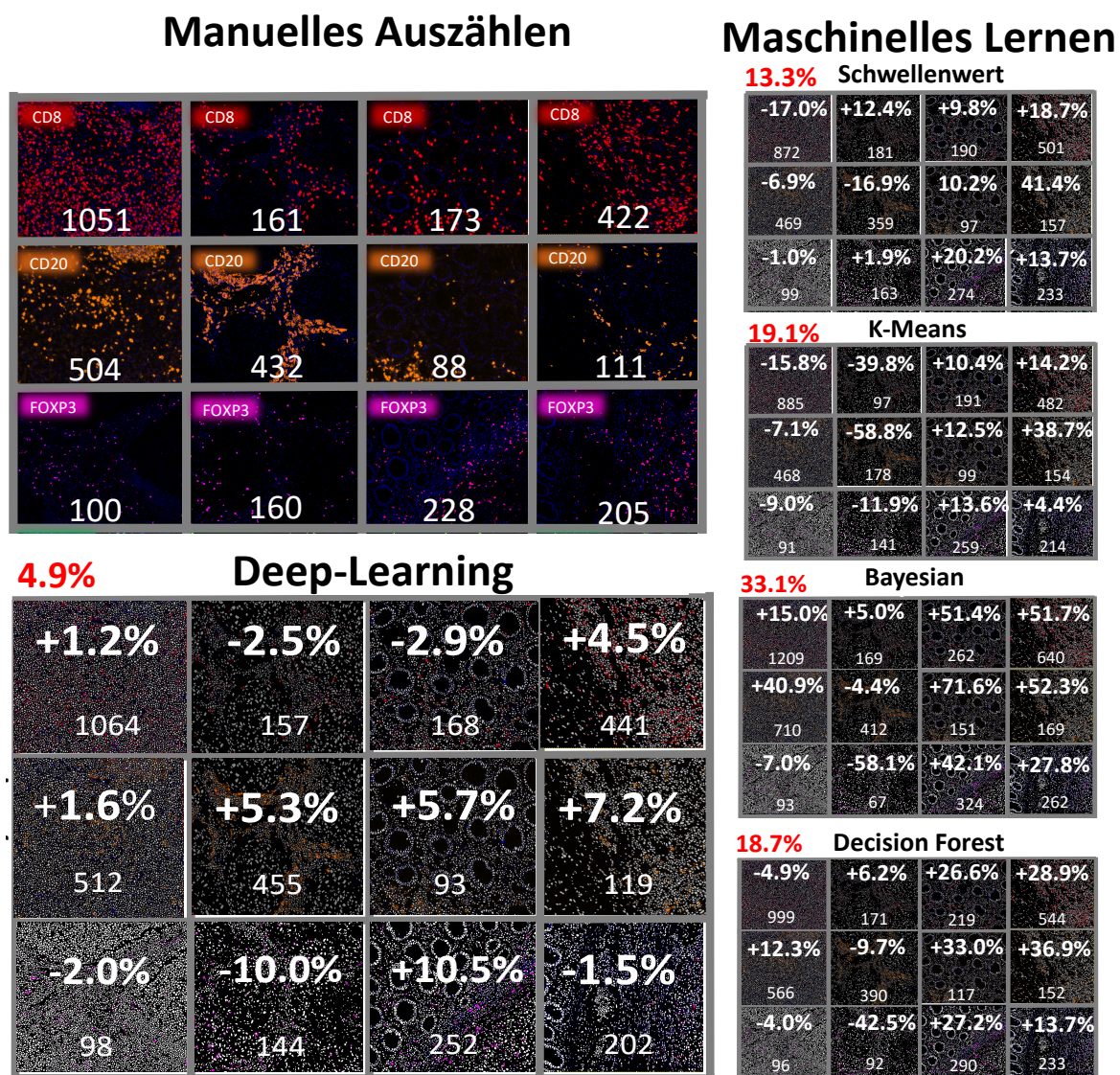


Abbildung 10: Zell-Trefferquote verschiedener Algorithmen der künstlichen Intelligenz

Getestet wurde die automatische Auszählung über vier verschiedene Algorithmen des maschinellen Lernens und einem Algorithmus des Deep Learnings gegen das manuelle Auszählen von Zellen.

Räumliche Zell-Zell-Kontakte (-Interaktionen).

Durch die Methode der Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie ermöglicht durch die Vielzahl von Antikörpern pro Zelle und der daraus resultierenden Vielzahl von Leukozyten (sub-) Populationen die räumliche Lagebeziehung der Zellen *in situ* zu untersuchen. Dieses Verständnis macht es möglich, räumliche Verhältnisse in dem Tumormikromilieu zu verdeutlichen und auch *in situ* Mehrfachfärbungen, durch verschiedene Marker, darzustellen. Die räumliche Darstellung der Zellen gibt Aufschluss darüber, welche Zelltypen (z. B.: Immunzellen, Tumorzellen) miteinander interagieren, in welchem proportionalen Verhältnis sie zueinanderstehen, welchen exakten Abstand sie voneinander und zu z. B. vaskulären Strukturen haben. Solche Erkenntnisse lassen sich nicht durch übliche Methoden wie der Durchflusszytometrie gewinnen. Hier werden die Zellen des gesamten Gewebes vermischt und nicht voneinander differenziert.

2.11. Statistische Analysen

Statistische Analysen der Daten wurden mit der R-Version 3.6.1 (The R Foundation) und dem JMP Pro 15 Software-Paket (SAS Institute Inc., NC, USA) durchgeführt. Für die Differenzierung der 3 Hauptgruppen wurde ein Schwellenwert für die PD-L1-Expression auf Tumor- ($\geq 1\%$) bzw. Immunzellen ($\geq 5\%$), anhand der von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen Tests festgelegt. Für die Einteilung der Gruppen in „entzündet“ und „nicht-entzündet“ wurde ein X-Shift- und ein Markov Clustering (MCL) mit einer Korrelation nach Pearson durchgeführt. Um Unterschiede zwischen Gruppen zu finden, wurde jeweils ein Anova und/oder ein P-Wert berechnet. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert unter 0,05 wurden als signifikant angesehen.

X-Shift-Clustering.

Eine genaue Identifizierung von Zellpopulationen ist ein Schlüsselpunkt für multidimensionale Einzelzelluntersuchung im Tumormikromilieu. Um biologisch relevante Phänotypen und Subpopulationen in dem Einzelzell-Datensatz dieser Studie herauszufinden und voneinander abzugrenzen, wurde unter anderem ein X-Shift-Clustering angewendet¹³⁷ (VorteX.jar, Java™ Plattform). Der X-Shift-Clustering-Algorithmus wurde entwickelt, um komplexe Datensätze durch einen gewichteten K-nearest neighbor density estimation (KNN-DE, Die Nächste-Nachbarn-Klassifikation; Schätzung von Wahrscheinlichkeits-Dichtefunktionen) in einem 2- bzw. 3-dimensionalen Graphen anzuordnen. Sobald der Graph erstellt wird, wird die Dichte der einzelnen Zell-Events genutzt, um die Daten in Cluster anzuordnen. Somit konnten in dieser Studie drei verschiedene Hauptgruppen differenziert werden (G1, G2, G3), und diese dann nochmals in jeweils zwei Untergruppen unterteilt werden (G1.1 - G3.2).

Markov Clustering (MCL).

Die Markov Clustering ist eine schnelle, skalierbare und unüberwachte Methode, um Netzwerke darzustellen. Wie auch beim X-Shift-Clustering werden bei dieser Methode Gemeinsamkeiten von Datenpunkten (in diesem Fall von Zelltypen zueinander) in einer Netzwerk-Grafik dargestellt. Mit dieser Methode lässt sich durch die Vernetzung der einzelnen Datenpunkte erkennen, wie die Zelltypen im Tumormikromilieu zueinanderstehen, ob es Ausreißer gibt und Gemeinsamkeiten (<https://CRAN.R-project.org/package=MCL>).

Cluster-Heatmap & Korrelationsmatrix.

Durch eine Cluster-Heatmap können analysierte Daten anhand ihres Wertes durch eine Farbskala visualisiert werden. Die Daten werden erst normalisiert (Min-max- Normalisierung) und anschließend mittels der Clustering-Methode hierarchisch anhand ihrer Ähnlichkeiten angeordnet. Die Variablen werden hierbei auf der X- und Y-Achse gleichermaßen aufgetragen und bilden jeweils eine Korrelation zueinander, die Gruppen von Messwerten darstellen und als Kästchen dargestellt werden. Bei einer Übereinstimmung der Daten zueinander beträgt die Korrelation 1. Je mehr sich die Variablen zueinander unterscheiden, desto weiter nähert sich der Wert in Richtung -1. Zur Vereinfachung der Dateninterpretation werden diese Werte meist einer Farbskala zugeordnet (z. B.: rot-blau, weiß-schwarz).

Kaplan-Meyer-Kurven.

Überlebensraten von Patientenkohorten werden mittels einer Kaplan-Meyer-Kurve dargestellt. Hierbei lässt sich analysieren, wie sich zwei oder mehrere Parameter auf das Überleben der Patienten auswirken. Bei dem Erfassen der Daten ist es wichtig zu wissen, in welchem Zeitraum der Patient unter Beobachtung/Behandlung stand und ob es einen Endpunkt, der sich als Tod oder Kontaktabbruch äußern kann, gibt. Das Ziel dieser Methode ist es, eine Prognose des jeweiligen Parameters vorherzusagen. In dieser Studie haben wir die Prognose der einzelnen Marker unter Verwendung von Kaplan-Meyer-Analysen für den Patienten so untersucht, dass wir jeden Marker anhand seines Medians oder Mittelwert in zwei Gruppen (High/Low), oder nach dem 25% Quantil aufgeteilt haben.

3. Ergebnisse

3.1. BLEACH&STAIN-Validierung.

In dieser Studie wurde eine neue BLEACH&STAIN-Multiplex-Fluoreszenz-immunhistochemische Methode entwickelt, die es ermöglicht, Gewebe auf eine schnelle und schonende Art mit 15 Markern in mehreren Etappen zu färben. Hierbei wurden alle Einzelvorgänge des Experiments, von der Auftragung des Gewebes auf den Objektträger bis hin zur Digitalisierung der einzelnen Bilder, genau abgestimmt. Dabei spielte die Schonung des Gewebes eine maßgebliche Rolle, um die Epitope für die folgenden Färberunden zu erhalten. Ein Zusammenspiel von Bleichen mit Wasserstoffperoxid und Licht sowie einer Kühlung des Gewebes bei 4 °C führte dazu, dass der Fluoreszenzfarbstoff des vorherigen Zyklus abgelöst werden und neue Fluoreszenzfarbstoffe für den nächsten Zyklus aufgetragen werden konnten. Diese Vorgehensweise führte dazu, dass eine Fluoreszenz-Signalverstärkung in andere Kanäle und eine Überlappung der Marker innerhalb der 5 Färbezyklen ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 11A). Die im Anschluss gemessenen Signal- und Hintergrund-Fluoreszenzwerte der repräsentativen Marker CD8 und panCK zeigten lediglich einen geringen Abfall des Signals über alle 5 Färbezyklen (1,6 % - 2,5 %, Abbildung 11B). Zusätzlich wurde geprüft, ob unterschiedliche Zelltypen des ersten und letzten Zyklus durch Färbeartefakte miteinander korrelierten. Hier zeigte eine Korrelationsmatrix, dass Zellen mit einer CD68-Expression (Zyklus 1, Makrophagen) und Zellen mit einer CD20-Expression (Zyklus 5, B-Zellen) nicht miteinander korrelierten und somit keine Ko-Expression vorhanden war (< 0,1 %, Abbildung 11C).

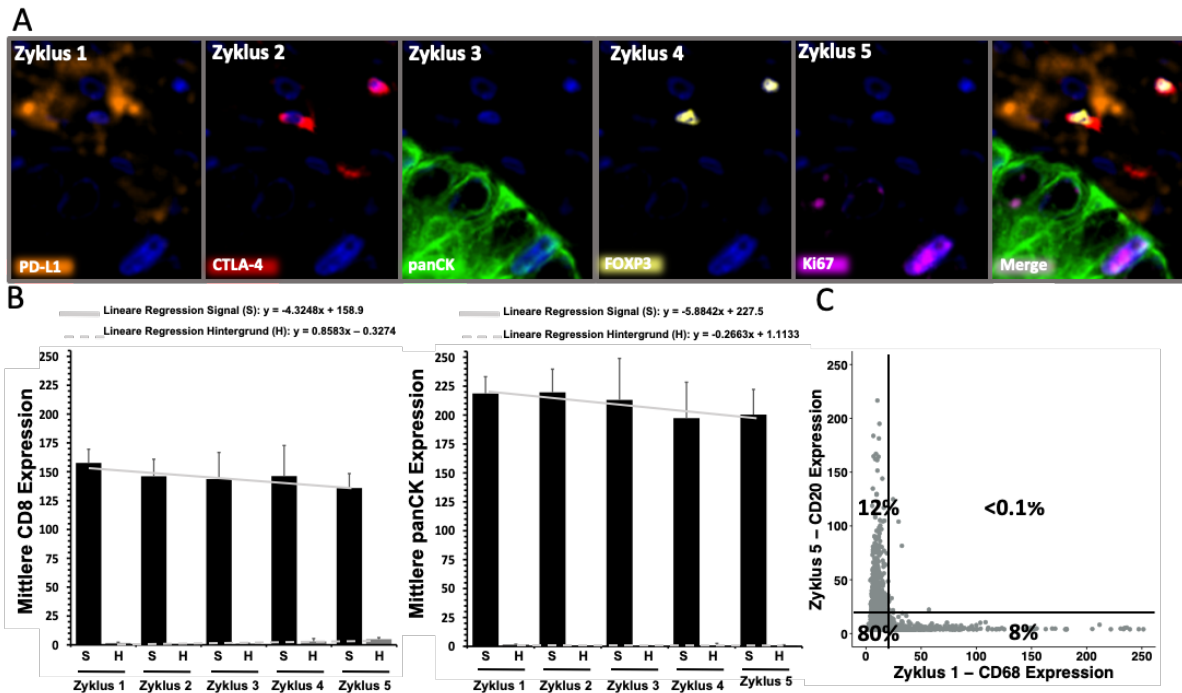


Abbildung 11: Validierung der BLEACH&STAIN-Methode mittels Signal-to-noise.

(A) Digitalisierung der fünf aufeinanderfolgenden BLEACH&STAIN Färbezyklen (400x Vergrößerung)
 (B) Die Validierung des Signals und Hintergrundrauschens durch die mittlere Expression (Schwarz) und die Hintergrundintensität (grau) von CD8 (links) und panCK (rechts) über die 5 Färbezyklen. Hier wurde eine lineare Regression durchgeführt, um Trends in der Akkumulation des Hintergrunds und des Signals in Verbindung mit der Zykluszahl aufzuzeigen.
 (C) Eine Korrelationsmatrix der Expression von CD68 (erster Zyklus) und CD20 (fünfter Zyklus) zeigt, dass Marker der ersten und letzten Färberunde nicht ko-exprimieren.

Eine weitere Schlüsselkomponente für eine erfolgreiche BLEACH&STAIN-Etablierung war es, den Ablauf der Färbung, des Scannens und das Übereinanderlegen der finalen Digitalisierung schnellstmöglich zu gestalten. Dabei war es wichtig, zeiteffizient eine Reduktion des Färbesignals zu erlangen, ohne das Gewebe für die nächste Färberunde zu schädigen aber auch keine Rückstände des Signals auf den nächsten Färbezyklus zu übertragen. Hier haben mehrere Validierungsexperimente gezeigt, dass eine Kombination aus verschiedenen Vorbehandlungen des Gewebes zu einer idealen Färbequalität führt. Hierzu zählen folgende Punkte:

1. Die Nutzung eines Autoklavs und einer absteigenden Alkoholreihe, um die Epitope für die Antikörperbindung zu demaskieren (Heat-induced epitope retrieval, HIER). Hierbei werden die quervernetzten Proteine des in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebes teilweise wieder gelöst und die Antigene freigelegt.

2. Eine vorausgehende hohe Validierung jedes Markers, seiner Spezifität und Färbequalität auf verschiedenen Kanälen.
3. Das Bleichen des Gewebes mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bei 4 °C und einer Bestrahlung mit einer 1.600-W-Halogen-Lampe (Abbildung 12A)
4. Die Verwendung von positiv geladenen Objektträgern, einhergehend mit einer erhöhten Haftung des Gewebes (Abbildung 12B).

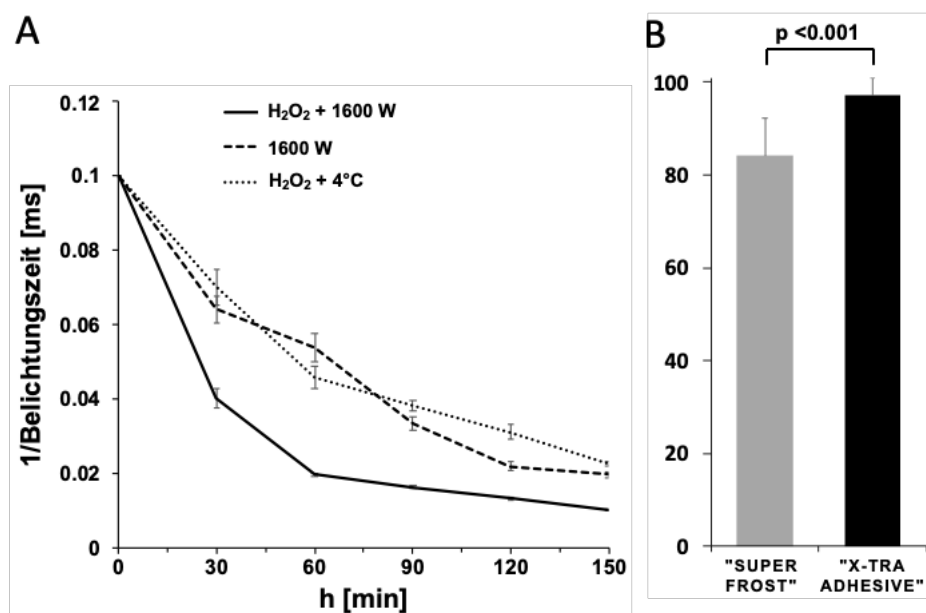


Abbildung 12: Validierung der BLEACH&STAIN-Methode – Wahl der Reagenzien.

Zusätzliche Validierungen des BLEACH&STAIN-Verfahrens wurden durchgeführt.

(A) Das Gewebe wurde für 150 min unter Verwendung verschiedener Bleichverfahren belichtet.

(B) Es wurden zwei verschiedene Objektträger für eine bessere Haftung des Gewebes überprüft. Der Vergleich von „Super-Frost“- (Thermofisher) und „X-tra-adhesive“ Objektträgern (Leica) zeigte einen geringeren Gewebeverlust bei der Verwendung von „Super-Frost“-Objektträgern.

3.2. PD-L1-Antikörpervalidierung in der Hellfeld-Färbung.

Der Vergleich der vier PD-L1-Antikörper MSVA-711R, E1L3N, SP142 und SP263 zeigte eine ähnlich hohe Spezifität und Sensitivität und somit eine vergleichbare Antikörper-Leistung (Tabelle 10). Repräsentative Bilder des verwendeten Normalgewebes visualisieren den Vergleich der immunhistochemischen Färbung mit den vier ausgewählten PD-L1-Antikörpern (Abbildung 13). Alle vier Antikörper zeigen eine organotypische PD-L1-Färbung im Epithel der Tonsille, der Plazenta, dem Corpus luteum des Ovars, Makrophagen und Blutgefäßen. Die vergleichbar schwächere Färbung des Antikörpers SP142 geht mit einer früheren Studie von Buttner et al. einher⁶⁹.

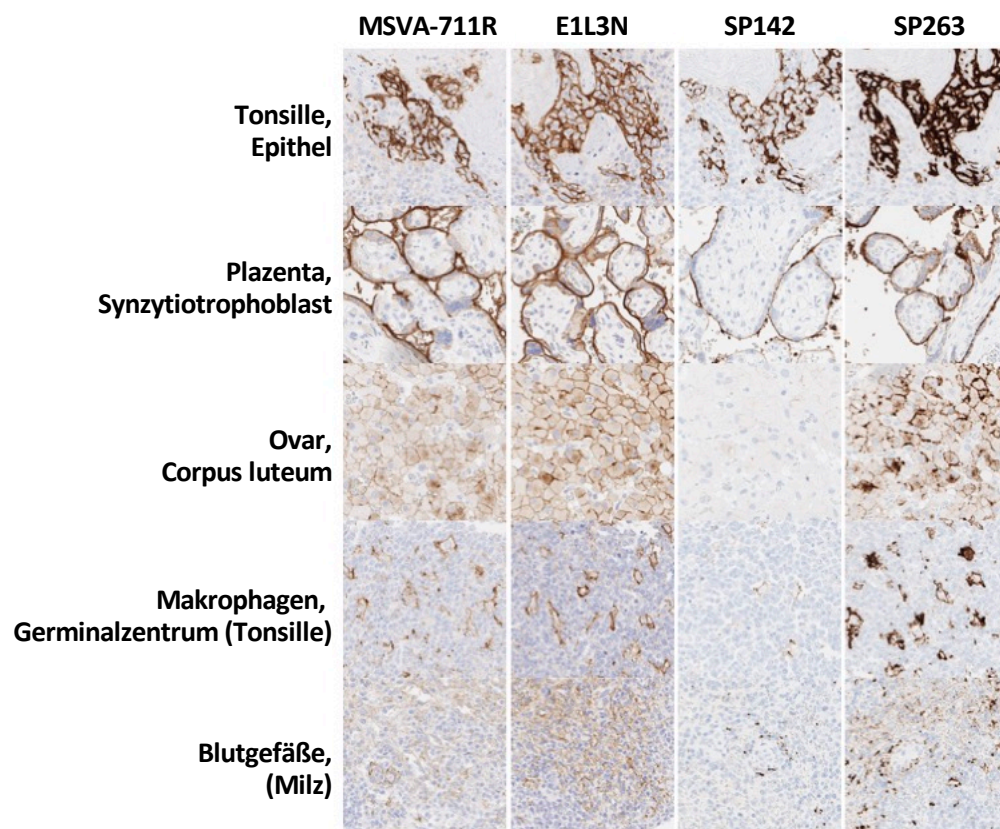


Abbildung 13: PD-L1-Antikörpervergleich im Normalgewebe.

Der Vergleich der vier PD-L1-Antikörper MSVA-711R, E1L3N, SP142 und SP263 zeigte eine ähnlich hohe Spezifität und Sensitivität und somit eine vergleichbare Antikörper-Leistung

Tabelle 10: Sensitivität und Spezifitätsmessung der 4 PD-L1-Antikörper.

Konsens-Zusammenstellung: Tumore mit deutlich positiver oder negativer PD-L1-Expression wurden genutzt, um die Spezifität und Sensitivität der ausgewählten Antikörper zu messen (Antikörper-Leistung).

		PD-L1 Antikörper			
		MSVA-711R	E1L3N	SP142	SP263
Konsens	PD-L1 positiv (n)	96	93	102	98
Zusammenstellung	PD-L1 negativ (n)	188	199	200	192
Antikörper Leistung	Richtig-positiv (n)	92	92	92	92
	Richtig-negativ (n)	187	187	187	187
	Falsch-positiv (n)	1	12	13	5
	Falsch-negativ (n)	4	1	10	6
	Sensitivität (%)	95.8	98.9	90.2	93.9
	Spezifität (%)	99.5	94.0	93.5	97.4

3.3. Auswertung der Antikörperherstellung

In dieser Studie wurde der monoklonale Antikörper FOXP3 hergestellt. Das Forkhead-Box-Protein P3 (FOXP3) ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Expression bestimmter Proteine in regulatorischen T-Zellen des Immunsystems zuständig ist. Hier spielt er eine große Rolle bei der Immunantwort auf Allergene und Mikroflora sowie Immunreaktionen auf Infektionserreger und Tumore. Loss-of-function-Mutationen des FOXP3-Gens können außerdem beim Menschen zu Autoimmunkrankheiten führen¹³⁸. Da FOXP3 als Protein der regulatorischen T-Zellen einen interessanten Marker im Tumormikromilieu darstellt, wurde er in dieser Studie eigens mittels Hybridomtechnologie hergestellt. Der hier hergestellte monoklonale Klon 1A6 (FOXP3 human monoclonal) zeigte eine spezifische Färbung in der Hellfeld-Immunhistochemie der Kontrollzelllinie und den regulatorischen T-Zellen im interfollikulären Bereich der Tonsille (Abbildung 14A). In der Fluoreszenzfärbung auf Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Gewebe zeigte sich ebenfalls eine spezifische Färbung der regulatorischen T-Zellen durch den FOXP3-Antikörper (Abbildung 14B). Die Western-Blot-Ergebnisse zeigten eine Bande bei 47 kDa ab einer Proteinkonzentration von 5 µg (Abbildung 14C). Es wurden jeweils 30-15-10-5 µg des Proteins auf die Membran aufgetragen und mit dem Überstand des monoklonalen FOXP3-Klons, im Verhältnis 1:1000 verdünnt, gefärbt. Das Hauskeeping-Gen alpha-Tubulin wurde zum Nachweis des gleichmäßigen Ladens des Blots verwendet und liegt bei einer Größe von 50 kDa. Das Zielgen

FOXP3 wurde durch eine RT-PCR in der Kontrollzelllinie nach der Transfektion von HeLa-Zellen nachgewiesen ($p=0.036$, Abbildung 14D). Hierbei wurde das Housekeeping-Gen ACT β als Referenzgen verwendet, welches als Housekeeping-Gen in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle vorhanden ist.

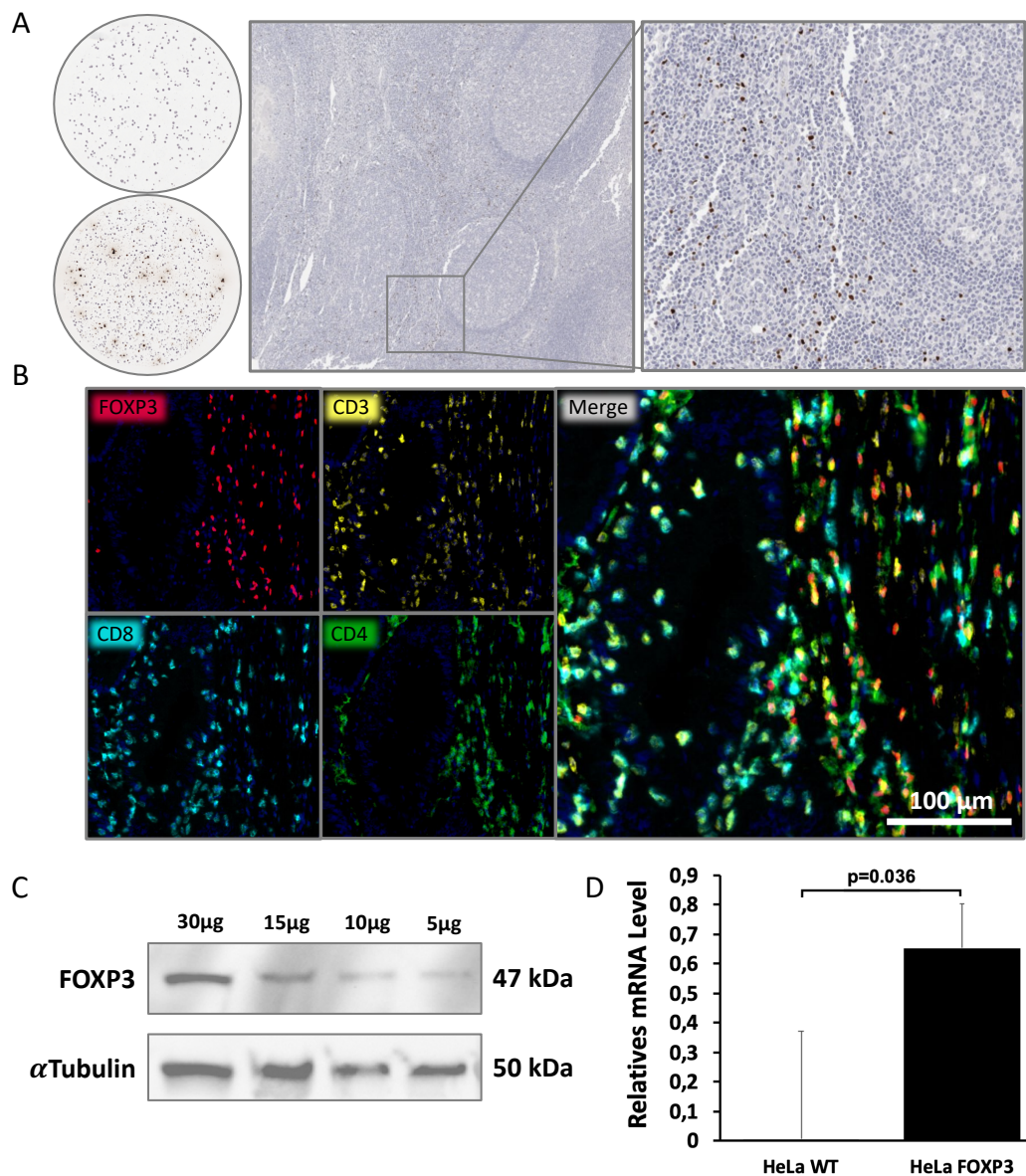


Abbildung 14: Auswertung der FOXP3-Antikörperherstellung

A) FOXP3-immunhistochemische Färbung im Hellfeld. In der HeLa-FOXP3-Kontrollzelllinie und in dem interfollikulären Bereich der Tonsille ist eine Färbung der regulatorischen T-Zellen zu erkennen. B) In der Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie des Colons ist eine Färbung der regulatorischen T-Zellen (rot) durch den FOXP3-Antikörper zu erkennen. C) Western-Blot-Analyse des FOXP3-Proteins, aus der Transfektion von FOXP3 in HeLa als Kontrollzelllinie für die immunhistochemischen Färbungen. D) zeigt die virtuelle mRNA-Expression des FOXP3-Gens in der HeLa-Zelllinie dar.

3.4. Deep Learning-basierte Struktur für die automatische PD-L1-Quantifizierung

Zur Unterstützung der Quantifizierung der 15 verschiedenen Zelltypmarker dieser Studie wurden neuronale Faltungsnetze (U-Net, eines für jeden Marker) für die vollautomatische Identifizierung von Zelltypen trainiert und validiert (Abbildung 9A, 10). Die manuelle Schwellenwertbestimmung der einzelnen Marker bringt den Nachteil mit sich, diese für jeden Patienten, je nach Färbequalität und Zustand des Gewebes, einzeln anpassen zu müssen. Durch die Deep Learning-basierte Intensitätsbestimmung ist die Möglichkeit gegeben, eine kontextbasierte Identität eines positiven Signals zu erfassen: Starke, falsch-positive Signale werden herausgefiltert und schwach-positive Signale werden von der künstlichen Intelligenz immer noch erfasst. Für die Bestätigung dieser Hypothese wurden die U-Net-basierte Zelltypidentifikation und verschiedene intensitäts-basierte manuelle Schwellenwerte (10, 20, 30, 40, 50, 100) an 30 Patientenproben mit unterschiedlichen Markerintensitäten getestet. Die Erkennung der zelltypspezifischen Marker zeigte eine signifikant höhere Genauigkeit bei der Verwendung des U-Net-Faltungsnetzwerks als bei den manuell gesetzten Schwellenwerten (je $\leq 0,001$, Abbildung 15). Diese manuelle Beurteilung einer Zelltypidentifizierung kommt einer konventionellen Bewertung, durch das geschulte Auge eines erfahrenen Pathologen, sehr nahe. Die Validierung der automatisierten BLEACH&STAIN-Methode für die automatische PD-L1-Erkennung auf Tumor- und Immunzellen stimmte im hohen Maße mit den Ergebnissen der konventionellen Hellfeld-immunhistochemischen Auswertung von Prof. Dr. Guido Sauter überein (Abbildung 15C).

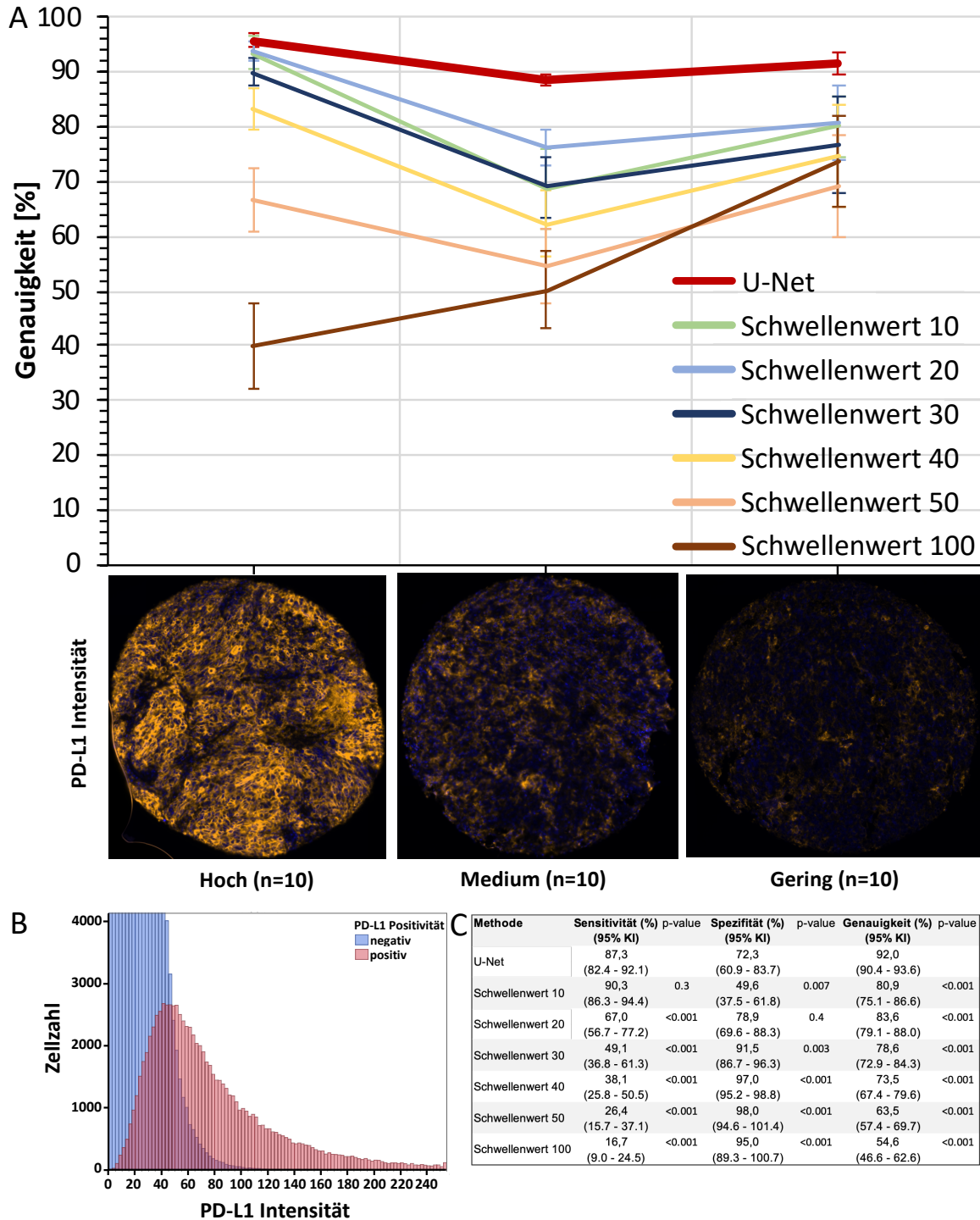


Abbildung 11: U-Net-basierte- vs. manuelle Zellerkennung.

A) U-Net-basierte Zelltypidentifikation und verschiedene intensitäts-basierte manuelle Schwellenwerte (10, 20, 30, 40, 50, 100) getestet an 30 Patientenproben mit unterschiedlichen Markerintensitäten. Die Erkennung der zelltypspezifischen Marker durch das U-Net-Faltungsnetzwerk zeigte eine signifikant höhere Genauigkeit als bei den manuell gesetzten Schwellenwerten (B + C).

3.5. Dichte der Marker-positiven Zellen und prozentualer Anteil der Immuncheckpoints innerhalb 44 Entitäten

Eine Patientenkohorte von 3.098 (88 %) aus 3.536 Gewebeproben unterschiedlicher Karzinome wurden in dieser Studie verwendet und analysiert. Die übrigen 438 Tumore wurden von dieser Studie aus Mangel an repräsentativen Tumorzellen ausgeschlossen. Zuerst wurde die Dichte der Immunzellmarker innerhalb der 44 Entitäten dargestellt. Die Dichte aller untersuchten Immunzellmarker war besonders hoch beim medullären Mammakarzinom (5774 Zellen/mm²), aber auch beim Nierenzellkarzinom (3652 Zellen/mm²). Eine geringe Dichte der Immunzellmarker war beim kleinzelligen neuroendokrinen Tumor (113 Zellen/mm²), sowie das Adenokarzinom der Prostata Gleason 3+3 zu erkennen (338 Zellen/mm²) (Abbildung 16).

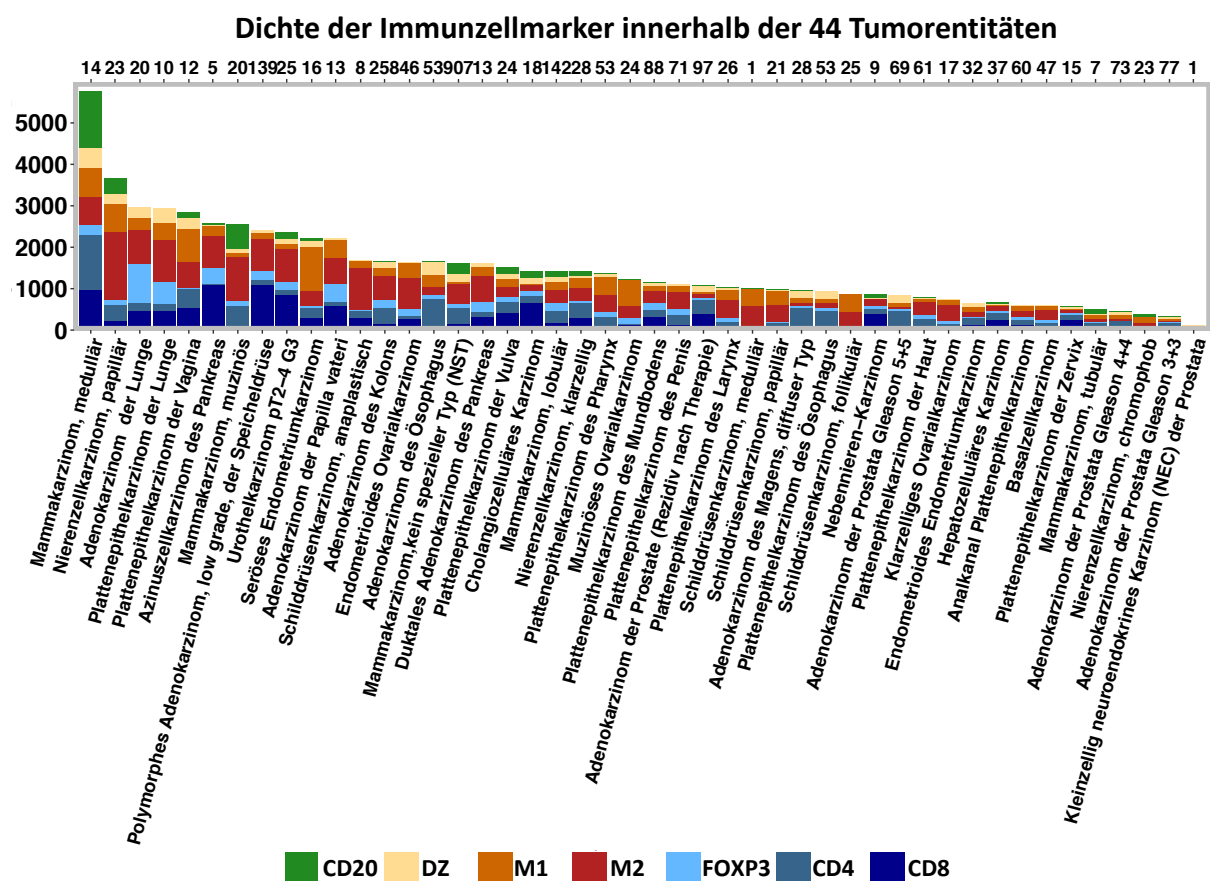


Abbildung 16: Dichte der Immunzellmarker innerhalb 44 Entitäten

Die Dichte der Immunzellmarker CD20, Dendritische Zellen (DZ), M1-Makrophagen (M1), M2-Makrophagen (M2), FOXP3 T-Zellen, CD4 T-Zellen und CD8 T-Zellen wurde innerhalb der 44 Tumorentitäten untersucht.

Anschließend wurden in denselben Entitäten die Expression der Immuncheckpoints PD-L1, PD-1 und CTLA-4 auf Tumor- und Immunzellen untersucht. Hierbei fiel auf, dass alle analysierten Tumorentitäten (100 %) von PD-1 auf T-Zellen aufwies. 98 % zeigten eine Expression von PD-L1 auf Makrophagen/Dendritischen Zellen (DZ), 83 % wiesen eine Expression von PD-L1 auf Tumoren auf und lediglich 46% eine Expression von CTLA-4 auf T-Zellen (Abbildung 17).

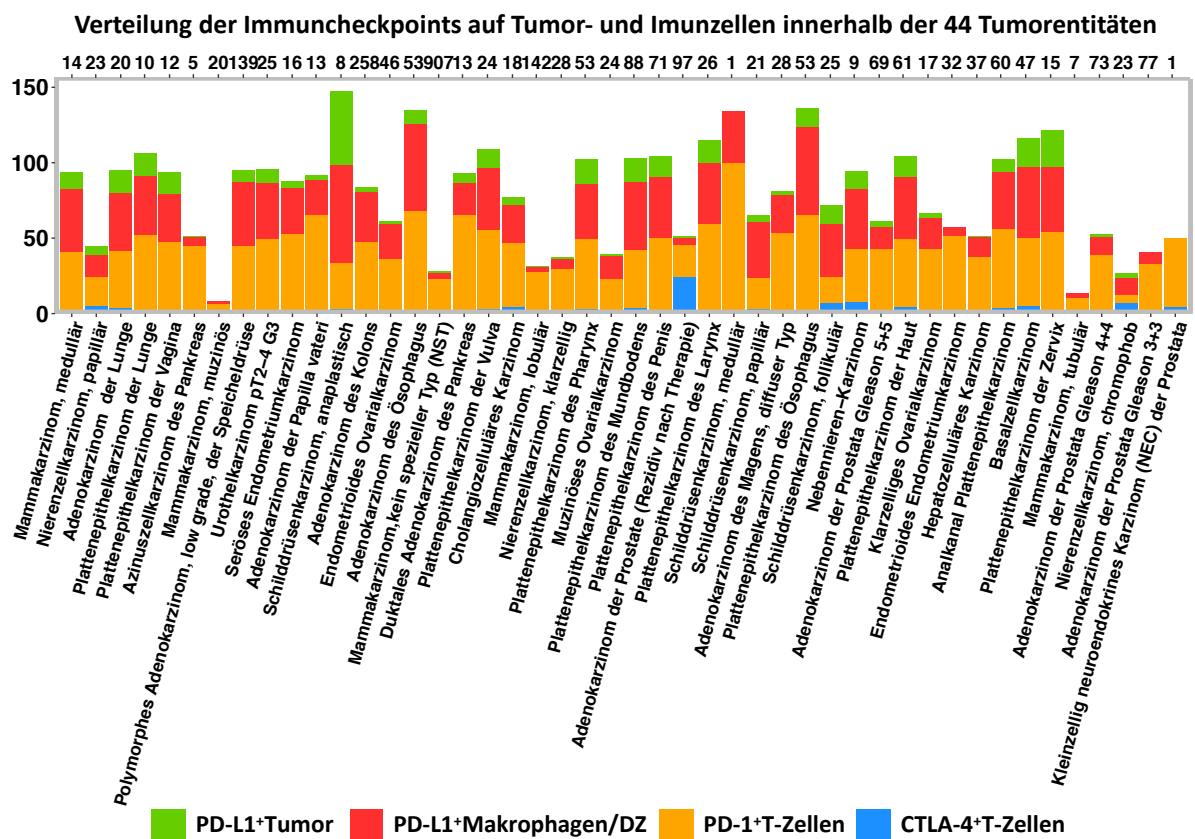


Abbildung 17: Verteilung der Immuncheckpointexpression innerhalb 44 Entitäten

Die prozentuale Verteilung der Immuncheckpoint-Expression auf Tumor- und/oder Immunzellen wurde innerhalb der 44 Tumorentitäten untersucht.

3.6. Gruppierung von Tumoren basierend auf dem PD-L1-Status und der Quantität inflammatorischer Zellen

Im Rahmen der Analyse der automatischen PD-L1-Erkennung wurden drei Gruppen über X-Shift Clustering identifiziert (Abbildung 18, 19):

Gruppe 1: PD-L1⁺-Tumor- und Immunzellen (G1, n = 817)

Gruppe 2: PD-L1⁺-Immunzellen (G2, n = 1.196)

Gruppe 3: PD-L1⁻-Immunphänotyp (G3, n = 1.085)

X-Shift- und MCL-Clustering zeigte eine zusätzliche Differenzierung der drei Hauptgruppen in jeweils zwei Untergruppen anhand der Dichte von Immunzellen (T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen, Abbildung 18).:

Gruppe 1.1: Entzündete PD-L1⁺-Tumor- und Immunzellen (G1.1, n = 444)

Gruppe 1.2: Nicht-entzündete PD-L1⁺-Tumor- und Immunzellen (G1.2, n = 373)

Gruppe 2.1: Entzündete PD-L1⁺-Immunzellen (G2.1, n = 634)

Gruppe 2.2: Nicht-entzündete PD-L1⁺-Immunzellen (G2.2, n = 562)

Gruppe 3.1: Entzündete PD-L1⁻-Immunphänotypen (G3.1, n = 491)

Gruppe 3.2: Nicht-entzündete PD-L1⁻-Immunphänotypen (G3.2, n = 594)

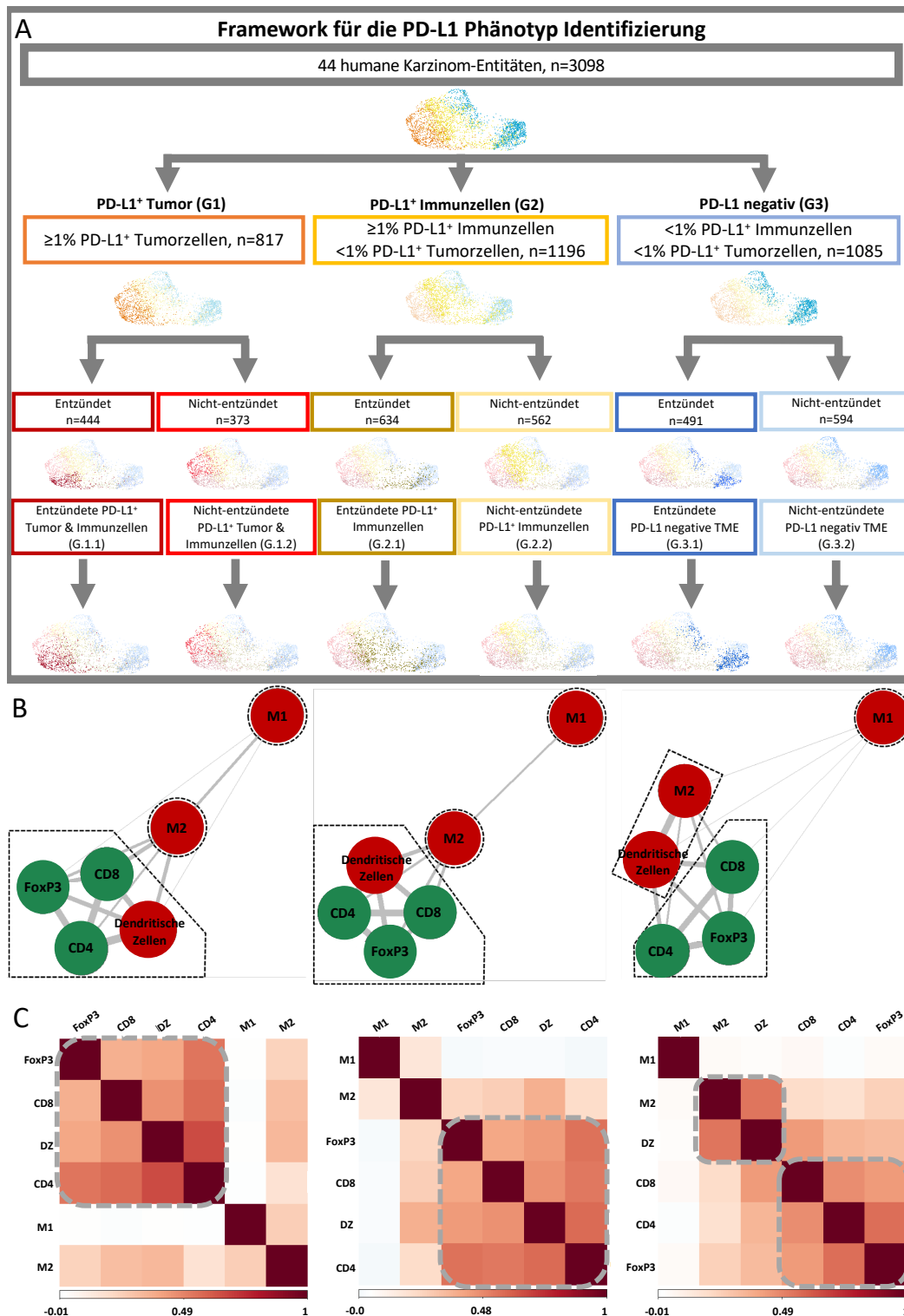


Abbildung 18: Charakterisierung der sechs Gruppen mittels X-Shift-, MCL-Clustering und Heatmap-Identifizierung.

A) Ein Flussdiagramm zeigt die Charakterisierung der drei wichtigsten PD-L1-Phänotypen und die weitere Klassifizierung in Entzündet und Nicht-entzündet mittels X-Shift-Clustering.

(B) Ein MCL-Cluster beschreibt die Beziehung der Dichte einzelner Immunzellmarker zwischen den Phänotypen innerhalb der drei Haupt-PD-L1-Gruppen G1 - G3.

(C) Eine Heatmap definiert die verschiedenen Untergruppen und zeigt eine unterschiedliche Gewichtung der Immunzellen innerhalb dieser 3 Gruppen.

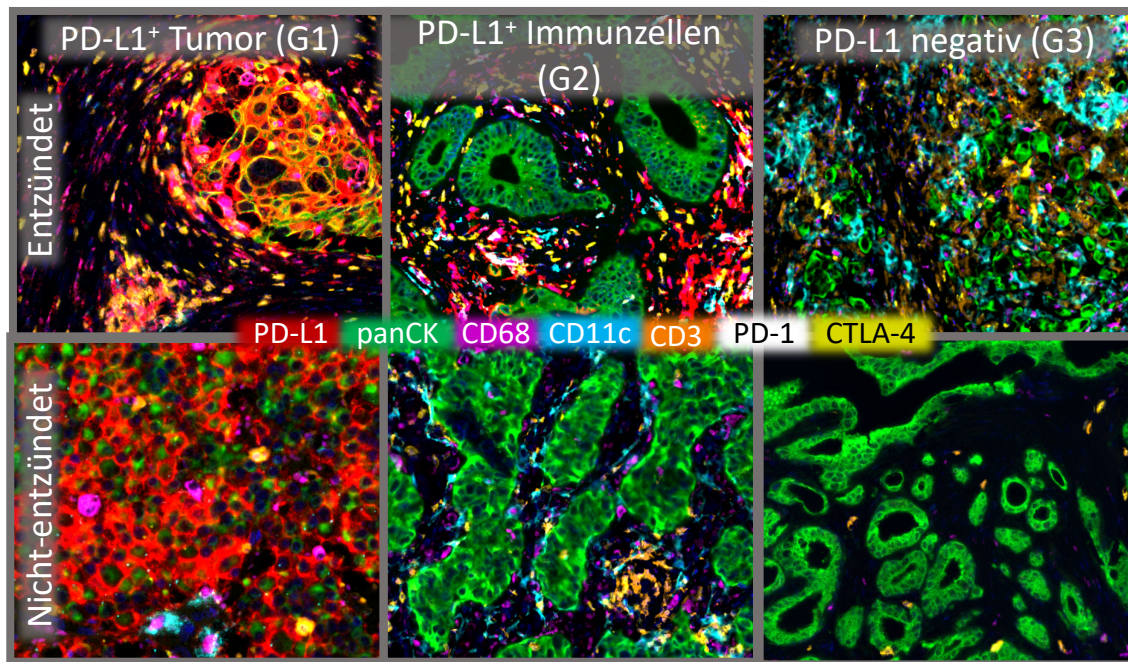


Abbildung 19: Digitalisierte Bilder der 6 Gruppen.

Die Marker PD-L1 (rot, Immuncheckpoint), panCK (grün, Epithelzellmarker), CD68 (violett, Makrophagen), CD11c (hellblau, dendritische Zellen), CD3 (orange, T-Zellen), PD-1 und CTLA-4 (weiß, gelb, Immuncheckpoint) veranschaulichen die deutlich abgegrenzten 6 Gruppen, welche von entzündeten PD-L1⁺-Tumoren (G1.1) bis zu nicht-entzündeten PD-L1-negativen Regionen reichen.

Die 6 Gruppen wurden anschließend auf verschiedene Parameter untersucht (Abbildung 20):

- Ihre Unterschiede innerhalb der vier bekannten Scores: Der prozentuale Anteil von PD-L1⁺-Tumorzellen, der prozentuale Anteil von PD-L1⁺-Makrophagen und dendritischen Zellen, der kombinierte positive Score und die Summe des prozentualen Anteils von PD-L1⁺-Zellen
- Den Daten aus einer früheren Hellfeld-immunhistochemischen PD-L1-Studie von Prof. Dr. Guido Sauter
- Der relativen Expression von PD-L1
- Der Dichte von Immunzellen
- Der lokalisationsabhängigen Analyse
- Der klinischen Daten

Die vier Scores bestätigen hierbei, dass die PD-L1-Expression von Gruppe 1.1 bis 3.2 stetig nachlässt. Auch die immunhistochemischen Daten im Hellfeld bestätigen eine Übereinstimmung mit den Daten der Multiplex-Fluoreszenz, generiert durch eine künstliche Intelligenz. Die relative Expression von CTLA-4 auf T-Zellen zeigt, entgegengesetzt der Resultate der anderen Gruppen dieser Rubrik, eine höhere relative Expression in der PD-L1-negativ-Gruppe (G3) und die geringste Expression in der Gruppe G1.2. Die Dichte der M1-Makrophagen ist in der Gruppe G1.2 am höchsten, wohingegen die Dichte von M2-Makrophagen und dendritischen Zellen in der Gruppe G1.1 höher ist. Bei den T-Zellen ist zu erkennen, dass die Dichte von CD8-, CD4- und FOXP3-T-Zellen in der Gruppe G1.1 überwiegen, wohingegen die B-Zellen am meisten in Gruppe G3.1 angesiedelt sind. Die lokalisationsabhängige Analyse ergab, dass in Gruppe 3.2 der prozentuale Anteil der intratumoralen T-Zellen am höchsten ist und die Dichte von panCK⁺-Immunzellen in Gruppe 1.1 dominieren. Die Analyse der Gruppen innerhalb der klinischen Daten zeigte, dass die Gruppe der entzündeten PD-L1⁺-Tumore (G1.1) den höchsten Ki67-Labeling-Index aufwies und den höchsten Tumor-Grad hatte. Die Gruppe der nicht-entzündeten PD-L1⁺-Tumore dominierte mit dem höchsten pT-Stadium und einer positiven nodalen Metastasierung (Abbildung 20).

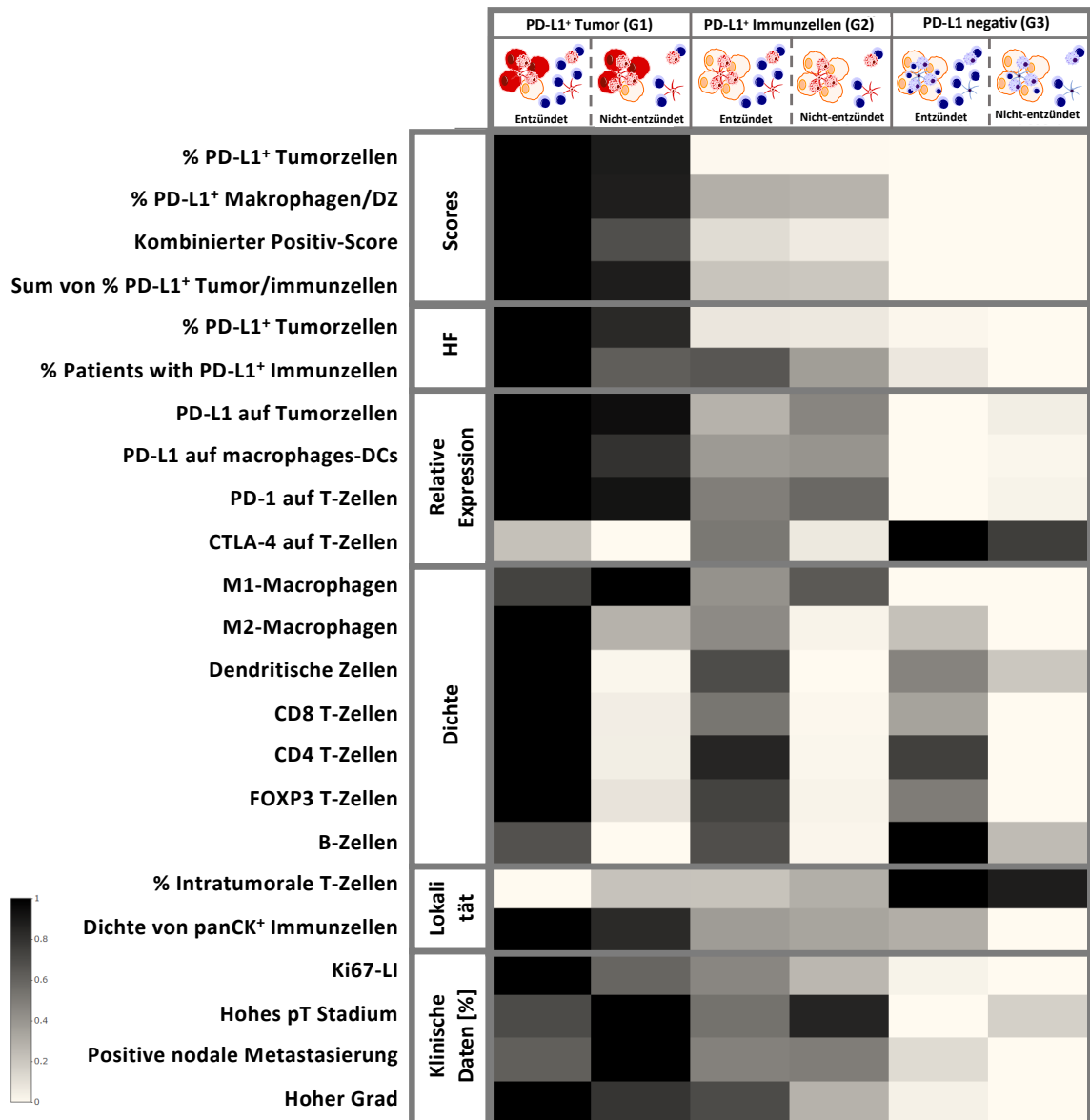


Abbildung 20: Analyse der 6 Gruppen innerhalb verschiedener Parameter durch eine Heatmap.

Das BLEACH&STAIN-System ermöglichte die Identifizierung von sechs (G1.1 - G3.2) verschiedenen PD-L1-Immunphänotypen, welche unterschiedlichen Parametern zugeordnet und untereinander verglichen wurden.

Anhand der Gruppierungen der Immunphänotypen durch das Clustering und der Analyse innerhalb der räumlichen Immunparameter und der klinischen Daten konnten signifikante Assoziationen in einem Netzdiagramm dargestellt werden (Abbildung 21). Diese Darstellung verdeutlicht das Gewicht der drei großen Gruppen und die Auftrennung in die entzündeten und nicht-entzündeten Gruppen mit ihren Eigenschaften in den jeweiligen Parametern.

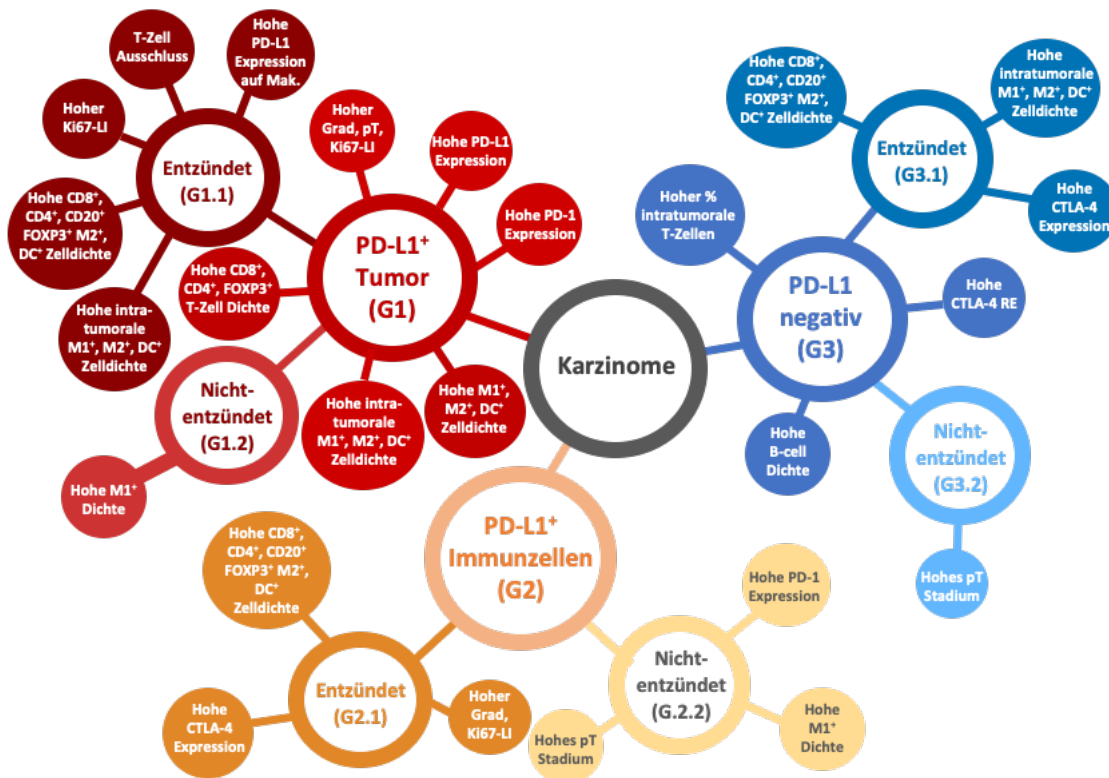


Abbildung 21: Netzdiagramm der 6 Gruppen aus 3.098 humanen Karzinomproben.

Signifikante Assoziationen der analysierten räumlichen Immunparameter mit den drei Hauptimmunphänotypen (G1-G3) und den sechs Subimmunphänotypen (G1.1 - G3.2) wurden durch einen Zusammenhang zwischen dem Parameter und dem Immunphänotyp angezeigt.

Somit ergab sich für die PD-L1⁺-Gruppen (G1.2, G2.2), dass die Dichte der M2-Makrophagen, CD11c⁺-dendritischen Zellen, CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen, CD4⁺-T-Helfer-Zellen und FOXP3⁺-regulatorische T-Zellen in entzündeten PD-L1⁺-Tumoren (G1.1) höher sind (je $p < 0,001$, Abbildung 20, Tabelle 11). Des Weiteren wurde in der Gruppe der nicht-entzündeten PD-L1⁺-Immunzellphänotypen (G2.2) eine hohe M1-Makrophagen-Dichte, im Gegensatz zu allen anderen Immunzellsubtypen der Makrophagen, dendritischen Zellen und T-Zellen, festgestellt ($p = 0,048$). Die Dichte der B-Zellen (CD20) war signifikant höher in der Gruppe der entzündeten PD-L1-Immunzellen ($p < 0,001$). Während eine hohe relative PD-1-Expression auf T-Zellen mit einer PD-L1-Positivität einherging (je $p < 0,001$), war eine erhöhte relative CTLA-4-Expression auf T-Zellen mit PD-L1-negativen Immunzellphänotypen verknüpft (je $p < 0,001$).

Tabelle 11: Assoziation zwischen den 3 Hauptgruppen und verschiedenen Parametern.

Es wurde ein Zusammenhang zwischen den 3 Hauptgruppen, aufgetrennt in entzündete und nicht-entzündete Gruppen, Scores, Hellfelddaten (HF), relativen Expressionen von Immun-Checkpoint-Markern, Dichten von Immunzellmarkern, lokalisationsabhängiger Analyse und klinisch-pathologischen Daten hergestellt.

Parameter	PD-L1 ⁺ Tumor (G1)			PD-L1 ⁺ Immunzellen (G2)			PD-L1 negativ (G3)			Gesamt
	Entzündet (G1.1)	Nicht-entzündet (G1.2)	p-Wert	Entzündet (G2.1)	Nicht-entzündet (G2.2)	p-Wert	Entzündet (G3.1)	Nicht-entzündet (G3.2)	p-Wert	p-Wert
% PD-L1 ⁺ Tumorzellen	24 (±31)	21 (±28)	0.2	0 (±0)	0 (±0)	0.041	0 (±0)	0 (±0)	0.3	<0.001
% PD-L1 ⁺ Makrophagen/DZ	60 (±28)	52 (±27)	<0.001	18 (±18)	17 (±16)	0.4	0 (±0)	0 (±0)	<0.001	<0.001
Kombinierter Positiv-Score	70 (±98)	48 (±140)	0.009	9 (±23)	5 (±16)	<0.001	0 (±1)	0 (±0)	0.009	<0.001
Sum von % of PD-L1 ⁺ Tumor/Immunzellen	84 (±52)	74 (±49)	0.005	18 (±18)	17 (±16)	0.4	0 (±0)	0 (±0)	<0.001	<0.001
% PD-L1 ⁺ Tumorzellen	30 (±37)	25 (±34)	0.09	3 (±11)	3 (±11)	0.8	1 (±7)	1 (±5)	0.3	<0.001
% Patienten mit PD-L1 ⁺ Immunzellen	66	44	<0.001	45	29	<0.001	11	7	0.019	<0.001
PD-L1 mittlere RE auf Tumorzellen	14 (±11)	14 (±8)	0.4	7 (±4)	9 (±3)	<0.001	4 (±3)	4 (±4)	0.019	<0.001
PD-L1 mittlere RE auf Tumor/Immunzellen	22 (±11)	19 (±7)	<0.001	11 (±6)	12 (±4)	0.13	5 (±4)	5 (±4)	0.19	<0.001
PD-1 mittlere RE auf T-Zellen	117 (±47)	111 (±56)	0.056	74 (±41)	81 (±56)	0.007	31 (±28)	33 (±35)	0.18	<0.001
CTLA-4 mittlere RE auf T-Zellen	90 (±32)	80 (±33)	<0.001	103 (±45)	83 (±40)	<0.001	125 (±53)	114 (±65)	0.002	<0.001
M1-Makrophagen	118 (±209)	152 (±680)	0.3	77 (±131)	107 (±348)	0.048	24 (±55)	24 (±99)	1	<0.001
M2-Makrophagen	384 (±398)	179 (±238)	<0.001	225 (±239)	105 (±176)	<0.001	162 (±132)	97 (±115)	<0.001	<0.001
Dendritische Zellen	271 (±411)	25 (±37)	<0.001	195 (±266)	21 (±26)	<0.001	139 (±188)	72 (±126)	<0.001	<0.001
CD8 T-Zellen	209 (±307)	19 (±26)	<0.001	115 (±158)	11 (±14)	<0.001	79 (±122)	9 (±10)	<0.001	<0.001
CD4 T-Zellen	438 (±536)	61 (±61)	<0.001	380 (±462)	49 (±49)	<0.001	338 (±487)	41 (±39)	<0.001	<0.001
FoxP3 T-Zellen	62 (±62)	9 (±10)	<0.001	46 (±54)	6 (±7)	<0.001	33 (±44)	4 (±5)	<0.001	<0.001
B-cells	166 (±932)	21 (±103)	0.003	168 (±403)	26 (±86)	<0.001	235 (±549)	75 (±151)	<0.001	<0.001
% Intratumorale T-Zellen	19 (±22)	25 (±29)	0.005	25 (±28)	26 (±30)	0.3	43 (±34)	40 (±33)	0.18	<0.001
% Intratumorale Makrophagen/DZ	18 (±18)	24 (±21)	<0.001	17 (±18)	22 (±21)	<0.001	21 (±19)	22 (±21)	0.8	<0.001
Dichte der panCK ⁺ Immunzellen	144 (±235)	129 (±459)	0.6	90 (±147)	87 (±327)	0.8	83 (±112)	57 (±120)	<0.001	<0.001
Ki67-IJ	27 (±22)	20 (±19)	<0.001	17 (±17)	14 (±17)	<0.001	10 (±11)	9 (±10)	0.4	<0.001
Hohes pT Stadium	41	52	0.004	35	46	<0.001	15	21	0.016	<0.001
Positives Nodal Stadium	50	59	0.027	49	47	0.5	48	42	0.12	<0.001
Hoher Grad	55	49	0.14	46	33	<0.001	25	24	0.7	<0.001

Innerhalb der 3 großen Gruppen (G1, G2, G3) war die Dichte von PD-L1 innerhalb der Gruppe der PD-L1⁺-Tumorzellen (G1) signifikant höher (Abbildung 22, links). Der prozentuale Anteil der M1-Makrophagen dominierte in den beiden nicht-entzündeten PD-L1-positiven Gruppen G1.2 und G2.2, wohingegen der Anteil der dendritischen Zellen in der nicht-entzündeten PD-L1-negativen Gruppe am höchsten war. Der prozentuale Anteil sowie auch die Dichte der T-Zellen überwog in den entzündeten PD-L1-Gruppen G1.1, G2.1 und G3.1 (je $p < 0,001$).

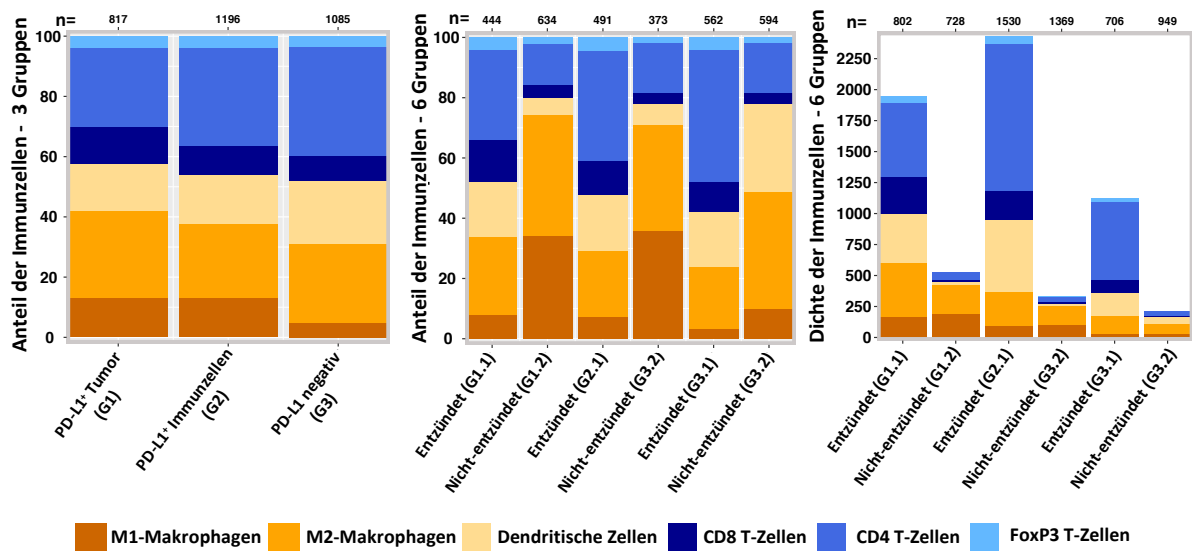


Abbildung 22: Beziehung der Immunzellen zu den 3 Gruppen.

Assoziation zwischen den 3 Haupt- und 6 Nebengruppen mit der PD-L1-Dichte (links), dem Anteil (mitte) und der Dichte (rechts) von Immununtergruppen.

Zusätzlich wurde eine PD-L1-Positivität auf Tumor und Immunzellen (G1, G2) mit Tumorparametern wie einem hohen Tumor-Grad, einer fortgeschrittenen Tumorgroße (pT) und einem Lymphdrüsenbefall (pN) assoziiert (je $p < 0,001$, Abbildung 23).

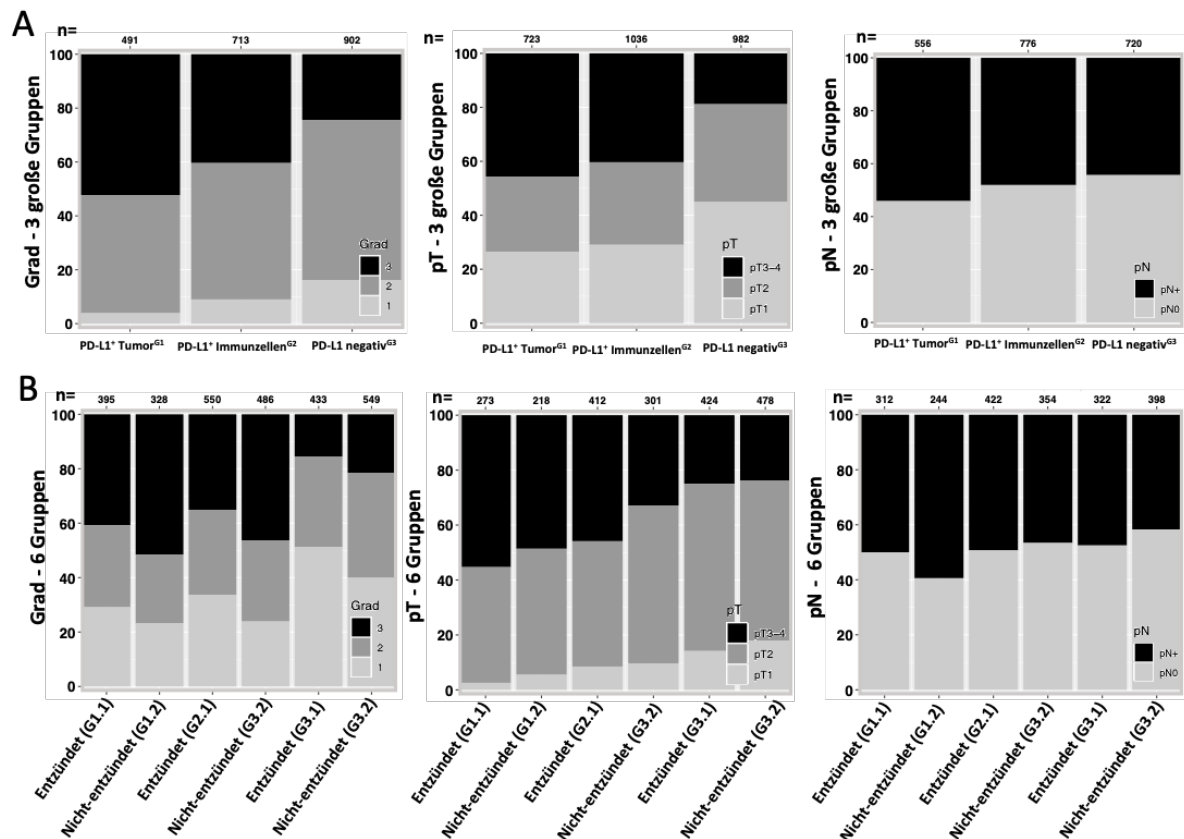


Abbildung 23: PD-L1-Phänotypen sind mit klinisch-histopathologischen Merkmalen assoziiert.

Assoziation zwischen den 3 Hauptgruppen (A) und den 6 Nebengruppen (B) mit dem Tumorgrad (Grad), der Tumorgroße (pT) und dem Nodalstadium (pN).

3.7. Lokalisationsabhängige Analyse der Expression PD-L1-Immunphänotypen

Die Digitalisierung der Immunfärbung zeigt einen hohen Grad an lokalisationsabhängigem T-Zell-Ausschluss aus dem intraepithelialen Bereich sowie eine hohe Makrophagen-Infiltration und eine PD-1-Expression auf T-Zellen (Abbildung 24A, links). Des Weiteren war zu erkennen, dass ein niedriger Grad an intraepithelialer Makrophagen-Infiltration mit einer intraepithelialen T-Zell-Infiltration einhergeht (Abbildung 24A, rechts). Die Distanz und die Anzahl an normalisierten Interaktionen (Zell-Zell-Kontakte) zwischen Immuncheckpoint-exprimierenden T-Zellen, Immunzellen (Makrophagen, dendritischen Zellen), und Tumorzellen wird hier dargestellt (Abbildung 24B). Die lokalisationsabhängigen Interaktionen zwischen T-Zellen und Makrophagen innerhalb des Tumors und im Stroma wurden auf der

Grundlage der Entfernung zueinander und den normalisierten Interaktionen untereinander berechnet (je $p < 0,001$, Abbildung 24C). Die Rolle der Makrophagen und der dendritischen Zellen im Immunsystems wurde mittels direkter Interaktion mit T-Zellen unterstützt durch eine signifikant geringere Zell-Zell-Entfernung und einer erhöhten Rate an Interaktionen zwischen PD-1⁺-T-Zellen und PD-L1⁺-Immunzellen verglichen mit PD-1⁺-T-Zellen zu PD-L1⁺-Tumorzellen ($p < 0,001$).

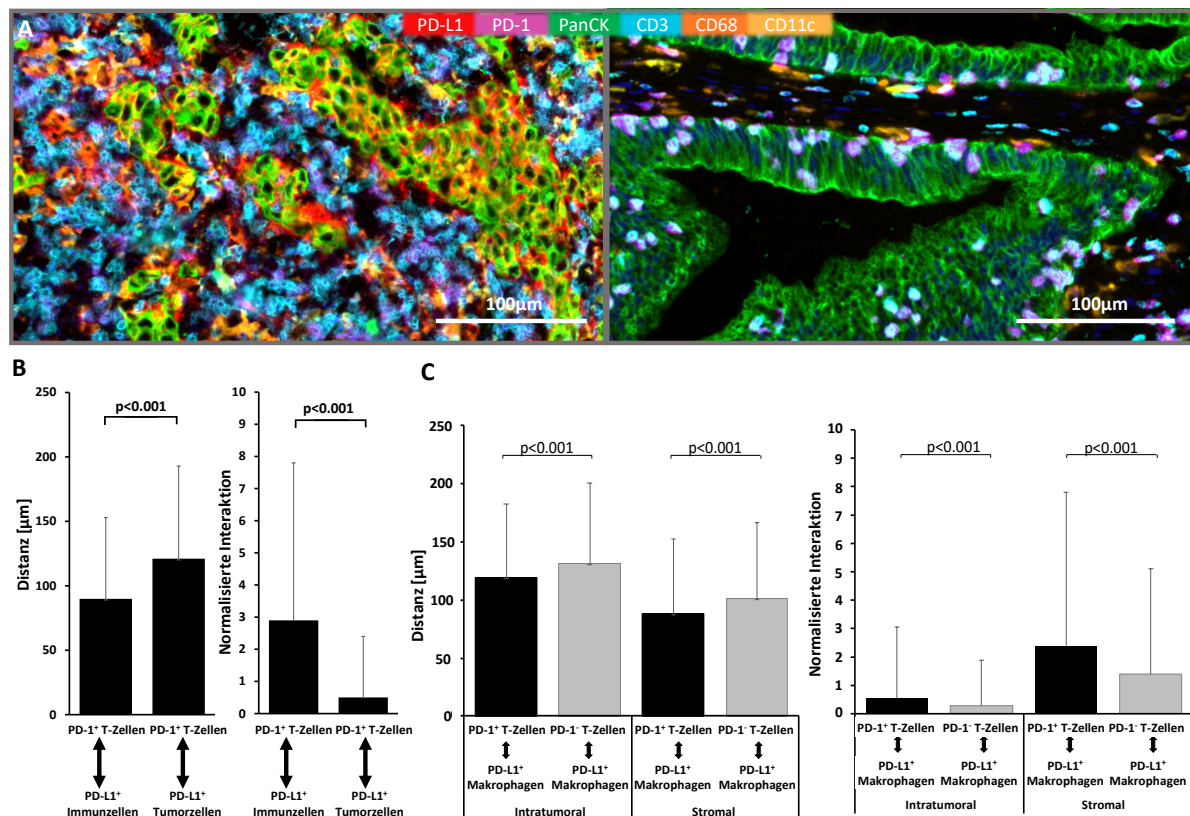


Abbildung 24: Lokalisationsabhängige Analyse von Immunzellen innerhalb der PD-L1-Immunphänotypen.

Eine Digitalisierung der Marker PD-L1 (rot), PD-1 (violett), panCK (grün), CD3 (hellblau), CD68 (orange), CD11c (gelb) zeigt den lokalisationsabhängigen T-Zell-Ausschluss und Makrophagen-Infiltration (A, links) und eine intraepitheliale Makrophagen- und T-Zell-Infiltration (A, rechts). Die Distanz und Anzahl an Zell-Zell-Kontakten zwischen PD-1⁺-T-Zellen und jeweils PD-L1⁺-Immun- bzw. Tumorzellen wird hier dargestellt (B). Die räumlichen Interaktionen zwischen T-Zellen und Makrophagen innerhalb des Tumors und im Stroma wurden auf der Grundlage der Entfernung und den normalisierten Interaktionen berechnet (C).

PD-L1-Expression auf Tumorzellen.

Eine lokalisationsabhängige Analyse der 6 PD-L1-Immunphänotyp-Gruppen ergab, dass entzündete PD-L1-positive Patienten der Gruppe G1.1 die höchste Dichte an intratumoralen (intraepithelialen) Makrophagen- und dendritischen Zellinfiltration aufwiesen ($p < 0,001$, Abbildung 25B). Diese Tumordinfiltration wurde begleitet vom höchsten Grad des intratumoralen T-Zell-Ausschlusses ($p < 0,001$, Abbildung 25A) und dem höchsten relativen PD-1-Expressionsniveau ($p < 0,001$, Abbildung 25A). Die zentrale Rolle von Makrophagen und dendritischen Zellen bei der Immunevasion durch direkte Interaktion mit T-Zellen wurde durch einen signifikant geringeren Zell-Zell-Abstand und eine höhere Rate normalisierter Interaktionen zwischen PD-1⁺-T-Zellen und PD-L1⁺-Immunzellen im Vergleich zu PD-1⁺-T-Zellen und PD-L1⁺-Tumorzellen (jeweils $p < 0,001$, Abbildung 25C) unterstützt.

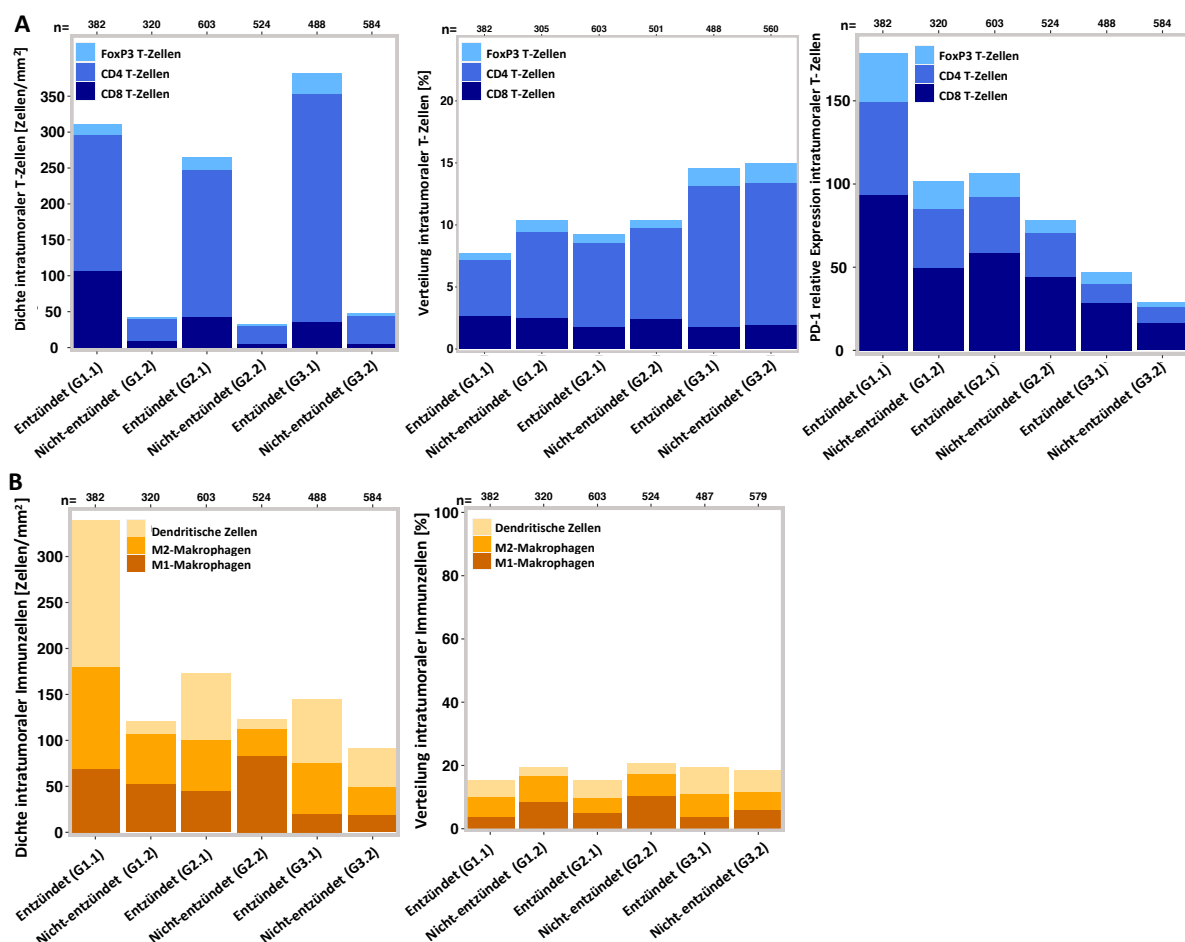


Abbildung 25: Lokalisationsabhängige Analyse der PD-L1 Expression auf Tumorzellen.

(A-B) Ein gestapeltes Säulendiagramm zeigt die Assoziation zwischen der lokalisationsabhängigen T-Zell Organisation (A, blau) sowie der lokalisationsabhängigen Aufteilung von Makrophagen/dendritischen Zellen (B, orange) und den sechs PD-L1 Immunphänotypen.

PD-L1-Expression auf Immunzellsubtypen.

Die immunzellbezogene, lokalisationsabhängige Analyse der 6 PD-L1-Immunphänotypgruppen zeigte, dass Patienten der jeweils entzündeten Gruppen eine höhere Dichte von T-Zellen im Stroma aufwiesen und die Gruppe der entzündeten PD-L1⁺-Tumor- und Immunzellen eine höhere relative Expression von PD-1 auf T-Zellen zeigten, die im entfernteren stromalen Milieu lagen (Abbildung 26A). Die Immunzellzusammensetzung im Stroma zeigte eine Dominanz der M2-Makrophagen und dendritischen Zellen (Abbildung 26B). Besonders bei den entzündeten Patientengruppen zeigte sich eine höhere Dichte von Immunzellen im Stroma.

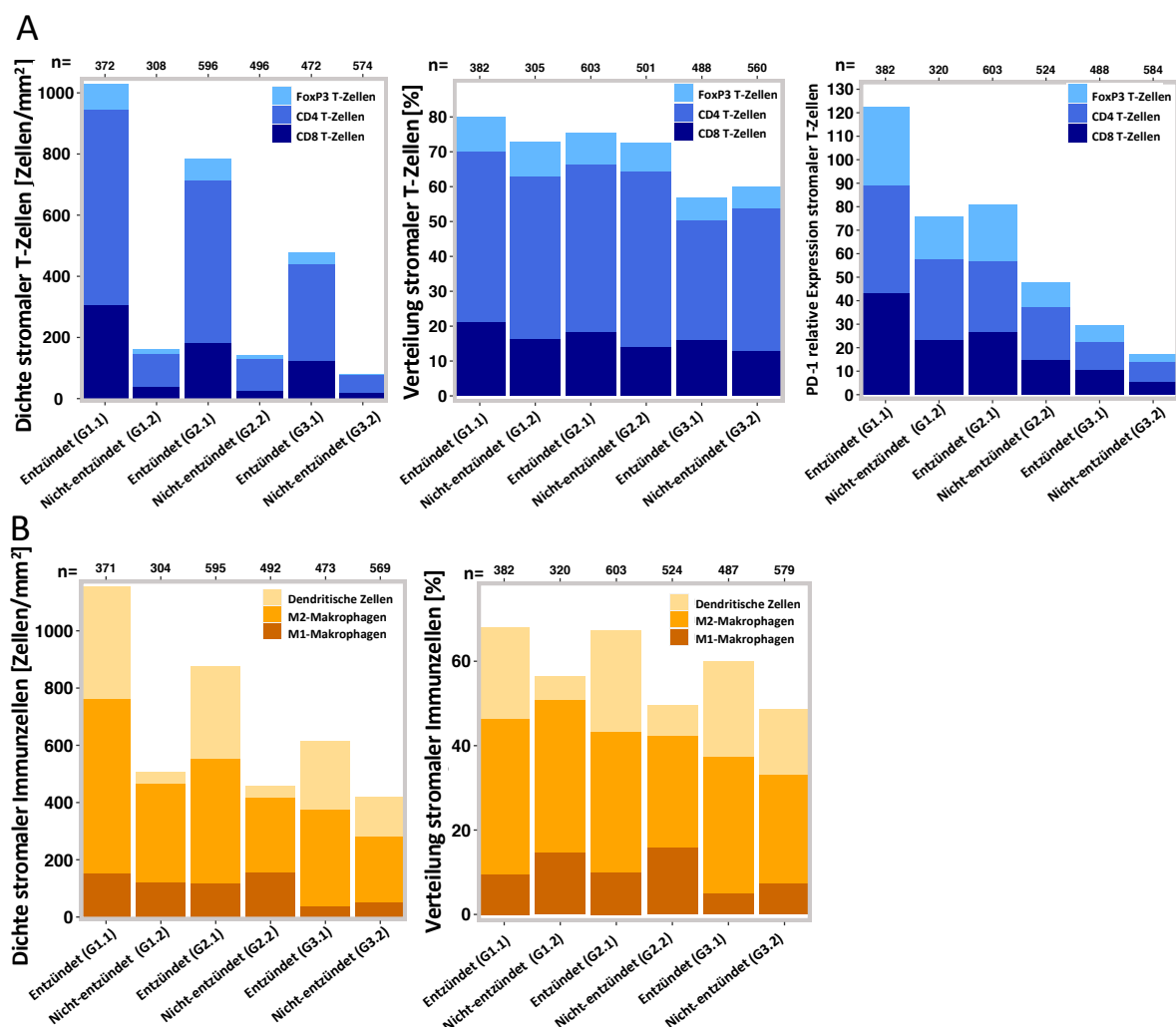


Abbildung 26: Lokalisationsabhängige Analyse der PD-L1 Expression auf Immunzellen.

Stroma- und lokalisationsabhängige T-Zell- (A, blau) und Immunzellanalysen (B, orange) wurden innerhalb der 6 Gruppen verglichen.

3.8. Untersuchungsergebnisse der sechs Gruppen in verschiedenen Entitäten

In 43 (98 %) von 44 verschiedenen Karzinom-Entitäten wurde eine PD-L1-Expression auf Tumorzellen und/oder Immunzellen nachgewiesen. Die Mehrheit der analysierten Tumorentitäten (77 %) wies mindestens fünf der sechs Immunphänotypen auf. Plattenepithelkarzinome unterschiedlicher Herkunftsregionen zeigten wie erwartet die höchste Proportion von Patienten mit PD-L1⁺-Tumor- und Immunzellen (G1, G2), während niedrig gradierte Prostatakrebs- und verschiedene Brustkrebs-Entitäten mit einer hohen Rate nicht-entzündeter PD-L1⁻-Patienten assoziiert wurden. Die hier zusammengestellte Immunzellkomposition wurde demnach von den Makrophagen und dendritischen Zellen der Gruppe 1 (PD-L1⁺-Immunzellen) dominiert, verglichen mit dem T-Zell-getriebenen Tumormikromilieu in Gruppe 3 (PD-L1-negativen Immunphänotypen) über alle Tumorentitäten (Abbildung 27).

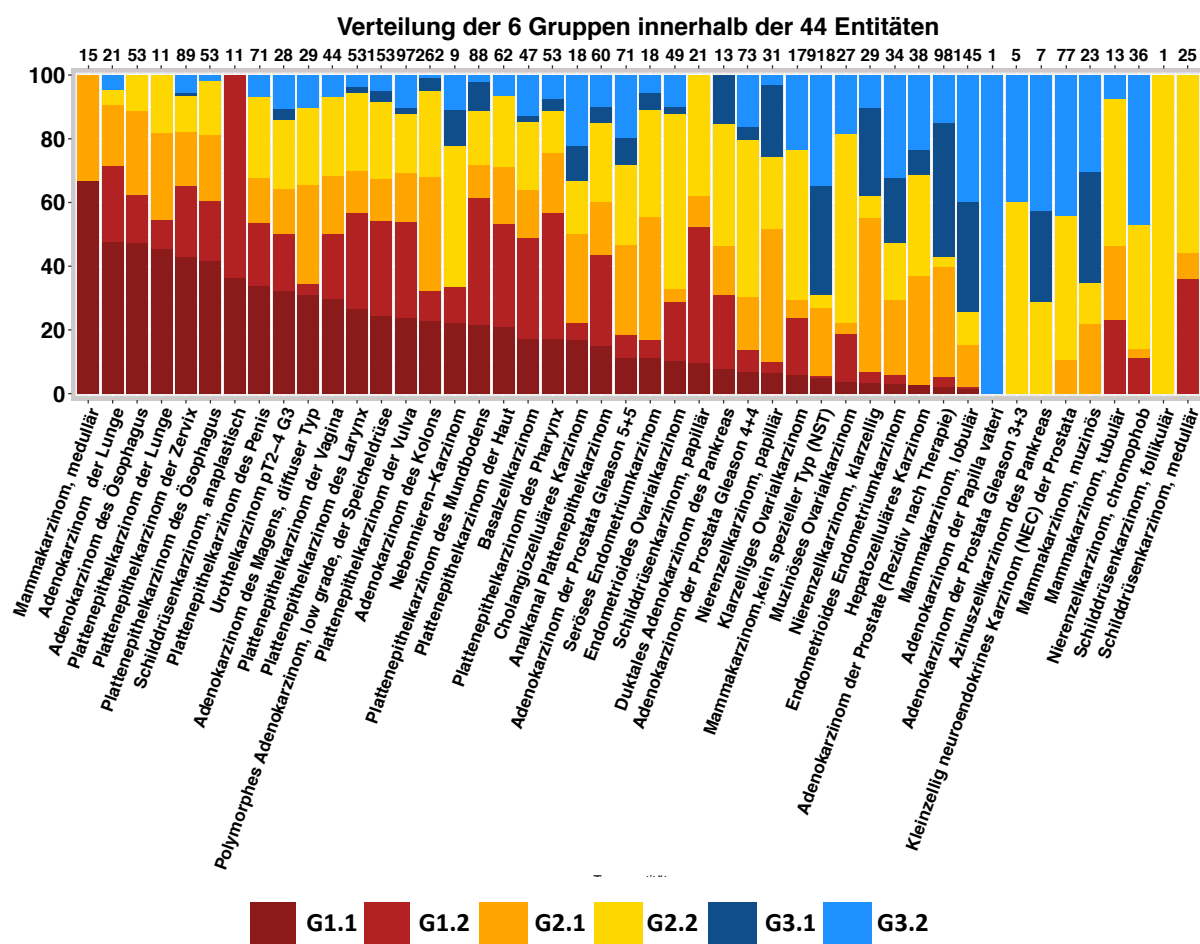
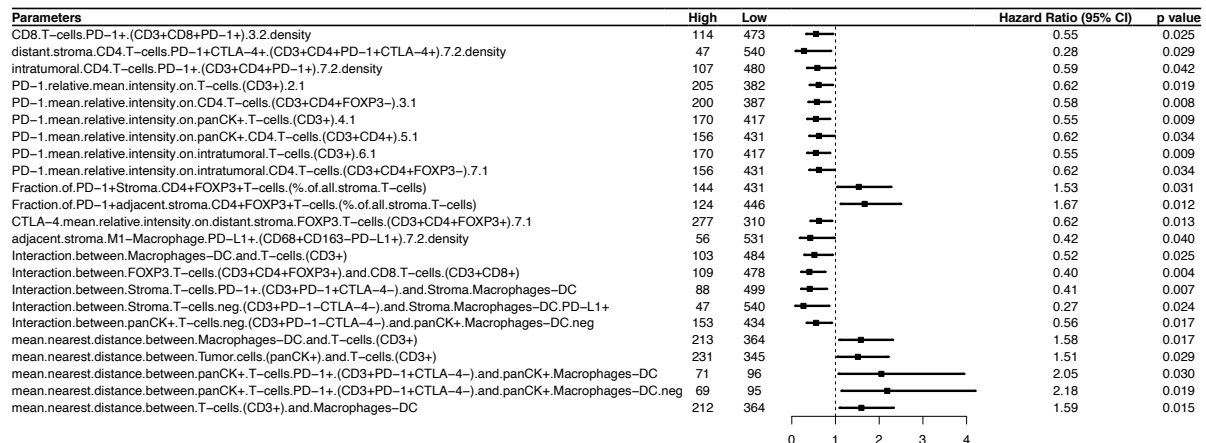


Abbildung 27: Verteilung der sechs PD-L1-Phänotypen innerhalb 44 Entitäten

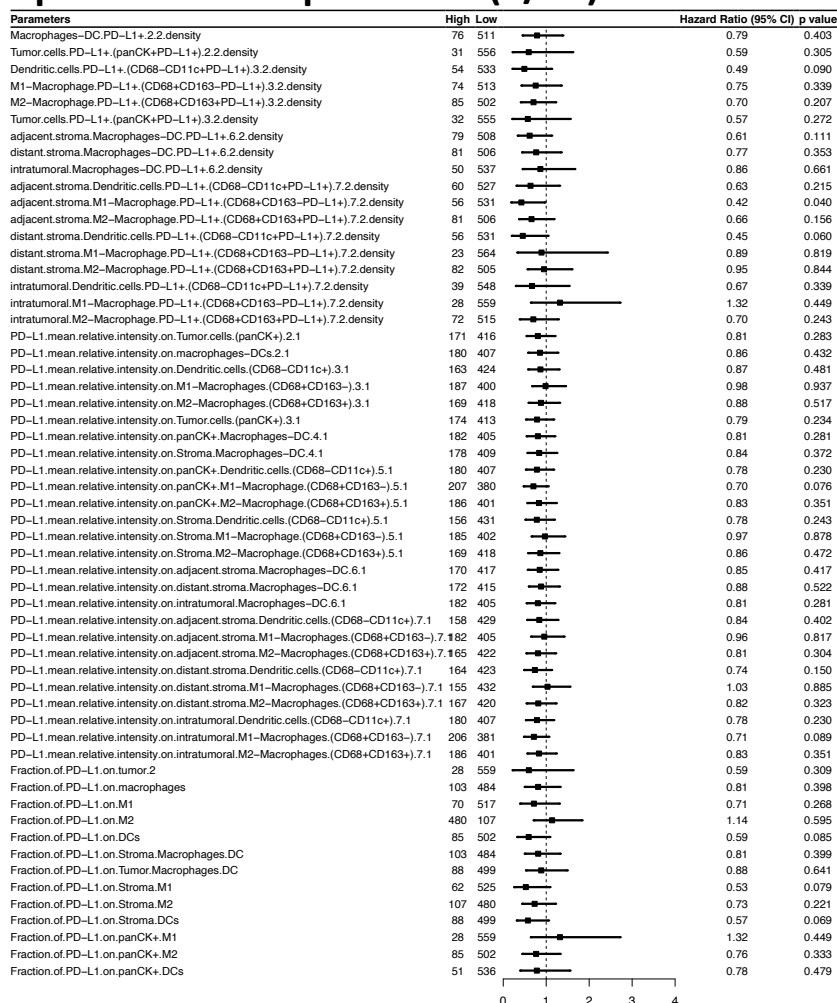
Die sechs PD-L1-Phänotypen kommen vermehrt in humanen Karzinomen vor. Hierbei wiesen einzelne Patienten der meisten Karzinom-Entitäten einen entzündeten PD-L1⁺-Immunphänotyp auf (G1.1, G2.1).

3.9. Brustkrebsprognose

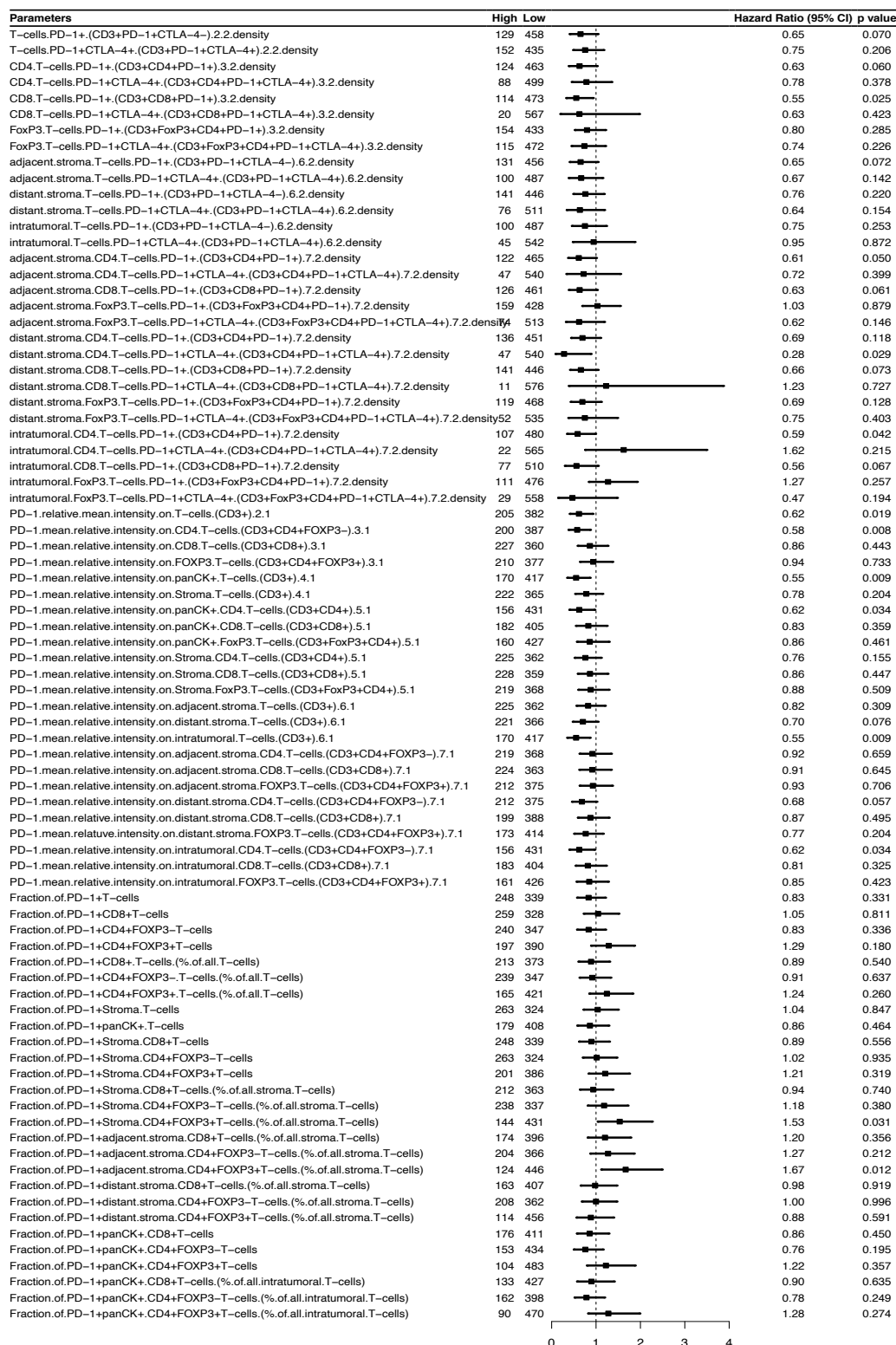
In dieser Studie waren 587 Brustkrebspatienten mit Verlaufsdaten analysierbar. Somit war es möglich, den prognostischen Einfluss von mehr als 250 verschiedenen Parametern auf das Überleben dieser Patientenkohorte zu untersuchen. Hierbei zeigten 23 von 287 Parameter einen prognostischen Einfluss ($p \leq 0,04$, Abbildung 28).



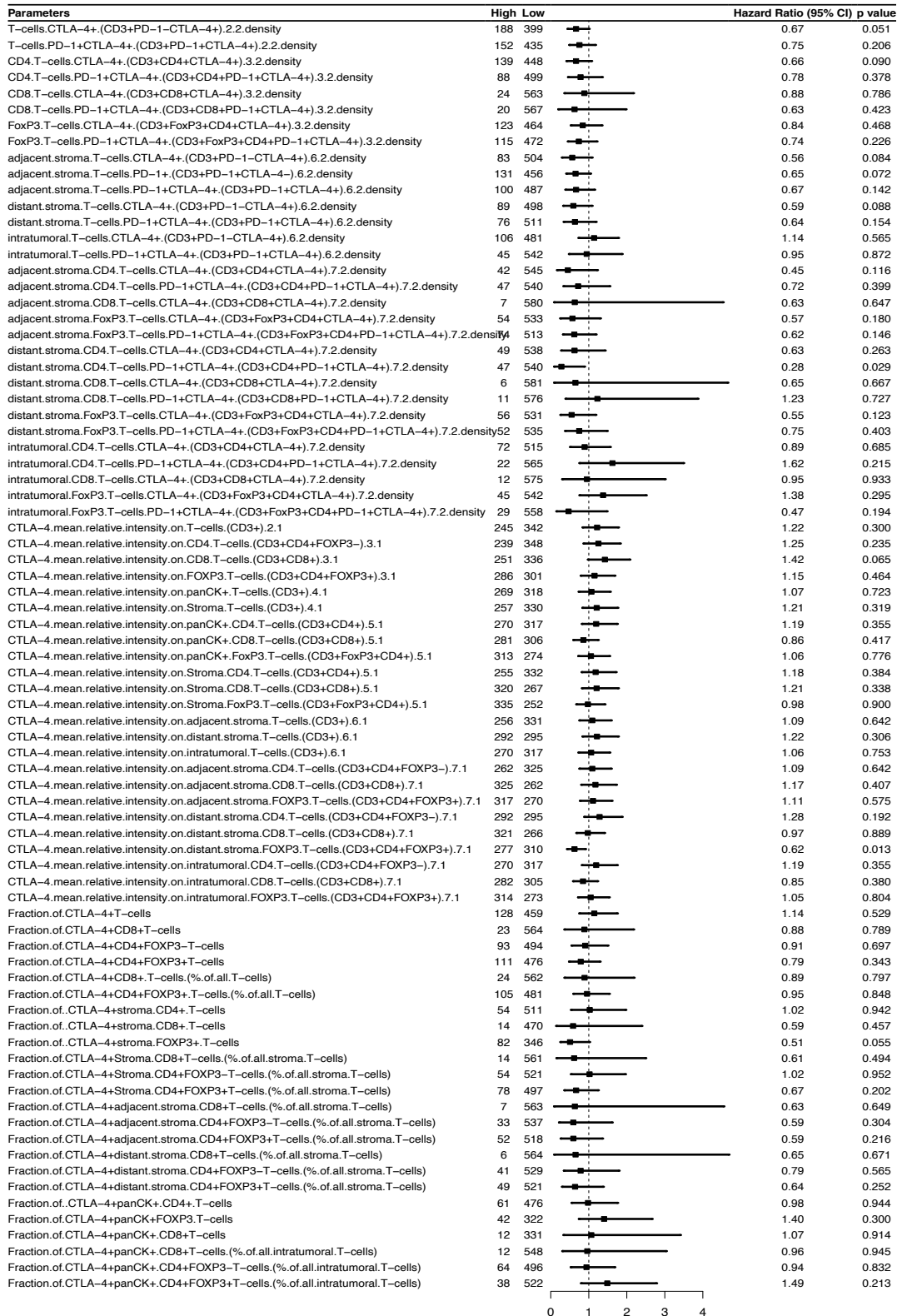
Spatial PD-L1 expression n(1/59)



Spatial PD-1 expression n(11/81)



Spatial CTLA-4 expression n(2/79)



Spatial analysis 10/68

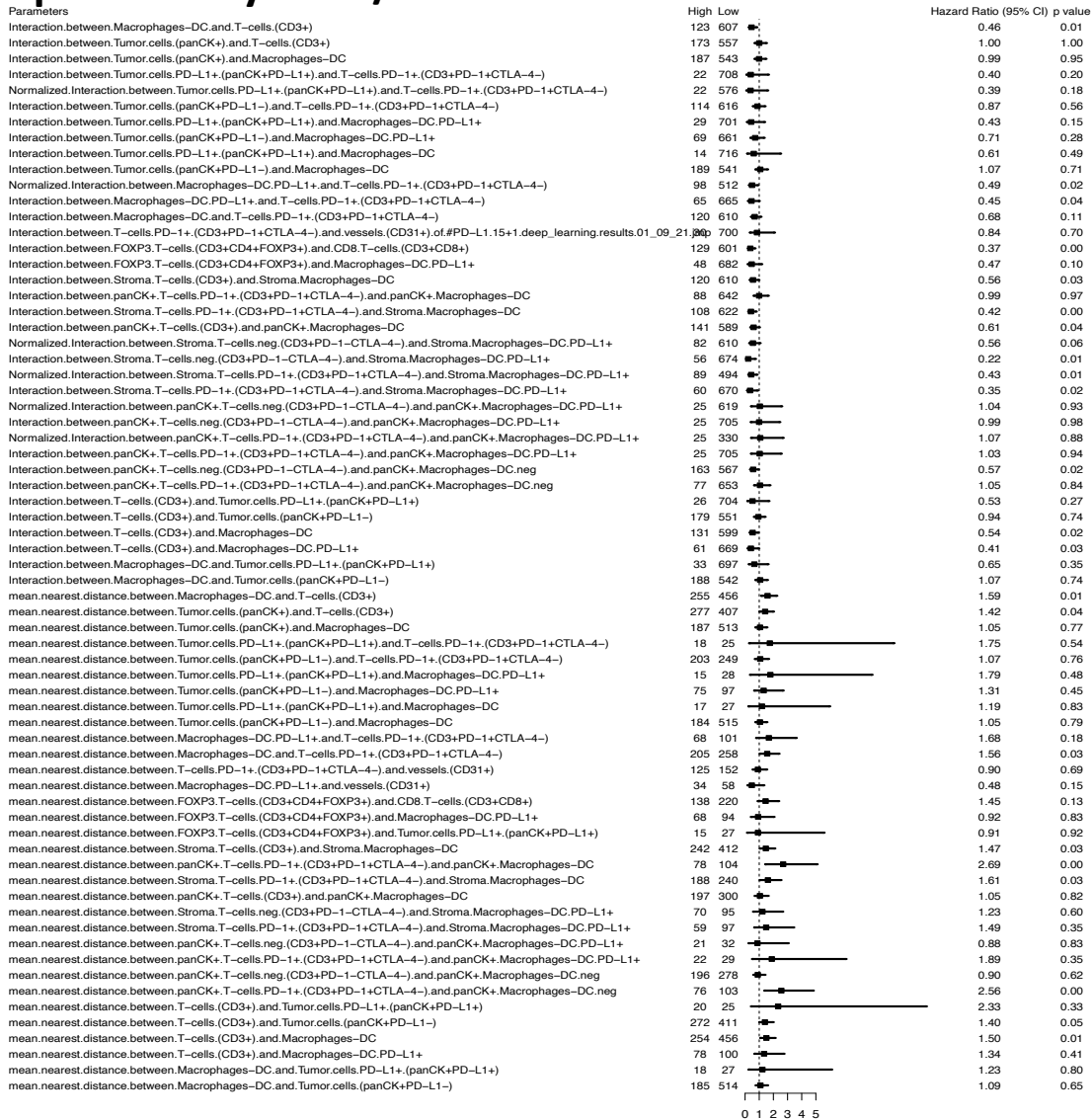


Abbildung 28: Kaplan-Meyer-Kalkulationen innerhalb der räumlichen Analyse werden durch Forest-Plots dargestellt

Eine Zeile der Tabelle impliziert eine Kaplan-Meyer-Kalkulation für einen spezifischen Parameter. Die Einteilung in „hoch“ und „niedrig“ wurde anhand des Mittelwertes berechnet und festgelegt. Der Balken zeigt das Hazard Ratio (HR) und das 95 %-Konfidenzintervall (confidential interval; CI) an.

Die nicht-entzündeten PD-L1⁺-Patienten der Gruppen G1.2 und G2.3 zeigten in der Kaplan-Meyer-Überlebenskurve eine schlechte Prognose. Die Gruppe der entzündeten PD-L1⁺-Tumor- und Immunzellen zeigten hier die beste Prognose (p < 0,001, Abbildung 29A). Eine Prognosewahrscheinlichkeit über die 3 Hauptgruppen war nicht signifikant und konnte deshalb nicht ausgewertet werden (p = 0,33, Abbildung 29B). Die Gesamtüberlebensrate für

die relative PD-L1-Expression auf Tumor- (AUC: 73,6, 95 %-Konfidenzintervall [KI]: 67,6- 79,7) und auf Immunzellen (AUC: 66,5, CI: 60,3 - 72,8), gemessen durch die Fluoreszenzintensität, eine höhere zeitabhängige Grenzwertoptimierungskurve (Receiver operating characteristic (ROC) mit einer „area under the curve“ (AUC)) verglichen mit dem üblich verwendeten prozentualen Anteil an PD-L1⁺-Tumor- (AUC: 54,2, CI: 50,8 - 57,6) und Immunzellen (AUC: 55,0, CI: 49,2 - 60,8, Abbildung 29C).

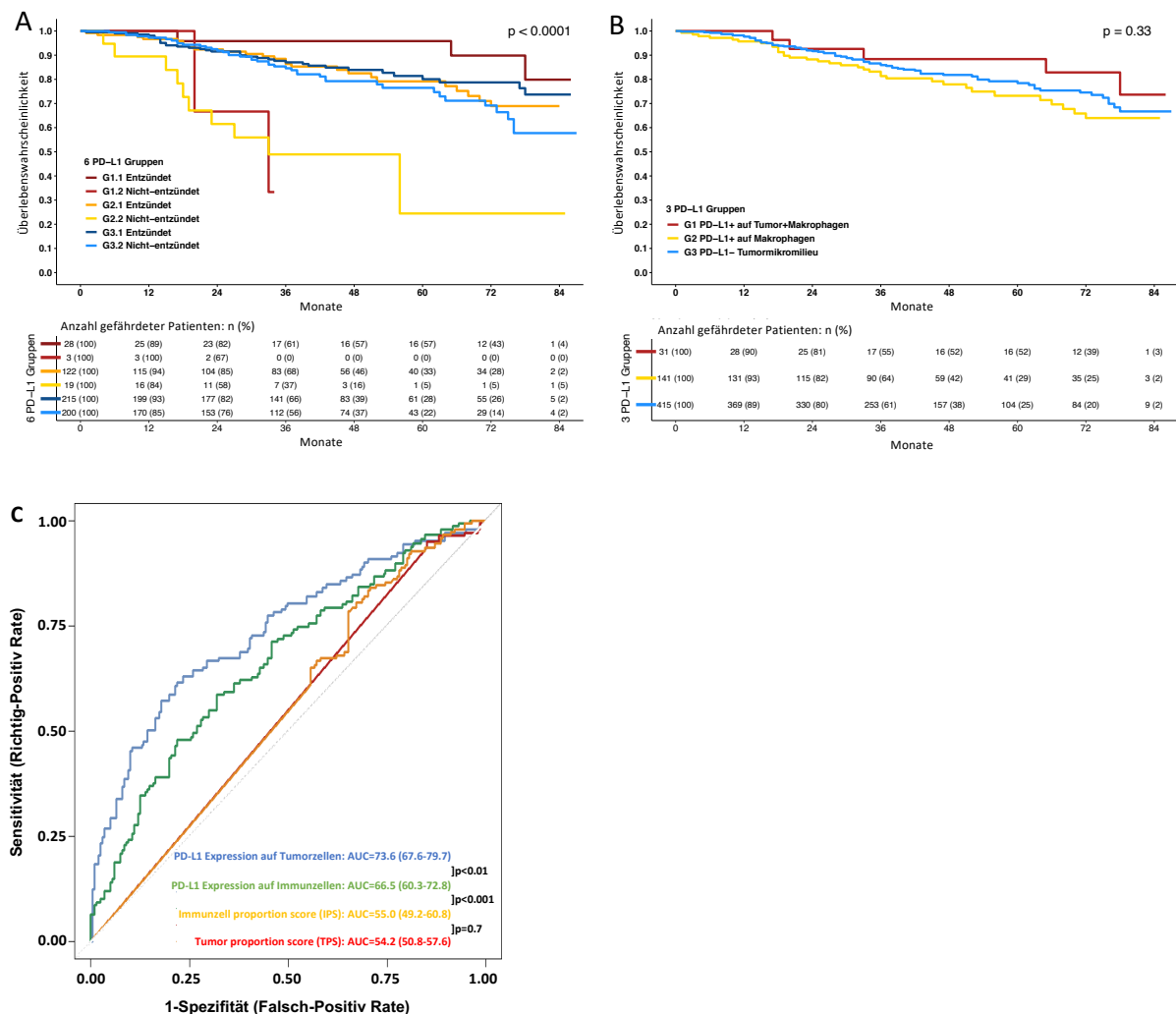


Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kalkulationen für das Gesamtüberleben und eine zeitabhängige „receiver operating characteristic“ (ROC) Kurve für die Sterblichkeit 5 Jahre nach der Operation des Patienten.

Die prognostische Relevanz der sechs Gruppen (G1.1 - G3.2, A) und 3 Hauptgruppen (G1 - G3, B) wird für die Patientenkohorte dieser Studie mit 587 Brustkrebspatientinnen gezeigt. ROC-Kurven und die dazugehörige „area under the curve“ AUC in derselben Patientenkohorte wurde berechnet (C).

4. Diskussion

4.1. BLEACH&STAIN

Die neue BLEACH&STAIN mIHC-Methode wurde an an Gewebemikroarray (Tissue Microarray - TMA) mit Gewebeproben einer Größe von 0,6 mm etabliert und validiert. Der TMA hat für die Etablierung der Methode die entscheidenden Vorteile, dass hunderte Gewebeproben gleichzeitig mit derselben Menge an Reagenzien gefärbt werden können, die für einen einzigen konventionellen Großschnitt erforderlich ist und zudem die exakt identischen experimentellen Bedingungen für alle Gewebe eingehalten werden. Die Verwendung eines TMAs senkt zudem die Kosten für die Reagenzien dramatisch: Bei Verwendung von 15 Antikörpern und 3 Fluoreszenzfarbstoffen betragen die Reagenzienkosten für die Analyse eines einzigen Gewebes als Großschnitt ca. 17 Euro, während im TMA mit 500 Spots nur noch 3 Cent auf jedes Gewebe entfallen. Die identischen, experimentellen Bedingungen für alle Spots erlauben es zudem, das „optimale“ Versuchsprotokoll zu finden, welches für die meisten Gewebeproben zu einer auswertbaren Färbung führt. Dass nicht alle Gewebeproben gleich gut funktionieren, ist der präanalytischen Prozessierung der Gewebe geschuldet: Probengröße, Gewebetyp und -beschaffenheit (z. B. Fettgehalt) führen zu unterschiedlichen Fixierungsbedingungen, die zusammen mit dem Alter der Gewebeproben einen Einfluss auf die Qualität der Immunfärbung haben^{139,140}. Bei zu wenig fixiertem Gewebe können Proteine durch Autolyse oder Mikroben zerstört werden, bei zu stark fixiertem Gewebe werden u. U. die Epitope unwiederbringlich geschädigt. Durch verschiedene Verfahren der Antigen-Demaskierung können veränderte Epitope in einem gewissen Maße wiederhergestellt werden¹⁴¹. Das „optimale“ BLEACH&STAIN-Verfahren ergab eine Auswertbarkeit von etwa 75 % der Gewebeproben des TMAs, wobei der größte Anteil nicht-auswertbarer Proben auf die typischen TMA-Probleme zurückzuführen war: Etwa 14 % der Spots enthielten überhaupt kein Gewebe und weitere 11 % der Spots keine Tumorzellen. Mit dieser „Versagerquote“ dürfte damit auch bei konventionellen Großschnitten zu rechnen sein. Hier zeigt sich ein Vorteil der Multiplex-IHC: Nicht analysierbare Gewebeproben fallen als solche auf! Bei der konventionellen Färbung eines einzigen Antikörpers kann demgegenüber kaum zwischen einem richtig negativen Ergebnis (d. h. Protein ist nicht exprimiert) und einem falsch negativen Ergebnis (Gewebe geschädigt, Antikörper kann nicht binden, obwohl das Zielprotein exprimiert wird) unterschieden werden. Es ist jedoch anzumerken, dass für einen

Einsatz der Methode in der Routine TMAs nicht in Frage kommen - es würde erstens viel zu lange dauern, einen „Diagnostik-TMA“ zu erstellen, und zweitens könnten in einem einzigen 0,6 mm Gewebe-Spot relevante Anteile des Tumors missachtet werden. Das etablierte Protokoll am TMA kann jedoch 1:1 auf Großschnitte übertragen werden.

Die BLEACH&STAIN-Methode kombiniert Verfahren, die bereits in der Literatur beschrieben wurden, aber bisher nicht in dieser Form verknüpft wurden. So wurde das Ausbleichen von Fluoreszenzfarbstoffen bereits bei Radtke et al (2020) sowie Lin et al (2018) für die Verfahren „Iterative bleaching extends multiplexity“ IBEX und „t-CyCIF stain and bleach cycle“ beschrieben^{142,143}. Das Ausbleichen stellt einen guten Kompromiss zwischen der möglichst kompletten, aber auch schnellen Entfernung der Fluoreszenzsignale dar, ohne dabei das Gewebe übermäßig zu schädigen und die Epitope für die nächsten Färberunden zu erhalten. Dies wird durch das nahezu identische Signal-Hintergrundrausch-Verhältnis von Antikörpern aus jedem einzelnen Färbezyklus belegt. In der Literatur werden auch andere Verfahren zur Entfernung von Fluoreszenzsignalen beschrieben. Die CODEX-mFIHC-Technologie¹⁴⁴ entfernt fluoreszierende Oligonukleotide durch chaotrope Lösungsmittel aus dem Gewebe. Sie hat jedoch gegenüber dem Bleichen den Nachteil, dass es zu einem erhöhten Hintergrundrauschen im Gewebe kommt und in den letzten Runden die Marker nicht mehr sauber detektiert werden können. Die „Black Hole Quencher“-Methode¹⁴⁵ verwendet zum Ablösen des Farbstoffs statt eines Bleichmittels einen Quencher, der den Farbstoff „ausknipst“. Diese Quencher absorbieren die Energie eines Fluorochroms und wandeln diese in Wärme um, wodurch sie das Licht des Farbstoffes anschließend löschen. Diese Methode hat gegenüber der BLEACH&STAIN-Methode den Nachteil, dass sie erstens nicht so kostengünstig ist und zweitens eine kompliziertere Handhabung und Materialbeschaffung hat.

Beim BLEACH&STAIN-Verfahren werden nur jeweils 3 Antikörper gleichzeitig inkubiert. Dies hat den Vorteil, dass die Methode auf die drei am besten etablierten, stabilsten, günstigsten und von vielen Anbietern verfügbaren Fluorophore (520 nm, 570 nm und 650 nm) beschränkt werden kann. Allerdings besteht grundsätzlich die Gefahr, dass nicht entfernte Fluoreszenzsignale im nächsten Färbezyklus erneut gemessen und dem falschen Protein zugeordnet werden. Die Ergebnisse der Kontrollmessungen zwischen den Färbeschritten

zeigen jedoch, dass eine Ausbleichdauer von 60 Minuten bei 1600 Watt Lichtleistung, 4 °C Kühlung und 3 % H₂O₂ ausreicht, um die Fluoreszenzfarbstoffe vollständig zu eliminieren. Die Idee der multiplen Färbung wurde erstmals von Nakane und Pierce während ihrer ersten Immunoenzym-Einzelfärbung erwähnt¹⁴⁶. Die gleichzeitige Inkubation mehrerer Antikörper mit unterschiedlicher Markierung auf dem gleichen Gewebeschnitt wurde somit bereits vor 54 Jahren beschrieben¹⁴⁷: Nakane führte eine Immunfärbung mit der Peroxidase-Anti-Peroxidase Methode (PAP-Methode) unter Verwendung von 3 unterschiedlichen Farbstoffen durch. Die meisten aktuellen Methoden bzw. kommerziellen Systeme verwenden durchaus mehr als 3 Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig. Grundsätzlich ist die Anzahl der Farbstoffe dadurch limitiert, dass mit steigender Anzahl der Fluorophore Überschneidungen der Emissionsspektren auftreten, die zu Falschmessungen führen, wenn sie nicht aufwändig herausgerechnet werden. Die Firma Akoya geht hier mit dem „Spectral Imaging“ einen besonderen Weg, bei dem spezielle Gemische von Fluoreszenzfarbstoffen durch deren Emissionsspektren auseinandergehalten werden können. Zurzeit ist das Akoya-Verfahren auf 7 verschiedene Marker limitiert¹⁴⁸. Andere Hersteller nutzen andere Verfahren zur Markierung der Antikörper, z. B. Hartmetallionen^{149,150}, Alkali Metallionen¹⁵¹ und Lanthaloide¹⁵², mit denen bis zu 5 Antikörper gleichzeitig detektiert werden können. Alle diese Verfahren haben jedoch wichtige Nachteile: Die verwendeten Markierungssysteme sind meist sehr teuer (z. B. direkt Fluoreszenz-konjugierte Antikörper), manchmal nur vom Hersteller des Systems lieferbar (z. B. Akoya Bioscience, Miltenyi Biotec) und in der Regel ausschließlich mit dem speziellen System des jeweiligen Herstellers messbar oder vom Hersteller nur selber ausführbar (z. B. Vectra Polaris Slide Scanner, MACS Imaging and Microscopy).

Ein weiterer Vorteil der Verwendung von nur 3 Antikörpern gleichzeitig ist, dass sie mit leicht erhältlichen kommerziellen Sekundärantikörpern detektiert werden können. Sekundärantikörper müssen aus einer anderen Spezies als der Primärantikörper stammen, sodass bei 3 verschiedenen Primärantikörpern zusätzlich 3 verschiedene Sekundärantikörper eingesetzt werden müssen, deren Herkunfts-Spezies sich nicht überschneiden dürfen. Mit diesem „klassischen“ Verfahren sind daher enge Grenzen für die Anzahl der gleichzeitig eingesetzten Antikörper vorgegeben, aber 3 Primärantikörper können auf diese Weise günstig nachgewiesen werden. In jeder neuen Färberunde können problemlos wieder

dieselben Antikörper-Spezies-Kombinationen eingesetzt werden. Erleichtert wird die Detektion weiterhin dadurch, dass nach jedem Färbezyklus nicht der Antikörper entfernt wird, sondern das jeweilige Fluorophor-konjugierte Thyramid an der Antigen-Bindestelle. Auch dadurch ist die Flexibilität gegeben, mehrere Antikörper der gleichen Spezies für die multiple Färbung des Gewebes einzusetzen (4).

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Reihenfolge der Antikörper in den Färbezyklen. Nicht jeder Antikörper, welcher in einem frühen Färbezyklus optimal färbte, konnte auch in den letzteren Färberunden mit zufriedenstellendem Ergebnis eingesetzt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Bindungsaktivität von Antikörpern von der Qualität und der Quantität der Epitope abhängig ist. Es erscheint logisch, dass manche Epitope empfindlich auf die wiederholten Behandlungsschritte des Gewebes mit Hitze und Chemikalien reagieren. Zudem bleiben die Antikörper vorhergehender Färbezyklen weitestgehend im Gewebe und könnten dadurch sterisch den Zugang zu den Epitopen der späten Färbezyklen erschweren. Es zeigte sich, dass es nützlich war, „starke“ Antikörper, wie zum Beispiel anti-panCK, in einer der letzten Färberunden zu verwenden. „Schwache“ Antikörper, wie der anti-CTLA-4-Antikörper, wurden besser in einem frühen Zyklus verwendet, um die optimale Bindung zu gewährleisten. Was ein „starker“ und was ein „schwacher“ Antikörper ist, muss empirisch ermittelt werden. Die Notwendigkeit solcher ausgedehnter Etablierungsversuche ist nicht speziell für das BLEACH&STAIN-System – es gilt vielmehr für jedes Multiplex-Verfahren und wurde z. B. auch für das Akoya-System ausführlich in der Literatur beschrieben¹⁴⁸.

4.2. Antikörperaustestung

Naturgemäß ist die Aussagekraft einer immunhistochemischen Färbung nur so gut wie die Qualität des verwendeten Antikörpers. Die 15 Antikörper für die vorliegende Studie wurden kommerziell erworben und ausgetestet. Zu den Auswahlkriterien zählte, dass der Antikörper bereits „erfolgreich“ in der Literatur am Formalin-fixierten Gewebe verwendet wurde, die dokumentierten Färbungen ansprechend aussahen und die Färbung in den Gewebetypen auftrat, in denen sie auch zu erwarten war. Tatsächlich zeigten 14 der 15 kommerziellen Antikörper eine gute Qualität, nur der kommerzielle FOXP3-Antikörper war zuerst nicht zufriedenstellend und wurde daher vorerst selbst hergestellt. Letztendlich wurde jedoch ein

geeigneter kommerzieller FOXP3 Antikörper gefunden, der den Anforderungen der Spezifität und Sensitivität entsprach und für die immunhistochemischen Färbungen dieser Studie verwendet werden konnte (Biolegend, Klon 206D). Die Qualitätsbestimmung der selbst hergestellten Antikörper gegen FOXP3 richtete sich danach, ob ein Antikörper offensichtlich „falsche“ Gewebe- oder Zelltypen färbte (was auf Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen hindeutet)^{125,126} oder generell eine zu hohe Hintergrundfärbung aufwies, die nicht durch Verringern der Antikörper-Konzentration (d. h. Verdünnen) beseitigt werden konnte (was auf eine geringe Affinität des Antikörpers hindeutet)¹²⁶. Der anti-FOXP3-Klon 1A6 färbte ausschließlich einige wenige Lymphozyten ohne störenden Hintergrund, erwies sich in der Western Blot-Analyse als spezifisch für FOXP3 und färbte HeLa-Zellen mit ektopischer FOXP3-Expression (aber nicht Wildtyp-HeLa-Zellen), sodass der Antikörper für die Studie ausgewählt wurde. Wenn auch die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen FOXP3 zunächst einfach erschien, mussten doch 8 Mäuse immunisiert werden, um diesen einen guten Antikörper zu erhalten. Da die Wahl des Mausstammes maßgeblich zu dem Erfolg der Antikörperproduktion im Organismus der Maus beitragen kann (7), wurden für die Experimente dieser Studie BALB/c-Mäuse verwendet. In einer Studie von Trunova et al. konnte festgestellt werden, dass in BALB/c-Mäusen die Konzentration unterschiedlicher Zytokine (IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, TNF- α) um ein Vielfaches höher war als in der oft verwendeten Linie C57BL/6. Die Inzucht-Linie C57BL/6 wies laut Trunova et al. eine höhere zelluläre Immunantwort (Th1) auf, wobei BALB/c-Mäuse eine größere Tendenz zu einer humoralen Immunantwort (Th2), also einer Produktion von Antikörpern durch die B-Lymphozyten, zeigten. Zwar konnten so über 100 Antikörper-Klone generiert werden, die im ELISA ein positives Resultat zeigten, und mehr als 50 dieser Klone färbten auch Lymphozyten in der Immunhistochemie am Formalin-fixierten Testgewebe (Lymphknoten, Kolon, Niere, Plazenta, FOXP3-positive und -negative Zelllinien). Allerdings war die Färbung bei fast allen dieser Klone (mit Ausnahme von 1A6) entweder nicht spezifisch für FOXP3, zu schwach, oder mit zu viel Hintergrund. Solche suboptimalen Antikörper können ggf. in einer einfachen Immunhistochemie verwendet werden (wenn es denn absolut keinen besseren Antikörper gibt), sind aber für die Fluoreszenz-IHC vollkommen ungeeignet, da sie ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis erzeugen mit entsprechend ungenauer Detektierung der verwendeten Marker. Der Klon 1A6 kann daher als „kostbar“ bezeichnet werden und wurde durch Einfrieren der Hybridoma-Kultur für kommende Studien gesichert. Durch die alleinige Zellkultur und das Einfrieren und Auftauen von Proben kann es

jedoch zu Mutationen und Chromosomenverlust¹⁵³, Zellschädigung durch Gefrierschwankungen¹⁵⁴ oder Kontaminationen¹⁵⁵ durch unsauberes Arbeiten in der Zellkultur kommen. Über die Generierung der Hybridom-Zelllinien hinaus wäre es daher ein lohnendes Anschlussprojekt, die kodierende Sequenz des Antikörpers zu bestimmen, zu klonieren und damit die Voraussetzung für eine rekombinante Version des Antikörpers zu schaffen¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

4.3. Analyse mittels künstlicher Intelligenz

Die manuelle Auswertung von biologischen und prognostischen Markern stellt gewisse Herausforderungen dar. Eine große Rolle spielt hier die Interobserver-Variabilität: denn obwohl geschulte Pathologen eine jahrelange Erfahrung mit der Auswertung immunhistochemischer Färbungen haben, ist es durch die konsekutiv geschnittenen Gewebeproben nicht möglich, eine Koexpression mehrerer Marker zu erkennen. Außerdem können da, wo die Arbeit vom Menschen verrichtet wird, Fehler durch subjektives Bewerten, schlechte Anleitung oder unsauberes Arbeiten durch Zeitmangel und Stress aufkommen. Die stetig steigende Anzahl von simultan zu analysierenden Biomarkern erfordert immer komplexere Methoden. Zur Analyse dieser umfangreichen Datensätze der Biomarker haben Goltsev et al. bereits den Vorgang der „Spillover Compensation“ untersucht. Hierbei handelt es sich um einen linearen Algorithmus, der die Kontamination durch Signale benachbarter Zellen erfasst¹⁴⁴. Eine ähnliche Methode wurde von Bai et al. als Reinforcement Dynamic Spillover Elimination (REDSEA) beschrieben. Diese Methode korrigiert ebenfalls die lateralen Überlagerungen der einzelnen Marker zwischen anliegenden Zellen¹⁵⁹. Diese kompetenten Methoden erlauben eine differenzierte Analyse von Immunzellen, können jedoch aufgrund von überlappenden Zellen gerade für die Analyse von Zell-Zell-Interaktionen ungeeignet sein. Um gerade die Genauigkeit der Zelldetektion im Rahmen interagierender Zellen (i.e., überlappender oder sich berührender Zellen) zu erfassen, wurde in dieser Studie ein Deep Learning-Algorithmus verwendet, welcher auf einem DAPI-Signal basiert, das den Zellkern anfärbt, um die Positionen der Zellen (bzw. der Zellkerne) zu bestimmen. Dadurch war es möglich, im zweiten Schritt eine koexpressions- und lokalisationsabhängige Analyse mehrerer Biomarker auf den Zelltypen automatisch durchzuführen. Hierzu wurde das DAPI-Färbesignal von 200 Zellkernen manuell nachgezeichnet. Im Anschluss wurden diese Zeichnungen mit dem Deep Learning-Algorithmus trainiert und zum erneuten Zeichnen von 200 weiteren

Zellen verwendet. Diese wurden manuell korrigiert, und nach mehreren Runden erweiterte sich das Trainingsset somit um ein Vielfaches. Der Algorithmus wurde letztendlich über mehrere Stunden auf dem Trainingsset trainiert, nicht zu lange, da es sonst zu einem „Auswendiglernen“ der Labels kommen kann. Zuletzt wurde dieser Algorithmus auf einem Gewebeausschnitt getestet, welcher nicht im Trainingsset enthalten war, und die Zellerkennung wurde manuell geprüft. Das trainierte Deep Learning-System basiert auf einem Zusammenspiel der Markerintensität, der Zellformgebung und der relativen Zellmarker-Expressionsstruktur. Es zeigte eine höhere Präzision als der üblicherweise verwendete intensitätsbasierte Schwellenwert, welcher für jeden Biomarker und jeden TMA individuell festgelegt werden muss¹⁶⁰. Diesbezüglich ermöglicht das hier entwickelte Deep Learning-basierte System für die automatische PD-L1-Erkennung auf Tumoren und Immunzellen eine reproduzierbare und vollautomatische PD-L1-Quantifizierung.

Um die Zuverlässigkeit der KI-gestützten Analyse zu beurteilen, wurden zunächst Tumorgewebe mit bekanntem Expressionsniveau von PD-L1 untersucht. Aus einer vorhergehenden Untersuchung lagen Daten zur PD-L1-Expression an einem Multitumor-TMA mit mehr als 11.838 Tumorgeweben von 118 verschiedenen Tumortypen vor¹⁶¹. PD-L1 wurde mit einem validierten Antikörper durch konventionelle Hellfeld-IHC gefärbt und lichtmikroskopisch durch einen Pathologen ausgewertet. Als Schwellenwert für einen positiven Befund in den Tumoren wurden 10 % sichtbar gefärbter Tumorzellen angenommen. Zudem wurde die Expression auf Immunzellen semiquantitativ (keine, wenig, viel) bestimmt. Ein Subset von 3.098 Tumoren von 44 verschiedenen Tumortypen wurde mit dem BLEACH&STAIN-Verfahren gefärbt und vollautomatisch über das KI-gestützte Verfahren ausgewertet. Die Ergebnisse der automatischen Auswertung stimmten signifikant mit den von einem erfahrenen Pathologen manuell ausgezählten Hellfelddaten überein. Darunter zeigte die Analyse der PD-L1-positiven Tumorzellen sowie der PD-L1-positiven Immunzellen eine hohe Signifikanz gegenüber der manuellen Hellfeld-Auszählung. Dass bei einigen Tumorentitäten die PD-L1-Positivität durch die KI nicht bestätigt werden konnte, ist vermutlich einer zu geringen Probenanzahl in den entsprechenden Entitäten geschuldet: Beim kleinzelligen neuroendokrinen Prostatakarzinom und dem medullären Schilddrüsenkarzinom gab es in dieser Studie nur einen Patienten, 5 (0,1 %) Patienten hatten ein Pankreaskarzinom und 11 (0,3 %) Patienten gab es in der Gruppe des tubulären

Brustkrebskarzinoms. Bemerkenswert ist ebenfalls, dass durch die KI-Analysen keine zusätzlichen PD-L1-positiven Tumorentitäten gefunden werden konnten, die mit der konventionellen Analyse „verpasst“ worden wären. Übereinstimmend mit den bisher publizierten Daten ist auch der Befund dieser Studie, dass PD-L1 je nach Tumorentität deutlich unterschiedlich häufig exprimiert wird, aber in praktisch allen Tumortypen vorkommen kann, wie Untersuchungen von O'Malley et al., Patel et al. und zuletzt auch bei Möller et al.^{24,160,162} bestätigen. Auch war die Rangfolge der Tumortypen nach Häufigkeit der PD-L1-Positivität mit konventioneller IHC-/manueller Auswertung und Multiplex-IHC-/KI-Auswertung praktisch identisch. So fand sich die PD-L1 besonders häufig in Plattenepithelkarzinomen unterschiedlichen Ursprungs^{163,164}, aber nur selten in Prostatakarzinomen¹⁶⁵. Die weitgehende Reproduzierbarkeit bestehender Daten belegt die Zuverlässigkeit der KI-gestützten automatischen Analyse. Dies gilt umso mehr, als andere Replikate des TMAs für die KI-Analyse verwendet wurden als für die ursprüngliche Hellfeld-Analyse. Die KI-Methode ist offensichtlich in der Lage, charakteristische Eigenschaften des Tumors und seiner Umgebung zuverlässig zu erfassen.

Die Analyse wurde anschließend erweitert, um die Tumoren gemäß ihrer PD-L1-Expression zu klassifizieren: Tumore mit PD-L1-Expression auf Tumor- und Immunzellen (Gruppe 1), Tumore mit PD-L1-Expression ausschließlich in den Immunzellen (Gruppe 2) und Tumore mit gänzlich fehlender PD-L1-Expression (Gruppe 3). In Kombination mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Immun-Biomarkern, welche in dieser Studie verwendet wurden, konnten breite, biologisch relevante Aussagen getroffen werden, die später zu einer weiteren Subklassifizierung der Tumoren in „entzündet“ und „nicht-entzündet“ führten. Der Ausdruck des „immunentzündeten Phänotyps“ ist durch eine hohe Dichte von tumorinfiltrierenden Lymphozyten im Zentrum sowie am invasiven Rand des Tumors gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu weist eine „Immunwüste“ (immune desert) eine geringe Dichte an tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) in beiden Kompartimenten auf^{166,167}. In dieser Studie ist jedoch deutlich zu erkennen, dass neben dem immunentzündeten Phänotyp auch ein nicht-entzündeter Phänotyp existiert, der anders als eine Immunwüste eine geringe Anzahl an Immunzellen aufweist. Diese Studie zeigte, dass ein großer Teil der PD-L1-positiven Gruppen (Subgruppen G1.2 und G2.2) eine geringe Anzahl von Immunzellen enthielten, also in die Rubrik „nicht-entzündet“ fielen. Diese Feststellung lässt sich mit einer panCK-Studie an

9.677 Proben des „The Cancer Genome Atlas“¹⁶⁸ vergleichen. Hier wurde gezeigt, dass ein signifikanter prozentualer Anteil von PD-L1-positiven Proben einen sehr geringen Anteil an CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen aufwies. Ähnliche Ergebnisse in früheren Übersichtsarbeiten^{169,170} hoben hervor, dass PD-L1-positive Fälle mit einer geringen Rate von lymphozytärer Infiltration einhergehen, jedoch ist hier die Häufigkeit und klinische Relevanz noch weitreichend ungeklärt.

Um die Komposition Tumor-infiltrierender Lymphozyten weiter zu untersuchen, wurden die einzelnen Subtypen innerhalb der drei oben genannten Phänotyp-Gruppen (Gruppen 1 - 3) mit einem MCL- und X-Shift-Clustering analysiert. Hier zeigte sich, dass T-Zellen und dendritische Zellen, meist in Verbindung mit einer geringen Anzahl an M2-Makrophagen, vermindert vorhanden waren, was ein Kennzeichen für ein nicht-entzündetes PD-L1⁺-Tumor-Mikromilieu ist (G1.2, G2.2). Diese Forschungsergebnisse werden durch die Tatsache, dass eine geringe CD8⁺-zytotoxische T-Zell-Infiltration mit einer geringen Infiltration von CD4⁺-T-Zellen¹⁷¹, FOXP3⁺-regulatorischen T-Zellen¹⁷¹, dendritischen Zellen¹⁷² und M2-Makrophagen¹⁷³ einhergehen, unterstützt. Zu erwähnen ist noch, dass die Erkenntnis der teilweise schlechten Prognose von nicht-entzündeten PD-L1⁺-Brustkrebspatienten in dieser Studie (G1.2, G2.2) ein Zeichen für eine klinische Relevanz ist und es möglich sein könnte, unsere Immunschubklassifikationen von PD-L1⁺ auf Tumor bei Brustkrebspatienten noch weiter zu differenzieren.

4.4. Lokalisationsabhängige PD-L1-Expressionen

Tumore mit starker PD-L1-Expression (G1.1) fielen im Vergleich zu den PD-L1-negativen Tumoren der Gruppe 3.2 durch eine veränderte Zusammensetzung des Immuninfiltrates auf. So fanden sich in Gruppe 1.1 etwa 5-mal mehr intratumorale M2-Makrophagen und 7-mal mehr intratumorale dendritische Zellen auf als in Gruppe 3.2. Diese Beobachtung passt gut zu der bekannten immunsuppressiven Wirkung von PD-L1²⁰. Darüber hinaus könnte aber auch den intratumoralen Makrophagen eine Rolle bei der Regulierung des lymphozytären Infiltrates zukommen. Denkbar wäre z. B., dass die Makrophagen Zytokine produzieren, die durch negative Chemotaxis zum Ausschluss bestimmter Lymphozyten aus dem Tumor führen. Ein solches „Bleib weg“ Signal könnte seinen Sinn darin haben, eine übermäßig ausufernde zytotoxische Reaktion zu verhindern. Mehrere Studien haben – wenn auch teils nur

anekdotisch – ähnliche Befunde erhoben¹⁷⁴⁻¹⁷⁷. So untersuchten z. B. Wu et al. die PD-L1-Expression im Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle: Hier fanden sie heraus, dass M1- und M2-Makrophagen-assoziierte Zytokine eine starke Korrelation mit PD-L1-Expression aufwiesen¹⁷⁷. In einer weiteren Studie mit konventioneller Hellfeld-Immunhistochemie zeigte sich, dass in den PD-L1-positiven Regionen eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms eine signifikant geringere Anzahl an Tumor-infiltrierenden Lymphozyten vorhanden war als in den PD-L1-negativen Regionen¹⁷¹. Die Autoren berichteten zudem von mehr Zell-Zell-Interaktionen im Tumormikromilieu zwischen PD-L1-positiven Tumorzellen und Makrophagen als zwischen PD-L1-positiven Tumorzellen und PD-1-positiven T-Zellen. Auch diese Beobachtung ist mit einer aktiven Beeinflussung des Immuninfiltrates durch die Makrophagen vereinbar.

4.5. PD-L1-Expression in 44 Karzinom-Entitäten und Prognoserelevanz im Brustkrebs

43 (98 %) von 44 unterschiedliche Karzinom-Entitäten zeigten in dieser Studie eine PD-L1 Expression auf Tumor- und/oder Immunzellen. Durch unterschiedliche Analysen wurden innerhalb dieser 44 unterschiedlichen Tumorentitäten 6 PD-L1-Gruppen festgelegt. Diese Gruppen beziehen sich nicht nur allein auf die Expression von PD-L1 auf Tumor, Makrophagen und dendritischen Zellen, sondern auch auf die Kombination mit Entzündungszellen im Tumormikromilieu aller Entitäten. Das Entitätendiagramm zeigte, dass beim Mammakarzinom die prozentuale Immuncheckpoint-Expression von PD-L1 und PD-1 auf T-Zellen, M1 und vor allem M2 hoch war, was ein guter Grund war, diese Entität noch genauer zu untersuchen. Dadurch dass Follow-up Daten von 587 Brustkrebspatienten vorhanden waren, war es möglich die prognostische Relevanz der 6 Gruppen zu untersuchen. Eine wichtige und bisher ungelöste Fragestellung ist es nämlich, ob PD-L1 zu einer guten oder schlechten Prognose bei Brustkrebs führt. Die Daten dieser Studie zeigten, dass die Prognose bei den entzündeten PD-L1⁺-Gruppen (G1.1, G2.1) und den PD-L1-negativen Gruppen signifikant besser war, als bei Patienten mit einer nicht-entzündeten PD-L1-Expression ($p < 0.001$). Die derzeitigen Meinungen dazu sind widersprüchlich: Wang et al. untersuchten in einer Studie von 2017 die prognostische Relevanz der PD-L1 Expression bei einer Kohorte von 443 Brustkrebspatienten und fanden heraus, dass die PD-L1 Expression signifikant mit einer schlechten Prognose assoziiert ist¹⁷⁸. Im Gegensatz dazu, zeigte eine Studie von Baptista et al. bei der Analyse der PD-L1-Expression bei 192 Brustkrebspatienten eine gute Prognose. Hier

vermutet Babbista et al., dass die Überlebensrate damit zusammenhängen könnte, dass eine starke Antitumor-Immunantwort zu einer PD-L1-Expression führen könnte¹⁷⁹, was die Ergebnisse dieser Dissertation unterstützt. An dieser Stelle muss jedoch noch erwähnt werden, dass die Aufteilung in die jeweiligen Gruppen dazu führte, dass die zwei Gruppen mit einer schlechten Prognose im Gegensatz zu den anderen Gruppen weniger Patienten beinhalteten (G1.2: n = 3, G2.2: n = 19). Fraglich ist hier, ob sich die Prognose mit mehr Patienten in den jeweiligen Gruppen anders verhalten hätte, wenn mehr Patienten vorhanden gewesen wären. Dieser Unterschied in der Prognose von PD-L1 zwischen entzündeten und nicht-entzündeten Gruppen könnte für die zukünftige Forschung ein guter Ausgangspunkt sein: Der Fokus würde dann nicht nur auf PD-L1 allein, sondern in Verbindung mit weiteren Parametern, wie Immunzellen, liegen. Die Überlebenskurve der 3 Hauptgruppen zeigte keine Signifikanz, wodurch keine klare Aussage getroffen werden kann.

Wichtig für die Forschung und Beantwortung von Fragestellungen ist es unter anderem, die Bestimmung der PD-L1-Expression auf Tumor- und Immunzellen einheitlich festzulegen. Bisher gehen die Studienergebnisse in der Literatur bei diesem Thema auseinander. Die Ergebnisse dieser Dissertation bestätigten die kritische Rolle der PD-L1-Expression im Brustkrebs: die automatisch detektierte relative Expression von PD-L1 zeigte einen starken prognostischen Einfluss auf die Gesamtüberlebensrate der Patienten, anders als der üblich verwendete prozentuale Anteil an PD-L1⁺-Tumor- und Immunzellen (TPS, MPS). Diese Erkenntnis unterstützt und erweitert die Ergebnisse aus einer Meta-Analyse von Lu et al., welche zeigte, dass eine PD-L1-Quantifizierung durch die Verwendung von Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie im Vergleich zu der klassischen Immunhistochemie signifikant genauer ist und somit das prädiktive Ansprechen auf anti-PD-L1/PD-1-Therapien erhöht ⁶⁰.

5. Zusammenfassung

Maligne Tumorerkrankungen sind die zweithäufigste Todesursache weltweit. Der Erfolg von sogenannten Immuncheckpoint-Therapien hat ein besonderes Schlaglicht auf die Interaktionen von den Tumorzellen und den Zellen des Immunsystems geworfen. Unklar bleibt bislang jedoch, warum ein relevanter Anteil der Patienten nicht auf die bislang verfügbaren Therapien anspricht. Die Suche nach neuen Therapie-Zielproteinen und Markerproteinen zur verbesserten Vorhersage der Patientenprognose sowie des Therapieansprechens wird jedoch durch die Vielzahl der beteiligten Proteine und ihre komplexen Interaktionen massiv erschwert. Die aktuell in der Routinediagnostik etablierten Analyseverfahren erlauben nur die Untersuchung einzelner Marker, wodurch eine Ko-Expression und ein räumlicher Bezug verschiedener Proteine praktisch nicht erfasst werden kann. Dementsprechend besteht ein dringender Bedarf für neue Methoden, die eine gleichzeitige Untersuchung möglichst vieler Proteine und damit eine umfassende Darstellung des Tumormikromilieus erlauben.

Die vorliegende Studie hatte deshalb zum Ziel, eine Methode zur Analyse des Tumormikromilieus zu etablieren, die sowohl in der Routinediagnostik als auch für die Hochdurchsatz-Gewebeanalyse in der Tumorforschung anwendbar ist. Die Tauglichkeit der Methode sollte für zwei Anwendungsbereiche validiert werden: Die Untersuchung der molekularen Epidemiologie verschiedener Tumor- und Immunproteine in vielen verschiedenen humanen Tumortypen, sowie die Suche nach neuen Prognosemarkern beim Mammakarzinom. Hierzu wurden Gewebemikroarrays mit mehr als 17.000 Gewebeproben 44 verschiedener Tumor- und Subtypen auf die Expression von mehr als 15 verschiedenen Proteinen des Tumor-Immun-Environments mittels spezieller adaptierter Multiplex-Fluoreszenz-IHC untersucht. Zur digitalen Bildanalyse wurden Verfahren des Deep Learnings der künstlichen Intelligenz angewendet und optimiert. Die biostatistische Auswertung wurde mit JMP 16.0.0- und R-Version 2021.09.1 durchgeführt.

Als Ergebnis der Studie wurde das BLEACH&STAIN Verfahren entwickelt, welches auf der sequenziellen Anwendung mehrere Runden von Multiplex-Fluoreszenz-IHC beruht. Durch wiederholte Färbe- und Bleichzyklen konnten 15 verschiedene Antikörper (PD-L1, PD-1, CTLA-4, CD3, CD4, CD8, FOXP3, CD68, CD163, CD11c, iNOS, Ki67, CD20, CD31 und panCK) auf ein und demselben Gewebe- bzw. Tumorarray-Schnitt „parallel“ gefärbt werden. Zur Analyse der

komplexen Färbungen wurde ein auf künstlicher Intelligenz-basierender Framework, der mehr als 20 verschiedene Deep Learning-Systeme (U-Net, DeepLabV3⁺) umfasst, entwickelt und validiert. Durch die automatisierte Analyse der Tumor-Mikroumgebung wurde die Charakterisierung von drei PD-L1-Phänotypen (PD-L1⁺ Tumor und Immunzellen [G1], PD-L1⁺ Immunzellen [G2], PD-L1 negativ [G3]), welche entweder „entzündet“ (G1.1, G2.1, G3.1) oder „nicht entzündet“ (G1.2, G2.2, G3.2) waren, ermöglicht. Patienten des entzündeten PD-L1⁺-Phänotyps (G1.1) wiesen eine erhöhte intratumorale CD68⁺CD163⁺ Makrophagen- und CD11c-dendritische Zell-Infiltration auf, die mit erhöhter PD-1 Expression, sowie fehlender Migration von T-Lymphozyten (CD3⁺CD4[±]CD8[±]FOXP3[±]) zum intraepithelialen Tumorkompartiment, einherging (je $p < 0.001$). Da von den Patienten mit Mammakarzinom Follow-up Daten vorhanden waren, konnte diese Entität auf die prognostische Relevanz von PD-L1 untersucht werden. Bei der Analyse dieser 587 Brustkrebspatienten konnte herausgefunden werden, dass nicht-entzündete PD-L1⁺-Patienten (G1.2, G2.2) eine schlechte Prognose aufwiesen ($p < 0,001$).

Die hier entwickelte BLEACH&STAIN Methode ermöglicht, in Kombination mit einem Deep Learning-basierten Framework für die automatische Quantifizierung von PD-L1 auf Tumor sowie Immunzellen, eine schnelle und umfangreiche Auswertung der Expression von PD-L1 auf verschiedenen Zelltypen und deren lokalitätsabhängigen Interaktionen zu inflammatorischen Zellen. Dieser Framework erlaubt die Identifikation von sechs unterschiedlichen PD-L1-Phänotypen, die von einem entzündeten PD-L1⁺-Tumorzell-Phänotyp (G1.1) mit einem intratumoralen T-Zell-Ausschluss zu einem nicht entzündeten PD-L1⁺-Immunzell-Phänotyp (G2.2) mit einer schlechten Prognose bei Brustkrebspatienten bis hin zu einem nicht-entzündeten PD-L1 negativen Phänotyp reichen (G3.2).

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: PD-1/PD-L1-Signalweg	4
Abbildung 2: Auswahl an T-Zell-aktivierenden und inhibierenden Immuncheckpoint-Rezeptoren.....	5
Abbildung 3: Einordnung der verschiedenen Begriffe der künstlichen Intelligenz.....	18
Abbildung 4: Maschinelles vs. Deep Learning	19
Abbildung 5: Anordnung des Gewebes auf einem TMA	24
Abbildung 6: Aufbau eines FOXP3-Expressionsvektors (https://www.sinobiological.com).....	31
Abbildung 7: Darstellung der BLEACH&STAIN-Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie- Technologie.....	46
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Deep Learning-basierten Einsatzes von künstlicher Intelligenz zur Bildanalyse.	47
Abbildung 9: Trainingszyklus der künstlichen Intelligenz am Beispiel von PD-L1.....	49
Abbildung 10: Zell-Trefferquote verschiedener Algorithmen der künstlichen Intelligenz.....	50
Abbildung 11: Validierung der BLEACH&STAIN-Methode mittels Signal-to-noise.	55
Abbildung 12: Validierung der BLEACH&STAIN-Methode – Wahl der Reagenzien.	56
Abbildung 13: PD-L1-Antikörpervergleich im Normalgewebe.....	57
Abbildung 14: Auswertung der FOXP3-Antikörperherstellung.....	59
Abbildung 15: U-Net-basierte- vs. manuelle Zellerkennung.	61
Abbildung 16: Dichte der Immunzellmarker innerhalb 44 Entitäten	62
Abbildung 17: Verteilung der Immuncheckpointexpression innerhalb 44 Entitäten	63
Abbildung 18: Charakterisierung der sechs Gruppen mittels X-Shift-, MCL-Clustering und Heatmap- Identifizierung.....	65
Abbildung 19: Digitalisierte Bilder der 6 Gruppen.	66
Abbildung 20: Analyse der 6 Gruppen innerhalb verschiedener Parameter durch eine Heatmap.	68
Abbildung 21: Netzdiagramm der 6 Gruppen aus 3.098 humanen Karzinomproben.....	69
Abbildung 22: Beziehung der Immunzellen zu den 3 Gruppen.	71
Abbildung 23: PD-L1-Phänotypen sind mit klinisch-histopathologischen Merkmalen assoziiert.....	72
Abbildung 24: Lokalisationsabhängige Analyse von Immunzellen innerhalb der PD-L1- Immunphänotypen.....	73
Abbildung 25: Lokalisationsabhängige Analyse der PD-L1 Expression auf Tumorzellen.....	74
Abbildung 26: Lokalisationsabhängige Analyse der PD-L1 Expression auf Immunzellen.....	75
Abbildung 27: Verteilung der sechs PD-L1-Phänotypen innerhalb 44 Entitäten	76
Abbildung 28: Kaplan-Meyer-Kalkulationen innerhalb der räumlichen Analyse werden durch Forest- Plots dargestellt	80

Abbildung 29: Kaplan-Meyer-Kalkulationen für das Gesamtüberleben und eine zeitabhängige „receiver operating characteristic“ (ROC) Kurve für die Sterblichkeit 5 Jahre nach der Operation des Patienten.	81
--	----

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PD-L1-Expression in humanen Tumoren ²⁷	7
Tabelle 2: FDA-zugelassene Companion-Assays für PD-L1	13
Tabelle 3: TMA-Kohorte der PD-L1 15+1-Studie	26
Tabelle 4: Zeitabstand der Zugabe von RPMI 1640-Medium	34
Tabelle 5: SDS-PAGE Protokoll für den Lauf von 2 Gelen	38
Tabelle 6: Komponenten für die cDNA-Herstellung pro Reaktion	40
Tabelle 7: Programmeinstellungen der Reversen Transkriptase	40
Tabelle 8: Liste der verwendeten Antikörper, pH-Werte, Verdünnungen und Opal-Fluorophore für die Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie	45
Tabelle 9: Auswahl der FDA-zugelassenen PD-L1-Antikörper	43
Tabelle 10: Sensitivität und Spezifitätsmessung der 4 PD-L1-Antikörper.	58
Tabelle 11: Assoziation zwischen den 3 Hauptgruppen und verschiedenen Parametern.	70

8. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Amper
AKT	Synonym der Proteinkinase B
Amp	Ampicillin
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
cDNA	Komplementäre DNA
CI	Konfidenzintervall
CMV	cytomegalovirus
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified eagles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
et al.	latein: und andere
FBS	fetal bovine serum
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
g	Gramm
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O _{dest}	Destilliertes Wasser
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin
HEK	human embryonic kidney
HR	Hazard-Ratio
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	immunoglobulin-like
IL-2	Interleukin-2
irAEs	Immune related adverse events
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
kDa	Kilodalton
KpnI	Restriktionsenzym aus <i>Klebsiella pneumoniae</i> OK8
l	Liter
MAPK	mitogen-activated protein
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

nm	Nanometer
ORF	Open reading frame
P	Phosphoryliert
P/S	Penicillin/Streptomycin
pan	total-
PBS	Phosphate buffered saline
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1
PD-L2	Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 2
PI3K	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PVDF	Polyvinylidene fluoride
Ras	Sarkom der Ratte
rpm	round per minute
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelectrophorese
SHP2	SH2 containing protein tyrosine phosphatase-2
TBS	Tris-buffered saline
TBS/T	Tris-buffered saline mit Tween20
V	Volt
W	Watt
WHO	World health organisation
XbaI	Restriktionsenzym aus dem Bakterium <i>Xanthomonas badrii</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

9. Literaturverzeichnis

- 1 Mattiuzzi, C. & Lippi, G. Current Cancer Epidemiology. *J Epidemiol Glob Health* 9, 217-222, doi:10.2991/jegh.k.191008.001 (2019).
- 2 Alt-Epping, B., Alt-Epping, S., Quintel, M. & Nauck, F. [Developments in modern oncology. Ramifications for anesthesia and intensive care medicine]. *Anaesthesist* 58, 821-826, doi:10.1007/s00101-009-1561-9 (2009).
- 3 Gegechkori, N., Haines, L. & Lin, J. J. Long-Term and Latent Side Effects of Specific Cancer Types. *Med Clin North Am* 101, 1053-1073, doi:10.1016/j.mcna.2017.06.003 (2017).
- 4 Paluch, C., Santos, A. M., Anzilotti, C., Cornall, R. J. & Davis, S. J. Immune Checkpoints as Therapeutic Targets in Autoimmunity. *Front Immunol* 9, 2306, doi:10.3389/fimmu.2018.02306 (2018).
- 5 Dine, J., Gordon, R., Shames, Y., Kasler, M. K. & Barton-Burke, M. Immune Checkpoint Inhibitors: An Innovation in Immunotherapy for the Treatment and Management of Patients with Cancer. *Asia Pac J Oncol Nurs* 4, 127-135, doi:10.4103/apjon.apjon_4_17 (2017).
- 6 Askeland, E. J., Newton, M. R., O'Donnell, M. A. & Luo, Y. Bladder Cancer Immunotherapy: BCG and Beyond. *Adv Urol* 2012, 181987, doi:10.1155/2012/181987 (2012).
- 7 Marin-Acevedo, J. A. *et al.* Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. *J Hematol Oncol* 11, 39, doi:10.1186/s13045-018-0582-8 (2018).
- 8 Sharma, P. *et al.* Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 18, 312-322, doi:10.1016/S1470-2045(17)30065-7 (2017).
- 9 Rosenberg, J. E. *et al.* Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* 387, 1909-1920, doi:10.1016/S0140-6736(16)00561-4 (2016).
- 10 Balar, A. V. *et al.* First-line pembrolizumab in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and unresectable or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-052): a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 18, 1483-1492, doi:10.1016/S1470-2045(17)30616-2 (2017).
- 11 Khunger, M. *et al.* Programmed Cell Death 1 (PD-1) Ligand (PD-L1) Expression in Solid Tumors As a Predictive Biomarker of Benefit From PD-1/PD-L1 Axis Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JCO Precision Oncology* 1, 1-15, doi:10.1200/po.16.00030 (2017).
- 12 Udall, M. *et al.* PD-L1 diagnostic tests: a systematic literature review of scoring algorithms and test-validation metrics. *Diagn Pathol* 13, 12, doi:10.1186/s13000-018-0689-9 (2018).
- 13 Galon, J. *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-1964, doi:10.1126/science.1129139 (2006).
- 14 Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. & Chen, L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5, 1365-1369, doi:10.1038/70932 (1999).

- 15 Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26, 677-704, doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331 (2008).
- 16 Catakovic, K., Klieser, E., Neureiter, D. & Geisberger, R. T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy. *Cell Commun Signal* 15, 1, doi:10.1186/s12964-016-0160-z (2017).
- 17 Alsaab, H. O. *et al.* PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol* 8, 561, doi:10.3389/fphar.2017.00561 (2017).
- 18 Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R. & Freeman, G. J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 8, 239-245, doi:10.1038/ni1443 (2007).
- 19 Weber, J. Immune checkpoint proteins: a new therapeutic paradigm for cancer--preclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade. *Semin Oncol* 37, 430-439, doi:10.1053/j.seminoncol.2010.09.005 (2010).
- 20 Han, Y., Liu, D. & Li, L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* 10, 727-742 (2020).
- 21 Mercadante, E. R. & Lorenz, U. M. Breaking Free of Control: How Conventional T Cells Overcome Regulatory T Cell Suppression. *Front Immunol* 7, 193, doi:10.3389/fimmu.2016.00193 (2016).
- 22 Wang, M. *et al.* Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer* 8, 761-773, doi:10.7150/jca.17648 (2017).
- 23 Swann, J. B. & Smyth, M. J. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 117, 1137-1146, doi:10.1172/JCI31405 (2007).
- 24 Patel, S. P. & Kurzrock, R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther* 14, 847-856, doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0983 (2015).
- 25 Freeman, G. J. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192, 1027-1034, doi:10.1084/jem.192.7.1027 (2000).
- 26 O'Malley, D. P. *et al.* Immunohistochemical detection of PD-L1 among diverse human neoplasms in a reference laboratory: observations based upon 62,896 cases. *Mod Pathol* 32, 929-942, doi:10.1038/s41379-019-0210-3 (2019).
- 27 Moeller K., K. M., Bady E. PD-L1 expression and CD8 positive lymphocytes in human neoplasms: A tissue microarray study on 11,838 tumor samples. *Cancer Biomarker (in Revision)* (2022).
- 28 Davis, A. A. & Patel, V. G. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker: an analysis of all US Food and Drug Administration (FDA) approvals of immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer* 7, 278, doi:10.1186/s40425-019-0768-9 (2019).
- 29 Taube, J. M. Unleashing the immune system: PD-1 and PD-Ls in the pre-treatment tumor microenvironment and correlation with response to PD-1/PD-L1 blockade. *Oncoimmunology* 3, e963413, doi:10.4161/21624011.2014.963413 (2014).
- 30 Brahmer, J. R. *et al.* Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 28, 3167-3175, doi:10.1200/JCO.2009.26.7609 (2010).

- 31 Topalian, S. L. *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366, 2443-2454, doi:10.1056/NEJMoa1200690 (2012).
- 32 Hargadon, K. M., Johnson, C. E. & Williams, C. J. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *Int Immunopharmacol* 62, 29-39, doi:10.1016/j.intimp.2018.06.001 (2018).
- 33 Weber, J. S. *et al.* Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 16, 375-384, doi:10.1016/S1470-2045(15)70076-8 (2015).
- 34 Robert, C. *et al.* Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* 372, 320-330, doi:10.1056/NEJMoa1412082 (2015).
- 35 Borghaei, H. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 373, 1627-1639, doi:10.1056/NEJMoa1507643 (2015).
- 36 Garon, E. B. *et al.* Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 372, 2018-2028, doi:10.1056/NEJMoa1501824 (2015).
- 37 Ansell, S. M. *et al.* PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 372, 311-319, doi:10.1056/NEJMoa1411087 (2015).
- 38 Armand, P. *et al.* Nivolumab for Relapsed/Refractory Classic Hodgkin Lymphoma After Failure of Autologous Hematopoietic Cell Transplantation: Extended Follow-Up of the Multicohort Single-Arm Phase II CheckMate 205 Trial. *J Clin Oncol* 36, 1428-1439, doi:10.1200/JCO.2017.76.0793 (2018).
- 39 Seiwert, T. Y. *et al.* Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol* 17, 956-965, doi:10.1016/S1470-2045(16)30066-3 (2016).
- 40 Ferris, R. L. *et al.* Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 375, 1856-1867, doi:10.1056/NEJMoa1602252 (2016).
- 41 Le, D. T. *et al.* Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 357, 409-413, doi:10.1126/science.aan6733 (2017).
- 42 Bellmunt, J. *et al.* Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med* 376, 1015-1026, doi:10.1056/NEJMoa1613683 (2017).
- 43 Fuchs, C. S. *et al.* Safety and Efficacy of Pembrolizumab Monotherapy in Patients With Previously Treated Advanced Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer: Phase 2 Clinical KEYNOTE-059 Trial. *JAMA Oncol* 4, e180013, doi:10.1001/jamaoncol.2018.0013 (2018).
- 44 El-Khoueiry, A. B. *et al.* Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet* 389, 2492-2502, doi:10.1016/S0140-6736(17)31046-2 (2017).
- 45 Nghiem, P. T. *et al.* PD-1 Blockade with Pembrolizumab in Advanced Merkel-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 374, 2542-2552, doi:10.1056/NEJMoa1603702 (2016).
- 46 Boland, C. R. & Goel, A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138, 2073-2087 e2073, doi:10.1053/j.gastro.2009.12.064 (2010).
- 47 Kunitomi, H. *et al.* New use of microsatellite instability analysis in endometrial cancer. *Oncol Lett* 14, 3297-3301, doi:10.3892/ol.2017.6640 (2017).
- 48 Zhu, L. *et al.* Microsatellite instability and survival in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Mol Clin Oncol* 3, 699-705, doi:10.3892/mco.2015.506 (2015).

- 49 Le, D. T. *et al.* PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 372, 2509-2520, doi:10.1056/NEJMoa1500596 (2015).
- 50 Riaz, N. *et al.* The role of neoantigens in response to immune checkpoint blockade. *Int Immunol* 28, 411-419, doi:10.1093/intimm/dxw019 (2016).
- 51 Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P. & Boon, T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 14, 135-146, doi:10.1038/nrc3670 (2014).
- 52 Costa, R. *et al.* Toxicity profile of approved anti-PD-1 monoclonal antibodies in solid tumors: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Oncotarget* 8, 8910-8920, doi:10.18632/oncotarget.13315 (2017).
- 53 Haratani, K. *et al.* Association of Immune-Related Adverse Events With Nivolumab Efficacy in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol* 4, 374-378, doi:10.1001/jamaoncol.2017.2925 (2018).
- 54 Day, D. & Hansen, A. R. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Inhibitors. *BioDrugs* 30, 571-584, doi:10.1007/s40259-016-0204-3 (2016).
- 55 Cortellini, A. *et al.* Correlations Between the Immune-related Adverse Events Spectrum and Efficacy of Anti-PD1 Immunotherapy in NSCLC Patients. *Clin Lung Cancer*, doi:10.1016/j.clcc.2019.02.006 (2019).
- 56 Berg, D., Malinowsky, K., Reischauer, B., Wolff, C. & Becker, K. F. Use of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues for diagnosis and therapy in routine clinical settings. *Methods Mol Biol* 785, 109-122, doi:10.1007/978-1-61779-286-1_8 (2011).
- 57 Matos, L. L., Trufelli, D. C., de Matos, M. G. & da Silva Pinhal, M. A. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark Insights* 5, 9-20, doi:10.4137/bmi.s2185 (2010).
- 58 Batenchuk, C. *et al.* A real-world, comparative study of FDA-approved diagnostic assays PD-L1 IHC 28-8 and 22C3 in lung cancer and other malignancies. *J Clin Pathol* 71, 1078-1083, doi:10.1136/jclinpath-2018-205362 (2018).
- 59 Rivalland, G. *et al.* Programmed Death–Ligand 1 (PD-L1) immunohistochemistry in NSCLC: Comparison and correlation between two antibodies. *Journal of Clinical Oncology* 34, e20036-e20036, doi:10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.e20036 (2016).
- 60 Lu, S. *et al.* Comparison of Biomarker Modalities for Predicting Response to PD-1/PD-L1 Checkpoint Blockade: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol* 5, 1195-1204, doi:10.1001/jamaoncol.2019.1549 (2019).
- 61 McLaughlin, J. *et al.* Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol* 2, 46-54, doi:10.1001/jamaoncol.2015.3638 (2016).
- 62 Camp, R. L., Chung, G. G. & Rimm, D. L. Automated subcellular localization and quantification of protein expression in tissue microarrays. *Nat Med* 8, 1323-1327, doi:10.1038/nm791 (2002).
- 63 Jorgensen, J. T. Companion and Complementary Diagnostics: Clinical and Regulatory Perspectives. *Trends Cancer* 2, 706-712, doi:10.1016/j.trecan.2016.10.013 (2016).
- 64 Phillips, T. *et al.* Development of an automated PD-L1 immunohistochemistry (IHC) assay for non-small cell lung cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 23, 541-549, doi:10.1097/PAI.0000000000000256 (2015).
- 65 Boyd, Z. *et al.* Abstract B001: Development of a PD-L1 companion diagnostic IHC assay (SP142) for atezolizumab. *Cancer Immunology Research* 4, B001-B001, doi:10.1158/2326-6074.CRICIMTEATIAACR15-B001 (2016).

- 66 Rebelatto, M. C. *et al.* Development of a programmed cell death ligand-1 immunohistochemical assay validated for analysis of non-small cell lung cancer and head and neck squamous cell carcinoma. *Diagn Pathol* 11, 95, doi:10.1186/s13000-016-0545-8 (2016).
- 67 Roach, C. *et al.* Development of a Companion Diagnostic PD-L1 Immunohistochemistry Assay for Pembrolizumab Therapy in Non-Small-cell Lung Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 24, 392-397, doi:10.1097/PAI.0000000000000408 (2016).
- 68 Rimm, D. L. *et al.* A Prospective, Multi-institutional, Pathologist-Based Assessment of 4 Immunohistochemistry Assays for PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol* 3, 1051-1058, doi:10.1001/jamaoncol.2017.0013 (2017).
- 69 Buttner, R. *et al.* Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry Testing: A Review of Analytical Assays and Clinical Implementation in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 35, 3867-3876, doi:10.1200/JCO.2017.74.7642 (2017).
- 70 Ratcliffe, M. J. *et al.* Agreement between Programmed Cell Death Ligand-1 Diagnostic Assays across Multiple Protein Expression Cutoffs in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 23, 3585-3591, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2375 (2017).
- 71 Scott, M. *et al.* Assessment of heterogeneity of PD-L1 expression in NSCLC, HNSCC, and UC with Ventana SP263 assay. *Journal of Clinical Oncology* 35, e14502-e14502, doi:10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.e14502 (2017).
- 72 Bussolati, G., Annaratone, L. & Maletta, F. The pre-analytical phase in surgical pathology. *Recent Results Cancer Res* 199, 1-13, doi:10.1007/978-3-319-13957-9_1 (2015).
- 73 Grizzle, W. E. Special symposium: fixation and tissue processing models. *Biotech Histochem* 84, 185-193, doi:10.3109/10520290903039052 (2009).
- 74 Start, R. D., Cross, S. S. & Smith, J. H. Assessment of specimen fixation in a surgical pathology service. *J Clin Pathol* 45, 546-547, doi:10.1136/jcp.45.6.546 (1992).
- 75 Elkon, K. & Casali, P. Nature and functions of autoantibodies. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4, 491-498, doi:10.1038/ncprheum0895 (2008).
- 76 Weller, M. G. Quality Issues of Research Antibodies. *Anal Chem Insights* 11, 21-27, doi:10.4137/ACI.S31614 (2016).
- 77 Rutgers, J. J. *et al.* Interobserver variability between experienced and inexperienced observers in the histopathological analysis of Wilms tumors: a pilot study for future algorithmic approach. *Diagn Pathol* 16, 77, doi:10.1186/s13000-021-01136-w (2021).
- 78 Lawrie, C. H. *et al.* Inter- and intra-observational variability in immunohistochemistry: a multicentre analysis of diffuse large B-cell lymphoma staining. *Histopathology* 61, 18-25, doi:10.1111/j.1365-2559.2012.04179.x (2012).
- 79 Marusyk, A. & Polyak, K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 1805, 105-117, doi:10.1016/j.bbcan.2009.11.002 (2010).
- 80 Necchi, A. *et al.* Pembrolizumab as Neoadjuvant Therapy Before Radical Cystectomy in Patients With Muscle-Invasive Urothelial Bladder Carcinoma (PURE-01): An Open-Label, Single-Arm, Phase II Study. *J Clin Oncol* 36, 3353-3360, doi:10.1200/JCO.18.01148 (2018).
- 81 Hirsch, F. R. *et al.* PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol* 12, 208-222, doi:10.1016/j.jtho.2016.11.2228 (2017).

- 82 Munari, E. *et al.* PD-L1 Expression Heterogeneity in Non-Small Cell Lung Cancer: Defining Criteria for Harmonization between Biopsy Specimens and Whole Sections. *J Thorac Oncol* 13, 1113-1120, doi:10.1016/j.jtho.2018.04.017 (2018).
- 83 Rasmussen, J. H. *et al.* Intratumor heterogeneity of PD-L1 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 120, 1003-1006, doi:10.1038/s41416-019-0449-y (2019).
- 84 Saito, Y. *et al.* Inter-tumor heterogeneity of PD-L1 expression in non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis* 11, 4982-4991, doi:10.21037/jtd.2019.12.24 (2019).
- 85 Bassanelli, M. *et al.* Heterogeneity of PD-L1 Expression and Relationship with Biology of NSCLC. *Anticancer Res* 38, 3789-3796, doi:10.21873/anticancer.12662 (2018).
- 86 Wei, Y. *et al.* The local immune landscape determines tumor PD-L1 heterogeneity and sensitivity to therapy. *J Clin Invest* 129, 3347-3360, doi:10.1172/JCI127726 (2019).
- 87 Widmaier, M. *et al.* Comparison of continuous measures across diagnostic PD-L1 assays in non-small cell lung cancer using automated image analysis. *Mod Pathol* 33, 380-390, doi:10.1038/s41379-019-0349-y (2020).
- 88 Cooper, W. A. *et al.* Intra- and Interobserver Reproducibility Assessment of PD-L1 Biomarker in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 23, 4569-4577, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0151 (2017).
- 89 Ehlerding, E. B. *et al.* Noninvasive Imaging and Quantification of Radiotherapy-Induced PD-L1 Upregulation with (89)Zr-Df-Atezolizumab. *Bioconjug Chem* 30, 1434-1441, doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00178 (2019).
- 90 Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A. & Yong, W. H. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol* 1897, 289-298, doi:10.1007/978-1-4939-8935-5_25 (2019).
- 91 Lin, J. R., Fallahi-Sichani, M., Chen, J. Y. & Sorger, P. K. Cyclic Immunofluorescence (CyclF), A Highly Multiplexed Method for Single-cell Imaging. *Curr Protoc Chem Biol* 8, 251-264, doi:10.1002/cpch.14 (2016).
- 92 Lin, J. R., Fallahi-Sichani, M. & Sorger, P. K. Highly multiplexed imaging of single cells using a high-throughput cyclic immunofluorescence method. *Nat Commun* 6, 8390, doi:10.1038/ncomms9390 (2015).
- 93 Klevanski, M. *et al.* Automated highly multiplexed super-resolution imaging of protein nano-architecture in cells and tissues. *Nat Commun* 11, 1552, doi:10.1038/s41467-020-15362-1 (2020).
- 94 Althammer, S. *et al.* Automated image analysis of NSCLC biopsies to predict response to anti-PD-L1 therapy. *J Immunother Cancer* 7, 121, doi:10.1186/s40425-019-0589-x (2019).
- 95 Nichols, J. A., Herbert Chan, H. W. & Baker, M. A. B. Machine learning: applications of artificial intelligence to imaging and diagnosis. *Biophys Rev* 11, 111-118, doi:10.1007/s12551-018-0449-9 (2019).
- 96 Choi, R. Y., Coyner, A. S., Kalpathy-Cramer, J., Chiang, M. F. & Campbell, J. P. Introduction to Machine Learning, Neural Networks, and Deep Learning. *Transl Vis Sci Technol* 9, 14, doi:10.1167/tvst.9.2.14 (2020).
- 97 Hinton, G. E. & Salakhutdinov, R. R. Reducing the dimensionality of data with neural networks. *Science* 313, 504-507, doi:10.1126/science.1127647 (2006).
- 98 LeCun, Y., Bengio, Y. & Hinton, G. Deep learning. *Nature* 521, 436-444, doi:10.1038/nature14539 (2015).

- 99 Ting, D. S. W. *et al.* Artificial intelligence and deep learning in ophthalmology. *Br J Ophthalmol* 103, 167-175, doi:10.1136/bjophthalmol-2018-313173 (2019).
- 100 Campanella, G. *et al.* Clinical-grade computational pathology using weakly supervised deep learning on whole slide images. *Nat Med* 25, 1301-1309, doi:10.1038/s41591-019-0508-1 (2019).
- 101 Thian, Y. L. *et al.* Deep Learning Systems for Pneumothorax Detection on Chest Radiographs: A Multicenter External Validation Study. *Radiol Artif Intell* 3, e200190, doi:10.1148/ryai.2021200190 (2021).
- 102 Hallinan, J. *et al.* Detection of Pneumothorax with Deep Learning Models: Learning From Radiologist Labels vs Natural Language Processing Model Generated Labels. *Acad Radiol*, doi:10.1016/j.acra.2021.09.013 (2021).
- 103 Iglesias-Puzas, A. & Boixeda, P. Deep Learning and Mathematical Models in Dermatology. *Actas Dermosifiliogr (Engl Ed)* 111, 192-195, doi:10.1016/j.ad.2019.01.014 (2020).
- 104 Zhao, W., Jiang, W. & Qiu, X. Deep learning for COVID-19 detection based on CT images. *Sci Rep* 11, 14353, doi:10.1038/s41598-021-93832-2 (2021).
- 105 Song, Y. *et al.* Deep Learning Enables Accurate Diagnosis of Novel Coronavirus (COVID-19) With CT Images. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* 18, 2775-2780, doi:10.1109/TCBB.2021.3065361 (2021).
- 106 Liang, W. *et al.* Addendum: Early triage of critically ill COVID-19 patients using deep learning. *Nat Commun* 12, 826, doi:10.1038/s41467-021-21044-3 (2021).
- 107 Cui, M. & Zhang, D. Y. Artificial intelligence and computational pathology. *Lab Invest* 101, 412-422, doi:10.1038/s41374-020-00514-0 (2021).
- 108 Cruz-Roa, A. *et al.* Accurate and reproducible invasive breast cancer detection in whole-slide images: A Deep Learning approach for quantifying tumor extent. *Sci Rep* 7, 46450, doi:10.1038/srep46450 (2017).
- 109 Litjens, G. *et al.* Deep learning as a tool for increased accuracy and efficiency of histopathological diagnosis. *Sci Rep* 6, 26286, doi:10.1038/srep26286 (2016).
- 110 Serag, A. *et al.* Translational AI and Deep Learning in Diagnostic Pathology. *Front Med (Lausanne)* 6, 185, doi:10.3389/fmed.2019.00185 (2019).
- 111 Gleason, D. F. & Mellinger, G. T. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 111, 58-64, doi:10.1016/s0022-5347(17)59889-4 (1974).
- 112 Xie, W. *et al.* Prostate Cancer Risk Stratification via Nondestructive 3D Pathology with Deep Learning-Assisted Gland Analysis. *Cancer Res* 82, 334-345, doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-2843 (2022).
- 113 Mridha, M. F. *et al.* A Comprehensive Survey on Deep-Learning-Based Breast Cancer Diagnosis. *Cancers (Basel)* 13, doi:10.3390/cancers13236116 (2021).
- 114 Yersal, O. & Barutca, S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol* 5, 412-424, doi:10.5306/wjco.v5.i3.412 (2014).
- 115 Planes-Laine, G. *et al.* PD-1/PD-L1 Targeting in Breast Cancer: The First Clinical Evidences Are Emerging. A Literature Review. *Cancers (Basel)* 11, doi:10.3390/cancers11071033 (2019).
- 116 Ren, Y., Song, J., Li, X. & Luo, N. Rationale and Clinical Research Progress on PD-1/PD-L1-Based Immunotherapy for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 23, doi:10.3390/ijms23168878 (2022).

- 117 Zhang, M. *et al.* Expression of PD-L1 and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 8, 31347-31354, doi:10.18632/oncotarget.15532 (2017).
- 118 Huang, W., Ran, R., Shao, B. & Li, H. Prognostic and clinicopathological value of PD-L1 expression in primary breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 178, 17-33, doi:10.1007/s10549-019-05371-0 (2019).
- 119 Chow, L. Q. M. *et al.* Antitumor Activity of Pembrolizumab in Biomarker-Unselected Patients With Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Results From the Phase Ib KEYNOTE-012 Expansion Cohort. *J Clin Oncol* 34, 3838-3845, doi:10.1200/JCO.2016.68.1478 (2016).
- 120 Herbst, R. S. *et al.* Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 387, 1540-1550, doi:10.1016/S0140-6736(15)01281-7 (2016).
- 121 Fu, T. *et al.* Spatial architecture of the immune microenvironment orchestrates tumor immunity and therapeutic response. *J Hematol Oncol* 14, 98, doi:10.1186/s13045-021-01103-4 (2021).
- 122 Tume, P. C. *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515, 568-571, doi:10.1038/nature13954 (2014).
- 123 Petitprez, F., Meylan, M., de Reynies, A., Sautes-Fridman, C. & Fridman, W. H. The Tumor Microenvironment in the Response to Immune Checkpoint Blockade Therapies. *Front Immunol* 11, 784, doi:10.3389/fimmu.2020.00784 (2020).
- 124 Johnson, D. B. *et al.* Quantitative Spatial Profiling of PD-1/PD-L1 Interaction and HLA-DR/IDO-1 Predicts Improved Outcomes of Anti-PD-1 Therapies in Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res* 24, 5250-5260, doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0309 (2018).
- 125 Hewitt, S. M., Baskin, D. G., Frevert, C. W., Stahl, W. L. & Rosa-Molinar, E. Controls for immunohistochemistry: the Histochemical Society's standards of practice for validation of immunohistochemical assays. *J Histochem Cytochem* 62, 693-697, doi:10.1369/0022155414545224 (2014).
- 126 Buchwalow, I., Samoilova, V., Boecker, W. & Tiemann, M. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Sci Rep* 1, 28, doi:10.1038/srep00028 (2011).
- 127 Saper, C. B. A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *J Histochem Cytochem* 57, 1-5, doi:10.1369/jhc.2008.952770 (2009).
- 128 Giraldo, N. A. *et al.* Multidimensional, quantitative assessment of PD-1/PD-L1 expression in patients with Merkel cell carcinoma and association with response to pembrolizumab. *J Immunother Cancer* 6, 99, doi:10.1186/s40425-018-0404-0 (2018).
- 129 Kononen, J. *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4, 844-847 (1998).
- 130 Blessin, N. C. *et al.* Prevalence of proliferating CD8(+) cells in normal lymphatic tissues, inflammation and cancer. *Aging (Albany NY)* 13, 14590-14603, doi:10.18632/aging.203113 (2021).
- 131 Blessin, N. C. *et al.* Patterns of TIGIT Expression in Lymphatic Tissue, Inflammation, and Cancer. *Dis Markers* 2019, 5160565, doi:10.1155/2019/5160565 (2019).
- 132 Dum, D. *et al.* Semi-automated validation and quantification of CTLA-4 in 90 different tumor entities using multiple antibodies and artificial intelligence. *Lab Invest* 102, 650-657, doi:10.1038/s41374-022-00728-4 (2022).

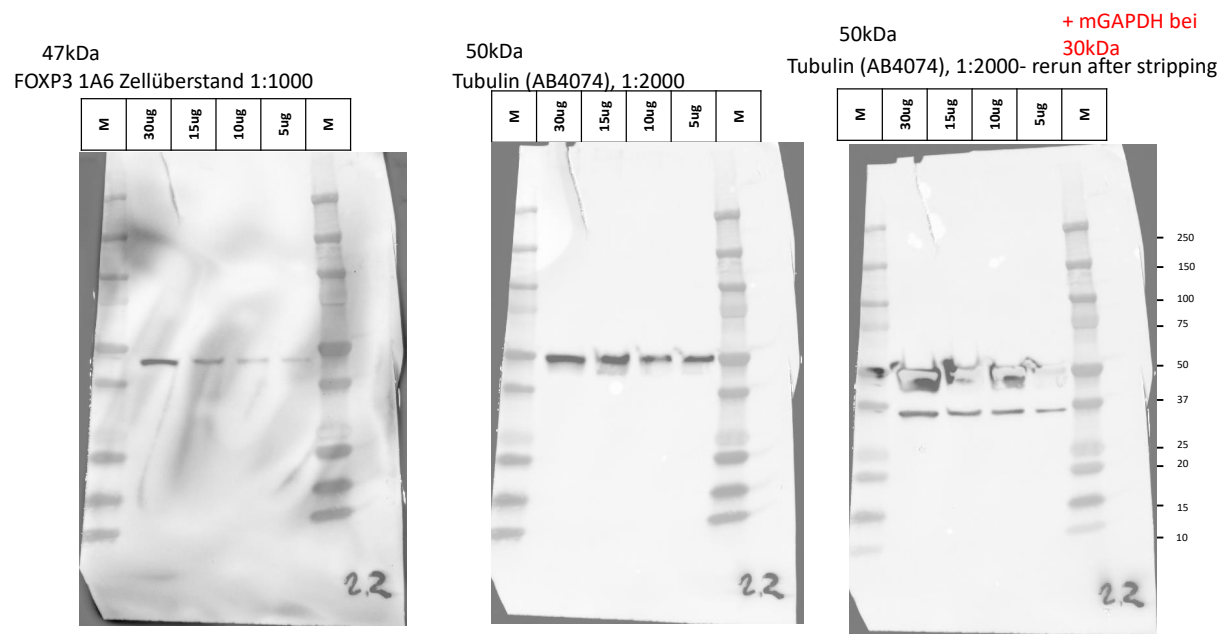
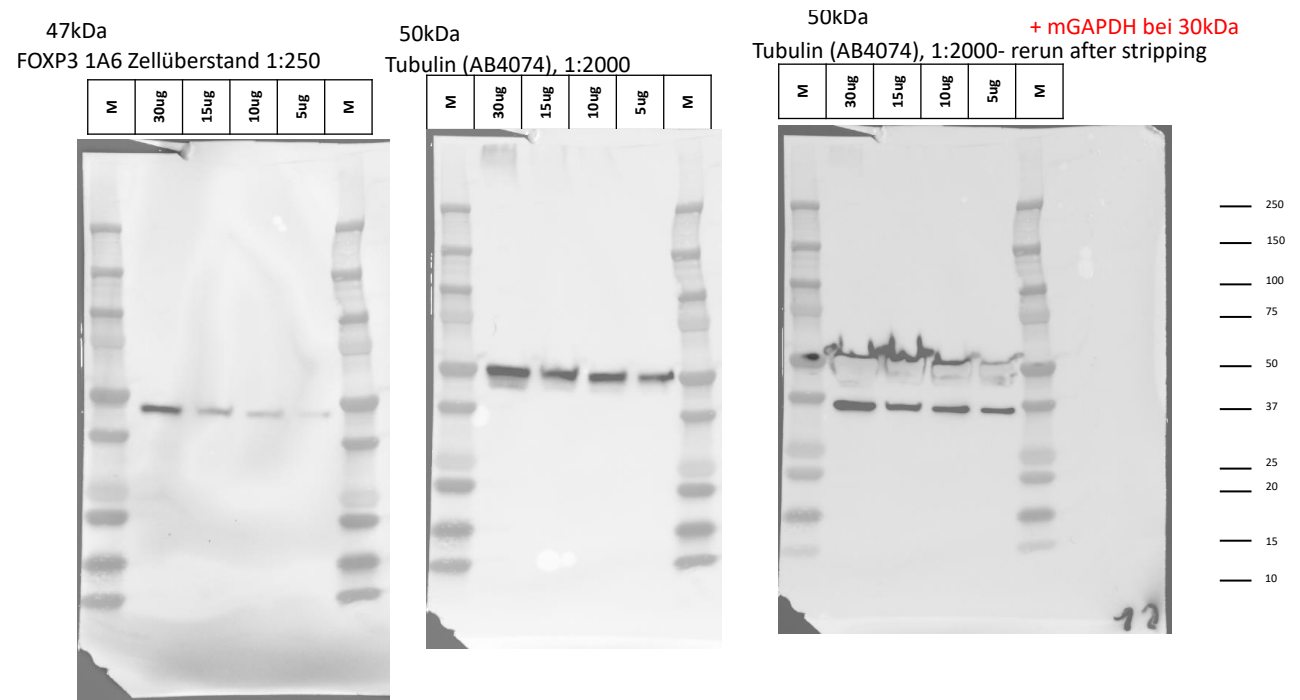
- 133 Uhlen, M. *et al.* A proposal for validation of antibodies. *Nat Methods* 13, 823-827, doi:10.1038/nmeth.3995 (2016).
- 134 Foundation, P. S. Python Language Reference, . Available at <http://www.python.org> (2021).
- 135 *R-Core-Team. R: A language and environment for statistical computing.* , 2019).
- 136 Blessin, N. C. *et al.* Automated Ki67-LI assessment in prostate cancer using artificial intelligence in multiplex fluorescence immunohistochemistry *The Journal of Pathology (in revision)* (2022).
- 137 Samusik, N., Good, Z., Spitzer, M. H., Davis, K. L. & Nolan, G. P. Automated mapping of phenotype space with single-cell data. *Nat Methods* 13, 493-496, doi:10.1038/nmeth.3863 (2016).
- 138 Rudensky, A. Y. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev* 241, 260-268, doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01018.x (2011).
- 139 Petersen, I., Blind, C., Koepfenik, A., Dietel, M. & Krenn, V. iCon-TMA for control and quantitation of immunohistochemistry and in situ molecular pathology analysis. *Pathol Res Pract* 203, 629-631, doi:10.1016/j.prp.2007.04.010 (2007).
- 140 Mirlacher, M. & Simon, R. Recipient block TMA technique. *Methods Mol Biol* 664, 37-44, doi:10.1007/978-1-60761-806-5_4 (2010).
- 141 Bogen, S. A., Vani, K. & Sompuram, S. R. Molecular mechanisms of antigen retrieval: antigen retrieval reverses steric interference caused by formalin-induced cross-links. *Biotech Histochem* 84, 207-215, doi:10.3109/10520290903039078 (2009).
- 142 Radtke, A. J. *et al.* IBEX: A versatile multiplex optical imaging approach for deep phenotyping and spatial analysis of cells in complex tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 33455-33465, doi:10.1073/pnas.2018488117 (2020).
- 143 Lin, J. R. *et al.* Highly multiplexed immunofluorescence imaging of human tissues and tumors using t-CyCIF and conventional optical microscopes. *Elife* 7, doi:10.7554/eLife.31657 (2018).
- 144 Goltsev, Y. *et al.* Deep Profiling of Mouse Splenic Architecture with CODEX Multiplexed Imaging. *Cell* 174, 968-981 e915, doi:10.1016/j.cell.2018.07.010 (2018).
- 145 Ko, J., Oh, J., Ahmed, M. S., Carlson, J. C. T. & Weissleder, R. Ultra-fast Cycling for Multiplexed Cellular Fluorescence Imaging. *Angew Chem Int Ed Engl* 59, 6839-6846, doi:10.1002/anie.201915153 (2020).
- 146 Nakane, P. K. & Pierce, G. B., Jr. Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J Cell Biol* 33, 307-318, doi:10.1083/jcb.33.2.307 (1967).
- 147 Nakane, P. K. Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: a study on pituitary glands of the rat. *J Histochem Cytochem* 16, 557-560, doi:10.1177/16.9.557 (1968).
- 148 Sun, Z., Nyberg, R., Wu, Y., Bernard, B. & Redmond, W. L. Developing an enhanced 7-color multiplex IHC protocol to dissect immune infiltration in human cancers. *PLoS One* 16, e0247238, doi:10.1371/journal.pone.0247238 (2021).
- 149 Johnson, D. K. Fluorescence polarization immunoassays for metal ions. *Comb Chem High Throughput Screen* 6, 245-255, doi:10.2174/138620703106298293 (2003).
- 150 Blake, D. A. *et al.* Antibody-based sensors for heavy metal ions. *Biosens Bioelectron* 16, 799-809, doi:10.1016/s0956-5663(01)00223-8 (2001).
- 151 Duta, M., Asfari, Z., Hagege, A., Thuery, P. & Leroy, M. Synthesis and complexation studies of various precursors based on calix[4]arene-crown-5 and-6 for the

- immunoanalysis of potassium and caesium ions. *Supramol Chem* 16, 205-215, doi:10.1080/10610270310001647001 (2004).
- 152 Corneillie, T. M., Whetstone, P. A., Fisher, A. J. & Meares, C. F. A rare earth-DOTA-binding antibody: probe properties and binding affinity across the lanthanide series. *J Am Chem Soc* 125, 3436-3437, doi:10.1021/ja029363k (2003).
- 153 Castillo, F. J. *et al.* Hybridoma stability. *Dev Biol Stand* 83, 55-64 (1994).
- 154 Xin, H. & Cutler, J. E. Hybridoma passage in vitro may result in reduced ability of antimannan antibody to protect against disseminated candidiasis. *Infect Immun* 74, 4310-4321, doi:10.1128/IAI.00234-06 (2006).
- 155 Jakway, J. P. & Shevach, E. M. Mycoplasma contamination: a hazard of screening hybridoma supernatants for inhibition of [3H]thymidine incorporation. *J Immunol Methods* 67, 337-345, doi:10.1016/0022-1759(84)90473-3 (1984).
- 156 Geyer, C. R., McCafferty, J., Dubel, S., Bradbury, A. R. & Sidhu, S. S. Recombinant antibodies and in vitro selection technologies. *Methods Mol Biol* 901, 11-32, doi:10.1007/978-1-61779-931-0_2 (2012).
- 157 Kang, T. H. & Seong, B. L. Solubility, Stability, and Avidity of Recombinant Antibody Fragments Expressed in Microorganisms. *Front Microbiol* 11, 1927, doi:10.3389/fmicb.2020.01927 (2020).
- 158 Frenzel, A., Hust, M. & Schirrmann, T. Expression of recombinant antibodies. *Front Immunol* 4, 217, doi:10.3389/fimmu.2013.00217 (2013).
- 159 Bai, Y. *et al.* Adjacent Cell Marker Lateral Spillover Compensation and Reinforcement for Multiplexed Images. *Front Immunol* 12, 652631, doi:10.3389/fimmu.2021.652631 (2021).
- 160 Sarker, M. M. K. *et al.* A Means of Assessing Deep Learning-Based Detection of ICOS Protein Expression in Colon Cancer. *Cancers (Basel)* 13, doi:10.3390/cancers13153825 (2021).
- 161 Möller, K. e. a. PD-L1 expression and CD8 positive lymphocytes in human neoplasms: A tissue microarray study on 11,838 tumor samples. *Cancer Biomarker (submitted)* (2022).
- 162 Moller, K. *et al.* Tumor cell PD-L1 expression is a strong predictor of unfavorable prognosis in immune checkpoint therapy-naïve clear cell renal cell cancer. *Int Urol Nephrol* 53, 2493-2503, doi:10.1007/s11255-021-02841-7 (2021).
- 163 Heeren, A. M. *et al.* Prognostic effect of different PD-L1 expression patterns in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Mod Pathol* 29, 753-763, doi:10.1038/modpathol.2016.64 (2016).
- 164 Janzic, U., Kern, I., Janzic, A., Cavka, L. & Cufer, T. PD-L1 Expression in Squamous-cell Carcinoma and Adenocarcinoma of the Lung. *Radiol Oncol* 51, 357-362, doi:10.1515/raon-2017-0037 (2017).
- 165 Martin, A. M. *et al.* Paucity of PD-L1 expression in prostate cancer: innate and adaptive immune resistance. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 18, 325-332, doi:10.1038/pcan.2015.39 (2015).
- 166 Chen, D. S. & Mellman, I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 541, 321-330, doi:10.1038/nature21349 (2017).
- 167 Kather, J. N. *et al.* Topography of cancer-associated immune cells in human solid tumors. *Elife* 7, doi:10.7554/eLife.36967 (2018).

- 168 Ock, C. Y. *et al.* Pan-Cancer Immunogenomic Perspective on the Tumor Microenvironment Based on PD-L1 and CD8 T-Cell Infiltration. *Clin Cancer Res* 22, 2261-2270, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2834 (2016).
- 169 Teng, M. W., Ngiow, S. F., Ribas, A. & Smyth, M. J. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res* 75, 2139-2145, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0255 (2015).
- 170 Sznol, M. & Chen, L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin Cancer Res* 19, 1021-1034, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2063 (2013).
- 171 Wang, J. *et al.* The presence of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) and the ratios between different subsets serve as prognostic factors in advanced hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 20, 731, doi:10.1186/s12885-020-07234-0 (2020).
- 172 Boissonnas, A. *et al.* CD8+ tumor-infiltrating T cells are trapped in the tumor-dendritic cell network. *Neoplasia* 15, 85-94, doi:10.1593/neo.121572 (2013).
- 173 Kim, K. J., Wen, X. Y., Yang, H. K., Kim, W. H. & Kang, G. H. Prognostic Implication of M2 Macrophages Are Determined by the Proportional Balance of Tumor Associated Macrophages and Tumor Infiltrating Lymphocytes in Microsatellite-Unstable Gastric Carcinoma. *PLoS One* 10, e0144192, doi:10.1371/journal.pone.0144192 (2015).
- 174 Bocanegra, A. *et al.* PD-L1 in Systemic Immunity: Unraveling Its Contribution to PD-1/PD-L1 Blockade Immunotherapy. *Int J Mol Sci* 21, doi:10.3390/ijms21165918 (2020).
- 175 Jiang, X. *et al.* Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Mol Cancer* 18, 10, doi:10.1186/s12943-018-0928-4 (2019).
- 176 Lu, D. *et al.* Beyond T Cells: Understanding the Role of PD-1/PD-L1 in Tumor-Associated Macrophages. *J Immunol Res* 2019, 1919082, doi:10.1155/2019/1919082 (2019).
- 177 Wu, T. *et al.* PD-L1-Mediated Immunosuppression in Oral Squamous Cell Carcinoma: Relationship With Macrophage Infiltration and Epithelial to Mesenchymal Transition Markers. *Front Immunol* 12, 693881, doi:10.3389/fimmu.2021.693881 (2021).
- 178 Wang, Z. Q. *et al.* PD-L1 and intratumoral immune response in breast cancer. *Oncotarget* 8, 51641-51651, doi:10.18632/oncotarget.18305 (2017).
- 179 Baptista, M. Z., Sarian, L. O., Derchain, S. F., Pinto, G. A. & Vassallo, J. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. *Hum Pathol* 47, 78-84, doi:10.1016/j.humpath.2015.09.006 (2016).

10. Anhang

10.5. Western Blot Ergebnisse



10.6. Tierversuchsantrag

- ☐ Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes¹
- ☒ Anzeige von Tierversuchen an Wirbeltieren, Kopffüßern oder Zehnfüßkrebse

Von der Genehmigungsbehörde auszufüllen!

Geschäftszeichen

Antragsteller:

PD Dr. rer. nat. Ronald Simon

Telefon:

01522-2816559

Telefax:

040-7410-55997

E-Mail:

r.simon@uke.de

Verantwortliche Leiterin/verantwortlicher Leiter des Vorhabens:

PD Dr. rer. nat. Ronald Simon

Dienstliche Anschrift (Einrichtung, Institut, Straße, Haus-Nr., Postleitzahl, Ort)

Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg

Telefon:

01522-2816559

Telefax:

040-7410-55997

E-Mail:

r.simon@uke.de

Stellvertretende Leiterin/stellvertretender Leiter des Vorhabens:

Elena Bady

Dienstliche Anschrift (Einrichtung, Institut, Straße, Haus-Nr., Postleitzahl, Ort)

Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg

Telefon:

040-7410-59241

Telefax:

040-7410-55997

E-Mail:

e.bady@uke.de

Anlagen:

1. Projektzusammenfassung (§ 31 Abs. 2 i. V. m. § 41 Abs. 1 TierSchVersV; nicht erforderlich bei Anzeigen)
2. Glossar der im Text verwendeten Abkürzungen und ggf. spezifischen Fachausdrücke
3. Liste der Literaturzitate (falls nicht im Text eingearbeitet) (s. Punkt 1.1.2)
4. ggf. Formblatt „Abschlussbeurteilung genetisch veränderter Zuchtlinien“ (s. Punkt 1.1.5.1)
5. ggf. Formblatt „Wiederholte Verwendung von Primaten“
6. a) Score Sheet (s. Punkt 1.2.10) b) Belastungstabelle (s. Punkt 1.2.9)
7. Aufzeichnungsmuster nach § 9 Abs. 5 TierSchG (s. Punkt 1.2.11)
8. ggf. Personenbögen
9. ggf. Formblätter „Angaben zur Biometrischen Planung“
10. Statistisches Gutachten ☐ vorhanden ☐ nicht vorhanden
11. Aktueller Hygienestatus der Versuchstiere / der Tierhaltung (s. Punkt 1.2.3)

¹ Alle Paragraphenangaben beziehen sich auf das Tierschutzgesetz (TierSchG) bzw. die Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV) in der jeweils geltenden Fassung

Eingang
Datum: 21.09.2020
Kürzel: PK



COPY

Freie und Hansestadt Hamburg
Behörde für Justiz und Verbraucherschutz

BJV, Billstraße 80, D - 20539 Hamburg

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Institut für Pathologie
Herr PD Dr. Ronald Simon
Martinistr. 52
20246 Hamburg

Amt für Verbraucherschutz
Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen

Billstraße 80
D - 20539 Hamburg
Telefon 040-428-37-3627
Telefax 040-4279 48184

Ansprechpartnerin: Frau Stefanie Günther
Zimmer: 8.05
E-Mail: Stefanie.Guenther@justiz.hamburg.de
Gz: V 1305 / 591-00.33
Hamburg, den 17.09.2020 DE

Nachrichtlich: Dres. Tiemann, Budack, Peters, Aulmann, Reitmeier, Kersch

A 017/2020

A8a 859 Nachfolge

**Tierversuche gemäß § 8a Abs. 1 Nr. 3a Tierschutzgesetz;
Eingriffe und Behandlungen zur Gewinnung/Vermehrung von Stoffen, Produkten oder
Organismen**

Ihre Anzeige vom 09.09.2020, hier vollständig eingegangen am 11.09.2020 mit der
Bezeichnung „Herstellung monoklonaler Antikörper (II)“

Sehr geehrter Herr PD Dr. Simon,

die Behörde für Justiz und Verbraucherschutz **bestätigt Ihre o.a. Anzeige** nach § 36 Abs. 2
Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125, 3126), in der derzeit
gültigen Fassung.

Für o.g. Projekt werden 1500 Mäuse benötigt, um die o.g. Methode durchzuführen (davon 103
Mäuse aus der Tierversuchsanzeige A8a/859)

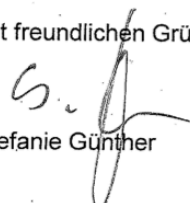
Hinweis:

Die Tötung der Tiere ist nur bei Vorliegen eines vernünftigen Grundes im Sinne des § 1 Satz
2 Tierschutzgesetz zulässig. Andere Rechtsbereiche, insbesondere das Arzneimittelrecht,
wurden bei der Prüfung der Anzeige nicht berücksichtigt.

Gebühren:

Diese Bestätigung ist nach der Gebührenordnung für das öffentliche Gesundheitswesen
i.d.j.g.F. gebührenpflichtig. Ein Gebührenbescheid wird mit besonderer Post übersandt.

Mit freundlichen Grüßen


Stefanie Günther

10.7. Score Sheet Tierversuch

Abbruchkriterien zu Antrag¹:

Belastungsscore/Abbruchkriterien

September 2020 / Oktober 2020

		Untersuchungsbefunde										
		Datum										
Beobachtung	Handlungsanweisung	23.	24.	25.	26.	27.	28.	29.	30.	01.	02.	
I Körpergewicht (bitte Zutreffendes ankreuzen) bezogen auf Ausgangsgewicht [] bezogen auf Kontrollgruppe (x) andere Mäuse desselben Alters im selben Käfig ggr. Reduktion > 5 % mgr. Reduktion > 10 % hgr. Reduktion > 20 %	0 A B C	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
II Allgemeinzustand Fell glatt, glänzend, anliegend; Körperöffnungen sauber geringgradige Störung z.B. Fell ggr. ungepflegt, verringerte Bewegung, ggr. gestörte Motorik mittelgradige Störung z.B. Fell mgr. Verschmutzt, struppig, Isolation, mgr. gestörte Motorik verschmutzte Augen	0 A B	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
hochgradige Störung normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte) ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik Isolation; Schmerzausdrücke; Apathie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Stereotypen; Koordinationsstörungen Automutilation, hoher Muskeltonus; Dehydratation	0 C	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
IV Versuchsspezifische Kriterien¹	ergänzen											
keine Belastung Schwellung der Injektionsstelle, abklingend innerhalb 24h anhaltende Schwellung und Rötung der Injektionsstelle Schmerzsymptome, Abszessbildung, Bauchfellentzündung, Verletzung Organe	0 A B C	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Bewertung, Maßnahmen keine Belastung geringe Belastung: sorgfältig weiter beobachten (1x tägl), evtl unterstützende Maßnahmen (z.B. Wärmezufuhr, Spezialfutter) mäßige Belastung: ggf. medizinische Versorgung einleiten (Analgesie, Antibiotikum) Überwachungsfrequenz alle 8 Stunden hochgradige Belastung: Tierschutzbeauftragten konsultieren; tierärztliche Versorgung einleiten; ggf. Tier einschläfern	0 A B C	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
1) Diese Punkte müssen vom Antragsteller ergänzt werden. 2) Buchstabe (A/B/C) wird pro Zeile 1 x vergeben sobald ein Kriterium erfüllt ist.		EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	
Handzeichen		EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	

Version02: 01.03.2010

Abbruchkriterien zu Antrag¹:

Belastungsscore/Abbruchkriterien

Oktober 2020

		Untersuchungsbefunde											
		Datum											
Beobachtung	Handlungsanweisung	03.	04.	05.	06.	07.	08.	09.	10.	11.	12.		
I Körpergewicht (bitte Zutreffendes ankreuzen) bezogen auf Ausgangsgewicht [] bezogen auf Kontrollgruppe (x) andere Mäuse desselben Alters im selben Käfig ggr. Reduktion > 5 % mgr. Reduktion > 10 % hgr. Reduktion > 20 %	0 A B C	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
II Allgemeinzustand Fell glatt, glänzend, anliegend; Körperöffnungen sauber geringgradige Störung z.B. Fell ggr. ungepflegt, verringerte Bewegung, ggr. gestörte Motorik mittelgradige Störung z.B. Fell mgr. Verschmutzt, struppig, Isolation, mgr. gestörte Motorik verschmutzte Augen	0 A B	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
hochgradige Störung normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte) ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik Isolation; Schmerzausdrücke; Apathie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Stereotypen; Koordinationsstörungen Automutilation, hoher Muskeltonus; Dehydratation	0 C	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
IV Versuchsspezifische Kriterien¹	ergänzen												
keine Belastung Schwellung der Injektionsstelle, abklingend innerhalb 24h anhaltende Schwellung und Rötung der Injektionsstelle Schmerzsymptome, Abszessbildung, Bauchfellentzündung, Verletzung Organe	0 A B C	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Bewertung, Maßnahmen keine Belastung geringe Belastung: sorgfältig weiter beobachten (1x tägl), evtl unterstützende Maßnahmen (z.B. Wärmezufuhr, Spezialfutter) mäßige Belastung: ggf. medizinische Versorgung einleiten (Analgesie, Antibiotikum) Überwachungsfrequenz alle 8 Stunden hochgradige Belastung: Tierschutzbeauftragten konsultieren; tierärztliche Versorgung einleiten; ggf. Tier einschläfern	0 A B C	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
1) Diese Punkte müssen vom Antragsteller ergänzt werden. 2) Buchstabe (A/B/C) wird pro Zeile 1 x vergeben sobald ein Kriterium erfüllt ist.		EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB		
Handzeichen		EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB		

Version02: 01.03.2010

Abbruchkriterien zu Antrag¹:

Belastungsscore/Abbruchkriterien

Belastungsscore/Abbruchkriterien		Untersuchungsbefunde Datum											
Beobachtung	Handlungsanweisung	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
I Körpergewicht (bitte Zutreffendes ankreuzen) bezogen auf Ausgangsgewicht [] bezogen auf Kontrollgruppe (x) andere Mäuse desselben Alters im selben Käfig ggr.Reduktion > 5 % mgr.Reduktion > 10 % hgr. Reduktion > 20 %	0 A B C	X	X	X	F	X	X	X	X	X	X		
II Allgemeinzustand Fell glatt, glänzend, anliegend; Körperöffnungen sauber geringgradige Störung z.B. Fell ggr. ungepflegt, veringerte Bewegung, ggr. gestörte Motorik mittelgradige Störung z.B. Fell mgr. Verschmutzt, struppig, Isolation, mgr. gestörte Motorik verschmutzte Augen	0 A B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
hochgradige Störung normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte) ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik Isolation; Schmerzäußerungen; Apathie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Stereotypen; Koordinationsstörungen Automutilation, hoher Muskeltonus; Dehydratation	0 C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
IV Versuchsspezifische Kriterien¹	ergänzen												
keine Belastung Schwellung der Injektionsstelle, abklingsend innerhalb 24h anhaltende Schwellung und Rötung der Injektionsstelle Schmerzsymptome, Abszessbildung, Bauchfellentzündung, Verletzung Organe	0 A B C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Bewertung, Maßnahmen keine Belastung geringe Belastung: sorgfältig weiter beobachten (1x tägl), evtl unterstützende Maßnahmen (z.B. Wärmezufuhr, Spezialfutter) mäßige Belastung: ggf. medizinische Versorgung einleiten (Analgesie, Antibiotikum) Überwachungsfrequenz alle 8 Stunden hochgradige Belastung: Tierschutzbeauftragten konsultieren; tierärztliche Versorgung einleiten; ggf. Tier einschläfern	0 A B C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
1) Diese Punkte müssen vom Antragsteller ergänzt werden. 2) Buchstabe (A/B/C) wird pro Zeile 1 x vergeben sobald ein Kriterium erfüllt ist.	Handzeichen	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB		

Version02: 01.03.2010

Abbruchkriterien zu Antrag¹:

Belastungsscore/Abbruchkriterien

Belastungsscore/Abbruchkriterien		Untersuchungsbefunde Datum											
Beobachtung	Handlungsanweisung	23	24	25	26	27	28	29	30	31	01		
I Körpergewicht (bitte Zutreffendes ankreuzen) bezogen auf Ausgangsgewicht [] bezogen auf Kontrollgruppe (x) andere Mäuse desselben Alters im selben Käfig ggr.Reduktion > 5 % mgr.Reduktion > 10 % hgr. Reduktion > 20 %	0 A B C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
II Allgemeinzustand Fell glatt, glänzend, anliegend; Körperöffnungen sauber geringgradige Störung z.B. Fell ggr. ungepflegt, verringerte Bewegung, ggr. gestörte Motorik mittelgradige Störung z.B. Fell mgr. Verschmutzt, struppig, Isolation, mgr. gestörte Motorik verschmutzte Augen	0 A B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
hochgradige Störung normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte) ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik Isolation; Schmerzäußerungen; Apathie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Stereotypen; Koordinationsstörungen Automutilation, hoher Muskeltonus; Dehydratation	0 C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
IV Versuchsspezifische Kriterien¹	ergänzen												
keine Belastung Schwellung der Injektionsstelle, abklingsend innerhalb 24h anhaltende Schwellung und Rötung der Injektionsstelle Schmerzsymptome, Abzessbildung, Bauchfellentzündung, Verletzung Organe	0 A B C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Bewertung, Maßnahmen keine Belastung geringe Belastung: sorgfältig weiter beobachten (1x tägl), evtl unterstützende Maßnahmen (z.B. Wärmezufuhr, Spezialfutter) mäßige Belastung: ggf. medizinische Versorgung einleiten (Analgesie, Antibiotikum) Überwachungsfrequenz alle 8 Stunden hochgradige Belastung: Tierschutzbeauftragten konsultieren; tierärztliche Versorgung einleiten; ggf. Tier einschläfern	0 A B C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
1) Diese Punkte müssen vom Antragsteller ergänzt werden. 2) Buchstabe (A/B/C) wird pro Zeile 1 x vergeben sobald ein Kriterium erfüllt ist.		Handzeichen											
		EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB		

Version02: 01.03.2010

Abbruchkriterien zu Antrag¹:

Belastungsscore/Abbruchkriterien

		November 2020										
		Untersuchungsbefunde										
		Datum										
Beobachtung	Handlungsanweisung	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	
I Körpergewicht (bitte Zutreffendes ankreuzen) bezogen auf Ausgangsgewicht [] bezogen auf Kontrollgruppe (x) andere Mäuse desselben Alters im selben Käfig ggr. Reduktion > 5 % mgr. Reduktion > 10 % hgr. Reduktion > 20 %	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
	C											
II Allgemeinzustand Fell glatt, glänzend, anliegend; Körperöffnungen sauber geringgradige Störung z.B. Fell ggr. ungepflegt, veringerte Bewegung, ggr. gestörte Motorik mittelgradige Störung z.B. Fell mgr. Verschmutzt, struppig, Isolation, mgr. gestörte Motorik verschmutzte Augen	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
	C											
hochgradige Störung normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte) ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik Isolation; Schmerzausdrücke; Apathie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Stereotypen; Koordinationsstörungen Automutilation, hoher Muskeltonus; Dehydratation	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
	C											
IV Versuchsspezifische Kriterien¹ keine Belastung Schwellung der Injektionsstelle, abklingend innerhalb 24h anhaltende Schwellung und Rötung der Injektionsstelle Schmerzsymptome, Abzessbildung, Bauchfellentzündung, Verletzung Organe	ergänzen											
	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
Bewertung, Maßnahmen keine Belastung geringe Belastung: sorgfältig weiter beobachten (1x tägl), evtl. unterstützende Maßnahmen (z.B. Wärmezufuhr, Spezialfutter) mäßige Belastung: ggf. medizinische Versorgung einleiten (Analgesie, Antibiotikum) Überwachungsfrequenz alle 8 Stunden hochgradige Belastung: Tierschutzbeauftragten konsultieren; tierärztliche Versorgung einleiten; ggf. Tier einschläfern	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
	C											
1) Diese Punkte müssen vom Antragsteller ergänzt werden. 2) Buchstabe (A/B/C) wird pro Zeile 1 x vergeben sobald ein Kriterium erfüllt ist.		Handzeichen	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB

Version02: 01.03.2010

Abbruchkriterien zu Antrag¹:

Belastungsscore/Abbruchkriterien

		November 2020										
		Untersuchungsbefunde										
		Datum										
Beobachtung	Handlungsanweisung	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
I Körpergewicht (bitte Zutreffendes ankreuzen) bezogen auf Ausgangsgewicht [] bezogen auf Kontrollgruppe (x) andere Mäuse desselben Alters im selben Käfig ggr. Reduktion > 5 % mgr. Reduktion > 10 % hgr. Reduktion > 20 %	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
	C											
II Allgemeinzustand Fell glatt, glänzend, anliegend; Körperöffnungen sauber geringgradige Störung z.B. Fell ggr. ungepflegt, veringerte Bewegung, ggr. gestörte Motorik mittelgradige Störung z.B. Fell mgr. Verschmutzt, struppig, Isolation, mgr. gestörte Motorik verschmutzte Augen	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
	C											
hochgradige Störung normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte) ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik Isolation; Schmerzausdrücke; Apathie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Stereotypen; Koordinationsstörungen Automutilation, hoher Muskeltonus; Dehydratation	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
	C											
IV Versuchsspezifische Kriterien¹ keine Belastung Schwellung der Injektionsstelle, abklingend innerhalb 24h anhaltende Schwellung und Rötung der Injektionsstelle Schmerzsymptome, Abzessbildung, Bauchfellentzündung, Verletzung Organe	ergänzen											
	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
Bewertung, Maßnahmen keine Belastung geringe Belastung: sorgfältig weiter beobachten (1x tägl), evtl. unterstützende Maßnahmen (z.B. Wärmezufuhr, Spezialfutter) mäßige Belastung: ggf. medizinische Versorgung einleiten (Analgesie, Antibiotikum) Überwachungsfrequenz alle 8 Stunden hochgradige Belastung: Tierschutzbeauftragten konsultieren; tierärztliche Versorgung einleiten; ggf. Tier einschläfern	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
	C											
1) Diese Punkte müssen vom Antragsteller ergänzt werden. 2) Buchstabe (A/B/C) wird pro Zeile 1 x vergeben sobald ein Kriterium erfüllt ist.		Handzeichen	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB

Version02: 01.03.2010

Abbruchkriterien zu Antrag¹:

Belastungsscore/Abbruchkriterien

		November Dezember 2020										
		Untersuchungsbefunde										
		Datum										
Beobachtung	Handlungsanweisung	22	23	24	25	26	27	28	29	30	01	
I Körpergewicht (bitte Zutreffendes ankreuzen) bezogen auf Ausgangsgewicht [] bezogen auf Kontrollgruppe (x) andere Mäuse desselben Alters im selben Käfig ggr. Reduktion > 5 % mgr. Reduktion > 10 % hgr. Reduktion > 20 %	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
	C											
II Allgemeinzustand Fell glatt, glänzend, anliegend; Körperöffnungen sauber geringgradige Störung z.B. Fell ggr. ungepflegt, veringerte Bewegung, ggr. gestörte Motorik mittelgradige Störung z.B. Fell mgr. Verschmutzt, struppig, Isolation, mgr. gestörte Motorik verschmutzte Augen	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
	C											
hochgradige Störung normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte) ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik Isolation; Schmerzausdrücke; Apathie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Stereotypen; Koordinationsstörungen Automutilation, hoher Muskeltonus; Dehydratation	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
	C											
IV Versuchsspezifische Kriterien¹ keine Belastung Schwellung der Injektionsstelle, abklingsend innerhalb 24h anhaltende Schwellung und Rötung der Injektionsstelle Schmerzsymptome, Abzessbildung, Bauchfellentzündung, Verletzung Organe	ergänzen											
	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
Bewertung, Maßnahmen keine Belastung geringe Belastung: sorgfältig weiter beobachten (1x tägl), evtl unterstützende Maßnahmen (z.B. Wärmezufuhr, Spezialfutter) mäßige Belastung: ggf. medizinische Versorgung einleiten (Analgesie, Antibiotikum) Überwachungsfrequenz alle 8 Stunden hochgradige Belastung: Tierschutzbeauftragten konsultieren; tierärztliche Versorgung einleiten; ggf. Tier einschläfern	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
	C											
1) Diese Punkte müssen vom Antragsteller ergänzt werden. 2) Buchstabe (A/B/C) wird pro Zeile 1 x vergeben sobald ein Kriterium erfüllt ist.		EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	
Handzeichen												

Version02: 01.03.2010

Abbruchkriterien zu Antrag¹:

Belastungsscore/Abbruchkriterien

		Dezember 2020										
		Untersuchungsbefunde										
		Datum										
Beobachtung	Handlungsanweisung	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	
I Körpergewicht (bitte Zutreffendes ankreuzen) bezogen auf Ausgangsgewicht [] bezogen auf Kontrollgruppe (x) andere Mäuse desselben Alters im selben Käfig ggr. Reduktion > 5 % mgr. Reduktion > 10 % hgr. Reduktion > 20 %	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
	C											
II Allgemeinzustand Fell glatt, glänzend, anliegend; Körperöffnungen sauber geringgradige Störung z.B. Fell ggr. ungepflegt, veringerte Bewegung, ggr. gestörte Motorik mittelgradige Störung z.B. Fell mgr. Verschmutzt, struppig, Isolation, mgr. gestörte Motorik verschmutzte Augen	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
	C											
hochgradige Störung normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte) ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik Isolation; Schmerzausdrücke; Apathie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Stereotypen; Koordinationsstörungen Automutilation, hoher Muskeltonus; Dehydratation	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
	C											
IV Versuchsspezifische Kriterien¹ keine Belastung Schwellung der Injektionsstelle, abklingsend innerhalb 24h anhaltende Schwellung und Rötung der Injektionsstelle Schmerzsymptome, Abzessbildung, Bauchfellentzündung, Verletzung Organe	ergänzen											
	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
Bewertung, Maßnahmen keine Belastung geringe Belastung: sorgfältig weiter beobachten (1x tägl), evtl unterstützende Maßnahmen (z.B. Wärmezufuhr, Spezialfutter) mäßige Belastung: ggf. medizinische Versorgung einleiten (Analgesie, Antibiotikum) Überwachungsfrequenz alle 8 Stunden hochgradige Belastung: Tierschutzbeauftragten konsultieren; tierärztliche Versorgung einleiten; ggf. Tier einschläfern	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	A											
	B											
	C											
1) Diese Punkte müssen vom Antragsteller ergänzt werden. 2) Buchstabe (A/B/C) wird pro Zeile 1 x vergeben sobald ein Kriterium erfüllt ist.		EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	EB	
Handzeichen												

Version02: 01.03.2010

11. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, 07.10.2022

E. Bady

12. Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Guido Sauter für die Gelegenheit meine Dissertation am Institut für Pathologie am Universitätsklinikum zu absolvieren. Danke für die Möglichkeit mein Interesse der Biologie mit der Medizin zu verknüpfen, die vielen Erlebnisse und interessanten Einblicke, die Sie mir während meiner Ausbildung am Institut gegeben und ermöglicht haben. Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Markus Glatzel, durch Sie habe ich einen Einblick in die Neuropathologie des UKEs bekommen, die Möglichkeit gehabt mich mit Gleichgesinnten auszutauschen und eine Unterstützung während meiner Dissertation zu erlangen. Ein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Thomas Oertner für den Vorsitz der Prüfungskommission. Lieber Ronald, vielen Dank für das große Spektrum, was ich in der gesamten Zeit in der Klinik abdecken konnte. Ob die Arbeit im Labor, die Forschung an Tieren, und zuletzt die Sicherheit in der Statistik und Forschung an Patientendaten. Durch deine offene und fröhliche Art, hast du mich immer aufgemuntert, bestärkt und unterstützt.

Nico, vielen Dank für dein immer offenes Ohr, deine Art und Weise mich zu motivieren, auch wenn der Weg steinig war. Du hast mir gezeigt, wie ich über meinen Schatten springen kann, wie ich ein noch stärkerer Mensch werde. Du hast meine Zweifel aus dem Weg geräumt, wir haben zusammen Herausforderungen gemeistert und Erfolge gefeiert. Ein großer Dank gilt Julia, danke dir für deine tolle Unterstützung, deinen Fleiß und dass du immer für mich da bist, wenn ich mal Redebedarf habe. Du hast mich motiviert und immer an mich geglaubt. Vielen Dank an unser tolles Team, welches mich immer mit Rat und Tat unterstützt hat, mit denen ich so viele Stunden am Tag verbringe, wir Erfolge und auch Sorgen miteinander teilen und immer füreinander da sind: Tim, Jonas, Max, Jan, Magalie, Zhihao, Cheng, Wenchao und Lisa. Danke auch an Claudia & Georgia, an die gute Laune die ihr hier im Institut verbreitet und euer positives Denken. Danke an das tolle TMA Team für die Unterstützung, insbesondere Inge, Melanie, Maren, Sünje und Laura. Und danke an meine Korrekturleserinnen Alexandra, Sabine und Stella.

“Remember to look up at the stars and not down at your feet. Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist. Be curious. And however difficult life may seem, there is always something you can do and succeed at”

– Stephen Hawking –

Danke an meine Freundinnen Vicky und Stella: Ihr habt meine Launen ausgehalten und mich in schwierigen Zeiten aufgemuntert. Vicky, du hast dich immer zurückgenommen, hast mich mit deiner Leichtigkeit und positiven Art beruhigt. Stella, mit dir konnte ich immer alles analysieren und diskutieren. Ihr seid der Grund, warum Hamburg meine Heimat geworden ist.

Amelie, wir können uns nicht nur emotional, sondern auch fachlich unterstützen, sind immer unglaublich stolz auf die Leistung des Anderen und können gönnen.

Vielen Dank auch an meine Nachbarn Denni und Freddy, für die tollen Tage während des Lockdowns, die ellenlange Gespräche bis in die Morgenstunden über Gott und die Welt.

Der größte Dank gilt meiner Familie: Meinen Eltern Marek und Sibylle, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben auf meinem langen, emotionalen, erfolgreichen und spannenden Weg. Die absolute Begeisterung für die Naturwissenschaft, die Neugierde für das Unerforschte die ich mit meinem Vater teile; Das Liebevollen und Fürsorgliche was meine Mutter mir gibt. Mein Bruder Johannes, der alles für seine kleine Schwester tun würde.

Meine Oma Gisela, die nie zu alt wird um sich für meine Forschung zu interessieren. Meine Oma Mimi, die mir immer ein „Gott beschütze dich“ mit auf den Weg gibt. Und mein Patenonkel Ian, der fragt wann ich denn jetzt endlich fertig bin und mir jedes Weihnachten mit viel Hoffnung ein Doktorgeschenk überreicht.

All diese Unterstützung und Liebe hat dazu geführt, dass ich ein Durchhaltevermögen und Ehrgeiz habe, Dinge durchziehe und mit Spaß dabei bin. Dass ich mich selber reflektiere, Kritik annehmen kann und immer darauf vertraue, dass am Ende alles gut wird.

„Das Unmögliche zu schaffen, gelingt einem nur, wenn man es für möglich befindet“

– Lewis Carroll –