

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie mit den Sektionen Molekularpathologie und Zytopathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

Auswertung und Quantifizierung der Ausprägung von CTLA-4 positiven Zellen in 90 Tumorentitäten mittels KI-unterstützter Analyse

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Tjark Leon Crispin Henke

aus Hamburg

Hamburg 2024

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am 15.05.2024

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Betreuer / Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Guido Sauter

Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Stefan Bonn

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Stefan Bonn

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Nicolaus Kröger

Mitglied der Prüfungskommission: PD Dr. Katharina Harms-Effenberger

Datum der mündlichen Prüfung: 09.02.2026

Inhalt

1. Publikation: Semi-automated validation and quantification of CTLA-4 in 90 different Tumor entities using multiple antibodies and artificial intelligence	4
2. Darstellung der Promotion	12
2.1. Einleitung	12
2.2. Material und Methoden	13
2.3. Ergebnisse	14
2.4 Diskussion	16
3. Zusammenfassung	20
4. Abstract	21
5. Erklärung des Eigenanteils	22
6. Abkürzungsverzeichnis	23
7. Literaturverzeichnis	24
8. Danksagung	29
9. Lebenslauf	30
10. Eidesstattliche Erklärung	31

1. Publikation: Semi-automated validation and quantification of CTLA-4 in 90 different Tumor entities using multiple antibodies and artificial intelligence.



www.nature.com/labinvest

ARTICLE OPEN



Semi-automated validation and quantification of CTLA-4 in 90 different tumor entities using multiple antibodies and artificial intelligence

David Dum^{1,3}, Tjark L. C. Henke^{1,3}, Tim Mandelkow¹, Cheng Yang¹, Elena Bady¹, Jonas B. Raedler^{1,2}, Ronald Simon¹ , Guido Sauter¹, Maximilian Lennartz¹, Franziska Büscheck¹, Andreas M. Luebke¹, Anne Menz¹, Andrea Hinsch¹, Doris Höflmayer¹, Sören Weidemann¹, Christoph Fraune¹, Katharina Möller¹, Patrick Lebok¹, Ria Uhlig¹, Christian Bernreuther¹, Frank Jacobsen¹, Till S. Clauditz¹, Waldemar Wilczak¹, Sarah Minner¹, Eike Burandt¹, Stefan Steurer¹ and Niclas C. Blessin¹

© The Author(s) 2022

CTLA-4 is an inhibitory immune checkpoint receptor and a negative regulator of anti-tumor T-cell function. This study is aimed for a comparative analysis of CTLA-4⁺ cells between different tumor entities. To quantify CTLA-4⁺ cells, 4582 tumor samples from 90 different tumor entities as well as 608 samples of 76 different normal tissue types were analyzed by immunohistochemistry in a tissue microarray format. Two different antibody clones (MSVA-152R and CAL49) were validated and quantified using a deep learning framework for automated exclusion of unspecific immunostaining. Comparing both CTLA-4 antibodies revealed a clone dependent unspecific staining pattern in adrenal cortical adenoma (63%) for MSVA-152R and in pheochromocytoma (67%) as well as hepatocellular carcinoma (36%) for CAL49. After automated exclusion of non-specific staining reaction (3.6%), a strong correlation was observed for the densities of CTLA-4⁺ lymphocytes obtained by both antibodies ($r = 0.87$; $p < 0.0001$). A high CTLA-4⁺ cell density was linked to low pT category ($p < 0.0001$), absent lymph node metastases ($p = 0.0354$), and PD-L1 expression in tumor cells or inflammatory cells ($p < 0.0001$ each). A high CTLA-4/CD3-ratio was linked to absent lymph node metastases ($p = 0.0295$) and to PD-L1 positivity on immune cells ($p = 0.0026$). Marked differences exist in the number of CTLA-4⁺ lymphocytes between tumors. Analyzing two independent antibodies by a deep learning framework can facilitate automated quantification of immunohistochemically analyzed target proteins such as CTLA-4.

Laboratory Investigation; <https://doi.org/10.1038/s41374-022-00728-4>

INTRODUCTION

CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CD152) is an important inhibitory immune checkpoint receptor. It is expressed on various subtypes of T-lymphocytes including CD4⁺ and CD8⁺ T-cells as well as regulatory T-cells¹. CTLA-4 can compete with its stimulating counterpart CD28 for ligand binding to CD80 and CD86^{2,3}. CD28 co-stimulation is required for T-cell activation, whereas CTLA-4 inhibits T-cell response by opposing the actions of CD28-mediated co-stimulation^{2,3}. Even though CTLA-4 is also expressed on activated CD8⁺ cytotoxic T-cells, the major physiologic role of CTLA-4 appears to be through down-modulation of non-regulatory T-cell activity and supportively enhancement of regulatory T-cell suppressive activity^{1,4–6}. The CTLA-4 pathway is a commonly targeted pathway in cancer immunotherapy. For example, the CTLA-4 inhibitor Ipilimumab alone or in combined therapy has been approved for the treatment of advanced malignant melanoma, renal cell and microsatellite instability-high colorectal cancer by the Food and Drug Administration (FDA)⁷.

Given the pivotal role of CTLA-4 as a successfully used drug target, the prevalence and topographic distribution of CTLA-4⁺

lymphocytes and lymphocyte subclasses is of interest. Most studies analyzing CTLA-4 in cancer have employed flow cytometry or RNA based methods^{1,8}. Because these techniques are best applicable to unfixed tissues which is unavailable from most tumors in routine praxis, studies on CTLA-4 in cancer mostly involved limited numbers of samples from frequently occurring tumor entities such as malignant melanoma ($n = 56–470$)^{8,9}, breast ($n = 928–1217$)¹⁰, colorectal ($n = 439–1003$)^{10–12} and renal cell cancers ($n = 813–928$)^{10,12,13}. Studies on less common tumor entities and larger patient cohorts require the use of routinely processed formalin fixed tissues but were so far hindered by a relative lack of CTLA-4 antibodies suitable for immunohistochemistry (IHC). Antibodies with documented specificity on unprocessed native target protein often show disappointing results on formalin fixed tissues^{14–16}. Potential shortcomings include a lack of target protein staining, an unfavorable signal-to-noise ratio resulting in non-specific background staining, and antibody cross-reactivity resulting in a distinct staining of structures not containing the target protein^{14,15}.

In order to determine the prevalence of CTLA-4⁺ lymphocytes in a broad range of different tumor entities, a set of preexisting

¹Institute of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ²College of Arts and Sciences, Boston University, Boston, MA, USA. ³These authors contributed equally: David Dum, Tjark L.C. Henke. [✉]email: R.Simon@uke.de

Received: 24 September 2021 Revised: 17 December 2021 Accepted: 17 December 2021
Published online: 29 January 2022

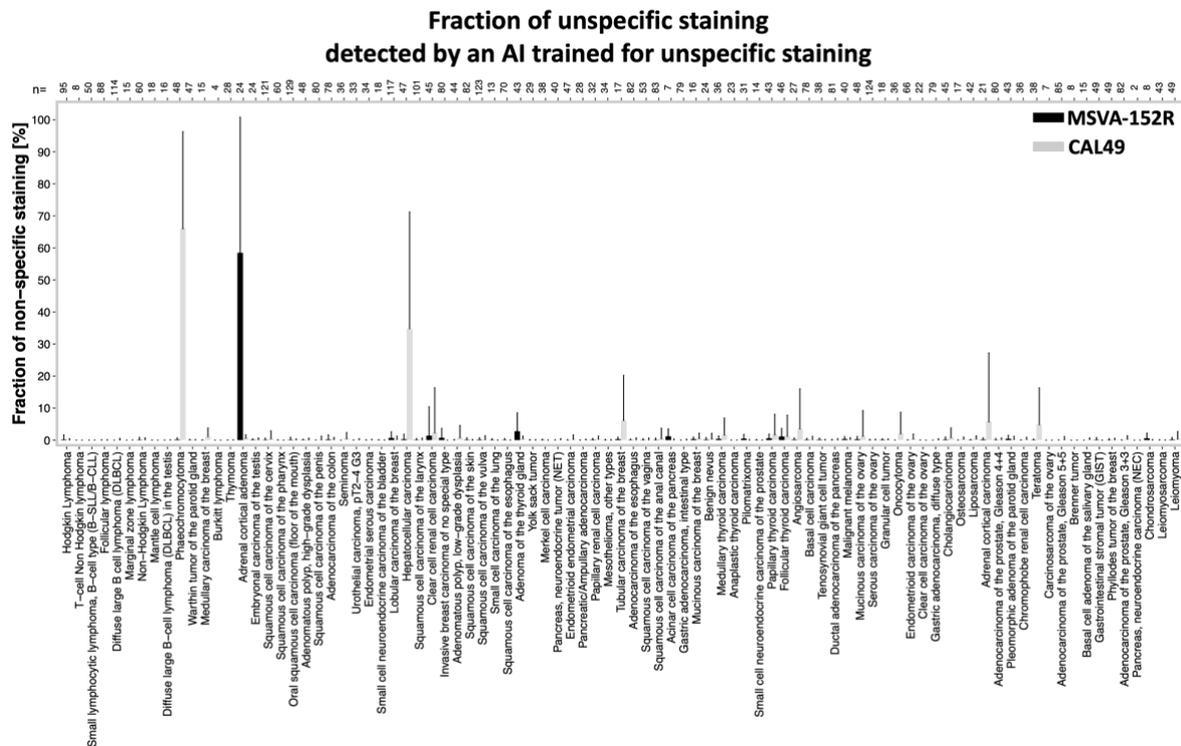


Fig. 1 Fraction of non-specific staining detect by an AI framework trained for non-specific staining. The mean fraction of non-specific stained cells is shown for both CTLA-4 antibody clones MSVA-152R (black) and CAL49 (grey). Error bars indicate standard deviations.

tissue microarrays (TMAs) was analyzed that included >4000 tumor samples from 90 types and subtypes as well as 76 different normal tissue categories. To compensate for possible shortcomings of CTLA-4 immunohistochemistry, two different CTLA-4 antibodies were used in combination with an artificial intelligence approach for automated discrimination of true from aberrant antibody staining.

MATERIALS AND METHODS

Tissue microarrays (TMAs)

Our normal tissue TMA was composed of 8 samples from 8 different donors for each of 76 different normal tissue types (608 samples on one slide). The cancer TMAs contained a total of 5706 primary tumors from 134 tumor types and subtypes. Detailed histopathological data such as grade, pT or pN information were available for >2600 cancers (Table 2). Data on the PD-L1 status of tumor-/inflammatory cells¹⁷ and the density of CD3⁺ T-cells¹⁷ were obtained in a previous study. The composition of normal and cancer TMAs is described in the results section. All samples were selected from the archives of the Institutes of Pathology, University Hospital of Hamburg, Germany, the Institute of Pathology, Clinical Center Osnabrueck, Germany, and Department of Pathology, Academic Hospital Fuerth, Germany. Tissues were fixed in 4% buffered formalin and then embedded in paraffin. The TMA manufacturing process was described earlier in detail^{18,19}. In brief, one tissue spot (diameter: 0.6 mm) was transmitted from a cancer containing donor block to an empty recipient paraffin block. The use of archived remnants of diagnostic tissues for TMA manufacturing, their analysis for research purposes, and patient data were according to local laws (HmbKHG, §12) and analysis had been approved by the local ethics committee (Ethics commission Hamburg, WF-049/09). All work has been carried out in compliance with the Helsinki Declaration.

Immunohistochemistry (IHC)

Freshly cut 4- μ m TMA sections were immunostained on one day and in one experiment. Slides were deparaffinized and exposed to heat-induced

antigen retrieval for 5 min in an autoclave at 121 °C in a pH 7.8 buffer. Primary antibody specific for CTLA-4 (rabbit recombinant, clone MSVA-152R, Cat#: 3451-152R, MS Validated Antibodies GmbH, Hamburg, Germany, 1:50 and rabbit recombinant, clone CAL49, Cat#: ab237712, Abcam, Cambridge, USA, 1:100) were applied at 37 °C for 60 min. Bound antibody was then visualized using the EnVision Kit (Agilent DAKO, Santa Clara, USA) according to the manufacturer's directions.

For multiplex fluorescence IHC a freshly cut 4- μ m healthy human tonsil was used. The experimental procedure was performed according to the manufacturer's instructions (AKOYA). Slides were initially boiled in an autoclave (30 min at 100–120 °C in pH9 buffer) for antigen retrieval. The antibody panel consisted of a CD3 antibody for T-cell detection (rabbit polyclonal, Cat#: IR503, Agilent DAKO, Santa Clara, USA, undiluted), MSVA-152R, and CAL49 for CTLA-4 detection. The OPAL dye kit (Cat# NEL811001KT, AKOYA Biosciences, Menlo Park, California, United States) was used to detect the primary antibodies CD3 (OPAL 520), MSVA-152R (OPAL 570), and CAL49 (OPAL 690). These were combined with diaminido-2-phenylindole (DAPI) staining. One cycle of antibody staining included peroxidase blocking, application of the primary antibody, detection with a secondary HRP-conjugated antibody, fluorescence dye detection, and removal of the bound antibodies by microwave treatment (5 min at 100 °C and 5 min at a mean temperature of 93 °C). This cycle was repeated two times for the remaining antibodies. Slides were subsequently counterstained with DAPI and mounted in an antifade solution. To measure the co-expression of both CTLA-4 antibody clones in human tonsil (Fig. S1A, B) the CTLA-4 density and expression level were analyzed: Correlation analysis of the CTLA-4 expression level confirmed a high degree of co-expression ($r = 0.81$, $p < 0.0001$; Fig. 1C). In addition, the density of CTLA-4⁺ cells of both clones was highly concordant in 35 representative areas ($r = 0.85$, $p < 0.0001$, Fig. S1C).

Deep learning-based image analysis

The slides were scanned using Leica's Aperio AT2 slide scanner. The digital images were analyzed using a two-stage approach combining a convolutional neural network (U-Net) for automated quantification of CTLA-4⁺ cells (1) and a deep neural network (DeepLab3⁺) for the detection of non-specific (2) CTLA-4 staining (Fig. S2).

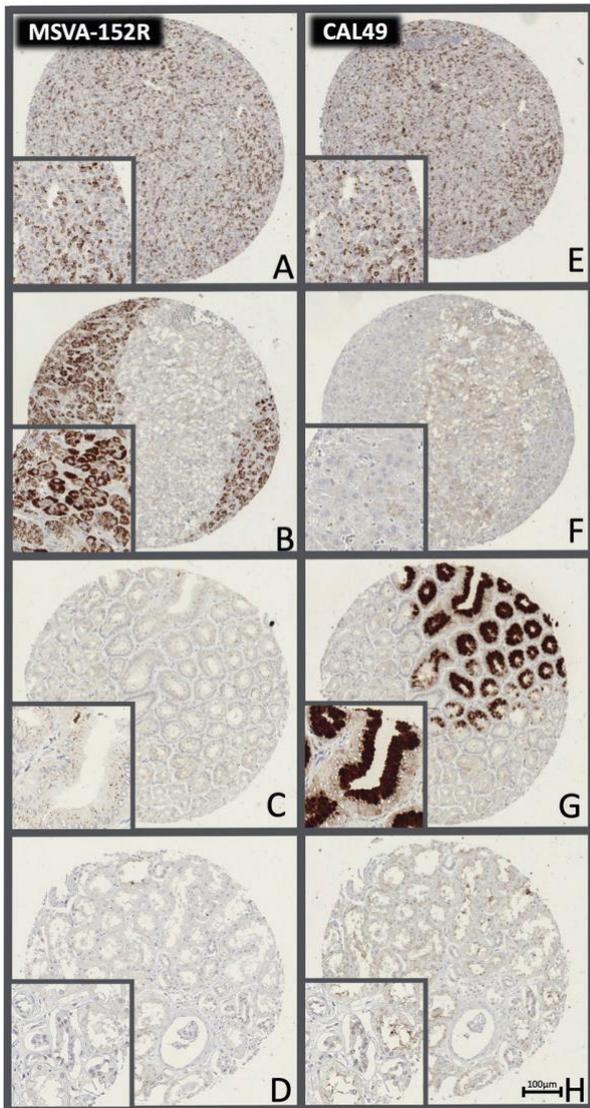


Fig. 2 CTLA-4 immunostaining of normal tissues. The panels show for the antibody MSVA-152R a strong membranous positivity of a subset of lymphocytes in the tonsil (A), a strong cytoplasmatic staining of the adrenal cortex (B) and a cytoplasmic granular staining in a fraction of superficial epithelial cells of the stomach (C) and of renal tubuli (D). For the antibody CAL49, a strong membranous positivity of the same subset of lymphocytes in the tonsil (E), a weak cytoplasmatic staining of the adrenal medulla (F), a strong cytoplasmatic staining superficial epithelial cells of the stomach (G), and an apical membranous staining of renal tubuli (H) is seen. The images (A–D) and (E–H) are from consecutive tissue sections and taken at 20x magnification.

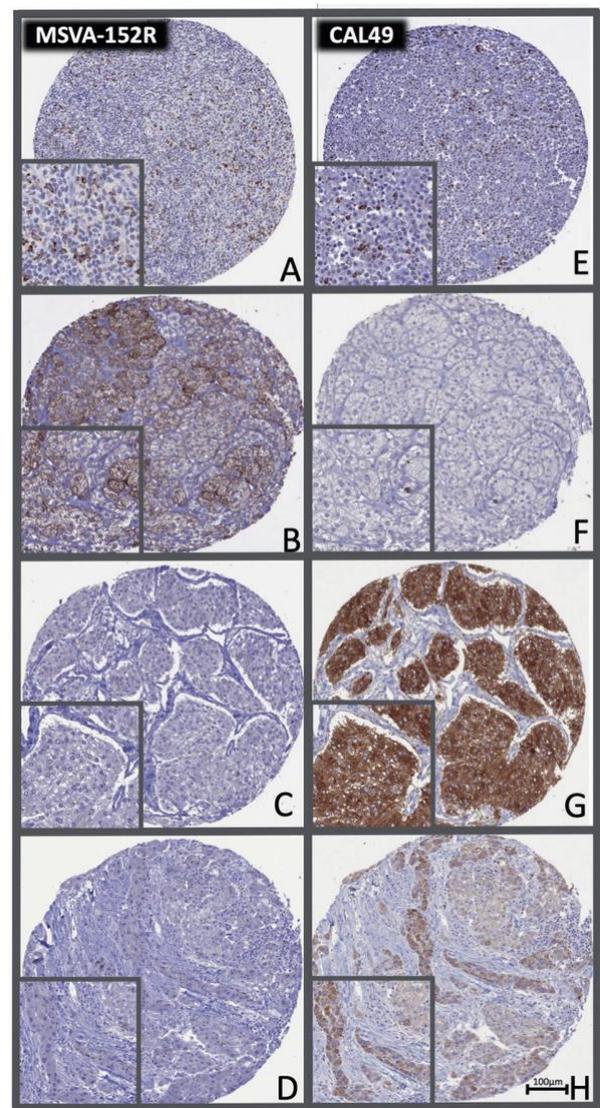


Fig. 3 Distinct target staining and non-overlapping cross-reactivities of two CTLA-4 antibodies. The panels show for the antibody MSVA-152R a strong staining of a subset of lymphocytes in a Hodgkin's lymphoma (A), a strong cytoplasmatic staining of an adrenocortical adenoma (B) absence of staining in a pheochromocytoma (C), and a staining of few lymphocytes in a hepatocellular carcinoma (D). For the antibody CAL49, an equally strong staining of the identical subset of lymphocytes in a Hodgkin's lymphoma is seen (E), while staining is lacking in an adrenocortical adenoma (F), and a cytoplasmatic staining occurs in a pheochromocytoma (G) and a hepatocellular carcinoma (H). The images (A–D) and (E–H) are from consecutive tissue sections and taken at 20x magnification.

1. The U-Net deep learning system for cell identification was trained and validated as described earlier²⁰. In brief, thresholding was used to label cell nuclei and the background of the first 500 patients. After manual correction of this training set the U-Net was trained for 300,000 iterations (~30 epochs). The trained U-Net was used to analyze/label further 500 patients, which were also manually corrected. A new U-Net was trained based on these two training sets to label the next 500 patients. The process was used to continuously increase the training set until 3306 (75%) TMA spots (from 90 different tumor entities), were successfully labeled, manually corrected, and used for the training of the final U-Net for cell segmentation. Of note, to avoid introducing potential bias by

selective manually correction two trained pathologist were relabeling and manually correcting the labels. The threshold for CTLA-4 positivity was visually investigated. The area in square millimeter of each spots was calculated by a pretrained U-Net algorithm²¹.

2. The DeepLab3⁺ deep learning system for detecting aberrant antibody staining was trained on 75% of cases for every tumor entity to assure a balanced training input. A pathologist identified regions and TMA cores showing non-specific staining so that thresholding could be used to label regions of non-specific staining as well as background. Comparison of the staining pattern from both CTLA-4 clones for the same consecutive TMA spot enabled the identification of false positive antibody staining. Specific CTLA-4

staining was labeled as background. The mean fraction of non-specific stained cells per tumor entity is shown in Fig. 1. Tumor samples with 5% or more cells with non-specific staining were identified as a case driven by false positive staining and excluded from further analysis (Fig. S3). Thus, the mean CTLA-4 density (cells/mm²) of both antibodies was based on TMA cores showing 4% or less non-specific CTLA-4 staining. The performance of both deep learning systems was evaluated by calculating the area under (AUC) receiver operating characteristics (ROC) using the remaining (25%) of patients as a validation set (Fig. S3). Python version 3.8²² and the Visiopharm software package (Hoersholm, Denmark) were used to label, train, and validate the deep learning systems.

Statistical analysis

Statistical calculations were performed with R version 3.6.1 (The R foundation)^{23,24} and JMP Pro 15 software package (SAS Institute Inc., NC, USA)²⁵. Contingency tables and the Chi-square test were used to search for associations between the density of CTLA-4 and tumor phenotype. All *p* values were two-sided, and *p* < 0.05 were considered as significant.

RESULTS

CTLA-4 in normal tissues

Using both antibodies, a strong and distinct, predominantly membranous CTLA-4 immunostaining was seen in a subset of T-lymphocytes. Both antibodies also stained thyroid colloid. In addition, for MSVA-152R, an intense granular cytoplasmic staining could be seen in adrenocortical cells and decidua cells while a less conspicuous granular staining could be observed in the apical cytoplasm of tall columnar cells of the epididymis, pancreatic acinar cells, hepatocytes, and gastrointestinal surface epithelium cells. For CAL49 a strong cytoplasmic staining was seen in gastric surface epithelial cells and sebaceous glands while a weak cytoplasmic staining was seen in medullary cells of the thyroid and a weak to moderate staining of apical membranes in selected renal tubuli. All these stainings which were distinct when applying

one antibody but absent for the other antibody were considered antibody-specific cross-reactivities. Although thyroidal colloid was stained by both antibodies, this staining was also rather considered cross-reactive because the function of CTLA-4 is not consistent with a role as a thyroidal colloid component. Representative images are shown in Fig. 2.

CTLA-4 antibody validation in tumor tissues

A total of 9405 images from 90 different tumor entities were used to train and validate a deep learning-based approach for detecting non-specific staining (Fig. S2). Our approach identified a high fraction of non-specific staining for MSVA-152R in adrenal cortical adenoma (58%) and for CAL49 in pheochromocytoma (66%) as well as hepatocellular carcinoma (35%, Fig. 1). Non-specific staining for both antibodies was found in 1% to 8% of cells in malignant melanomas, adrenocortical carcinomas, renal and thyroidal tumors. Representative tumor images are shown in Fig. 3. After automated exclusion of perceived non-specific staining reaction in 126 cases (2.7%) of the 4723 cases stained with MSVA-152R and in 213 (4.5%) of the 4682 cases stained with CAL49, a strong correlation was observed for the densities of CTLA-4⁺ cells obtained by our two antibodies (*r* = 0.93; *p* < 0.0001; Fig. S4). For all further analyses, the average densities of CTLA-4⁺ cells obtained by both antibodies were used for each patient except for tumor samples with >5% of non-specific staining. In these cases, only the data from the antibody with specific staining was utilized.

CTLA-4 in tumor tissues

A total of 4582 different patients from 90 different tumor entities—after exclusion of 339 (3.6%) of 9405 cases—were analyzed in this study. The mean density of CTLA-4⁺ cells was 674 ± 1482 cells/mm² and ranged from 71 ± 175 cells/mm² in leiomyoma to 5916 ± 3826 cells/mm² in Hodgkin's lymphoma (Fig. 4; Table S1). A comparison of the densities of CTLA-4⁺ cells in different tumor

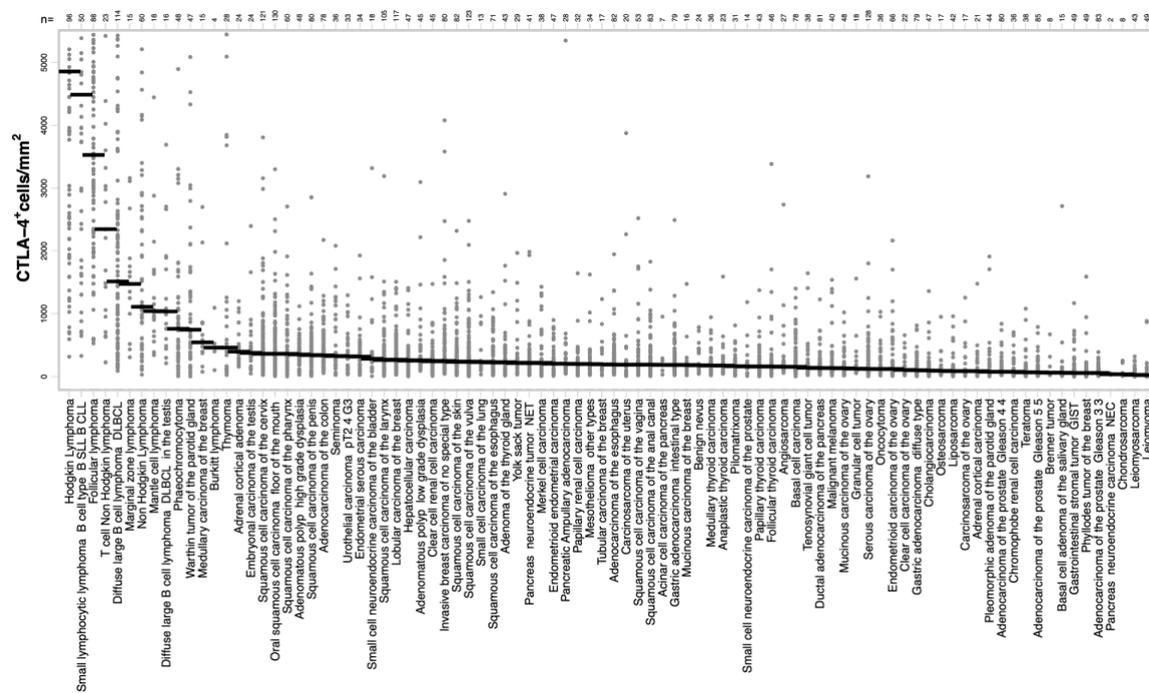


Fig. 4 CTLA-4 density in human neoplasms. Distribution of the CTLA-4⁺ cell density (cell/mm²) across 90 different human tumor entities. In total 4582 tumor samples, represented by gray dots, were analyzed. The vertical bars indicate the mean density per entity.

Table 1. CTLA-4⁺ cell densities (cells/mm²) and CTLA-4/CD3-ratio in different tumor categories.

Characteristic	Patient number (%)	Mean density of both CTLA4-Ab	p value	Patient number (%)	CTLA4/CD3-ratio	p value
Total	4582	673 (±1482) median: 214		4292	17 (±52) median: 2	
Benign/malignant			<0.0001			0.3442
Malignant	3470 (75.7%)	734 (±1621)		3259 (75.9%)	15 (±40)	
Benign	432 (9.4%)	395 (±663)		452 (10.5%)	18 (±65)	
Origin			<0.0001			<0.0001
Lymphoma	424 (9.3%)	3642 (±3207)		297 (6.9%)	5 (±7)	
Biphasic	133 (2.9%)	609 (±1057)		128 (3.0%)	11 (±29)	
Germ cell tumor	127 (2.8%)	401 (±468)		144 (3.4%)	8 (±24)	
Epithelial	2954 (64.5%)	335 (±471)		2855 (66.5%)	18 (±48)	
Melanocytic	64 (1.4%)	307 (±340)		70 (1.6%)	25 (±43)	
Mesothelial	34 (0.7%)	281 (±320)		35 (0.8%)	15 (±31)	
Mesenchymal	235 (5.1%)	145 (±268)		255 (5.9%)	9 (±31)	
Lymphoma			<0.0001			0.0873
Hodgkin's lymphoma	96 (2.1%)	5916 (±3826)		50 (1.2%)	3 (±2)	
NHL B-cell	305 (6.7%)	2997 (±2710)		236 (5.5%)	5 (±8)	
NHL T-cell	23 (0.5%)	2701 (±1949)		11 (0.3%)	6 (±7)	
Epithelial tumors			<0.0001			0.2193
Squamous	908 (19.8%)	421 (±469)		861 (20.1%)	20 (±45)	
Urothelial	33 (0.7%)	418 (±347)		37 (0.8%)	15 (±46)	
Adeno	1477 (32.2%)	268 (±375)		1419 (33.1%)	16 (±43)	
Renal	113 (2.5%)	256 (±269)		120 (2.8%)	17 (±34)	
Adenocarcinomas			<0.0001			0.1630
Lower GI	89 (1.9%)	448 (±343)		78 (1.8%)	20 (±33)	
Breast	245 (5.4%)	411 (±505)		220 (5.1%)	18 (±52)	
Thyroid gland	248 (5.4%)	300 (±452)		93 (2.2%)	23 (±49)	
Hep/Biliary/Pancreas	211 (4.6%)	258 (±432)		207 (4.8%)	17 (±45)	
Gyn	345 (7.5%)	256 (±336)		332 (7.7%)	15 (±40)	
Upper GI	240 (5.2%)	249 (±295)		221 (5.1%)	17 (±54)	
Adrenal cortical	21 (0.5%)	221 (±324)		25 (0.6%)	14 (±28)	
Prostate	78 (1.7%)	110 (±124)		242 (5.6%)	8 (±23)	

categories identified highest values in lymphomas (3642 ± 3207 cells/mm²), biphasic (609 ± 1057 cells/mm²) as well as germ cell tumors (401 ± 468 cells/mm²) and the lowest in mesothelial (281 ± 319 cells/mm²) as well as mesenchymal neoplasms (145 ± 268 cells/mm²; Table 1). Within epithelial tumors, the density of CTLA-4⁺ cells was higher in squamous cell (421 ± 469 cells/mm²) and urothelial carcinomas (418 ± 347 cells/mm²) than in adenocarcinomas (268 ± 375 cells/mm²) and renal cell neoplasms (256 ± 269 cells/mm²; Table 1). A comparison with histologic parameters and PD-L1 status revealed significantly higher rates of CTLA-4⁺ cells in tumors with low pT category ($p < 0.0001$), absent lymph node metastases ($p = 0.0031$), and PD-L1 expression in tumor cells or inflammatory cells ($p < 0.0001$ each; Table 2). Similar associations were also seen within the more homogeneous subgroups of adenocarcinomas and squamous cell carcinomas (data not shown). Across 908 squamous cell carcinomas, a high density of CTLA-4⁺ cells was linked to a positive HPV status ($p = 0.0130$; Table 2). Unequivocal CTLA-4 immunostaining of tumor cells was not seen in our patients.

CTLA-4/CD3 in tumor tissues

An elevated CTLA-4 density was linked to a high CD3⁺ T-cell density ($r = 0.69$, $p < 0.0001$, Fig. S5). If the ratio of the CTLA-4⁺ cell density and the CD3⁺ T-cell density was used as an analyte, most

associations seen for the CTLA-4 density were no longer found. There was, however, a significant association between a high CTLA-4/CD3-ratio and absence of nodal metastases in 1756 cancer samples ($p = 0.0354$, Table 2). A high CTLA-4/CD3-ratio was linked to PD-L1 positivity on immune cells ($p = 0.0026$, Table 2). The CTLA-4/CD3-ratio also showed differences between different tumor categories: Lowest values were found in lymphomas (5 ± 7) and germ cell tumors (8 ± 24) while highest values were seen in melanocytic (25 ± 43) as well as epithelial tumors (18 ± 48, $p < 0.0001$, Table 1). Even though, the CTLA-4 density was highly variable in epithelial tumors (ranging from 256 to 421 cells/mm²; $p < 0.0001$) the CTLA-4/CD3-ratio was similar in different origins of epithelial tumors (ranging from 15 to 20; $p = 0.2193$; Table 2).

DISCUSSION

The data from this study demonstrate the feasibility of a reliable and precise high-throughput quantification of lymphocyte subpopulations by employing an AI supported multiple antibody approach.

Two different CTLA-4 antibodies were used for this study because the use of multiple independent antibodies is the only practically feasible approach for validating lymphocyte marker antibodies for immunohistochemistry on formalin fixed tissues.

Table 2. Association between the CTLA-4⁺ cell density (cells/mm²) as well as the CTLA4/CD3-ratio and clinicopathological parameters.

Characteristic	Patient number (%)	CTLA4 ⁺ cell density	p value	Patient number (%)	CTLA4/CD3-ratio	p value
Total	4582	673 (±1482) median: 214		4292	17 (±52) median: 2	
Pathological tumor stage			<0.0001			0.1846
pT1	763 (16.7%)	410 (±570)		740 (17.2%)	20 (±56)	
pT2	746 (16.3%)	350 (±467)		714 (16.6%)	18 (±46)	
pT3	839 (18.3%)	273 (±364)		710 (16.5%)	16 (±39)	
pT4	341 (7.4%)	306 (±345)		328 (7.6%)	15 (±30)	
Missing data	1893 (41.3%)	-		1800 (41.9%)	-	
Pathological nodal stage			0.0031			0.0354
pN-	839 (18.3%)	373 (±491)		794 (18.5%)	21 (±55)	
pN+	1003 (21.9%)	312 (±398)		962 (22.4%)	16 (±37)	
Missing data	2740 (59.8%)	-		2536 (59.1%)	-	
PD-L1 on tumor cells			<0.0001			0.0026
Negative	2583 (56.4%)	628 (±1382)		2498 (58.2%)	16 (±49)	
Positive	662 (14.4%)	920 (±1744)		605 (14.1%)	23 (±64)	
Missing data	1337 (29.2%)	-		1189 (27.7%)	-	
PD-L1 on immune cells			<0.0001			0.1010
Negative	2063 (45.0%)	310 (±534)		2068 (48.2%)	19 (±59)	
Positive	1371 (29.9%)	1233 (±2059)		1231 (28.7%)	16 (±45)	
Missing data	1148 (25.1%)	-		993 (23.1%)	-	
HPV			0.0130			0.9020
Negative	326 (7.1%)	393 (±392)		291 (6.8%)	25 (±56)	
Positive	243 (5.3%)	489 (±524)		221 (5.2%)	25 (±40)	
Missing data	4013 (87.6%)	-		3780 (88.0%)	-	

Although the International Working Group for Antibody Validation (IWGAV) has proposed that antibody validation for immunohistochemistry could alternatively include a comparison of the IHC findings with expression data obtained by another independent method²⁶, this approach is not practical for immune cell markers due to the widespread distribution of immune cells across virtually all tissues. That both applied antibodies identified almost identical subsets of lymphocytes in multicolor analyses demonstrates, provides strong evidence for both antibodies recognizing CTLA-4 in formalin fixed tissues. The comprehensive screening of 76 different normal tissue categories also indeed identified multiple tissue structures that were significantly stained by one antibody but not by the other. While a staining of the target protein can be expected to occur with every suitable antibody it is likely that cross-reactivities are more antibody specific and therefore will involve non-overlapping tissues and cell types. The CAL49 staining observed in stomach and kidney epithelium as well as the MSVA-152R staining in adrenal gland, decidua cells and other epithelial cells are thus considered antibody cross-reactivities. Cross-reactivities of diagnostically used antibodies are not uncommonly found if an extensive normal tissue screening is executed. For example, we had recently observed non-specific staining of smooth-muscle for the PLAP antibody clone 8A9²⁷, spermatocytes of the testis for the DOG1 clone SP31²⁸, and of corpus luteum of the ovary, adrenal cortical cells, decidua cells for the SATB2 clone 384R-18²⁹.

Antibody cross-reactivity does not necessarily represent a significant limitation to the utility of an antibody and can even be considered advantageous. Cross-reactive binding of Melan A clone A103 to adrenocortical cells is for example used as a diagnostic feature for distinguishing adrenocortical tissue from clear cell renal cell carcinoma³⁰. The thorough analysis of >4582 tumors from 90 different tumor types demonstrated in this study, that the cross-reactivities detected for our two CTLA-4 antibodies hindered the quantitation of CTLA-4⁺ lymphocytes in only few

tumor entities. Because the artefact prone tumor entities were antibody-specific and did not overlap for our antibodies, the use of just two antibodies enabled a successful analysis of the entire tumor set although a few individual tumors such as heavily pigmented melanoma cases remained uninformative for both antibodies. It is of note, that several earlier IHC studies had described CTLA-4 to occur in tumor cells of malignant melanoma³¹, breast cancer³², and esophageal carcinomas³³. Given the complete lack of confirmed tumor cell staining in the 4582 cancers of our study, it appears possible that these earlier reports were based on non-specific antibody binding to tumor cells.

The fact that the analysis of more than 4000 tumor samples from 90 different tumor entities was executed using the same deep-learning algorithm for both antibodies was a major strongpoint of this study and enabled a fully reproducible evaluation of non-specific staining for multiple antibodies. Thus, the Artificial Intelligence (AI) framework for the detection of non-specific staining reaction was trained on immunostaining of both antibodies—in an equal proportion—to ensure a good performance for both antibody clones. To cover such a wide range of different staining patterns of multiple antibodies across various tumor entities, the AI framework was based on an AI for cell segmentation and the pivotal AI for detecting non-specific antibody staining. However, a major hurdle in developing an AI specific for non-specific staining was to achieve a great diversity of non-specific staining patterns as well as specific lymphocytic staining patterns in the training set. Here, we took advantage of the fact that in most tumor entities the staining quality of both antibodies was complementary to each other (i.e., at least one of the antibody clones showed a specific immunostaining), which dramatically increased the accuracy of our AI. In addition, another advantage of CTLA-4 was the fundamental differences in the shape of CTLA-4⁺ lymphocytes and non-specific staining. Therefore, the AI approach described in this study can be particularly effective in case of lymphocyte markers. For the future, the

purpose of this AI approach is—similar to other AI based decision support systems in pathology³⁴—to assist the pathologist by excluding >90% of unimportant tumor samples and pointing out the TMA cores of interest (i.e., with potential non-specific staining). Taken together, integrating an AI framework in the process of antibody validation might result in an efficient semi-automated workflow for quality assessment of new antibody clones.

Several data generated from our tumor cohort suggest a possible biological relevance of CTLA-4⁺ lymphocytes. Although the prognostic role of CTLA-4 has been reported contradictory³⁵, the fact that the density of CTLA-4⁺ lymphocytes varied between tumor types as well as between individual tumors and that the CTLA-4 density was lower in tumors of advanced clinicopathological parameters was expected because similar findings had been observed for an inflamed immune phenotype^{36–38}, CD3⁺, CD8⁺³⁶, and CD4⁺⁴⁰, lymphocytes as well as for PD-L1⁺ immune cells⁴¹ or CD112R⁺ lymphocyte subsets²¹. For the same reason, the significant link between a high number of CTLA-4⁺ cells and PD-L1 expression in tumor cells or tumor associated inflammatory cells is also consistent with the literature⁴². Despite the expected general link between high absolute numbers of CTLA-4⁺ cells and favorable tumor features, there were also some associations between a high CTLA-4/CD3-ratio and favorable tumor features. The latter finding would clearly fit with the concept that immune checkpoint receptors—such as CTLA-4—are upregulated in T-cell accumulations in the tumor micro-environment, so that a high immune checkpoint expression functions as a surrogate for a high number of T-cell accumulations (i.e., a high T-cell density, an inflamed immune phenotype)^{21,43–45}. Given that the CD3 density was quantified in an earlier study on non-consecutive slides, it is possible that some associations with clinicopathological parameters might be underrated in this study. Several other studies have also suggested that a high expression of CTLA-4⁺ on T-cells is linked to a favorable disease outcome or tumor features in 289 squamous cell lung cancer⁴⁶, 162 testicular germ cell tumors⁴⁷, 130 breast cancers³², 45 mesothelioma patients⁴⁸, and 39 B-cell chronic lymphocytic leukemia⁴⁹.

In summary, CTLA-4⁺ cells could be rapidly and precisely quantitated in this study despite inherent limitations of available CTLA-4 antibodies. The use of two independent antibodies enabled our AI to automatically distinguish “true” from “false” immunostaining and enabled the identification of potentially relevant biological data such as a link between a low ratio of CTLA-4/CD3 and pN as well as PD-L1⁺ immune cells. Further investigations on the role of CTLA-4⁺ lymphocyte subsets by multiplex fluorescence IHC will most likely benefit from using similar approaches as described here.

DATA AVAILABILITY

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

REFERENCES

- Chan, D. V. et al. Differential CTLA-4 expression in human CD4⁺ versus CD8⁺ T cells is associated with increased NFAT1 and inhibition of CD4⁺ proliferation. *Genes Immun.* **15**, 25–32 (2014).
- Sansom, D. M. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology* **101**, 169–177 (2000).
- Rowshanravan, B., Halliday, N. & Sansom, D. M. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood* **131**, 58–67 (2018).
- Lindsten, T. et al. Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J. Immunol.* **151**, 3489–3499 (1993).
- Friedline, R. H. et al. CD4⁺ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. *J. Exp. Med.* **206**, 421–434 (2009).
- Wing, K. et al. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* **322**, 271–275 (2008).

- Valdepally, R. K., Kharel, P., Pandey, R., Garje, R. & Chandra, A. B. Review of indications of FDA-approved immune checkpoint inhibitors per NCCN guidelines with the level of evidence. *Cancers (Basel)* **12**, 738–757 (2020).
- Roh, W. et al. Integrated molecular analysis of tumor biopsies on sequential CTLA-4 and PD-1 blockade reveals markers of response and resistance. *Sci. Transl. Med.* **9**, eaah3560 (2017).
- Goltz, D. et al. CTLA4 methylation predicts response to anti-PD-1 and anti-CTLA-4 immunotherapy in melanoma patients. *JCI Insight* **3**, e96793 (2018).
- Zhang, P. et al. Mechanism- and immune landscape-based ranking of therapeutic responsiveness of 22 major human cancers to next generation Anti-CTLA-4 antibodies. *Cancers (Basel)* **12**, 284–303 (2020).
- Zou, C. et al. CTLA4 tagging polymorphisms and risk of colorectal cancer: a case-control study involving 2,306 subjects. *Onco. Targets Ther.* **11**, 4609–4619 (2018).
- Liu, J. N. et al. Clinical implications of aberrant PD-1 and CTLA4 expression for cancer immunity and prognosis: a pan-cancer study. *Front. Immunol.* **11**, 2048 (2020).
- Cesana, G. C. et al. Characterization of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **24**, 1169–1177 (2006).
- Hewitt, S. M., Baskin, D. G., Frevert, C. W., Stahl, W. L. & Rosa-Molinari, E. Controls for immunohistochemistry: the Histochemical Society's standards of practice for validation of immunohistochemical assays. *J. Histochem. Cytochem.* **62**, 693–697 (2014).
- Buchwalow, I., Samoilo, V., Boecker, W. & Tiemann, M. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Sci. Rep.* **1**, 28 (2011).
- Saper, C. B. A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* **57**, 1–5 (2009).
- Bady, E. et al. BLEACH&STAIN 15 marker multiplexed imaging in 3098 human carcinomas revealed six major PD-L1 driven immune phenotypes with distinct spatial orchestration. *Nat. Methods (submitted)* (2021).
- Kononen, J. et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med.* **4**, 844–847 (1998).
- Mirlacher, M. & Simon, R. Recipient block TMA technique. *Methods Mol. Biol.* **664**, 37–44 (2010).
- Blessin, N. C. et al. Automated Ki67-LI assessment in prostate cancer using artificial intelligence in multiplex fluorescence immunohistochemistry *European Urology (submitted, temporary download here: https://mega.nz/folder/y4YwRD7J#2V97_7wmc5JJigBodYQUA)* (2021).
- Blessin, N. C. et al. Deep profiling revealed an upregulation of CD112R in human cancer. *Cancer Immunol. Res. (submitted)* (2021).
- Foundation, P. S. Python Language Reference., Available at. <http://www.python.org> (2021).
- Tippmann, S. Programming tools: adventures with R. *Nature* **517**, 109–110 (2015).
- R-Core-Team. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.* URL. <https://www.R-project.org/> (2021).
- JMP®, V. SAS Institute Inc., Cary, NC, <https://www.jmp.com> 1989–2019.
- Uhlen, M. et al. A proposal for validation of antibodies. *Nat. Methods* **13**, 823–827 (2016).
- Reiswich, V. et al. Pattern of placental alkaline phosphatase (PLAP) expression in human tumors: a tissue microarray study on 12,381 tumors. *J. Pathol. Clin. Res.* **7**, 577–589 (2021).
- Jansen, K. et al. DOG1 expression is common in human tumors: a tissue microarray study on more than 15,000 tissue samples. *Pathol. Res. Pract.* **228**, 153663 (2021).
- Dum, D., Kromm, D., ..., Clauditz, S. T. & Krech, T. SATB2 expression in human tumors: a tissue microarray study on more than 15,000 tumors. (2022). (In press).
- Ghorab, Z., Jorda, M., Ganjei, P. & Nadji, M. Mejan A (A103) is expressed in adrenocortical neoplasms but not in renal cell and hepatocellular carcinomas. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **11**, 330–333 (2003).
- Laurent, S. et al. The engagement of CTLA-4 on primary melanoma cell lines induces antibody-dependent cellular cytotoxicity and TNF-alpha production. *J. Transl. Med.* **11**, 108 (2013).
- Yu, H. et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression in human breast cancer: implications for prognosis. *Cancer Immunol. Immunother.* **64**, 853–860 (2015).
- Zhang, X. F. et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 expression in esophageal carcinoma: implications for prognosis. *Oncotarget* **7**, 26670–26679 (2016).
- Campanella, G. et al. Clinical-grade computational pathology using weakly supervised deep learning on whole slide images. *Nat. Med.* **25**, 1301–1309 (2019).
- Hu, P. et al. The prognostic value of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **7**, 42913 (2017).
- Blessin, N. C. et al. Prognostic role of proliferating CD8(+) cytotoxic T cells in human cancers. *Cell Oncol. (Dordr).* <https://doi.org/10.1007/s13402-021-00601-4> (2021).

37. Burandt, E. et al. T cell density at the invasive margin and immune phenotypes predict patient's outcome in vulvar carcinomas. *J ImmunoTher Cancer (submitted)* (2021).
38. Ye, C. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored anti-HIV scFv efficiently protects CD4 T cells from HIV-1 infection and deletion in hu-PBL mice. *J. Virol.* **91**, e1389–16 (2017).
39. Galon, J. et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **313**, 1960–1964 (2006).
40. Matsumoto, H. et al. Increased CD4 and CD8-positive T cell infiltrate signifies good prognosis in a subset of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat* **156**, 237–247 (2016).
41. 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 (2019).
42. Jiang, C., Cao, S., Li, N., Jiang, L. & Sun, T. PD-1 and PD-L1 correlated gene expression profiles and their association with clinical outcomes of breast cancer. *Cancer Cell Int.* **19**, 233 (2019).
43. Zenke, S. et al. Quorum regulation via nested antagonistic feedback circuits mediated by the receptors CD28 and CTLA-4 confers robustness to T Cell Population Dynamics. *Immunity* **52**, 313–327 e317 (2020).
44. Cheng, Y. & Upregulation of CD112R (PVRIG) and PD-1 on cytotoxic T-cells located in T-cell-niche of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res. (submitted)* (2021).
45. Liu, F. et al. CTLA-4 correlates with immune and clinical characteristics of glioma. *Cancer Cell Int.* **20**, 7 (2020).
46. Paulsen, E. E. et al. CTLA-4 expression in the non-small cell lung cancer patient tumor microenvironment: diverging prognostic impact in primary tumors and lymph node metastases. *Cancer Immunol. Immunother.* **66**, 1449–1461 (2017).
47. Lobo, J. et al. Detailed characterization of immune cell infiltrate and expression of immune checkpoint molecules PD-L1/CTLA-4 and MMR proteins in testicular germ cell tumors disclose novel disease biomarkers. *Cancers (Basel)* **11**, 1535–60 (2019).
48. Roncella, S. et al. CTLA-4 in mesothelioma patients: tissue expression, body fluid levels and possible relevance as a prognostic factor. *Cancer Immunol. Immunother.* **65**, 909–917 (2016).
49. Joshi, A. D. et al. ATM, CTLA4, MND4, and HEM1 in high versus low CD38 expressing B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.* **13**, 5295–5304 (2007).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Julia Ebner, Inge Brandt, Melanie Witt, Maren Eisenberg and Sünje Seekamp for excellent technical assistance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: D.D., T.H., R.S., G.S., N.B. Development of methodology: D.D., T.H., R.S., G.S., N.B. Acquisition of data: D.D., T.H., T.M., C.Y., E.B., J.R. Analysis and interpretation of data: D.D., T.H., T.M., C.Y., E.B., J.R., R.S., G.S., N.B. Writing, review, and/or revision of the manuscript: D.D., T.H., R.S., G.S., N.B. Administrative, technical, or material support: D.D., T.H., T.M., C.Y., E.B., J.R., M.L., F.B., A.L., A.M., A.H., D.H., S.W., C.F.,

K.M., P.L., R.U., C.B., F.J., T.C., W.W., S.M., E.Bu, S.S., N.B. Study supervision: G.S., R.S., and N.B. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

COMPETING INTERESTS

All authors except one (GS) declare no conflict of interest. The CTLA-4 antibody clone MSVA-152R was provided from MS Validated Antibodies GmbH (owned by a family member of GS).

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Usage of archived tissues has been approved by local laws (HmgKhG §12) and the local ethics committee (Ethics commission Hamburg, WF-049/09). All work has been carried out in compliance with the Helsinki Declaration.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41374-022-00728-4>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Ronald Simon.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

2. Darstellung der Promotion

2.1. Einleitung

CTLA-4 (cytotoxic t-lymphocyte antigen 4, CD-152) ist ein Rezeptor, der sowohl auf CD4+-Helfer- und Regulatorischen T-Zellen als auch CD8+- cytotoxischen-T-Zellen exprimiert wird (Rowshanravan et al., 2018, McCoy and Le Gros, 1999). Zusammen mit dem Rezeptor CD28 spielt er eine Rolle in der Regulation der T-Zell-Antwort. Beide Rezeptoren binden die gemeinsamen Liganden CD80 sowie CD86, die auch B7-Proteine genannt und ihnen von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden. (Rowshanravan et al., 2018, Schwartz et al., 2001) Während CD28, wenn an die Liganden gebunden, eine co-stimulatorische Wirkung auf die T-Zell-Antwort ausübt, kommt CTLA-4 generell ein hemmender Effekt zu. Ausgeübt wird dieser Effekt zu einem wesentlichen Anteil über die Aktivierung der regulatorischen T-Zellen (Tregs), welche als natürliche „Bremse“ der Immunantwort wirken (Wing et al., 2008, Sakaguchi et al., 2008). Der CTLA-4-Signalweg wird häufig in der Immuntherapie gezielt genutzt: So wurde der CTLA-4-Inhibitor Ipilimumab allein oder in einer Kombinationstherapie von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für die Behandlung des fortgeschrittenen malignen Melanoms, des Nierenzellkarzinoms und des mikrosatelliteninstabilen kolorektalen Karzinoms zugelassen (Hodi et al., 2010, Ribas et al., 2016, Hargadon et al., 2018, Vaddepally, et al., 2020).

In Anbetracht der Rolle von CTLA-4 als Ziel von Arzneimitteln ist die Prävalenz und topografische Verteilung von CTLA-4+ Lymphozyten und Lymphozyten-Unterklassen von Interesse. Die bisher vorrangig eingesetzten Verfahren zum Nachweis CTLA-4-positiver Zellen in Tumorgewebe setzen häufig auf Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie oder RNA-basierten Verfahren (Chan et al., 2014, Roh et al., 2017). Da diese Techniken am besten an unfixiertem Gewebe anwendbar sind, das bei den meisten Tumoren in der Routinepraxis nicht zur Verfügung steht, sind Untersuchungen an großen Kohorten und insbesondere an seltenen Tumorentitäten erschwert. Derartige Studien erfordern die Verwendung von routinemäßig aufbereitetem, formalinfixiertem Gewebe, wurden aber bisher durch einen Mangel an CTLA-4-Antikörpern behindert, die für die Immunhistochemie (IHC) geeignet sind. Antikörper mit nachgewiesener Spezifität für unverarbeitetes, natives Zielprotein zeigen bisher auf formalinfixiertem Gewebe oft enttäuschende Ergebnisse (Hewitt et al., 2014, Buchwalow et al., 2011, Saper, 2009). Zu den potenziellen Mängeln gehören eine fehlende Anfärbung des Zielproteins, ein ungünstiges Signal-Rausch-Verhältnis, welches zu einer unspezifischen Hintergrundfärbung führt oder eine Kreuzreaktivität der Antikörper, die zu einer deutlichen Anfärbung von Strukturen führt, die das Zielprotein nicht enthalten (Hewitt et al., 2014, Buchwalow et al., 2011).

Im Bereich der histopathologischen Diagnostik nimmt der Einsatz von künstlicher Intelligenz einen immer höheren Stellenwert ein. In den letzten Jahren kommen dank der Digitalisierung der Medizin zunehmend Programme zum Einsatz, die die optische Auswertung an Gewebeschnitten unterstützen. (Forsch et al., 2021, van der Laak et al., 2021): So existieren bereits seit mehreren Jahren Assistenzsysteme, die in der histopathologischen Aufarbeitung Regionen von erhöhter Auffälligkeit identifizieren und z.B. auf Metastasen- oder Tumorwachstum hinweisen können (Ehteshami Bejnordi et al., 2017, Steiner et al., 2018). In der regelhaften histopathologischen Diagnostik spielen diese Systeme noch eine untergeordnete Rolle (Ahmad et al., 2021).

Im hier verfolgten Untersuchungsansatz wurden zwei Antikörper verwendet, die CTLA-4+-Zellen in verschiedenen Tumorentitäten in formalinfixiertem Gewebe anfärben. Um die Schwächen der Antikörper zu kompensieren, erfolgte der Einsatz einer KI, welche die Unterscheidung zwischen unspezifischer und spezifischer Färbung unterstützte.

Mithilfe von Tissue Micro arrays („TMA“) ist es möglich, parallel immunhistochemische Untersuchungen an mehreren Gewebeproben vorzunehmen. Hierzu werden aus in Paraffinblöcken eingelagerten Normalgeweben oder Tumoren die entsprechenden Areale durch Pathologen eingezeichnet, ausgestanzt und in Paraffinblöcke eingesetzt. Auf diese Weise können mehrere hundert Tumorstanzes parallel und unter gleichen Bedingungen ausgewertet werden (Kononen et al., 1998).

2.2. Material und Methoden

Die durchgeführten Methoden und die verwendeten Materialien sind in der Publikation detailliert dargestellt. Die nachfolgende Darstellung ist stark vereinfacht. In der gezeigten Arbeit wurde neben einem Normalgewebe-TMA mit 76 unterschiedlichen Normalgeweben ein „Multi-Tumor Array“ (MTA) verwendet, welcher aus über 5000 verschiedenen Tumorgeweben von 134 Tumorarten besteht.

Für die Durchführung der immunhistochemischen Analyse (IHC) der TMA-Schnitte wurden frische 4 µm dicke Gewebeschnitte zugeschnitten und diese mit den beiden Antikörpern MSVA-152R und CAL49 nach Herstellerangaben gefärbt.

Um das Färbemuster der beiden CTLA-4 Antikörper zu vergleichen, wurde ein angefärbtes Areal in einer menschlichen Tonsille untersucht. Dies ergab eine hohe Korrelation ($r = 0.81$, $p < 0.0001$).

Die Gewebeschnitte wurden durch Leicas „Aperio AT2 slide scanner“ digitalisiert. Die Analyse der entstandenen Bilder wurde mittels eines zweistufigen Verfahrens durchgeführt, welches „convolutional neural networks“ (U-Net) für die quantitative Auswertung von CTLA-

4-positiven Zellen und ein „deep neural network“ (DeepLab3⁺) zur Erkennung von nicht-spezifischer CTLA-4 Anfärbung beinhaltete.

Der U-Net Algorithmus zur Erkennung der einzelnen Zellen wurde wie folgt trainiert: Einem „Machine Learning“ Algorithmus, welcher die Kontraste von Zellkernen und Hintergrund erkennen soll, wurden Schwellenwerte zu deren Unterscheidung vorgegeben (sog. „Thresholding“) und diese zum Annotieren der ersten 500 Patienten genutzt. Nach Korrektur dieser 500 Patienten durch Pathologen wurden weitere, nun sukzessiv trainierte U-Nets mit nun mehr Patienten trainiert und manuell korrigiert, bis das finale U-Net zur Zellerkennung an 75% der Patienten trainiert worden war; anschließend erfolgte die Anwendung auf das Gesamtkollektiv. Der Schwellenwert der Färbung, welcher eine Wertung als CTLA-4 positiv festlegte, wurde von erfahrenen Pathologen visuell festgelegt und anschließend die Flächen der jeweiligen CTLA-4 positiven Zellen ebenfalls durch einen trainierten U-Net Algorithmus berechnet.

Das DeepLab3⁺ deep-learning Programm zur Erkennung von jeweils abweichenden Anfärbungen wurde an 75% der Fälle von jeder der verwendeten Tumorentitäten trainiert. Durch Pathologen wurden manuell Flächen markiert, welche nicht-spezifische Anfärbung von CTLA-4 aufwies, sodass das Programm anhand dieser Grenzwerte ebenfalls nicht-spezifische Anfärbung identifizieren konnte. Die Bewertung als falsch-positive Anfärbung wurde mittels Vergleichs der Anfärbemuster beider verwendeter CTLA-4 Antikörper vorgenommen. Analytierte Gewebeschnitte, die über 5% an nicht-spezifischer Anfärbung aufwiesen, wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Folglich wurde die Analyse der Dichte von CTLA-4 positiven Zellen (Zellen / mm²) anhand von Gewebeschnitten durchgeführt, die 5% oder weniger nicht-spezifische Anfärbung ausmachten.

Python (Version 3.822) und das Visiopharm software Package (Hoershom, Dänemark) wurden zum Training und zur Auswertung der KI-Systeme verwendet (Tippmann, 2015).

Statistische Berechnungen wurden mittels R (Version 3.6.1. (The R foundation) und JMP Pro 15 software package (SAS Institute Inc., NC, USA) durchgeführt. Es wurden Kontingenztafeln und der Chi-Quadrat-Test zur Analyse von Auffälligkeiten zwischen CTLA-4-Dichte und Tumor-Phänotyp durchgeführt.

2.3. Ergebnisse

Die Ergebnisse sind detailliert in der beiliegenden Originalpublikation „Semi-automated validation and quantification of CTLA-4 in 90 different Tumor entities using multiple

antibodies and artificial intelligence.“ beschrieben. Die wichtigsten Befunde der Untersuchung waren:

CTLA-4-positive Zellen im Normalgewebe

Größtenteils zeigten die beiden verwendeten Antikörper eine zu erwartende starke Anfärbung der Zellmembranen von zahlreichen T-Lymphozyten.

Beide Antikörper färbten außerdem übereinstimmend Schilddrüsengewebe an.

Unterschiede im Normalgewebe zeigten sich bei mehreren Gewebetypen: So färbte MSVA-152R stark das Cytoplasma von Nebennierenkortikalis- und Deziduazellen des Endometriums an. Außerdem wurden die Gewebe vom Zylinderepithel des Nebenhodens, die exokrinen azinösen Zellen des Pankreas, Hepatozyten und Oberflächenepithel des Gastrointestinaltraktes schwach angefärbt.

CAL-49 färbte stark das Zytoplasma von oberflächlichen Epithelzellen des Magens und Zellen der Talgdrüsen der Haut an. Mittelstark bis schwach angefärbt wurden Medullazellen der Schilddrüse und epitheliale Zellen der Nierentubuli.

Alle diese Anfärbungen bestanden bei jedem der Antikörper isoliert, sodass diese als Kreuzreaktion gewertet wurden. Obwohl das Schilddrüsengewebe von beiden Antikörpern stark angefärbt worden war, wurde dies ebenfalls als Kreuzreaktion gewertet, da CTLA-4 nach aktuellem Kenntnisstand keine zu erwartende biologische Funktion im Schilddrüsengewebe hat.

CTLA-4 Validierung im Tumorgewebe

Insgesamt wurden zum Training und zur Validierung des deep-learning Algorithmus über 9400 Bilder von 90 verschiedenen Tumorentitäten verwendet, um eine automatisierte Erkennung von nicht-spezifischer Anfärbung der Antikörper zu ermöglichen.

Ein hoher Anteil von nicht-spezifischer Anfärbung zeigte sich für MSVA-152R in Adenomen der Nebennierenkortikalis (58%) und für CAL49 in Phäochromozytomen (66%) und Hepatozellulären Karzinomen (35%). Bei malignen Melanomen, Nebennierenrindenzarzinomen, Nieren- und Schilddrüsentumoren wurde bei 1% bis 8% der Zellen eine unspezifische Färbung für beide Antikörper festgestellt. Nach automatisiertem Ausschluss unspezifischer Färbereaktionen wurde in 126 Fällen (2,7 %) der 4723 mit MSVA-152R gefärbten Fälle und in 213 (4,5 %) der 4682 mit CAL49 gefärbten Fälle eine starke Korrelation zwischen den mit beiden Antikörpern ermittelten Dichten an CTLA-4+-Zellen festgestellt ($r = 0,93$; $p < 0,0001$). Für alle weiteren Analysen wurden die mit beiden Antikörpern ermittelten durchschnittlichen Dichten von CTLA-4+-Zellen für jeden Patienten

verwendet, außer bei Tumorproben mit >5 % unspezifischer Färbung. In diesen Fällen wurden nur die Daten des Antikörpers mit spezifischer Färbung verwendet.

CTLA-4 im Tumorgewebe

Die Dichte von CTLA-4-positiven Zellen variierte über die 90 untersuchten Tumorentitäten sehr stark: Die höchste Dichte von CTLA-4+ Zellen zeigte sich erwartungsgemäß in Lymphomen. Über die Karzinome zeigte sich ebenfalls eine hohe Varianz der CTLA-4-Dichte, jedoch auch innerhalb der Tumorentitäten gab es starke Schwankungen.

Nach Einbeziehung von histopathologischen Parametern zeigte sich über alle epithelialen Neoplasien hinweg, dass eine hohe Dichte von CTLA-4+ Zellen mit einem günstigen pT Status ($p < 0,0001$), einem pN0 Stadium ($p = 0,0031$) und PD-L1-Positivität in Tumor- und Entzündungszellen (jew. $p < 0,0001$) vergesellschaftet war.

2.4 Diskussion

Die Daten dieser Studie zeigen die Machbarkeit einer zuverlässigen und präzisen Hochdurchsatz-Quantifizierung von Lymphozyten-Unterpopulationen unter Verwendung eines KI-gestützten Mehrfachantikörper-Ansatzes.

Für diese Studie wurden zwei verschiedene CTLA-4-Antikörper verwendet, da die Verwendung mehrerer unabhängiger Antikörper der einzig praktikable Ansatz zur Validierung von Lymphozytenmarker-Antikörpern für die Immunhistochemie an formalinfixiertem Gewebe ist.

Obwohl die Internationale Arbeitsgruppe für Antikörpervalidierung (International Working Group for Antibody Validation, IWGAV) vorgeschlagen hat, dass die Antikörpervalidierung für die Immunhistochemie alternativ einen Vergleich der IHC-Befunde mit Expressionsdaten umfassen könnte, die mit einer anderen unabhängigen Methode gewonnen wurden (Uhlen et al., 2016), ist dieser Ansatz für Immunzellmarker aufgrund der weiten Verbreitung von Immunzellen in praktisch allen Geweben nicht praktikabel.

Die Tatsache, dass beide verwendeten Antikörper in Multicolor-Analysen nahezu identische Untergruppen von Lymphozyten identifizierten, ist ein starker Hinweis dafür, dass beide Antikörper CTLA-4 in formalinfixiertem Gewebe erkennen. Bei dem umfassenden Screening von 76 verschiedenen normalen Gewebekategorien wurden auch mehrere Gewebestrukturen identifiziert, die von einem Antikörper eindeutig angefärbt wurden, von dem anderen jedoch nicht. Während bei jedem funktionierenden Antikörper eine Anfärbung des Zielproteins zu erwarten ist, ist es wahrscheinlich, dass Kreuzreaktivitäten eher antikörperspezifisch sind und daher nicht überlappende Gewebe und Zelltypen betreffen.

Die CAL49-Anfärbung von Magen- und Nierenepithel sowie die MSVA-152R-Färbung in Nebennieren-, Deziduazellen und anderen Epithelialen Zellen werden daher als Antikörper-Kreuzreaktivitäten gewertet. Kreuzreaktivitäten von diagnostisch verwendeten Antikörpern sind keine Seltenheit, wenn ein umfangreiches Screening von Normalgewebe durchgeführt wird (Fritschy et al., 2008). So haben wir bereits unspezifische Färbungen von glattem Muskelgewebe für den PLAP-Antikörperklon 8A9 (Reiswich et al., 2021), von Spermatozyten des Hodens für den DOG1-Klon SP31 (Jansen et al., 2021) und von Gelbkörperzellen des Eierstocks, Nebennierenrindenzellen und Deziduazellen für den SATB2-Klon 384R-18 (Dum et al., 2022) beobachtet. Die Kreuzreaktivität von Antikörpern stellt nicht unbedingt eine Einschränkung des Nutzens eines Antikörpers dar und kann sogar vorteilhaft eingesetzt werden: Die kreuzreaktive Bindung des Melan-A-Klons A103 an Nebennierenrindenzellen wird zum Beispiel in der Diagnostik zur Unterscheidung zwischen Nebennierenrindengewebe und klarzelligem Nierenzellkarzinom verwendet (Ghorab et al., 2003).

Die gründliche Analyse von >4582 Tumoren aus 90 verschiedenen Tumorarten zeigte in dieser Studie, dass die für unsere beiden CTLA-4-Antikörper festgestellten Kreuzreaktivitäten die Quantifizierung von CTLA-4-+-Lymphozyten nur in wenigen Tumorentitäten behinderten. Da die artefaktanfälligen Tumorentitäten antikörperspezifisch waren und sich für unsere Antikörper diesbezüglich nicht überschneiden, ermöglichte die Verwendung von nur zwei Antikörpern eine erfolgreiche Analyse des gesamten Tumorsets, obwohl einige einzelne Tumoren, wie z. B. stark pigmentierte Melanome, für keinen der beiden Antikörper ein aussagekräftiges Ergebnis erbrachten. Weiterhin fiel auf, dass sich in keinem der 4582 angefärbten Tumoren ein bestätigter Nachweis von CTLA-4-angefärbten Tumorzellen erbringen ließ, obwohl in mehreren früheren IHC-Studien das Vorkommen von CTLA-4 in Tumorzellen von malignen Melanomen (Laurent et al., 2013), Brustkrebs (Yu et al., 2015) und Speiseröhrenkarzinomen (Zhang et al., 2016) beschrieben wurde. Es erscheint möglich, dass diese früheren Berichte auf einer unspezifischen Antikörperbindung an Tumorzellen beruhten.

Die Tatsache, dass die Analyse von mehr als 4000 Tumorproben aus 90 verschiedenen Tumorentitäten mit demselben Deep-Learning-Algorithmus für beide Antikörper durchgeführt werden konnte, war eine Stärke dieser Studie und ermöglichte eine vollständig reproduzierbare Analyse der unspezifischen Färbung für mehrere Antikörper. Daher wurde die künstliche Intelligenz (KI) für die Erkennung unspezifischer Färbereaktionen auf Immunfärbungen beider Antikörper trainiert, und zwar zu gleichen Teilen, um eine gute Leistung für beide Antikörperklone zu gewährleisten. Um ein so breites Spektrum unterschiedlicher Färbemuster mehrerer Antikörper in verschiedenen Tumorentitäten

abzudecken, basierte das KI-Framework auf einer KI zur Zellsegmentierung sowie auf der zentralen KI zur Erkennung von unspezifischer Antikörper-Anfärbung.

Eine große Hürde bei der Entwicklung einer KI zur Erkennung unspezifischer Färbungen war es, eine große Vielfalt an unspezifischen Färbemustern sowie von spezifischem lymphozytären Färbemustern in der Trainingsmenge zu erreichen. Hierfür war die Tatsache von Nutzen, dass bei den meisten Tumorentitäten die Färbequalität der beiden Antikörper komplementär zueinander war (d. h. mindestens einer der der Antikörperklone eine spezifische Immunfärbung zeigte), was die Genauigkeit unserer KI deutlich erhöhte. Ein weiterer Vorteil waren die grundlegenden Unterschiede in der Form der CTLA-4+-Lymphozyten und der unspezifischen Färbung. Daher kann der in dieser Studie beschriebene AI-Ansatz besonders bei Lymphozytenmarkern besonders effektiv sein. In Zukunft kann dieser KI-Ansatz - ähnlich wie andere KI-basierte Entscheidungsunterstützungssysteme in der Pathologie (Campanella et al., 2019) - den Pathologen unterstützen, indem er >90 % der unwichtigen Tumorproben ausschließen und auf die TMA-Kerne von Interesse (d. h. mit potenziell unspezifischer Färbung) hinweisen kann. Zusammengenommen könnte die Integration von standardisierten KI-Arbeitsschritten in den Prozess der Antikörper-Validierung zu einem effizienten halbautomatischen Prozess für die Qualitätsbewertung neuer Antikörperklone führen.

Mehrere Daten aus unserer Tumorkohorte deuten auf eine mögliche biologische Relevanz von CTLA-4+-Lymphozyten hin. Obwohl es widersprüchliche Aussagen über die prognostische Rolle von CTLA-4 gibt, war die Tatsache, dass die Dichte der CTLA-4+-Lymphozyten zwischen den Tumorentitäten sowie zwischen einzelnen Tumoren variierte und dass die CTLA-4-Dichte bei Tumoren mit fortgeschrittenen klinisch-pathologischen Parametern geringer war, zu erwarten, da ähnliche Befunde für einen entzündeten Immunphänotyp (Blessin et al., 2021, Burandt et al., 2022, Ye, 2017), CD3+- (Galon et al., 2006), CD8+- (Blessin et al., 2021)- und CD4+- (Matsumoto et al., 2016) Lymphozyten sowie für PD-L1+-Immunzellen (Huang et al., 2019) beobachtet wurden. Aus demselben Grund stimmt auch der signifikante Zusammenhang zwischen einer hohen Anzahl an CTLA-4+-Zellen und der PD-L1-Expression in Tumor- oder tumorassoziierten Entzündungszellen mit der Literatur überein (Jiang et al., 2019). Trotz des erwarteten allgemeinen Zusammenhangs zwischen hohen absoluten Zahlen von CTLA-4+-Zellen und günstigen Tumormerkmalen gab es auch einige Assoziationen zwischen einem hohen CTLA-4/CD3-Verhältnis und günstigen Tumormerkmalen. Letzteres würde eindeutig zu dem Konzept passen, dass Immun-Checkpoint-Rezeptoren - wie CTLA-4 - in T-Zell-Akkumulationen in der Tumormikroumgebung hochreguliert sind, so dass eine hohe Expression von Immun-Checkpoints als Hinweis für eine hohe Anzahl von T-Zell-

Akkumulationen (d. h. eine hohe T-Zell-Dichte, ein entzündeter Immunphänotyp) fungiert (Yang, 2023, Zenke et al., 2020, Liu, 2020). Da die CD3-Dichte in einer früheren Studie an nicht konsekutiven Objektträgern quantifiziert wurde, ist es möglich, dass einige Zusammenhänge mit klinisch-pathologischen Parametern in dieser Studie unterbewertet wurden. Mehrere andere Studien haben ebenfalls gezeigt, dass eine hohe Expression von CTLA-4+ auf T-Zellen mit einem günstigen Krankheitsverlauf oder Tumormerkmalen bei 289 Plattenepithelkarzinomen der Lunge (Paulsen et al., 2017), 162 Keimzelltumoren des Hodens (Lobo et al., 2019), 130 Mammakarzinomen (Yu et al., 2015), 45 Mesotheliomen (Roncella et al., 2016) und 39 chronisch lymphatischen Leukämien (Joshi et al., 2007) assoziiert war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CTLA-4+ Lymphozyten in dieser Studie schnell und präzise quantifiziert werden konnten, obwohl beide verfügbaren CTLA-4-Antikörper Limitationen aufweisen. Die Verwendung von zwei unabhängigen Antikörpern ermöglichte unserer KI die automatische Unterscheidung von "echtem" und "falschem" Immunostaining und die Identifizierung potenziell relevanter biologischer Daten wie z. B. eines Zusammenhangs zwischen einem niedrigen Verhältnis von CTLA-4/CD3 und des pN-Status sowie von PD-L1-positiven Immunzellen. Weitere Untersuchungen zur Rolle von CTLA-4+-Lymphozyten-Untergruppen mittels Multiplex-Fluoreszenz-IHC werden höchstwahrscheinlich von der Verwendung von ähnlichen Ansätzen, wie den hier Beschriebenen, profitieren

3. Zusammenfassung

CTLA-4 ist ein inhibitorischer Immun-Checkpoint-Rezeptor und ein negativer Regulator der Anti-Tumor-Wirkung von T-Zellen. Ziel dieser Studie war eine vergleichende Analyse der CTLA-4+-Zellen zwischen verschiedenen Tumorentitäten.

Zur Quantifizierung der CTLA-4+-Zellen wurden 4582 Tumorproben von 90 verschiedenen Tumorentitäten sowie 608 Proben von 76 verschiedenen Normalgewebetypen mittels Immunhistochemie in einem Gewebe-Mikroarray-Format analysiert.

Zwei verschiedene Antikörperklone (MSVA-152R und CAL49) wurden mit Hilfe eines Deep-Learning-Systems zum automatischen Ausschluss unspezifischer Immunfärbung validiert und quantifiziert. Der Vergleich der beiden CTLA-4-Antikörper ergab ein klonabhängiges unspezifisches Färbemuster in Nebennierenrindenadenomen (63 %) für MSVA-152R und in Phäochromozytomen (67 %) sowie hepatozellulären Karzinomen (36 %) für CAL49.

Nach dem automatischen Ausschluss unspezifischer Färbereaktionen (3,6 %) wurde eine starke Korrelation zwischen den mit beiden Antikörpern ermittelten Dichten von CTLA-4+-Lymphozyten festgestellt ($r = 0,87$; $p < 0,0001$).

Eine hohe CTLA4+-Zelldichte war verbunden mit einer niedrigen pT-Kategorie ($p < 0,0001$), pN0 Stadium ($p = 0,0354$) und PD-L1-Positivität in Tumorzellen oder Entzündungszellen (jeweils $p < 0,0001$). Ein hohes CTLA-4/CD3-Verhältnis stand im Zusammenhang mit fehlenden Lymphknotenmetastasen ($p = 0,0295$) und mit PD-L1-Positivität auf Immunzellen ($p = 0,0026$). Es bestehen deutliche Unterschiede in der Anzahl der CTLA-4+-Lymphozyten zwischen den Tumoren.

Die Analyse von zwei unabhängigen Antikörpern durch ein Deep-Learning-Framework kann die automatisierte Quantifizierung von immunhistochemisch analysierten Zielproteinen wie CTLA-4 erleichtern.

4. Abstract

CTLA-4 is an inhibitory immune checkpoint receptor and a negative regulator of anti-tumor T-cell function. This study is aimed for a comparative analysis of CTLA-4+ cells between different tumor entities.

To quantify CTLA-4+ cells, 4582 tumor samples from 90 different tumor entities as well as 608 samples of 76 different normal tissue types were analyzed by immunohistochemistry in a tissue microarray format.

Two different antibody clones (MSVA-152R and CAL49) were validated and quantified using a deep learning framework for automated exclusion of unspecific immunostaining. Comparing both CTLA-4 antibodies revealed a clone dependent unspecific staining pattern in adrenal cortical adenoma (63%) for MSVA-152R and in pheochromocytoma (67%) as well as hepatocellular carcinoma (36%) for CAL49.

After automated exclusion of non-specific staining reaction (3.6%), a strong correlation was observed for the densities of CTLA-4+ lymphocytes obtained by both antibodies ($r = 0.87$; $p < 0.0001$).

A high CTLA-4+ cell density was linked to low pT category ($p < 0.0001$), absent lymph node metastases ($p = 0.0354$), and PD-L1 expression in tumor cells or inflammatory cells ($p < 0.0001$ each). A high CTLA-4/CD3-ratio was linked to absent lymph node metastases ($p = 0.0295$) and to PD-L1 positivity on immune cells ($p = 0.0026$). Marked differences exist in the number of CTLA-4+ lymphocytes between tumors.

Analyzing two independent antibodies by a deep learning framework can facilitate automated quantification of immunohistochemically analyzed target proteins such as CTLA-4.

5. Erklärung des Eigenanteils

Ich habe die Datenerhebung durch die Zusammenstellung des Multi-Tumor Arrays und die Akquise der Normalgewebearrays unterstützt.

Ich habe mit der Arbeitsgruppe die Analysealgorithmen, die Konzeptualisierung der Studie und somit die KI-gestützte Antikörpervalidierung etabliert.

Einen Anteil der mfl-IHC-Messungen habe ich assistierend durchgeführt.

An der statistischen Analyse der erhobenen- und Vergleichsdaten war ich beteiligt, außerdem habe ich Literaturrecherche für die Publikation betrieben, die Abbildungen und Tabellen bearbeitet und habe in Zusammenarbeit relevante Anteile der Publikation geschrieben. Des Weiteren war ich an der Fertigstellung und den Revisionen der finalen Version des Papers bis hin zur fertigen Publikation beteiligt.

Anteil der Ko-Autoren der Studie:

- Konzept und Design der Studie: David Dum, Tjark Henke, Ronald Simon, Guido Sauter, Niclas C. Blessin
- Entwicklung der Methode: David Dum, Tjark Henke, Ronald Simon, Guido Sauter, Niclas C. Blessin
- Erhebung der Daten: David Dum, Tjark Henke, Tim Mandelkow, Cheng Yang, Elena Bady, Jonas B. Raedler
- Analyse und Interpretation der Daten: Tjark Henke, David Dum, Tim Mandelkow, Cheng Yang, Elena Bady, Jonas B. Raedler, Ronald Simon, Guido Sauter, Niclas C. Blessin,
- Schreiben, Bearbeiten und Überprüfung der Forschungsarbeit David Dum, Tjark Henke, Ronald Simon, Guido Sauter, Niclas C. Blessin,
- Administrative, technische oder materielle Unterstützung: David Dum, Tjark Henke, Tim Mandelkow, Cheng Yang, Elena Bady, Jonas B. Raedler, Maximilian Lennartz, Franziska Büscheck, Andreas M. Luebke, Anne Menz, Andrea Hinsch, Doris Höflmayer, Sören Weidemann, Christoph Fraune, Katharina Möller, Patrick Lebok, Ria Uhlig, Christian Bernreuther, Frank Jacobsen, Till S. Clauditz, Waldemar Wilczak, Sarah Minner, Eike-Christian Burandt, Stefan Steurer, Niclas C. Blessin
- Studienaufsicht: Guido Sauter, Ronald Simon, Niclas C. Blessin

6. Abkürzungsverzeichnis

APC: Antigenpräsentierende Zelle

CD: „cluster of differentiation“

CTLA-4: „cytotoxic t-lymphocyte antigen 4“, CD-152

CTLA-4-+-Zellen: CTLA-4-positive Zellen

FDA: Federal Drug Administration, USA

HCC: Hepatozelluläres Karzinom

HE: Hämatoxylin-Eosin

HZL: Haarzell-Leukämie

IFN- α 2: „Interferon-alpha 2“

IHC: Immunhistochemie

KI: Künstliche Intelligenz

mfl-IHC: Multiplex-fluoreszenz-Immunhistochemie

MTA: „Multi-Tumor-Array“

PD: „Programmed Cell death protein“

PD-L1: „Programmed Cell death protein ligand 1“

pN: Pathologischer Nodal-/Lymphknotenstatus

pT: pathologischer T-Status

RNA: Ribonuclein-Acid

TMA: „Tissue micro Array“

Treg: T-regulatorische Zelle

U-net: „convolutional neural network“

7. Literaturverzeichnis

- AHMAD, Z., RAHIM, S., ZUBAIR, M. & ABDUL-GHAFAR, J. 2021. Artificial intelligence (AI) in medicine, current applications and future role with special emphasis on its potential and promise in pathology: present and future impact, obstacles including costs and acceptance among pathologists, practical and philosophical considerations. A comprehensive review. *Diagn Pathol*, 16, 24.
- BEER, T. M., KWON, E. D., DRAKE, C. G., FIZAZI, K., LOGOTHETIS, C., GRAVIS, G., GANJU, V., POLIKOFF, J., SAAD, F., HUMANSKI, P., PIULATS, J. M., GONZALEZ MELLA, P., NG, S. S., JAEGER, D., PARNIS, F. X., FRANKE, F. A., PUENTE, J., CARVAJAL, R., SENGELOV, L., MCHENRY, M. B., VARMA, A., VAN DEN EERTWEGH, A. J. & GERRITSEN, W. 2017. Randomized, Double-Blind, Phase III Trial of Ipilimumab Versus Placebo in Asymptomatic or Minimally Symptomatic Patients With Metastatic Chemotherapy-Naive Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Clin Oncol*, 35, 40-47.
- BERTRAND, A., KOSTINE, M., BARNETCHE, T., TRUCHETET, M. E. & SCHAEVERBEKE, T. 2015. Immune related adverse events associated with anti-CTLA-4 antibodies: systematic review and meta-analysis. *BMC Med*, 13, 211.
- BLESSIN, N. C., LI, W., MANDELKOW, T., JANSEN, H. L., YANG, C., RAEDLER, J. B., SIMON, R., BUSCHECK, F., DUM, D., LUEBKE, A. M., HINSCH, A., MOLLER, K., MENZ, A., BERNREUTHER, C., LEBOK, P., CLAUDITZ, T., SAUTER, G., MARX, A., UHLIG, R., WILCZAK, W., MINNER, S., KRECH, T., FRAUNE, C., HOFLMAYER, D., BURANDT, E. & STEURER, S. 2021a. Prognostic role of proliferating CD8(+) cytotoxic Tcells in human cancers. *Cell Oncol (Dordr)*, 44, 793-803.
- BLESSIN, N. C., YANG, C., MANDELKOW, T., RAEDLER, J. B., LI, W., BADI, E., VETTORAZZI, R., LENNARTZ, M., BERNREUTHER, C., FRAUNE, C., JACOBSEN, F., KRECH, T., MARX, A., LEBOK, P., MINNER, S., BURANDT, E., CLAUDITZ, T. S., WILCZAK, W., SAUTER, G., HEINZER, H., HAESE, A., SCHLOMM, T., GRAEFEN, M. & STEURER, S. 2021b. Automated Ki67-L-assessment in prostate cancer using artificial intelligence in multiplex fluorescence immunohistochemistry (https://mega.nz/folder/y4YwRD7J#2V97_7wmC5JJjigBodYQUA), eingereicht.
- BORGHAEI, H., PAZ-ARES, L., HORN, L., SPIGEL, D. R., STEINS, M., READY, N. E., CHOW, L. Q., VOKES, E. E., FELIP, E., HOLGADO, E., BARLESI, F., KOHLHAUFL, M., ARRIETA, O., BURGIO, M. A., FAYETTE, J., LENA, H., PODDUBSKAYA, E., GERBER, D. E., GETTINGER, S. N., RUDIN, C. M., RIZVI, N., CRINO, L., BLUMENSCHNEIN, G. R., JR., ANTONIA, S. J., DORANGE, C., HARBISON, C. T., GRAF FINCKENSTEIN, F. & BRAHMER, J. R. 2015. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 373, 1627-39.
- BRAHMER, J., RECKAMP, K. L., BAAS, P., CRINO, L., EBERHARDT, W. E., PODDUBSKAYA, E., ANTONIA, S., PLUZANSKI, A., VOKES, E. E., HOLGADO, E., WATERHOUSE, D., READY, N., GAINOR, J., AREN FRONTERA, O., HAVEL, L., STEINS, M., GARASSINO, M. C., AERTS, J. G., DOMINE, M., PAZ-ARES, L., RECK, M., BAUDELET, C., HARBISON, C. T., LESTINI, B. & SPIGEL, D. R. 2015. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 373, 123-35.
- BRASSARD, D. L., GRACE, M. J. & BORDENS, R. W. 2002. Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein. *J Leukoc Biol*, 71, 565-81.
- BROWN, C., SEKHAVATI, F., CARDENES, R., WINDMUELLER, C., DACOSTA, K., RODRIGUEZ-CANALES, J. & STEELE, K. E. 2019. CTLA-4 Immunohistochemistry and Quantitative Image Analysis for Profiling of Human Cancers. *J Histochem Cytochem*, 67, 901-918.
- BUCHWALOW, I., SAMOILOVA, V., BOECKER, W. & TIEMANN, M. 2011. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Sci Rep*, 1, 28.
- CAMPANELLA, G., HANNA, M. G., GENESLAW, L., MIRAFLOR, A., WERNECK KRAUSS SILVA, V., BUSAM, K. J., BROGI, E., REUTER, V. E., KLIMSTRA, D. S. & FUCHS, T. J. 2019. Clinical-grade

- computational pathology using weakly supervised deep learning on whole slide images. *Nat Med*, 25, 1301-1309.
- CHAN, D. V., GIBSON, H. M., AUFIERO, B. M., WILSON, A. J., HAFNER, M. S., MI, Q. S. & WONG, H. K. 2014. Differential CTLA-4 expression in human CD4+ versus CD8+ T cells is associated with increased NFAT1 and inhibition of CD4+ proliferation. *Genes Immun*, 15, 25-32.
- COLEY, W. B. 1893. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res*, 3-11.
- CUI, M. & ZHANG, D. Y. 2021. Artificial intelligence and computational pathology. *Lab Invest*, 101, 412-422.
- DUM, D., KROMM, D., LENNARTZ, M., DE WISPELAERE, N., BUSCHECK, F., LUEBKE, A. M., BURANDT, E., MENZ, A., KLUTH, M., HUBE-MAGG, C., HINSCH, A., HOFLMAYER, D., WEIDEMANN, S., FRAUNE, C., MOLLER, K., LEBOK, P., SAUTER, G., SIMON, R., UHLIG, R., WILCZAK, W., MINNER, S., KRECH, R., BERNREUTHER, C., MARX, A., STEURER, S., JACOBSEN, F., CLAUDITZ, T. & KRECH, T. 2022. SATB2 Expression in Human Tumors. *Arch Pathol Lab Med*.
- EHTESHAMI BEJNORDI, B., VETA, M., JOHANNES VAN DIEST, P., VAN GINNEKEN, B., KARSSEMEIJER, N., LITJENS, G., VAN DER LAAK, J., THE, C. C., HERMSEN, M., MANSON, Q. F., BALKENHOL, M., GEESSINK, O., STATHONIKOS, N., VAN DIJK, M. C., BULT, P., BECA, F., BECK, A. H., WANG, D., KHOSLA, A., GARGEYA, R., IRSHAD, H., ZHONG, A., DOU, Q., LI, Q., CHEN, H., LIN, H. J., HENG, P. A., HASS, C., BRUNI, E., WONG, Q., HALICI, U., ONER, M. U., CETIN-ATALAY, R., BERSETH, M., KHVATKOV, V., VYLEGZHANIN, A., KRAUS, O., SHABAN, M., RAJPOOT, N., AWAN, R., SIRINUKUNWATTANA, K., QAISER, T., TSANG, Y. W., TELLEZ, D., ANNUSCHEIT, J., HUFNAGL, P., VALKONEN, M., KARTASALO, K., LATONEN, L., RUUSUVUORI, P., LIIMATAINEN, K., ALBARQOUNI, S., MUNGAL, B., GEORGE, A., DEMIRCI, S., NAVAB, N., WATANABE, S., SENO, S., TAKENAKA, Y., MATSUDA, H., AHMADY PHOULADY, H., KOVALEV, V., KALINOVSKY, A., LIAUCHUK, V., BUENO, G., FERNANDEZ-CARROBLES, M. M., SERRANO, I., DENIZ, O., RACOCEANU, D. & VENANCIO, R. 2017. Diagnostic Assessment of Deep Learning Algorithms for Detection of Lymph Node Metastases in Women With Breast Cancer. *JAMA*, 318, 2199-2210.
- ENO, J. 2017. Immunotherapy Through the Years. *J Adv Pract Oncol*, 8, 747-753.
- FORSCH, S., KLAUSCHEN, F., HUFNAGL, P. & ROTH, W. 2021. Artificial Intelligence in Pathology. *Dtsch Arztebl Int*, 118, 194-204.
- FRITSCHY, J. M. 2008. Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. *Eur J Neurosci*, 28, 2365-70.
- GALON, J., COSTES, A., SANCHEZ-CABO, F., KIRILOVSKY, A., MLECNIK, B., LAGORCE-PAGES, C., TOSOLINI, M., CAMUS, M., BERGER, A., WIND, P., ZINZINDOHOUE, F., BRUNEVAL, P., CUGNENC, P. H., TRAJANOSKI, Z., FRIDMAN, W. H. & PAGES, F. 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, 313, 1960-4.
- GHORAB, Z., JORDA, M., GANJEI, P. & NADJI, M. 2003. Melan A (A103) is expressed in adrenocortical neoplasms but not in renal cell and hepatocellular carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 11, 330-3.
- GOVINDAN, R., SZCZESNA, A., AHN, M. J., SCHNEIDER, C. P., MELLA, P. F. G., BARLESI, F., HAN, B. H., GANEA, D. E., VON PAWEL, J., VLADIMIROV, V., FADEEVA, N., LEE, K. H., KURATA, T., ZHANG, L., TAMURA, T., POSTMUS, P. E., JASSEM, J., O'BYRNE, K., KOPIT, J., LI, M. S., TSCHAIKA, M. & RECK, M. 2017. Phase III Trial of Ipilimumab Combined With Paclitaxel and Carboplatin in Advanced Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 35, 3449-+.
- HARGADON, K. M., JOHNSON, C. E. & WILLIAMS, C. J. 2018. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *International Immunopharmacology*, 62, 29-39.
- HEWITT, S. M., BASKIN, D. G., FREVERT, C. W., STAHL, W. L. & ROSA-MOLINAR, E. 2014. Controls for immunohistochemistry: the Histochemical Society's standards of practice for validation of immunohistochemical assays. *J Histochem Cytochem*, 62, 693-7.

- HODI, F. S., O'DAY, S. J., MCDERMOTT, D. F., WEBER, R. W., SOSMAN, J. A., HAANEN, J. B., GONZALEZ, R., ROBERT, C., SCHADENDORF, D., HASSEL, J. C., AKERLEY, W., VAN DEN EERTWEGH, A. J., LUTZKY, J., LORIGAN, P., VAUBEL, J. M., LINETTE, G. P., HOGG, D., OTTENSMEIER, C. H., LEBBE, C., PESCHEL, C., QUIRT, I., CLARK, J. I., WOLCHOK, J. D., WEBER, J. S., TIAN, J., YELLIN, M. J., NICHOL, G. M., HOOS, A. & URBA, W. J. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363, 711-23.
- HU, P., LIU, Q., DENG, G., ZHANG, J., LIANG, N., XIE, J. & ZHANG, J. 2017. The prognostic value of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, 7, 42913.
- HUANG, W., RAN, R., SHAO, B. & LI, H. 2019. Prognostic and clinicopathological value of PD-L1 expression in primary breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*, 178, 17-33.
- JANSEN, K., FARAHI, N., BUSCHECK, F., LENNARTZ, M., LUEBKE, A. M., BURANDT, E., MENZ, A., KLUTH, M., HUBE-MAGG, C., HINSCH, A., HOFLMAYER, D., WEIDEMANN, S., FRAUNE, C., MOLLER, K., LEBOK, P., SAUTER, G., SIMON, R., UHLIG, R., WILCZAK, W., JACOBSEN, F., MINNER, S., KRECH, R., CLAUDITZ, T., BERNREUTHER, C., DUM, D., KRECH, T., MARX, A. & STEURER, S. 2021. DOG1 expression is common in human tumors: A tissue microarray study on more than 15,000 tissue samples. *Pathol Res Pract*, 228, 153663.
- JIANG, C., CAO, S., LI, N., JIANG, L. & SUN, T. 2019. PD-1 and PD-L1 correlated gene expression profiles and their association with clinical outcomes of breast cancer. *Cancer Cell Int*, 19, 233.
- JOSHI, A. D., HEGDE, G. V., DICKINSON, J. D., MITTAL, A. K., LYNCH, J. C., EUDY, J. D., ARMITAGE, J. O., BIERMAN, P. J., BOCIEK, R. G., DEVETTEN, M. P., VOSE, J. M. & JOSHI, S. S. 2007. ATM, CTLA4, MND4, and HEM1 in high versus low CD38 expressing B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*, 13, 5295-304.
- KONONEN, J., BUBENDORF, L., KALLIONIEMI, A., BARLUND, M., SCHRAML, P., LEIGHTON, S., TORHORST, J., MIHATSCH, M. J., SAUTER, G. & KALLIONIEMI, O. P. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4, 844-7.
- KWON, E. D., DRAKE, C. G., SCHER, H. I., FIZAZI, K., BOSSI, A., VAN DEN EERTWEGH, A. J., KRAINER, M., HOUEDE, N., SANTOS, R., MAHAMMEDI, H., NG, S., MAIO, M., FRANKE, F. A., SUNDAR, S., AGARWAL, N., BERGMAN, A. M., CIULEANU, T. E., KORBENFELD, E., SENGELOV, L., HANSEN, S., LOGOTHETIS, C., BEER, T. M., MCHENRY, M. B., GAGNIER, P., LIU, D., GERRITSEN, W. R. & INVESTIGATORS, C. A. 2014. Ipilimumab versus placebo after radiotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer that had progressed after docetaxel chemotherapy (CA184-043): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 15, 700-12.
- LAURENT, S., QUEIROLO, P., BOERO, S., SALVI, S., PICCIOLI, P., BOCCARDO, S., MINGHELLI, S., MORABITO, A., FONTANA, V., PIETRA, G., CARREGA, P., FERRARI, N., TOSETTI, F., CHANG, L. J., MINGARI, M. C., FERLAZZO, G., POGGI, A. & PISTILLO, M. P. 2013. The engagement of CTLA-4 on primary melanoma cell lines induces antibody-dependent cellular cytotoxicity and TNF-alpha production. *J Transl Med*, 11, 108.
- LITJENS, G., BANDI, P., EHTESHAMI BEJNORDI, B., GEESINK, O., BALKENHOL, M., BULT, P., HALILOVIC, A., HERMSEN, M., VAN DE LOO, R., VOGELS, R., MANSON, Q. F., STATHONIKOS, N., BAIDOSHVILI, A., VAN DIEST, P., WAUTERS, C., VAN DIJK, M. & VAN DER LAAK, J. 2018. 1399 H&E-stained sentinel lymph node sections of breast cancer patients: the CAMELYON dataset. *Gigascience*, 7.
- LIU, F., HUANG, J., LIU, X., CHENG, Q., LUO, C. & LIU, Z. 2020. CTLA-4 correlates with immune and clinical characteristics of glioma. *Cancer Cell Int*, 20, 7.
- LOBO, J., RODRIGUES, A., GUIMARAES, R., CANTANTE, M., LOPES, P., MAURICIO, J., OLIVEIRA, J., JERONIMO, C. & HENRIQUE, R. 2019. Detailed Characterization of Immune Cell Infiltrate and Expression of Immune Checkpoint Molecules PD-L1/CTLA-4 and MMR Proteins in Testicular Germ Cell Tumors Disclose Novel Disease Biomarkers. *Cancers (Basel)*, 11.

- MAIO, M., SCHERPEREEL, A., CALABRO, L., AERTS, J., PEREZ, S. C., BEARZ, A., NACKAERTS, K., FENNEL, D. A., KOWALSKI, D., TSAO, A. S., TAYLOR, P., GROSSO, F., ANTONIA, S. J., NOWAK, A. K., TABOADA, M., PUGLISI, M., STOCKMAN, P. K. & KINDLER, H. L. 2017. Tremelimumab as second-line or third-line treatment in relapsed malignant mesothelioma (DETERMINE): a multicentre, international, randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet Oncol*, 18, 1261-1273.
- MATSUMOTO, H., THIKE, A. A., LI, H., YEONG, J., KOO, S. L., DENT, R. A., TAN, P. H. & IQBAL, J. 2016. Increased CD4 and CD8-positive T cell infiltrate signifies good prognosis in a subset of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 156, 237-47.
- MCCOY, K. D. & LE GROS, G. 1999. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunol Cell Biol*, 77, 1-10.
- PAULSEN, E. E., KILVAER, T. K., RAKAEE, M., RICHARDSEN, E., HALD, S. M., ANDERSEN, S., BUSUND, L. T., BREMNES, R. M. & DONNEM, T. 2017. CTLA-4 expression in the non-small cell lung cancer patient tumor microenvironment: diverging prognostic impact in primary tumors and lymph node metastases. *Cancer Immunol Immunother*, 66, 1449-1461.
- REISWICH, V., GORBOKON, N., LUEBKE, A. M., BURANDT, E., MENZ, A., KLUTH, M., HUBE-MAGG, C., WITTMER, C., WEIDEMANN, S., FRAUNE, C., MOLLER, K., LEBOK, P., SAUTER, G., SIMON, R., UHLIG, R., WILCZAK, W., JACOBSEN, F., MINNER, S., KRECH, R., BERNREUTHER, C., MARX, A., STEURER, S., CLAUDITZ, T. & KRECH, T. 2021. Pattern of placental alkaline phosphatase (PLAP) expression in human tumors: a tissue microarray study on 12,381 tumors. *J Pathol Clin Res*, 7, 577-589.
- RIBAS, A., HAMID, O., DAUD, A., HODI, F. S., WOLCHOK, J. D., KEFFORD, R., JOSHUA, A. M., PATNAIK, A., HWU, W. J., WEBER, J. S., GANGADHAR, T. C., HERSEY, P., DRONCA, R., JOSEPH, R. W., ZAROOR, H., CHMIELOWSKI, B., LAWRENCE, D. P., ALGAZI, A., RIZVI, N. A., HOFFNER, B., MATEUS, C., GERGICH, K., LINDIA, J. A., GIANNOTTI, M., LI, X. N., EBBINGHAUS, S., KANG, S. P. & ROBERT, C. 2016. Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma. *JAMA*, 315, 1600-9.
- RIBAS, A., KEFFORD, R., MARSHALL, M. A., PUNT, C. J., HAANEN, J. B., MARMOL, M., GARBE, C., GOGAS, H., SCHACHTER, J., LINETTE, G., LORIGAN, P., KENDRA, K. L., MAIO, M., TREFZER, U., SMYLLIE, M., MCARTHUR, G. A., DRENO, B., NATHAN, P. D., MACKIEWICZ, J., KIRKWOOD, J. M., GOMEZ-NAVARRO, J., HUANG, B., PAVLOV, D. & HAUSCHILD, A. 2013. Phase III randomized clinical trial comparing tremelimumab with standard-of-care chemotherapy in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol*, 31, 616-22.
- ROH, W., CHEN, P. L., REUBEN, A., SPENCER, C. N., PRIETO, P. A., MILLER, J. P., GOPALAKRISHNAN, V., WANG, F., COOPER, Z. A., REDDY, S. M., GUMBS, C., LITTLE, L., CHANG, Q., CHEN, W. S., WANI, K., DE MACEDO, M. P., CHEN, E., AUSTIN-BRENEMAN, J. L., JIANG, H., ROSZIK, J., TETZLAFF, M. T., DAVIES, M. A., GERSHENWALD, J. E., TAWBI, H., LAZAR, A. J., HWU, P., HWU, W. J., DIAB, A., GLITZA, I. C., PATEL, S. P., WOODMAN, S. E., AMARIA, R. N., PRIETO, V. G., HU, J., SHARMA, P., ALLISON, J. P., CHIN, L., ZHANG, J., WARGO, J. A. & FUTREAL, P. A. 2017. Integrated molecular analysis of tumor biopsies on sequential CTLA-4 and PD-1 blockade reveals markers of response and resistance. *Sci Transl Med*, 9.
- RONCELLA, S., LAURENT, S., FONTANA, V., FERRO, P., FRANCESCHINI, M. C., SALVI, S., VARESANO, S., BOCCARDO, S., VIGANI, A., MORABITO, A., CANESSA, P. A., GIANNONI, U., ROSENBERG, I., VALENTINO, A., FEDELI, F., MERLO, D. F., CEPPI, M., RIGGIO, S., ROMANI, M., SAVERINO, D., POGGI, A. & PISTILLO, M. P. 2016. CTLA-4 in mesothelioma patients: tissue expression, body fluid levels and possible relevance as a prognostic factor. *Cancer Immunol Immunother*, 65, 909-17.
- ROWSHANRAVAN, B., HALLIDAY, N. & SANSOM, D. M. 2018. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood*, 131, 58-67.
- SAKAGUCHI, S., YAMAGUCHI, T., NOMURA, T. & ONO, M. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133, 775-87.

- SAPER, C. B. 2009. A guide to the perplexed on the specificity of antibodies, *J Histochem Cytochem*, 57(1), 1-5
- SCHWARTZ, J. C., ZHANG, X., FEDOROV, A. A., NATHENSON, S. G. & ALMO, S. C. 2001. Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. *Nature*, 410, 604-8.
- STEINER, D. F., MACDONALD, R., LIU, Y., TRUSZKOWSKI, P., HIPPEL, J. D., GAMMAGE, C., THNG, F., PENG, L. & STUMPE, M. C. 2018. Impact of Deep Learning Assistance on the Histopathologic Review of Lymph Nodes for Metastatic Breast Cancer. *Am J Surg Pathol*, 42, 1636-1646.
- THALLINGER, C., FUREDER, T., PREUSSER, M., HELLER, G., MULLAUER, L., HOLLER, C., PROSCH, H., FRANK, N., SWIERZEWSKI, R., BERGER, W., JAGER, U. & ZIELINSKI, C. 2018. Review of cancer treatment with immune checkpoint inhibitors : Current concepts, expectations, limitations and pitfalls. *Wien Klin Wochenschr*, 130, 85-91.
- TIPPMANN, S. 2015. Programming tools: Adventures with R. *Nature*, 517, 109-10.
- UHLEN, M., BANDROWSKI, A., CARR, S., EDWARDS, A., ELLENBERG, J., LUNDBERG, E., RIMM, D. L., RODRIGUEZ, H., HILTKE, T., SNYDER, M. & YAMAMOTO, T. 2016. A proposal for validation of antibodies. *Nat Methods*, 13, 823-7.
- VADDEPALLY, R. K., KHAREL, P., PANDEY, R., GARJE, R., CHANDRA, A. B. 2020. Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. *Cancers (Basel)*, 12, 3
- VAN DER LAAK, J., LITJENS, G. & CIOMPI, F. 2021. Deep learning in histopathology: the path to the clinic. *Nat Med*, 27, 775-784.
- WING, K., ONISHI, Y., PRIETO-MARTIN, P., YAMAGUCHI, T., MIYARA, M., FEHERVARI, Z., NOMURA, T. & SAKAGUCHI, S. 2008. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*, 322, 271-5.
- YE, C., WANG, W., CHENG, L., LI, G., WEN, M., WANG, Q., ZHANG, Q., LI, D., ZHOU, P. & SU, L. 2017. Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Anti-HIV scFv Efficiently Protects CD4 T Cells from HIV-1 Infection and Deletion in hu-PBL Mice. *J Virol*, 91.
- YU, H., YANG, J., JIAO, S., LI, Y., ZHANG, W. & WANG, J. 2015. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression in human breast cancer: implications for prognosis. *Cancer Immunol Immunother*, 64, 853-60.
- ZANG, X. 2018. 2018 Nobel Prize in medicine awarded to cancer immunotherapy: Immune checkpoint blockade - A personal account. *Genes Dis*, 5, 302-303.
- ZENKE, S., PALM, M. M., BRAUN, J., GAVRILOV, A., MEISER, P., BOTTCHER, J. P., BEYERSDORF, N., EHL, S., GERARD, A., LAMMERMANN, T., SCHUMACHER, T. N., BELTMAN, J. B. & ROHR, J. C. 2020. Quorum Regulation via Nested Antagonistic Feedback Circuits Mediated by the Receptors CD28 and CTLA-4 Confers Robustness to T Cell Population Dynamics. *Immunity*, 52, 313-327 e7.
- ZHANG, P., XIONG, X., ROLFO, C., DU, X., ZHANG, Y., YANG, H., RUSSO, A., DEVENPORT, M., ZHOU, P., LIU, Y. & ZHENG, P. 2020. Mechanism- and Immune Landscape-Based Ranking of Therapeutic Responsiveness of 22 Major Human Cancers to Next Generation Anti-CTLA-4 Antibodies. *Cancers (Basel)*, 12.
- ZHANG, X. F., PAN, K., WENG, D. S., CHEN, C. L., WANG, Q. J., ZHAO, J. J., PAN, Q. Z., LIU, Q., JIANG, S. S., LI, Y. Q., ZHANG, H. X. & XIA, J. C. 2016. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 expression in esophageal carcinoma: implications for prognosis. *Oncotarget*, 7, 26670-9.

8. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Guido Sauter, welcher die Möglichkeiten für diese Promotion bereitstellte und für die Belange der Arbeitsgruppe ein stets erreichbarer zuverlässiger Ansprechpartner war. Ebenso an David Dum für die stets unkomplizierte und nette Zusammenarbeit. Auch der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich danken, insbesondere Prof. Ronald Simon und Dr. Martina Kluth für die lehrreichen Weiterbildungen und die stete Geduld. Auch danke ich dem Labor und insbesondere Jeanette Lütgens für die Zusammenarbeit und die technische Hilfe.

Auch möchte ich Jannes Lutz, Annika Jaretzke, Neele Heckmann und Carsten Marcus für die gemeinsame Zeit der Promotion und besonders der gewonnenen Freundschaft danken.

Mein besonderer Dank gilt Niclas Blessin, der als Organisator, Erklärer, Forscher und insbesondere als Freund stets ein offenes Ohr und Unterstützung parat hatte.

9. Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: