

Aus dem Institut für Pathologie
(Direktor: Prof. Dr. C. Röcken)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DIGITALISIERTE BILDANALYSEN DES TUMORMIKROMILIEUS
VON KLASISCHEN HODGKIN-LYMPHOMEN:
QUANTIFIZIERUNG DER ZELLULÄREN ZUSAMMENSETZUNG
UND ANALYSE DER KLINISCHEN RELEVANZ**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Luise Pieper
aus Geesthacht

Kiel 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfram Klapper

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Martin Neumann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 10.02.2022

gez.: Prof. Dr. Wolfram Klapper

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **IV**

Abbildungsverzeichnis **V**

Tabellenverzeichnis **VI**

1 Einleitung **1**

1.1 Thematische Einführung.....1

1.2 Fragestellungen2

1.3 Hodgkin Lymphome.....3

 1.3.1 Das klassische Hodgkin Lymphom3

1.4 Tumormikromilieu.....8

 1.4.1 Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen und das Tumormikromilieu im klassischen Hodgkin-Lymphom9

 1.4.2 Tumormakromilieu12

2 Materialien und Methoden.....14

2.1 Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und Software14

2.2 Kollektiv16

2.3 Verarbeitung der Gewebeproben19

2.4 Ethikvotum20

2.5 Digitale Bildanalyse.....20

 2.5.1 Gehalt von B- und T-Zellen.....22

2.5.2 Gehalt von Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen und Makrophagen.....	23
2.6 Messvariabilität	26
2.7 Statistische Auswertung	26
3 Ergebnisse	27
3.1 Bewertung der digitalen Bildanalyse als Methode zur Zellquantifizierung	27
3.1.1 Objektivität und Reliabilität der Methode	27
3.1.2 Genauigkeit der Erfassung von Folgeschnitten.....	29
3.2 Quantifizierung des Tumormikromilieus im klassischen Hodgkin-Lymphom.....	30
3.2.1 Beschreibung des erfassten Tumormikromilieus.....	30
3.2.2 Unterschiede des Tumormikromilieus zwischen den histologischen Subtypen des klassischen Hodgkin-Lymphoms	32
3.3 Korrelationen der verschiedenen erfassten Anteile der Zellarten	36
3.4 Die Zusammensetzung des Tumormikromilieus als klinisch prognostischer Marker.....	38
3.4.1 Validierung der CD20-Daten	41
4 Diskussion	42
4.1 Einführung	42
4.2 Digitale Bildanalyse von Ganzschnitten – eine geeignete Methode zur Zellquantifizierung an histologischen Schnitten.....	43
4.3 Umfassende Deskription des Tumormikromilieus im klassischen Hodgkin Lymphom.....	46
4.4 Lineare Korrelationen sind unzureichend für die Beschreibung des Tumormikromilieus.	48
4.5 Nutzen der Ganzschnittanalyse – B-Zellen als potentieller prognostischer Biomarker ...	48
4.6 Einordnung der Ergebnisse und Ausblick	53

5 Zusammenfassung	54
6 Literaturverzeichnis	56
7 Publikation der Ergebnisse.....	63
8 Danksagungen	64
9 Lebenslauf	65
10 Eidesstattliche Erklärung.....	66

Abkürzungsverzeichnis

CHL	Classic Hodgkin Lymphoma = klassisches Hodgkin Lymphom
KI 95%	95%-Konfidenzintervall
CR	Complete remission = komplette Remission
CTL	Cytotoxic T-lymphocytes = zytotoxische T-Zellen
EBV	Epstein-Barr-Virus
FFTF	Freedom from treatment failure = Zeit ohne Therapieversagen
GHSG	German Hodgkin Study Group
HIV	Human immunodeficiency virus
HRSC	Hodgkin-Reed-Sternberg-Cells = Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen
IHC	Immunhistochemisch
IPS	International Prognostic Score
Neg.	Negativ
NK-Zelle	Natürliche Killerzellen
NOS	No other specified = nicht anders klassifiziert
PET	Positronenemissionstomographie
PFS	Progression free survival = progressionsfreies Überleben
Pos.	Positiv
OS	Overall survival = Gesamtüberleben
ROC	Receiver operating curve
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
Th-Zelle	T-Helfer-Zellen
TME	Tumormicroenvironment = Tumormikromilieu
Treg-Zelle	Regulatorische T-Zellen

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schritt 1 der digitalen Bildanalyse. Manuelle und automatisierte Detektion der Areale (S.21)
- Abbildung 2: Schritt 2 der digitalen Bildanalyse. Vergrößerung repräsentativer Ausschnitte und Kerndetektion an einem für CD30 gefärbten Lymphomschnitt (S.22)
- Abbildung 3: Schritt 3 der digitalen Bildanalyse. Individualisierte Detektion immunhistochemisch pos. Zellen und neg. Zellen unter Anpassung verschiedener Schwellenwerte (S.23)
- Abbildung 4: Schritt 3 der digitalen Bildanalyse. Individualisierte Detektion immunhistochemisch pos. Fläche unter Anpassung verschiedener Schwellenwerte (S.24)
- Abbildung 5: Interobservervariabilität (S.27)
- Abbildung 6: Intraobservervariabilität (S.28)
- Abbildung 7: Korrelation der Gesamzellzahl bzw. Gesamtkernzahl der Folgeschnitte (S.29)
- Abbildung 8: Darstellung der erfassten prozentualen Anteile an immunhistochemisch pos. Zellen (S.31)
- Abbildung 9: Darstellung der durchschnittlichen prozentualen Verteilung der untersuchten Zellarten in einem Lymphompräparat (S.31)
- Abbildung 10: Darstellung der durchschnittlich erfassten Zusammensetzung des Tumormikromilieus in den verschiedenen Subtypen des klassischen Hodgkin Lymphom (S.35)
- Abbildung 11: Korrelation der Anteile von je zwei Zellarten in einem histologischen Schnitt (S.37)
- Abbildung 12: Progressionsfreies Überleben von Patienten/-innen mit einem CD20 pos. Zellgehalt (B-Zellen) von $>21\%$ bzw. $\leq 21\%$ (S.40)
- Abbildung 13: Darstellung des progressionsfreien Überlebens der Patienten/-innen in der Validierungskohorte mit einem CD20 pos. Zellgehalt (B-Zellen) von $>10\%$ bzw. $\leq 10\%$ (S.41)

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Stadieneinteilung des klassischen Hodgkin-Lymphoms nach Ann-Arbor mit Cotswold-Modifikationen (S.5)
- Tabelle 2: Risikoadaptierte Einteilung des klassischen Hodgkin-Lymphoms in frühes, mittleres und fortgeschrittenes Stadium und entsprechende Erst-Linien-Therapieempfehlungen (S.6)
- Tabelle 3: Darstellung der Charakteristika in den untersuchten Kollektiven und ursprünglichen German Hodgkin Study Group (GHSG) Studien (S.18)
- Tabelle 4: Informationen zur immunhistochemischen Färbung: Zielantigen, Antikörperdetails, Vorbehandlung und Verdünnung (S.20)
- Tabelle 5: Deskriptive Statistik der Zellerfassung in den verschiedenen Subtypen des klassischen Hodgkin Lymphoms (S.33)
- Tabelle 6: Testung der Signifikanz der Unterschiede zwischen dem Anteil der untersuchten Zellarten zwischen den verschiedenen Subtypen des klassischen Hodgkin Lymphoms (S.34)
- Tabelle 7: Korrelation der Anteile der verschiedenen untersuchten Zellarten nach Pearson (S.36)
- Tabelle 8: Vergleich des B-Zell-Gehalts (Anteil CD20 pos. Zellen) von Patienten/-innen mit progressionsfreiem Überleben und solchen mit Rezidiv oder Progress in den verschiedenen Subtypen des klassischen Hodgkin Lymphoms (S.38)

1 Einleitung

1.1 Thematische Einführung

Das klassische Hodgkin Lymphom (cHL) ist eine Neoplasie des lymphatischen Systems. Bei diesem malignen Lymphom sind die neoplastischen Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen (HRSC) von einem ausgeprägten reaktiven Begleitinfiltat umgeben (Swerdlow et al., 2008).

Dieses Begleitinfiltat wird als Tumormikromileu (TME) bezeichnet und enthält überwiegend immunologische Zellen, aber auch Stromazellen, Endothelzellen, Adipozyten und reichlich extrazelluläre Matrix. Im Gegensatz zu anderen Malignomen besteht das Lymphomgewebe des cHL zu weit über 90% aus eben jenem Begleitinfiltat und nur zu einem sehr geringen Anteil aus den neoplastischen Zellen (Küppers, 2009). Die Zusammensetzung des TME unterscheidet sich dabei zum einen zwischen den verschiedenen cHL Subtypen, die unter anderem durch die histologische Erscheinung des TME definiert wurden, zum anderen ist sie aber auch innerhalb eines Subtyps außerordentlich variabel und selbst intratumoral sehr heterogen (Steidl et al., 2011).

Obwohl das cHL heute in frühen Stadien eine exzellente Prognose hat, fehlen weiterhin verlässliche und praktikable Biomarker, die eine optimale Risikostratifizierung ermöglichen. Ziel solcher Biomarker soll es sein, sowohl aggressive Polychemotherapien für Niedrig-Risiko-Patienten/-innen zu vermeiden als auch den Hoch-Risiko-Patienten/-innen entsprechend wirksame und intensive Therapien zukommen zu lassen, um so Rezidive oder Progresse, die eine erheblich schlechtere Prognose mit sich bringen, zu vermeiden. Die bisherigen Forschungsergebnisse zum cHL zeigen deutlich, dass die Zusammensetzung des TME solch ein potentieller Biomarker sein kann (Steidl et al., 2011). Bisher besteht jedoch Uneinigkeit darüber, wie das TME am besten zu erfassen ist und welche Zellzusammensetzung einen prognostisch günstigen oder ungünstigen Wert hat (Venkataraman et al., 2014). Problematisch und zugleich einer der entscheidenden Faktoren bei der Charakterisierung der Zusammensetzung des TME im cHL ist dabei dessen intratumorale Heterogenität. Die manuelle Auszählung kleiner Ausschnitte in hoher Vergrößerung, sogenannter high power fields von etwa 0,1-0,4 mm² Fläche, kann diese Heterogenität kaum erfassen und führt so zu falsch hohen oder niedrigen Werten. Ebenso problematisch ist, dass diese Zählungen

subjektiv beeinflusst sind, etwa durch tagesabhängige Konzentrationsschwankungen des Untersuchers und einen gewissen Interpretationsspielraum. Durch die Subjektivität und den willkürlich gewählten kleinen Bildausschnitt ist diese Methode dann nur bedingt reproduzierbar. Auch bei der automatisierten Analyse von Tissue Microarrays ist die Aussagekraft durch die intratumorale Heterogenität gemindert, sie erfassen meist weniger als 1mm². Genexpressionsanalysen sind um einiges genauer und umfassender als manuelle Auszählungen, erfassen aber gegebenenfalls auch ungewollt nekrotische Tumoranteile und Gewebe, welches nicht direkt zum Lymphom gehört. Außerdem lassen Genexpressionsanalysen keine Rückschlüsse über die regionale Verteilung und Lage der einzelnen Zellarten zu und sind abhängig von der relativen Expression der untersuchten Gene in den einzelnen Zellen (Greaves et al., 2013b, Kim et al., 2010).

Eine neue Technik zur Quantifizierung von Zellen in histologischen Schnitten stellt die digitale Bildanalyse dar. Bei dieser Technik werden mit Hilfe einer Software an repräsentativen Ausschnitten eines immunhistochemisch (IHC) gefärbten Präparates Einstellungen zur Analyse gewählt, um anschließend automatisiert IHC positive (pos.) Zellen am gesamten Präparat detektieren zu lassen. Diese Form der Quantifizierung von Zelltypen soll eine umfangreichere Erfassung von Zellen eines Schnittes mit erhöhter Objektivität und Reproduzierbarkeit ermöglichen und Probleme, die bei der manuellen Auszählung und Genexpressionsanalyse auftreten, überwinden. (Seidal et al., 2001, Tadrous, 2010).

In der vorliegenden Arbeit soll folglich untersucht werden, ob es mit dieser Methode gelingen kann, neue Erkenntnisse über die Zusammensetzung des TME im cHL zu erlangen und ob die so erfolgte Quantifizierung eine klinische Relevanz haben könnte.

1.2 Fragestellungen

1. Kann die Zusammensetzung des TME im cHL mit Hilfe der digitalen Bildanalyse zuverlässig erfasst werden?
2. Wie ist das TME im cHL im Allgemeinen und in den verschiedenen Subtypen zusammengesetzt und wie hoch ist die intertumorale Heterogenität?
3. Sind Korrelationen zwischen dem Gehalt an verschiedenen Zellarten zu erkennen?
4. Ist die Zusammensetzung des TME im cHL mit klinischen Parametern assoziiert?

1.3 Hodgkin Lymphome

Die WHO Klassifikation für Lymphome teilt die Neoplasien des lymphatischen Systems in B-Zell-Lymphome, T-Zell-Lymphome und Hodgkin-Lymphome ein. Sie stellt eine kontinuierliche Weiterentwicklung einer Anfang des 20. Jahrhunderts erstellten morphologischen Einteilung von Lymphomen in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome dar (Jaffe et al., 2008). Zur Gruppe der Hodgkin-Lymphome wird heute neben dem cHL, welches 95% aller Hodgkin-Lymphome ausmacht, auch das noduläre lymphozytenprädominante Hodgkin-Lymphom gezählt. Dies ist eine sehr seltene Lymphomentität, die dem cHL stark ähnelt, aber bei der anstatt HRSC die lymphozytischen und histiozytischen Zellen nachweisbar sind (Küppers, 2009).

1.3.1 Das klassische Hodgkin Lymphom

Das cHL wurde erstmals 1832 durch den britischen Pathologen Thomas Hodgkin als Krankheitsbild beschrieben. Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts folgte die unabhängige histologische Deskription der HRSC durch die Wissenschaftler Dorothy Reed Mendenhall und Carl Sternberg (Reed, 1902, Sternberg, 1898). Das cHL gilt damit als erste näher definierte Lymphomentität (Liu et al., 2014). Nach vielen Jahren der Forschung zur Tumorbiologie wurde in den späten 1990er Jahren erkannt, dass die malignen HRSC ursprünglich von B-Zellen abstammen, aber kaum noch klassische B-Zell-Marker aufweisen (Küppers et al., 2012). Diese neoplastischen Zellen finden sich im Lymphomgewebe nur in sehr geringer Zahl und sind von einem reaktiven Begleit infiltrat, dem TME, umgeben. Es besteht überwiegend aus immunologischen Zellen, aber auch aus Stromazellen, Endothelzellen, Adipozyten und reichlich extrazellulärer Matrix, jeweils in inter- und intratumoral variablen Anteilen. Die Zusammensetzung des TME definiert gemeinsam mit spezifischen Wachstumsmustern die vier histologischen Subtypen des cHL: Noduläre Sklerose (70%), Mischtyp (25%), lymphozytenreiches cHL (4%), lymphozytenarmes cHL (1%) (Küppers et al., 2012). Diejenigen cHL, die keinem dieser Subtypen zugeordnet werden können, werden in der Regel mit „no other specified“ (NOS) angegeben.

Nur etwa 0,5% aller Krebserkrankungen sind ein cHL. Es macht aber 20% aller Diagnosen lymphatischer Neoplasien in der westlichen Welt aus und mit entsprechend etwa 2400

jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland ist das cHL daher als seltene Tumorentität, aber häufige Lymphomentität einzuordnen. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 43 Jahren. In der Altersgruppe 15-29, dem ersten Inzidenzpeak, sind über 10% aller Krebserkrankungen ein cHL. Ein zweiter Inzidenzpeak liegt bei 75-84 Jahren. Männer sind insgesamt etwas häufiger als Frauen betroffen (1,3:1), diese Rate nimmt mit höherem Alter zu (Hermann & Kraywinkel, 2018).

Zur Ätiologie des cHL besteht bis heute viel Unklarheit. Neben der Tatsache, dass es sich um ein B-Zell-Lymphom handelt, ist gesichert, dass auch das Epstein-Barr-Virus (EBV) eine signifikante Rolle spielt. Bei etwa 40% der Patienten/-innen kann das Virus in den HRSC nachgewiesen werden (Küppers et al., 2012). Die exprimierten Virusproteine LMP1/2 und EBNA1 könnten dabei auch direkte Bedeutung für die Tumorgenese haben, da in verschiedenen Mauseexperimenten eine Wirkung dieser Proteine als Onkogen für infizierte Zellen nachgewiesen wurde (Küppers, 2009). Die latente EBV-Infektion könnte daher auch prognostisch relevant sein (Steidl et al., 2011). Darüber hinaus ist bekannt, dass Patienten/-innen mit einem angeborenen oder erworbenen Immundefekt, z.B. einer Infektion mit dem Human immunodeficiency virus (HIV) oder einer Autoimmunerkrankung, häufiger an EBV pos. cHL erkranken (Shanbhag & Ambinder, 2018).

Klinisch manifestiert sich das cHL meist in vergrößerten, indolenten Lymphknoten, am häufigsten im Bereich der Kopf-Hals-Region und dem Mediastinum. Eines oder mehrere der B-Symptome: Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust, treten bei etwa 30% der Patienten/-innen auf (Ansell, 2016). Als selten, aber dafür pathognomisch für das cHL, gilt ein Schmerz in den Lymphknoten nach dem Genuss von Alkohol. Vereinzelt kommt es auch zu atypischen klinischen Manifestationen des cHL (Banerjee, 2011).

Für die Stadieneinteilung und damit Festlegung des Schweregrads der Erkrankung wird die Ann-Arbor-Klassifikation mit der Cotswold-Modifikation, wie in Tabelle 1 dargestellt, verwendet. Die Einordnung der Patienten/-innen in ein entsprechendes Stadium beruht dabei heute in der Regel auf bildgebenden Verfahren (Townsend & Linch, 2012).

Tabelle 1 Stadieneinteilung des klassischen Hodgkin-Lymphoms nach Ann-Arbor mit Cotswold-Modifikationen (aus Townsend & Linch, 2012)

Ann-Arbor Stadium	Definition
I	Befall einer Lymphknotenregion oder eines lymphatischen Organs
II	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf einer Seite des Diaphragmas
	Befall von Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Diaphragmas
III	1) Infradiaphragmal: Milz, Lymphknoten des Milzhilus, der Bauchhhöhle oder der Portalvene 2) Infradiaphragmal: paraaortale, iliakale oder mesenteriale Lymphknoten
IV	Befall von nicht an den betroffenen Lymphknoten angrenzenden extranodalen Strukturen
Cotswold-Modifikation	Definition
A	Keine B-Symptome*
B	Vorliegen eines oder mehrerer B-Symptome
X	Tumorbulk (Durchmesser der mediastinalen Tumormasse >1/3 des Thorax oder >10cm an jeder anderen Lokalisation)
E	Lokalisierte Befall von extralymphatischem Gewebe (ausgenommen Leber und Knochenmark)

*B-Symptome: Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust von mindestens 10% in 6 Monaten

Das cHL als schnell proliferierende Lymphomentität reagiert sehr sensibel sowohl auf Chemo- als auch auf Strahlentherapie, welche entsprechend auch kombiniert angewendet werden. Grundsätzlich erfolgt die Therapie des cHL dabei adaptiert an klinische Risikofaktoren (Shanbhag & Ambinder, 2018). Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über die klinische Risikoeinstufung und die entsprechenden risikoadaptierten Therapieempfehlungen in Deutschland gemäß der German Hodgkin Study Group (GHSG). Diese Einstufung ist bisher die einzige Risikostratifizierung, die breite klinische Anwendung in Deutschland findet. Sie ist allerdings noch nicht ausreichend geeignet, all jene Patienten/-innen innerhalb der einzelnen Risikogruppen zu identifizieren, die ein hohes Risiko für Therapierefraktärheit oder Rezidive haben.

Die gängigen Chemotherapieschemata sind zum einen ABVD, welches aus Adriamycin oder Doxorubicin (A), Bleomycin (B), Vinblastin (V) und Dacarbazin (D) besteht, sowie das intensivere BEACOPP, bestehend aus Bleomycin (B), Adriamycin (A), Cyclophosphamid (C), Vincristin (O), Procarbacin (P) und Prednisolon (P), zum Teil in eskalierter Dosierung (eBEACOPP) (Bröckelmann & Engert, 2015). Bei Therapieversagen oder Rezidiven kommen intensive Salvage-Chemotherapien und autologe Stammzelltransplantationen zum Einsatz

(Ansell, 2016). Neue Therapieansätze, die derzeit in vielen klinischen Phase-2- und 3-Studien getestet werden und zum Teil auch schon regelhaften klinischen Einsatz finden, sind der auf die HRSC ziellende CD30-Antikörper Brentuximab sowie die Immuncheckpointinhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab, welche Einfluss auf das TME nehmen (Ansell et al., 2014). Ebenso wird in ersten Studien getestet, ob eine Therapie mit CAR-T-Cells für Patienten/-innen mit refraktären cHL in Frage kommt. Hierbei werden aktivierte, Tumorantigen-spezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) dem Patienten/-innen zugeführt, um eine Immunantwort gegen das Lymphom auszulösen. (Vassilakopoulos et al., 2019)

Tabelle 2 Risikoadaptierte Einteilung des klassischen Hodgkin-Lymphoms in frühes, mittleres und fortgeschrittenes Stadium und entsprechende Erst-Linien-Therapieempfehlungen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019))

Risikofaktoren	Ann Arbor Stadium		
	I, IIA	IIB	III, IV
Keine	<i>Frühes Stadium</i> 2x ABVD* ¹ + 20Gy IF* ²		<i>Fortgeschrittenes Stadium:</i>
>2 Lymphknotenareale	<i>Mittleres Stadium</i> <60 Jahre: 2x BEACOPP* ³ eskaliert + 2x ABVD + 30Gy IF >60 Jahre: 4x ABVD + 30Gy IF		<60 Jahre: 6x BEACOPP eskaliert + RT* ⁵ von Restgewebe >2,4cm >60 Jahre: 6-8x ABVD* + RT von Restgewebe >1,4cm
Hohe BSG* ⁴			
Mediastinaler Bulk Extranodaler Befall			

*¹ABVD = Adriamycin/ Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastin, Darcarbazin

*²IF = Involved Field Radiotherapie

*³BEACOPP = Bleomycin, Adriamycin, Cyclophosphamid, Vincristin, Procarbazin, Prednisolon

*⁴BSG = Blutsenkungsgeschwindigkeit

*⁵RT = Radiotherapie

Verglichen mit vielen anderen Krebserkrankungen hat das cHL, obwohl es ohne Therapie ein unausweichlich rasch fortschreitendes und fatal endendes Lymphom ist, heute eine außerordentlich gute Prognose. Insgesamt können etwa 70-90% der Patienten/-innen geheilt werden, betrachtet man nur frühe Stadien, liegt die Quote sogar bei deutlich über 90%. Dennoch erleiden 20-30% aller Patienten/-innen auch nach intensiver Chemotherapie einen Progress oder ein Rezidiv, wodurch sich die Prognose deutlich verschlechtert (Bröckelmann & Engert, 2015). Es ist bisher weitgehend unklar, welche Patienten/-innen

innerhalb der einzelnen Stadien nicht auf die erste Therapie adäquat reagieren oder früh ein Rezidiv erleiden (Steidl et al., 2011). Während vor einigen Jahrzehnten noch die verschiedenen Subtypen als prognostisch relevant angesehen wurden, sind diese Unterschiede im Risikoprofil der Patienten/-innen mit Einführung der intensiveren Therapien kaum noch nachweisbar. Trotzdem scheint das lymphozytenreiche cHL mit einer etwas besseren und das lymphozytenarme cHL mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein (Hermann & Kraywinkel, 2018, Swerdlow et al., 2008, Shimabukuro-Vornhagen et al., 2005). Aktuell wird die funktionelle Bildgebung mittels Positronenemissionstomographie (PET) als prädiktiver Biomarker diskutiert und findet bereits Anwendung im klinischen Alltag. Hierbei wird jeweils die Tumorlast, gemessen an Lymphknoten oder Organen, welche pathologisch viel fluoreszierende Glucose (^{18}F -Fluor-2-Desoxyglucose = FDG) aufnehmen, bestimmt. Insbesondere Therapierefraktärheit und Rezidive können so deutlich früher detektiert werden (Zaucha et al., 2019). Die PET ist daher bereits heute essenzieller Bestandteil als Primärdiagnostik in den Behandlungsprotokollen im Leitlinienprogramm Onkologie, außerhalb von Studien wird es uneingeschränkt jedoch nur im fortgeschrittenen Stadium als Interimsdiagnostik empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019)). Problematisch ist die noch immer hohe Rate an falsch negativen Ergebnissen von 13-19% sowie eine recht hohe Subjektivität in der Auswertung (Aoki & Steidl, 2018). Für Patienten/-innen mit einem cHL in einem fortgeschrittenen Stadium wurde der International Prognostic Score (IPS) entwickelt. Dieser besteht aus sieben Items, die unabhängig voneinander einen negativen prognostischen Einfluss haben (Hasenclever & Diehl, 1998). Allerdings hat der IPS seit Einführung der intensiveren Therapien nur noch wenig Einfluss auf die Therapieempfehlungen (Aoki & Steidl, 2018, Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019)).

Obwohl die Heilungschancen für Patienten/-innen mit cHL sehr hoch sind, sind die akuten Nebenwirkungen, die insbesondere die Therapie bei älteren und komorbidien Patienten/-innen erschweren, und die späten Nebenwirkungen der Therapie, von denen besonders junge Patienten/-innen zwischen 20-40 betroffen sind, als problematisch anzusehen. Frühe Nebenwirkungen sind beispielsweise eine ausgeprägte Neutropenie mit hoher Infektionsgefahr sowie Nerven- oder Nierenschäden (Engert, 2019). Zu den späten therapieassoziierten Schäden zählen unter anderem Kardiomyopathien durch die verwendeten Anthrazykline, das Auftreten von sekundären Malignomen durch die

Polychemo- und Strahlentherapie sowie Lungenschäden durch Bleomycin. Besonders bei der BEACOPP-Therapie, Salvage-Therapien und allogener Stammzelltransplantation kann es außerdem zu Infertilität kommen (Shanbhag & Ambinder, 2018).

1.4 Tumormikromilieu

Neben den eigentlichen Tumorzellen bestehen Malignome auch aus einem komplexen Begleit infiltrat, dem TME, welches immunologische Zellen, aber auch Stromazellen, Endothelzellen, Adipozyten und reichlich extrazelluläre Matrix enthält. Das TME ist eine äußerst dynamische Umgebung und variiert inter- und intratumoral stark in seiner Zusammensetzung. Für Malignome ist das TME von essenzieller Bedeutung und es wurde unter den Punkten „evading immune destruction“ und „tumor promoting inflammation“ in die sogenannten „Hallmarks of cancer“ aufgenommen, das wohl bekannteste Modell zur Tumorgenese (Hanahan & Weinberg, 2011). Es wird dabei angenommen, dass das körpereigene Immunsystem ständig versucht, die Entstehung von Tumoren zu unterbinden. In der Tumorgenese formiert sich jedoch um die malignen Zellen herum eine Umgebung, die, anstatt die neoplastischen Zellen effektiv abzutöten, für das Überleben und Wachsen derselben unerlässlich sind. Welche Funktion dabei welchen Zellen zukommt und welche Rolle auch sezernierte Faktoren spielen, wie z.B. Wachstumsfaktoren oder reaktive Sauerstoffspezies, ist bisher nur in Ansätzen verstanden. Gesichert ist, dass sich in der Umgebung der malignen Zellen Immunzellen finden, die das Überleben des Tumors fördern können, darunter T-Helfer-Zellen (Th-Zellen), regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) und tumorassoziierte Makrophagen (TAM), aber auch solche, die versuchen, den Tumor zu eliminieren, wie die zytotoxischen T-Zellen (CTL) und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Hui & Chen, 2015). Über die Funktionen der Stromazellen, Gefäße und der Extrazellulärmatrix ist wenig bekannt. Vermutet wird, dass sie insbesondere für die Neoangiogenese, Metastasierung und Disseminierung von Bedeutung sind (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.4.1 Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen und das Tumormikromilieu im klassischen Hodgkin-Lymphom

Die Besonderheiten des TME im cHL bestehen darin, dass die neoplastischen Zellen, die HRSC, nur einen Bruchteil der Zellen im Lymphomgewebe ausmachen und dass das TME entsprechend sehr ausgeprägt und darüber hinaus außergewöhnlich heterogen ist (Steidl et al., 2011). Es ist bekannt, dass die HRSC über die Ausschüttung von Zytokinen verschiedene Immunzellen in das TME locken (Küppers, 2009). Im Folgenden soll auf die HRSC und die Funktionen der größten umgebenden Zellpopulationen, die T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen, näher eingegangen werden.

HRSC sind sehr große und häufig mehrkernige Zellen, die zwar von B-Zellen des Keimzentrums abstammen und mutierte Immunglobulingene aufweisen, aber keinen typischen B-Zell-Phänotyp mehr haben, was einen Unterschied zu allen anderen B-Zell-Lymphomen darstellt (Küppers, 2009). Sie weisen zudem auch Signalwege und Rezeptoren auf, die normalerweise in anderen hämatologischen Zellen, nicht jedoch in B-Zellen aktiviert sind (Cirillo et al., 2019). Unter den wenigen B-Zell-Markern, die sie behalten haben, sind CD40 und CD80 sowie sehr vereinzelt CD20 und der MHCII-Komplex. Vermutet wird, dass diese Oberflächenmoleküle insbesondere für die Interaktion mit dem TME von Bedeutung sind (Küppers, 2009). Man kann morphologisch zwischen den einkernigen Hodgkin-Zellen und den mehrkernigen Reed-Sternberg-Zellen, welche vermutlich durch Fusion nach unvollständiger Zellteilung entstehen, unterscheiden (Rengstl et al., 2013). Kennzeichnend für beide sind die Expression des Oberflächenmarkers CD30 sowie zum Teil CD15. In der Forschung werden sie meist als eine Zellart behandelt (Cirillo et al., 2019). HRSC haben, anders als die meisten anderen Tumorzellen, nur ein sehr geringes intrinsisches Proliferationspotenzial und sind daher angewiesen auf eine Umgebung, die durch direkte Zell-Zell-Interaktion sowie durch sezernierte Faktoren die Tumorgenese und Proliferation vorantreibt. Insbesondere die Aktivierung von Signalwegen, wie die durch die Interaktion mit dem TME ausgelösten NF- κ B- und der JAK/STAT-Signalwege, aber auch aktivierende Mutationen sind dabei für die Überleben der neoplastischen Zellen von essentieller Bedeutung (Cirillo et al., 2019, Küppers et al., 2012, Küppers, 2009). Diese starke Abhängigkeit der HRSC vom TME zeigt sich auch darin, dass es nur schwer möglich ist, HRSC

in Zellkulturen anzuzüchten und dass auch bei der Disseminierung eines cHL in extralymphatische Organe das typische TME immer zu finden ist (Küppers, 2009). Die größte Population im TME des cHL sind, unabhängig vom Subtyp, die T-Zellen. Den Hauptteil davon machen CD4 pos. T-Zellpopulationen aus, wie Th-Zellen und Treg-Zellen (Liu et al., 2014). Sie sind im gesamten Lymphom verteilt zu finden, formieren aber auch direkt um die HRSC herum sogenannte T-Zell-Rosetten. Im gesunden Gewebe sind T-Zellen, vor allem die CTL und Th-Zellen, unter anderem dafür zuständig, maligne Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Diese natürliche immunologische Antwort scheint im cHL nicht effektiv genug zu sein, um einen Tumorprogress zu verhindern (Vardhana & Younes, 2016). Über die genauen Funktionen der einzelnen T-Zellpopulationen und deren spezielles Zusammenspiel im TME des cHL wird noch viel spekuliert. Gründe für die ineffektive Immunantwort gegen die neoplastischen HRSC könnten Zytokine sein, die von den HRSC sezerniert werden. Dazu gehört zum Beispiel CCL17, welches vermehrt nur jene T-Zellpopulationen anlockt, denen tumorfördernde Eigenschaften zugeschrieben werden, wie zum Beispiel Treg-Zellen. Zudem werden auch solche Zytokine sezerniert, die in der Lage sind, infiltrierende naive T-Zellen in spezifische Subtypen umzuwandeln, wie MIF, Galectin-1, IL-7 und IL-13 (Steidl et al., 2011, Liu et al., 2014). Ebenso wird vermutet, dass die Anti-Tumorantwort, insbesondere der CTL, durch die von HRSC und den Treg-Zellen ausgeschütteten Zytokine IL-10 und TGF- β und durch die Interaktion mit dem Apoptose auslösenden CD95-Liganden auf den HRSC geschwächt wird (Liu et al., 2014). Bei den T-Zellrosetten, die überwiegend Th-Zellen beinhalten, wird vermutet, dass sie eine Art direkte Barriere für die HRSC vor Angriffen der CTL darstellen (Cirillo et al., 2019). Ebenso bekannt ist, dass sich auf den vorhandenen T-Zellen im cHL vermehrt der Rezeptor PD-1 finden lässt. Dieser wurde ursprünglich als Zeichen von T-Zell-Erschöpfung bei viralen Infektionen entdeckt. Bei Kontakt von PD-1 und dem T-Zell-Rezeptor mit den entsprechenden Liganden PD-L1 und MHC-I kommt es zur Herunterregulierung der effektiven Immunantwort der T-Zellen. Im cHL findet sich dieser Ligand unter anderem auf den HRSC und Makrophagen, was vermuten lässt, dass sie zu einer induzierten T-Zell-Erschöpfung fähig sind und damit eine effektive Antitumorantwort abschwächen können (Vardhana & Younes, 2016). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die große Population der T-Zellen im TME des cHL sowohl tumorfördernde Zellen beinhaltet als auch solche, die für eine Antitumorantwort zuständig sind. Die genauen Funktionsweisen der einzelnen Subpopulationen sind aber noch nicht ausreichend verstanden. Die HRSC

sorgen durch die Ausschüttung von Zytokinen und direkte Zell-Zell-Interaktion dafür, dass tumorfördernde Populationen gestärkt und die HRSC vor Angriffen durch die tumorhemmenden Populationen geschützt werden. Untersuchungen an IHC-Präparaten zur Korrelation von vorhandenen T-Zell-Subpopulationen und dem klinischen Outcome zeigten, dass T-Zellen potentielle prognostische Biomarker sein könnten. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass einige Studien Treg-Zellen als prognostisch ungünstig und CTL als prognostisch günstig herausstellten (Álvaro et al., 2005, Greaves et al., 2013b, Chetaille et al., 2009), einige jedoch auch genau das Gegenteil demonstrierten (Schreck et al., 2009, Hollander et al., 2018). Diese Arbeiten differierten alle stark in der Kollektivzusammensetzung und Methodik und bedürfen daher weiterer Validierungen und eines tieferen biologischen Verständnisses, um daraus einen praktikablen Biomarker zu erarbeiten. In den letzten Jahren haben sich die PD-1 beziehungsweise PDL-1-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab, die letztlich eine Herrunterregulierung der T-Zellantwort verhindern, in der Therapie von refraktären cHL etabliert und damit die Bedeutung der T-Zellen, insbesondere der CTL als vermutlich tumorhemmende T-Zell-Subpopulation, im TME des cHL hervorgehoben (Vardhana & Younes, 2016).

Ebenso ubiquitär wie T-Zellen finden sich B-Zellen im TME des cHL. Hierbei hervorzuheben ist, dass sich die B-Zellen im cHL histologisch teils knotig anordnen, wie sie es auch in Primär- und Sekundärfollikeln eines gesunden Lymphknotens tun, teils aber auch diffus verstreut liegen (Cirillo et al., 2019). Über die Funktionen der B-Zellen im TME des cHL ist noch wenig bekannt. Man vermutet, dass B-Zellen eine weitgehend antitumorale Funktion haben, wobei auch hier vermutlich zwischen verschiedenen B-Zell-Subpopulationen unterschieden werden muss (Tudor et al., 2013). In Untersuchungen an IHC Präparaten und in Genexpressionsanalysen konnte ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an B-Zellen und der Prognose hergestellt werden (Chetaille et al., 2009, Tudor et al., 2013, Greaves et al., 2013b, Steidl et al., 2010). Ein erhöhter Gehalt an B-Zellen war demnach mit einem besseren Outcome verbunden, doch auch hier bedarf es weiterer Validierung durch unabhängige und größere Studien. Es bleibt dabei auch ungewiss, ob viele B-Zellen im Lymphomgewebe bedeuten, dass der Tumor noch nicht aggressiv genug war, um die physiologische Follikelarchitektur und die darin enthaltenen B-Zellen zu verdrängen, oder ob die B-Zellen selbst antitumoröse Eigenschaften haben und eine hohe Zahl daher prognostisch günstig sein könnte (Cirillo et al., 2019).

Nicht nur im cHL, sondern auch in vielen weiteren Tumorentitäten sind die Makrophagen und Monozyten schon früh in den Fokus der Forschung zum TME gerückt. So wurden die tumorassoziierten Makrophagen (TAM) bereits 1980 in einer Studie als potentieller Biomarker für das cHL präsentiert (Steidl et al., 2011). Es wird vermutet, dass Makrophagen, durch die Tumorzellen und das umgebende TME angelockt, in ihrer ursprünglichen, tumorhemmenden Funktion unterdrückt und in eben jene TAM umgewandelt werden, die durch Zytokine und direkte Zell-Zell-Interaktionen eine effektive T-Zell-Antitumorantwort verhindern können (De Palma & Lewis, 2013). In verschiedenen Genexpressionsstudien und Untersuchungen an IHC Präparaten wurde ein erhöhter Gehalt an Makrophagen als unabhängiger, negativ prognostischer Biomarker postuliert (Sánchez-Espíridión et al., 2009, Kamper et al., 2011, Steidl et al., 2010, Tan et al., 2012), obgleich es Studien gab, die dies nicht bestätigen konnten (Azambuja et al., 2012, Kayal et al., 2014, Sánchez-Espíridión et al., 2012, Sánchez-Espíridión et al., 2010). Da all diese Studien unterschiedliche Erkrankungsstadien untersuchten und verschiedene Methoden nutzten, bedarf es auch hier weiterer Forschungsarbeiten, bevor der Gehalt an Makrophagen als Biomarker auch in der Klinik angewendet werden kann.

1.4.2 Tumormakromilieu

Eine allgemein anerkannte Definition, bis wohin das TME von Malignomen reicht, liegt bisher nicht vor. Es gibt Bestrebungen, neben dem TME auch ein Tumormakromilieu zu beschreiben und in seiner Bedeutung für Malignome zu untersuchen. Grund hierfür ist die Annahme, dass für das Entstehen und Überleben eines Tumors nicht nur die Zellen in direkter Nachbarschaft der neoplastischen Zellen von großer Bedeutung sind, sondern auch weitreichendere Interaktionen mit dem betroffenen Organ und dem gesamten metabolischen System des Körpers. Für diese Interaktionen sollen, anders als im TME, in dem direkte Zell-Interaktionen und parakrin wirkende Zytokine eine große Rolle spielen, insbesondere das Blut- und Lymphgefäßsystem sowie das Immunsystem verantwortlich sein (Al-Zoughbi et al., 2014). Insbesondere bei Lymphomen, bei denen keine Metastasierung im eigentlichen Sinne stattfindet, sondern sich vielmehr eine Disseminierung der neoplastischen Zellen und des entzündlichen Begleitinfiltates über das Lymph- und Blutgefäßsystem im gesamten Körper vollzieht, könnte es wichtig sein, zwischen TME und Tumormakromilieu

näher zu differenzieren (Pals et al., 2007). Insbesondere wenn, wie in der vorliegenden Arbeit, Ganzschnitte oder sogar gesamte Lymphknoten ausgewertet werden, sollte bedacht werden, dass diejenigen Zellen, die die neoplastischen Zellen direkt umgeben, womöglich andere Funktionen als jene Zellen der gleichen Zellart übernehmen, die weiter von den neoplastischen Zellen entfernt zu finden sind (Carey et al., 2017). Da diese Thematik bisher, insbesondere bei Lymphomen, noch nicht ausreichend erforscht und beschrieben wurde, wird in der hier vorliegenden Arbeit jedoch ausschließlich der Begriff TME für die erfassten Zellen, egal ob nah oder fern einer HRSC, verwendet.

2 Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und Software

- IHC Färbung
 - Antikörper
 - CD20: Maus-anti-CD20 Klon L26
(Dako, Glostrup, Dänemark)
 - CD30: Maus anti-CD30 Klon Ber-Her2
(Institut für Pathologie, UKSH, Campus Kiel, Deutschland)
 - CD3: Hase anti-CD3 Klon SP7
(Neomarkers Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)
 - CD68: Maus anti-CD68 Klon PG-M1
(Dako, Glostrup, Dänemark)
 - Reagenzien
 - BondTM Epitopdemaskierungslösung 1
(Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)
 - BondTM Epitopdemaskierungslösung 2
(Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)
 - BondTM Polymer Refine Detection
(Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)
- Hämalaun Färbung
 - Hämatoxylin = Mayers Hämalaunlösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

- Geräte und weitere Materialien
 - o Bond-Max Färbeautomat
(Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)
 - o Nanozoomer RS 2.0 Scanautomat
(Hamamatsu Photonics, Ammersee, Deutschland)
 - o Schlittenmikrotom 2010R
(Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)
 - o Rotationsmikrotom Thermo Scientific HM 325
(Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)
 - o Axiophot Photomikroskop
(Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland)
 - o Objektträger beschichtet
(Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)
 - o Pertex Einkleckgläser
(Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)
 - o Wärmeschrank
(Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)

- Software
 - o Definiens Tissue Studio 64
(Definiens AG, München, Deutschland)
 - o NDPI Viewer
(Hamamatsu Photonics, Ammersee, Deutschland)
 - o ProGres Capture Pro 2.9.0.1
(Jenoptik, Jena, Deutschland)
 - o MS Paint
(Microsoft Corporation, Redmond, USA)
 - o Graph Pad Prism 8
(Graph Pad Software Inc., San Diego, USA)
 - o SAS 9.4
(SAS Institute Inc., North Carolina, USA)

2.2 Kollektiv

Für diese Arbeit wurden insgesamt knapp 600 Lymphomproben von Patienten/-innen mit einem cHL untersucht. Diese Patienten/-innen waren in die Studien HD12, HD15 und HD18 der GHSG eingeschlossen, welche insgesamt 5801 Patienten/-innen umfassten. Das erste Kollektiv wurde aus den Studien HD12 und HD15, ein Validierungskollektiv für die CD20 gefärbten Schnitte aus der HD18 Studie gebildet. Bei den Patienten/-innen wurde zwischen Januar 1999 und Juli 2017 ein cHL diagnostiziert. Die Therapie entsprach dem durch Randomisation zugewiesenen Studienarm. Die Chemotherapie bestand dabei aus 6-8 Zyklen mit einem BEACOPP Regime (eBEACOPP, bBEACOPP oder BEACOPP14). Bei den HD12-Patienten/-innen wurden in den Armen B und C nicht bestrahlt; in den Armen A und D erhielten sie als Konsolidierung 30 GY Restbestrahlung und auf initialen Bulk. In HD15 und HD18 wurden nur PET-positive Restbefälle konsolidierend bestrahlt (Borchmann et al., 2017, Borchmann et al., 2011, Engert et al., 2012).

Für diese GHSG Studien galten folgende Einschlusskriterien: Ann-Arbor Stadium IIb mit großem Mediastinalbefall (>1/3 des Thoraxdurchmesser im Röntgen-Thorax a.p. Aufnahme) oder einem extranodalen Befall, alternativ ein Ann-Arbor Stadium III oder IV, Alter zum Zeitpunkt des Studieneinschluss zwischen 18 und 69, HIV-Status negativ, ECOG von max. 2 (Index von 0 bis 5 zur Quantifizierung der Einschränkung durch die Erkrankung von der Eastern Co-operative Oncology Group), keinerlei therapieeinschränkende Komorbiditäten. Primärer Studienendpunkt war die Zeit bis zum Therapieversagen (FFT) für die HD12 und HD15 Studie, definiert als Zeitraum ohne Progression, Rezidiv, Notwendigkeit einer intensivierten oder modifizierten Therapie, Tod oder Abbruch der studienkonformen Therapie und Progressionsfreies Überleben (PFS), definiert als Zeitraum bis zum Fortschreiten der Erkrankung oder Tod jedweder Ursache, für die HD18 Studie. Progressionsfreies Überleben bei den HD12 und HD15 Studien (PFS), Gesamtüberleben (OS), komplette Remission (CR) sowie das Auftreten therapieassozierter Schäden waren die sekundären Studienendpunkte (Borchmann et al., 2017, Borchmann et al., 2011, Engert et al., 2012).

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde aus diesen Studien retrospektiv ein Kollektiv gewählt, bei dem das Verhältnis von Patienten/-innen mit Progress oder Rezidiv und solchen ohne Progress oder Rezidiv 1:2 betrug. Für die Aufnahme von Patienten/-innen in dieses

Kollektiv galten darüber hinaus folgende Voraussetzungen: Vorliegen der diagnostischen Gewebeproben und einer histologischen Diagnose in einem der pathologischen Referenzzentren der GHSG, Vorliegen aller nötigen Daten und bekannten IPS Risikofaktoren, langjährige Follow-up Daten sowie Einverständnis der Patienten/-innen zur Nutzung ihrer Gewebeproben für weitere Forschungszwecke. Zur Verfügung gestellt wurden diese Proben in Form von Paraffinblöcken aus den Archiven der pathologischen Referenzzentren der GHSG: Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel und Lübeck, Charité Berlin, Universitätsklinikum Frankfurt am Main, Universitätsklinikum Würzburg, Kantonsspital St. Gallen.

Von 408 vorhandenen Lymphomproben aus den HD12 und HD15 Studien wurden für ein finales Kollektiv von 387 Proben die Anteile der vier Zellarten: B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen, HRSC bestimmt. Grund für die Reduktion waren abhanden gekommene Paraffinblöcke oder Schnitte (n=8), stark beschädigtes Gewebe, welches nicht zur Analyse geeignet war (n=6), eine qualitativ unzureichende Färbung (n=6) und eine fehlerhafte Diagnose (n=1). Für die statistische Auswertung der kombinierten histopathologischen und klinischen Daten wurden letztlich die Daten von 340 Patienten/-innen verwendet, die übrigen Patienten/-innen (n=47), bei denen ein Tod aufgrund lymphom- und therapieunabhängiger Erkrankung vorlag, wurden aus diesem Kollektiv ausgeschlossen. Die Untersuchungen an den für CD20 und CD68 gefärbten Schnitten wurden von einem ehemaligen Mitarbeiter des Instituts durchgeführt und waren zu Beginn der Arbeit an der hier vorliegenden Dissertation bereits abgeschlossen.

Für eine Validierung der B-Zell-Daten wurden 190 weitere Proben aus der HD18 Studie ebenfalls auf ihren CD20 pos. Zellgehalt hin untersucht. Um eine optimale Vergleichbarkeit mit den Primärdaten zu gewährleisten, wurde dieses Kontrollkollektiv später wiederum auf 147 Proben reduziert, sodass die Zusammensetzung der Patienten/-innen dem ersten untersuchten Kollektiv entsprach. Die Charakteristika dieses ersten untersuchten Kollektivs sowie des Validierungskollektivs und der GHSG Studien, sind in Tabelle 3 dargestellt. Das Follow-up in der Primärkohorte lag im Median bei 66 Monaten (KI 95%: 63-71) und in der Kontrollkohorte bei 62 Monaten (KI 95%: 57-65) (Jachimowicz et al., 2020).

Tabelle 3 Darstellung der Charakteristika in den untersuchten Kollektiven und ursprünglichen German Hodgkin Study Group (GHSG) Studien (Jachimowicz et al., 2020)

Charakteristika	1.Untersuchtes Kollektiv N* ¹ =340	HD12+HD15 N=3426	Validierungs-kollektiv N=147	HD18 N=2101
Medianes Alter (IQR)* ²	31 (24-40)	33 (24-42)	33(25-42)	32 (24-43)
GHSG Risikofaktoren N (%)				
Extranodale Erkrankung	64 (18.8)	693 (20.3)	28 (19)	407 (19.4)
>=3 Lymphknoten-Areale	304 (89.4)	2884 (84.3)	128 (87.1)	1809 (86.1)
Mediastinaler Bulk	106 (31.2)	1024 (30.1)	37 (25.2)	592 (28.2)
Erhöhte BSG* ³	248 (72.9)	2310 (65.9)	93 (63.3)	1332 (63.4)
IPS*⁴ Risikofaktoren N (%)				
Männliches Geschlecht	205 (60.3)	2059 (60.1)	96 (66)	1278 (60.8)
Alter >=45 Jahre	53 (15.6)	719 (21)	26 (17.7)	437 (22.4)
Ann-Arbor Stadium IV	142 (41.8)	1198 (35.0)	53 (36.1)	765 (36.4)
Albumin <4g/dl	192 (56.5)	1796 (55.1)	85 (87.5)	1180 (56.2)
Hämoglobin < 10.5g/dl	56 (16.5)	617 (18.1)	28 (19)	379 (18)
Leukozytose	77 (22.6)	700 (20.5)	30 (20.4)	436 (20.8)
Lymphopenie	23 (6.8)	261 (8.0)	10 (6.8)	151 (7.2)
IPS Score N (%)				
0-2	204 (60)	1721 (55.8)	92 (63)	1206 (61.9)
3-7	136 (40)	(34.6)	54 (37)	741 (38.1)
Histologischer Subtyp N (%)				
Noduläre Sklerose	221 (65)	1778 (51.9)	72 (49)	747 (35.6)
Mischtyp	100 (29.4)	780 (22.8)	25 (17.0)	245 (11.7)
Lymphozytenreiches cHL	9 (2.6)	73 (2.1)	4 (2.7)	29 (1.4)
Lymphozytenarmes cHL	4 (1.2)	35 (1)	0	8 (0.4)
NOS* ⁵	6 (1.7)	760 (22.2)	46 (31.2)	1072 (51)

*¹N = Anzahl

*²IQR = Interquartilrange von 25-75%

*³BSG = Blutsenkungsgeschwindigkeit

*⁴IPS = International Prognostic Score (Hasenclever & Diehl, 1998)

*⁵NOS = no other specified

2.3 Verarbeitung der Gewebeproben

Aus den in Formalin fixierten und in Paraffinblöcken eingebetteten Gewebeproben wurden mit einem Schlitten- und einem Rotationsmikrotom (Schlittenmikrotom 2010R: Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland; Rotationsmikrotom: Thermo Scientific HM 325, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) 2-3µm dicke Schnitte erstellt, auf beschichtete Objektträger (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) aufgezogen und im Wärmeschrank (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) bei 37-42°C über Nacht getrocknet. Um eine möglichst valide Aussage über die Zellzusammensetzung an einer definierten Stelle des Lymphoms zu machen, wurden nur Folgeschnitte der Präparate angefertigt und verarbeitet. Diese Schnitte wurden anschließend immunhistochemisch für die Marker CD3 für T-Zellen, CD20 für B-Zellen, CD68 für Makrophagen und CD30 für HRSC vollautomatisiert im Leica BondTM Max Automat (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) gefärbt. Diese IHC Färbungen machen spezifische Zellproteine durch eine Antigen-Antikörperreaktionen sichtbar. Hierfür wurden die Schnitte mit einer Inkubation in Xylol (10 min) entparaffiniert und einer absteigenden Alkoholreihe (3x 100%, 2x 96%, 1x 70%) rehydriert. Anschließend folgte eine Bearbeitung der Schnitte im Färbeautomaten mit der BondTM Epitopdemaskierungslösung 1 (Citrat-Puffer, pH-Wert 5,9-6,1) oder 2 (EDTA-Puffer, pH-Wert 8,9-9,1) (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland), um die Antigene freizulegen. In einem nächsten Schritt wurde jeweils der an das spezifische Antigen bindende Antikörper verdünnt hinzugegeben und mit dem polymeren Detektionssystem des Bond Max Automaten (BondTM Polymer Refine Detection, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) verstärkt sichtbar gemacht. Danach erfolgte eine Gegenfärbung der Schnitte mit Hämalaun nach Meier, um das IHC negative (neg.) Gewebe darzustellen. Abschließend wurde eine aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt und die Schnitte wurden mit Pertex (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) eingedeckt. Die verwendeten Antikörper, Vorbehandlungen und Verdünnungen sind Tabelle 4 zu entnehmen. Die gefärbten Schnitte wurden mit dem Hamamatsu Nanozoomer RS 2.0 (Hamamatsu Photonics, Ammersee, Deutschland) hochauflösend in 40facher Vergrößerung gescannt und als ndpi-Dateien gespeichert.

Tabelle 4 Informationen zur immunhistochemischen Färbung: Zielantigen, Antikörperdetails, Vorbehandlung und Verdünnung

Zielantigen	Klon	Herkunft	Vorbehandlung	Verdünnung
CD3	SP7	Hase	Bond™ Epitopdemaskierungslösung 1	1:100
CD20	L26	Maus	Bond™ Epitopdemaskierungslösung 1	1:400
CD30	BerH2	Maus	Bond™ Epitopdemaskierungslösung 1	1:5
CD68	PG-M1	Maus	Bond™ Epitopdemaskierungslösung 2 (pH9)	1:100

2.4 Ethikvotum

Es liegt eine schriftliche Einwilligung der Patienten/-innen für die jeweilige GHSG-Studie vor, welche eine translationale Analyse wie in der vorliegenden Arbeit mit einschließt. Die schriftliche Einwilligung nach Aufklärung wurde von der Ethikkommission der Universität Köln begutachtet und genehmigt. Die Studien wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt (ClinicalTrials.gov NCT00265031 (HD12), NCT00515554 (HD18), isRCTN.com ISRCTN32443041 (HD15)).

Die Bearbeitung der Gewebeproben ohne Einholung neuer klinischer Daten wird zudem durch das Ethikvotum der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität für die Arbeit mit Archivmaterial in der Pathologie gedeckt (D447/10).

2.5 Digitale Bildanalyse

Die Scans der IHC gefärbten Schnitte wurden einzeln als ndpi-Dateien in die Bildanalysesoftware TissueStudio 64 (Definiens AG, München, Deutschland) importiert und analysiert. Diese Software ermöglicht es, Ganzschnitte hinsichtlich ihres Gehalts an IHC pos. Zellen teilautomatisiert zu analysieren. Die gewählten Softwareeinstellungen sind im Folgenden detailliert aufgeführt. Zum besseren Verständnis sind die Arbeitsschritte in Abbildung 1-4 noch einmal dargestellt.

Als konstante Voreinstellungen für die Bildanalyse wurde der im Scan gespeicherte Vergrößerungsmaßstab 40x = $\mu\text{m}/\text{pxl}$ 0,22711 verwendet, die vorliegende Färbung als IHC, braun und chromogen definiert und die Lokalisation des IHC Markers als membranständig angegeben.

Zunächst erfolgte durch die Einstellung eines Homogenitätsgrenzwertes von 0,5 von 5, eines individuellen Helligkeitsgrenzwertes von 180-222 von 255 und einer Gewebemindestgröße von $2000 \mu\text{m}^2$ eine separate Definition von Gewebe und Hintergrund (*Tissue-Background Separation*). Das Gewebe wurde dann automatisiert als zu analysierendes Material erfasst (*Composer: Initialization*) und die äußeren Gewebegrenzen wurden geglättet (*Composer: Reclassify Region*). Anschließend wurde eine Überprüfung dieser Auswahl vorgenommen und nicht-analysierbare Bereiche wurden als solche manuell markiert und ausgeschlossen (*Composer: ROI Correction*). Als nicht-analysierbar gewertet wurden über- und unterfärzte, stark zerklüftete oder gequetschte Areale, Farbflecken, TMA-Stanzlöcher sowie eindeutig nicht dem Lymphom zugehörige Gewebsabschnitte, wie zum Beispiel große Fettgewebsanhänge (Abbildung 1).

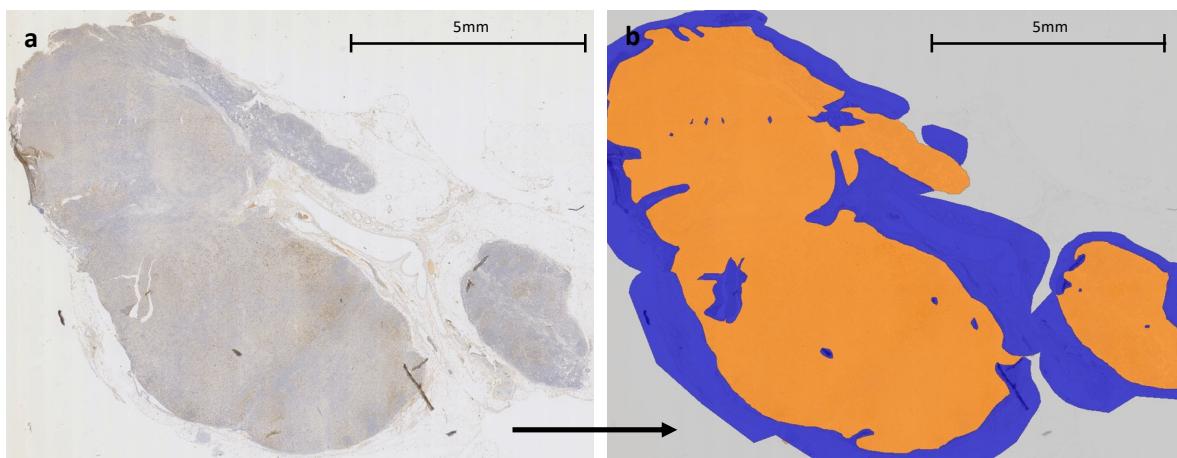


Abbildung 1 Schritt 1 der digitalen Bildanalyse
Kombinierte manuelle und automatisierte Definition der Areale. **a** Original Scan eines Lymphomschnittes mit einer Färbung für CD30. **b** Overlay nach der Detektion von geeigneten (orange) und ungeeigneten (blau) Arealen.

Für die weiteren Analyseschritte dienten jeweils 4 repräsentative vergrößerte Ausschnitte des Schnittes (*Initialize Cellular Analysis*). In dieser 4-Bild-Ansicht wurden dann die Zellkerne automatisiert bei einem Intensitätsschwellenwert für die Hämatoxylinfärbung von 0,01 und für die IHC Färbung von 0,1 detektiert und die charakteristische Kerngröße mit $20 \mu\text{m}^2$ beschrieben (*Nucleus Detection*). Kleinere Artefakte wie z.B. Kerntrümmer sowie kernähnliche Farbspritzer wurden durch den Ausschluss von detektierten Arealen unter einer Größe von $7 \mu\text{m}^2$ entfernt (*Nucleus Morphology and Filter*) (Abbildung 2).

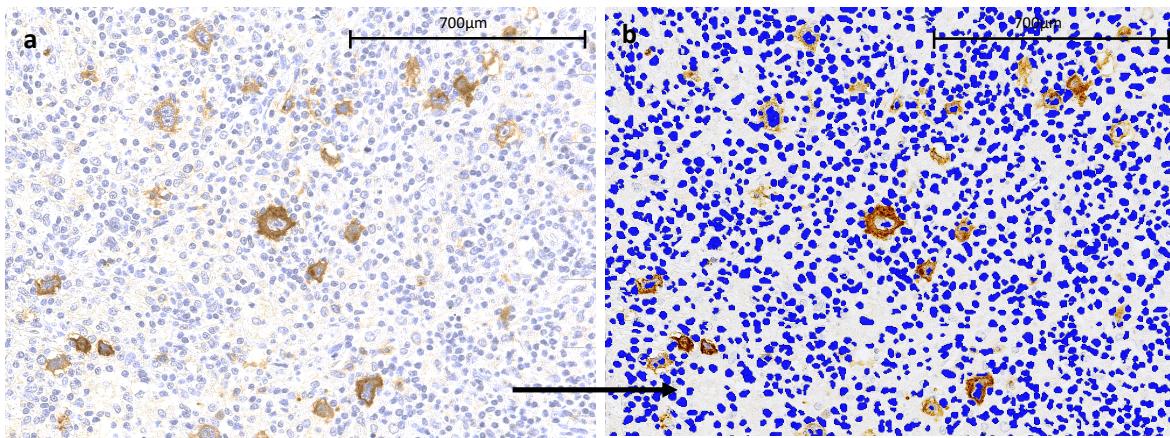


Abbildung 2 Schritt 2 der digitalen Bildanalyse

Vergrößerung repräsentativer Ausschnitte und Kerndetektion an einem für CD30 gefärbten Lymphomschnitt. **a** Beispiel eines Ausschnitts, in jeder Analyse wurden vier Ausschnitte gewählt. **b** Darstellung der Kerndetektion auf diesem Ausschnitt durch blaues Overlay der Kerne.

2.5.1 Gehalt von B- und T-Zellen

Der Gehalt an T-Zellen wurde als Anteil der CD3 pos. Zellen von allen detektierten Zellen gemessen, der Gehalt an B-Zellen entsprechend als Anteil an CD20 pos. Zellen. Hierzu erfolgte nach der Detektion aller Zellkerne eine automatisierte Erkennung der Zellen, indem der Intensitätsschwellenwert für die IHC Färbung auf 0 von 1 gesetzt und die Membrandicke mit 1 ppxl von 4 definiert wurde (*Membranes and Cells*). Für die Klassifizierung in CD3 pos. und CD3 neg. Zellen und entsprechend CD20 pos. und CD20 neg. Zellen wurde der Intensitätsschwellenwert für die IHC Färbung für jeden Schnitt individuell angepasst mit Werten zwischen 0,04 – 0,32 von 3 (*Cell Classification*). Das Programm Definiens *TissueStudio* (Definiens AG, München, Deutschland) analysierte den gesamten Schnitt in automatisiert eingeteilten, wenige mm² großen Quadranten. Um zu vermeiden, dass Zellen, die sich auf der Grenze zwischen zwei Quadranten befanden, doppelt gezählt wurden, wurden dabei alle Zellen, die durch die Abschnittsgrenzen angeschnitten waren, aus der Analyse durch die Einstellung Distanz ≤ 0 entfernt (*Cell Classification Exclusion*) (Abbildung 3).

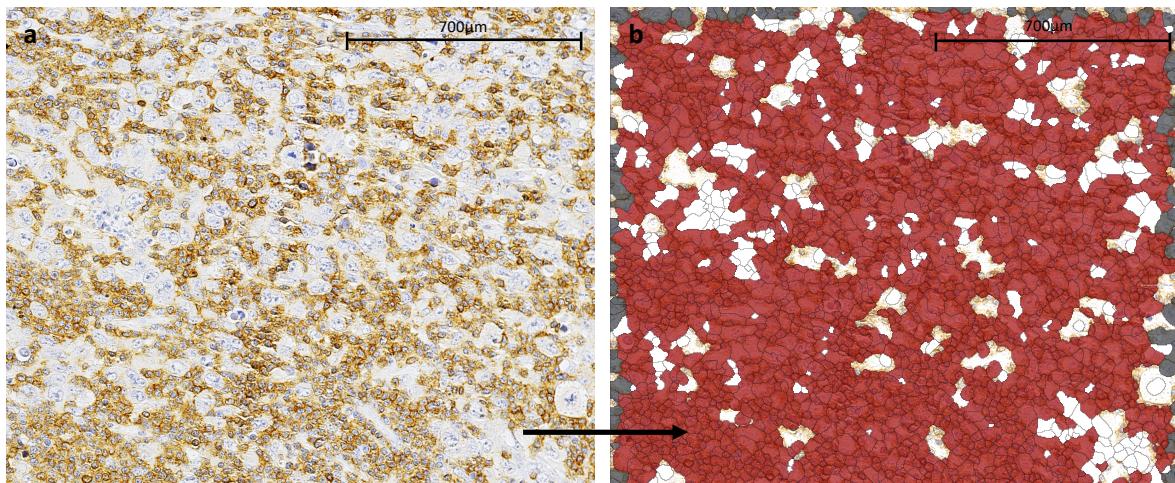


Abbildung 3 Schritt 3 der digitalen Bildanalyse

Individualisierte Detektion immunhistochemisch pos. Zellen und neg. Zellen unter Anpassung verschiedener Schwellenwerte. **a** Ausschnitt eines für CD3 gefärbten Lymphomschnittes.

b Overlay mit roter (pos.) und weißer (neg.) Farbe nach Detektion. Angeschnittene Zellen am Rand wurden von der Analyse automatisch ausgeschlossen (grau), um Doppelungen zu vermeiden.

Der T- und B-Zellgehalt wurde dann nach der automatisierten Analyse des gesamten Schnittes (*Default Export*) durch die Software sowohl als absoluter als auch als prozentualer CD3 pos. beziehungsweise CD20 pos. Anteil an Zellen von allen detektierten Zellen angegeben. Diese Auswahl an Analyseschritten für die Berechnung der für CD3 und für CD20 gefärbten Schnitte war von einem ehemaligen Mitarbeiter des Institutes bereits erfolgt, welcher die Auswertung der ersten für CD20 gefärbten Schnitte vorgenommen hatte (Jachimowicz et al., 2020).

2.5.2 Gehalt von Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen und Makrophagen

Die zellbasierte Detektion war bei den CD30 und CD68 Färbungen nicht möglich. HRSC waren häufig unregelmäßig groß und heterogen angefärbt, wodurch das Programm nur unzuverlässig die einzelnen Zellen erkannte. Makrophagen lagen häufig dicht beieinander und wiesen ebenfalls nicht immer konstante Färbeintensitäten der Membran auf. Daher wurden für die Erfassung des Gehaltes an HRSC die IHC pos. Fläche der für CD30 gefärbten Schnitte, für die Erfassung des Gehaltes an Makrophagen entsprechend für CD68 gefärbten Schnitte berechnet. Hierzu wurde je Schnitt ein individueller Intensitätsgrenzwert für die IHC Färbung von 0,02 – 0,32 von 2 und die Mindestgröße des zusammenhängenden IHC Areals auf 40-60 μm^2 festgelegt (*Marker Area Detection*) (Abbildung 4).

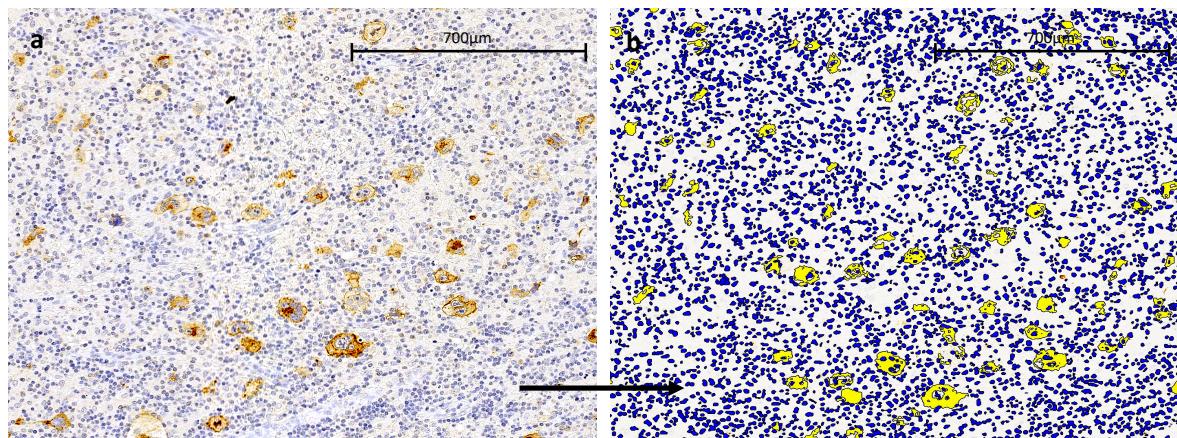


Abbildung 4 Schritt 3 der digitalen Bildanalyse

Individualisierte Detektion immunhistochemisch pos. Fläche unter Anpassung verschiedener Schwellenwerte. **a** Ausschnitt eines für CD30 gefärbten Lymphomschnittes. **b** Overlay mit gelb zur Darstellung immunhistochemisch pos. Fläche. Mit blau markiert sind detektierte Zellkerne.

Mit diesen Einstellungen erfolgte dann eine automatisierte Analyse des gesamten Schnittes (*Default Export*), die den Gehalt an HRSC- beziehungsweise der Makrophagen sowohl als prozentualen als auch als absoluten IHC pos. Flächenanteil in μm^2 der insgesamt analysierten Gewebefläche berechnete. Der Analyseweg im Bildbearbeitungsprogramm für die Berechnungen der für CD68 gefärbten Schnitte wurde von einem ehemaligen Mitarbeiter des Instituts bereits im Vorfeld bei der Auswertung für die CD68 Auswertung aufgestellt und für die CD30 Auswertung übernommen.

Für die Berechnungen der für CD20 und für CD3 gefärbten Schnitte wurden jeweils die gesamte Zellzahl des Schnittes (All Cells), die Kernzahl (All nucleus) und die entsprechenden IHC pos. pos. Zellen (IHC positiv cells) von der Software ausgegeben. Für die anti-CD30 und anti-CD68 gefärbten Schnitte konnte nur der Parameter Kernzahl (All nucleus) und IHC pos. Fläche (Marker Area) von der Software erhoben werden. Um alle vier Färbungen untereinander vergleichbar machen zu können, wurde daher für die CD30 und CD68 Berechnungen hypothetisch der Wert „gesamte Zellzahl“ ermittelt.

Um zunächst von dem errechneten IHC pos. Flächenanteil auf den Anteil der IHC pos. Zellen im Gewebe des Schnittes zu schließen, erfolgte nach den Analysen an zehn repräsentativen Schnitten der Kohorte zunächst eine Erfassung der Zellgröße von HRSC und Makrophagen vorgenommen.

Dafür wurden die IHC gefärbten Schnitte unter dem Axiophot Photomikroskop (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland) betrachtet und in 400x Vergrößerung repräsentative Fotos aufgenommen. In diesem Bild erfolgte dann die Markierung aller sichtbaren HRSC beziehungsweise Makrophagen im Programm MS Paint (Microsoft Corporation, Redmond, USA) mit einem Kreuz und die manuelle Auszählung. Gleichzeitig wurde dasselbe Bild mit den oben beschriebenen Einstellungen in Definiens TissueStudio (Definiens AG, München, Deutschland) analysiert. Die von der Bildanalyse detektierte CD30 pos. bzw. CD68 pos. Fläche in μm^2 wurde dann durch die Anzahl der manuell gezählten Zellen geteilt, um auf die mit Definiens TissueStudio (Definiens AG, München, Deutschland) detektierte Größe einer einzelnen HRS-Zelle und eines einzelnen Makrophagen zu schließen. Durch die Erhebung des arithmetischen Mittelwertes der zehn untersuchten Schnitte ließ sich die durchschnittliche Größe einer HRS-Zelle und eines Makrophagen in unseren Untersuchungen annähernd mit 167,6 μm^2 (HRSC) und 127,3 μm^2 (Makrophage) beschreiben. Als Richtwert für die Gesamtzellzahl in den jeweiligen Schnitten wurde die detektierte Gesamtkernzahl genutzt. Entsprechend wurde der Anteil an Makrophagen beziehungsweise HRSC als „(errechnete Anzahl an Zellen/Alle Kerne) * 100“ in die entsprechende und mit den anderen Ergebnissen vergleichbare Prozentzahl umgewandelt.

2.6 Messvariabilität

Um zu überprüfen, wie hoch die Messvariabilität bei der beschriebenen Untersuchungsmethode war, wurden 15 Schnitte mit gleichem Scan und Einstellungen und 20 Schnitte mit neuem Scan und neuen Einstellungen für die für CD20 gefärbten Schnitte (Interobservervariabilität) und je 10 Schnitte mit neuen Einstellungen für die für CD3 und CD30 gefärbten Schnitte (Intraobservervariabilität) ein zweites Mal analysiert.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der bei der Bildanalyse erhobenen Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism (Graph Pad Software Inc., San Diego, USA). Als Grenzwert für Signifikanz wurde ein $p \leq 0,05$ festgelegt.

Zur Analyse der Eignung der digitalen Bildanalyse zur Erfassung des TME wurden die oben beschriebenen Daten nach Pearson korreliert. Um die Zusammensetzung des TME im cHL zu beschreiben, wurden deskriptive Statistiken wie Durchschnitt, Standardabweichung und 95%-Konfidenzintervall (CI 95%) berechnet. Beobachtete Unterschiede zwischen den Subtypen wurden mittels zweiseitigen t-Testungen auf Signifikanz geprüft.

Darüber hinaus erfolgte eine Auswertung der Studiendaten der Patienten/-innen und der von uns erstellten Daten mit der Software SAS 9.4 (SAS Institute Inc., North Carolina, USA) von der GHSG. Ziel war es, den Einfluss der Zusammensetzung des Tumormikromilieus auf den klinischen Verlauf zu untersuchen. Dafür wurde zunächst eine Normalisierung der Daten durch eine Log2-Transformation vorgenommen. Um den Gehalt an CD20 pos., CD3 pos., CD30 pos. und CD68 pos. Zellen zwischen Patienten/-innen mit PFS und solchen ohne PFS zu vergleichen, wurden wiederum zweiseitige t-Testungen durchgeführt. Mit Kaplan-Meier-Kurven wurde das Überleben der Patienten/-innen unter Verwendung eines log-rank-Tests visualisiert. Für verschiedene Risikogruppen wurden Hazard ratios mit Hilfe des Cox-Hazard-Regressionsmodell errechnet. Zur Findung eines optimalen cut-off-Wertes für einen potentiellen Biomarker wurde eine receiver operating characteristic (ROC) Analyse zwischen Zellgehalt und PFS durchgeführt (Jachimowicz et al., 2020).

3 Ergebnisse

3.1 Bewertung der digitalen Bildanalyse als Methode zur Zellquantifizierung

3.1.1 Objektivität und Reliabilität der Methode

Für die Überprüfung der Interobservervariabilität und damit der Reproduzierbarkeit und Objektivität der angewandten Methode wurden Schnitte, die bereits von einem anderen Mitarbeiter des Instituts ausgewertet waren, erneut auf ihren Anteil an CD20 pos. Zellen getestet. In der ersten Testreihe wurde dabei der gleiche Scan mit den gleichen Einstellungen erneut analysiert. In der zweiten Testreihe wurden neue Scans angefertigt und sowohl die Auswahl der zu analysierenden Bereiche als auch die Grenzwerte zu Detektion der IHC Färbung ohne Kenntnis der ersten Einstellungen neu gewählt. Bei gleichem Scan und gleichen Einstellungen betrug die Korrelation nach Pearson $r=0,996$ ($p<0,0001$, $n=15$) (Abbildung 5a), bei einem neuen Scan und neuen Einstellungen für den IHC Grenzwert und der zu analysierenden Bereiche betrug die Korrelation nach Pearson $r=0,936$ ($p<0,0001$, $n=20$) (Abbildung 5b).

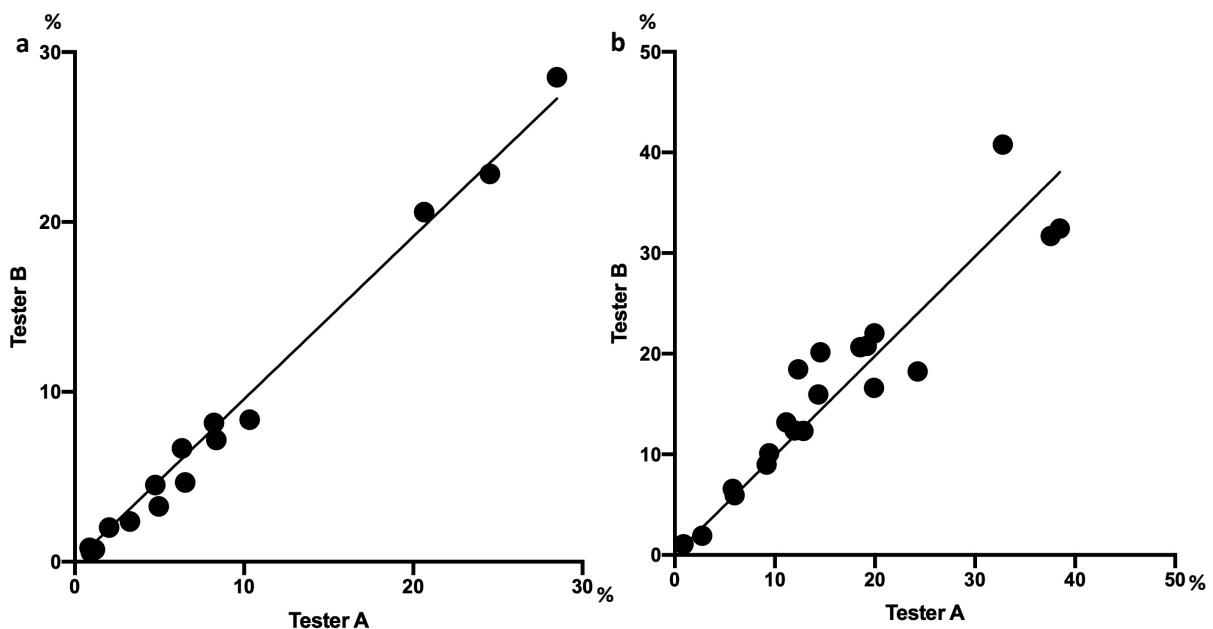


Abbildung 5 a Interobservervariabilität bei gleichem Scan und gleichen Einstellungen.

Ein Punkt entspricht den jeweiligen detektierten Anteilen an CD20 pos. Zellen der Tester ($n=15$), Pearson $r=0,996$, $p<0,001$. **b** Interobservervariabilität bei neuem Scan und neuen Einstellungen.

Ein Punkt entspricht den jeweiligen detektierten Anteilen an CD20 pos. Zellen der Tester ($n=20$), Pearson $r=0,936$, $p<0,0001$.

Zur Prüfung der Intraobservervariabilität und damit Reliabilität wurden jeweils 10 Schnitte gefärbt für CD30 und CD3 ohne Kenntnis der zuvor gewählten Einstellungen für die zu analysierenden Bereiche und den IHC Grenzwert nach einem halben Jahr erneut ausgewertet. Hier betrug die Korrelation für die getesteten Schnitte bei CD30 nach Pearson $r=0,983$ ($p<0,001$, $n=10$) (Abbildung 6a) und bei CD3 nach Pearson $r=0,908$ ($p=0,0003$, $n=10$) (Abbildung 6b).

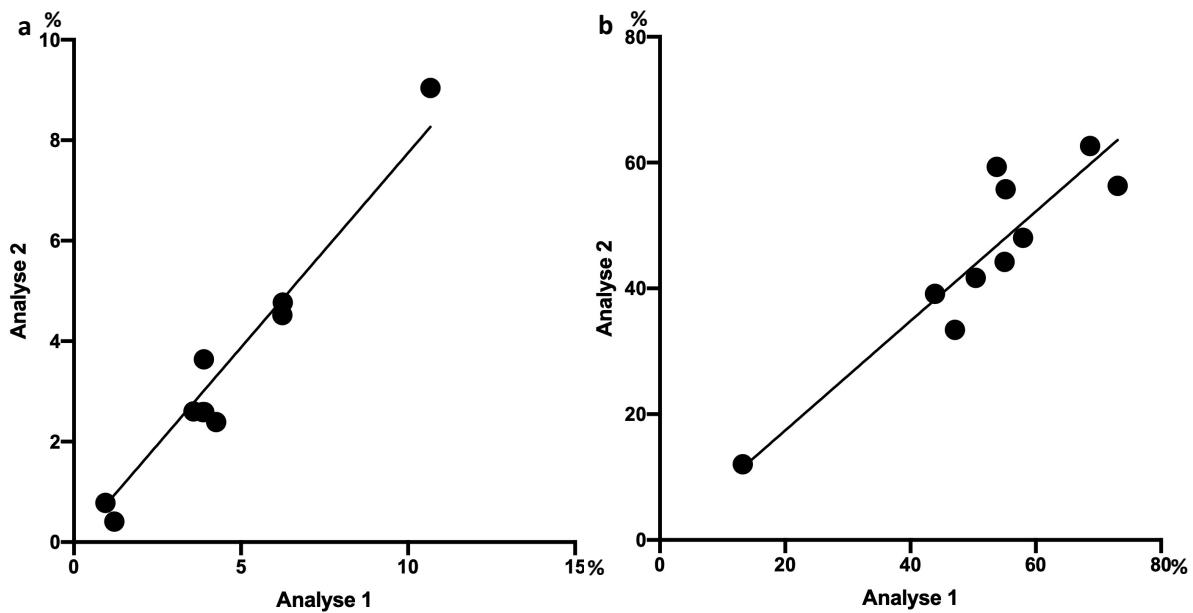


Abbildung 6 a Intraobservervariabilität bei den CD30-Analysen. Ein Punkt entspricht den jeweiligen detektierten Anteilen an CD30 pos. Fläche in den beiden Analysen ($n=10$), Pearson $r=0,983$, $p<0,001$. **b** Intraobservervariabilität bei den CD3-Analysen. Ein Punkt entspricht den jeweiligen detektierten Anteilen an CD3 pos. Zellen in den beiden Analysen ($n=10$), Pearson $r=0,908$, $p=0,0003$.

3.1.2 Genauigkeit der Erfassung von Folgeschnitten

Um eine möglichst valide Aussage über die Zellzusammensetzung an einer definierten Stelle des Lymphoms zu machen, wurden ausschließlich Folgeschnitte eines cHL Präparates angefertigt, gefärbt und analysiert. Zur Prüfung der damit erreichten jeweiligen Vergleichbarkeit dieser Folgeschnitte wurden für CD20 und CD3 die Anzahl der gesamten detektierten Zellen, für CD68 und CD30 die Anzahl der detektierten Kerne korreliert. Diese Werte waren unabhängig von der IHC Färbung. Die Gesamtanzahl der Zellen korrelierte in den für CD20 und CD3 gefärbten Schnitten nach Pearson mit $r=0,923$ ($p<0,001$, $n=387$) (Abbildung 7a), die Gesamtanzahl der Kerne in den für CD68 und CD30 gefärbten Schnitten korrelierte nach Pearson mit $r=0,909$ ($p<0,0001$, $n=387$) (Abbildung 7b).

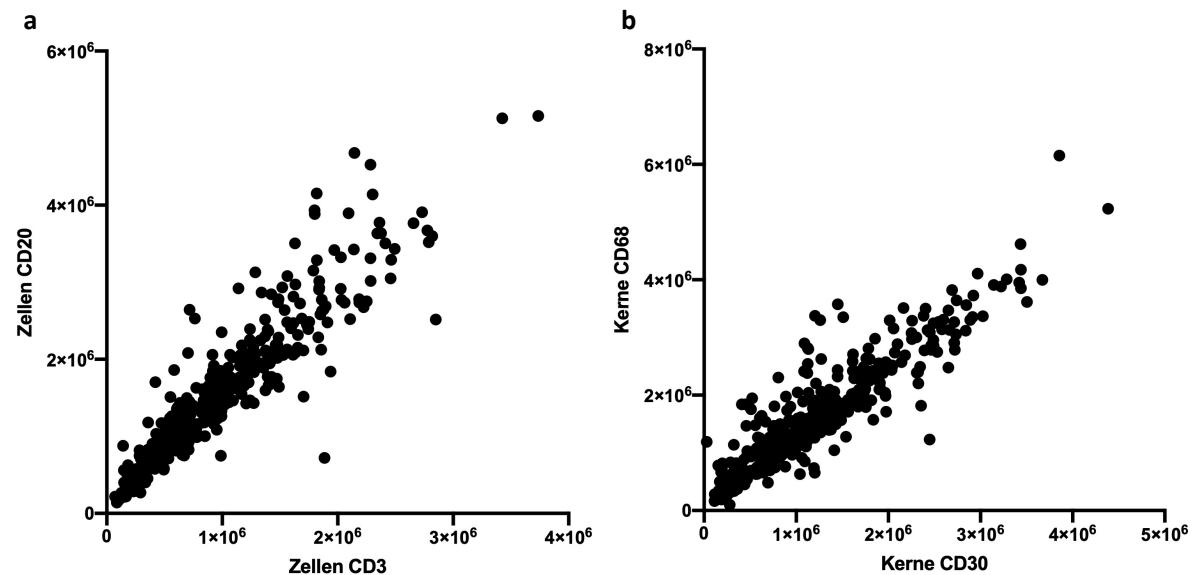


Abbildung 7 a Korrelation der Gesamtzellzahl der Folgeschnitte (gefärbt für CD3 und CD20). Ein Punkt entspricht dabei der jeweils detektierten Zellzahl einer Lymphomprobe ($n=387$), Pearson $r=0,923$, $p<0,001$. **b** Korrelation der Gesamt kernzahl der Folgeschnitte (gefärbt für CD30 und CD68). Ein Punkt entspricht dabei der jeweils detektierten Kernzahl einer Lymphomprobe ($n=387$), Pearson $r=0,909$, $p<0,0001$.

3.2 Quantifizierung des Tumormikromilieus im klassischen Hodgkin-Lymphom

3.2.1 Beschreibung des erfassten Tumormikromilieus

Um das TME möglichst umfassend zu quantifizieren, wurden die bereits vorhandenen Analysen zum B-Zell- und Makrophagengehalt um die Analysen zum T-Zell- und HRSC-Gehalt für ein Kollektiv von 387 Patienten/-innen ergänzt.

Im Durchschnitt konnte bei den für CD30 und CD68 gefärbten Schnitten $174734662 \mu\text{m}^2 = 1,747 \text{ cm}^2$ Präparat analysiert (Standardabweichung 124444677, KI 95%: 162297170; 187172153) und 1426084 Kerne (Standardabweichung 894654, KI 95%: 1336668; 1515499) detektiert werden. In den für CD3 und CD20 gefärbten Schnitten wurden durchschnittlich 1269569 Zellen (Standardabweichung 794084, KI 95%: 1190205; 1348932) detektiert.

Der Anteil an HRSC, gemessen als CD30 pos. Zellen, betrug dabei im Mittel 3,67% (Standardabweichung 3,95%, KI 95%: 3,27%; 4,06%), der Anteil an Makrophagen, gemessen als Anteil an CD68 pos. Zellen, 9,6% (Standardabweichung 6,25%, KI 95%: 8,98%; 10,23%).

Die als CD3 pos. gewerteten T-Zellen waren im Mittel mit 53,52% (Standardabweichung 19,98%; KI 95%: 51,52%; 55,51%) vertreten, die als CD20 pos. gewerteten B-Zellen mit 16,31% (Standardabweichung 13,73%; KI 95%: 14,94%; 17,68%). Abbildung 8 zeigt die deskriptive Statistik der Erfassung der vier Zellanteile als Graph mit Box-Whisker-Plots.

Rechnet man die erfassten prozentualen Anteile der vier Zellreihen zusammen, ergibt sich im Mittel eine Zuordnung von 83,1% Prozent der gesamten Zellen, die in den vier Folgeschnitten detektiert wurden. Die durchschnittliche prozentuale Verteilung der vier Zellarten sowie der nicht erfassten Zellen ist in Abbildung 9 in einem Kreisdiagramm dargestellt.

Für die Kontrollkohorte bestehend aus 147 Patienten/-innen der HD18 Studie wurde nur der Anteil an CD20 pos. Zellen (B-Zellen) erfasst. Die durchschnittlich erfasste Gesamzellzahl lag hier bei 1253204 Zellen, der Anteil an CD20 pos. Zellen betrug durchschnittlich 19,76% (Standardabweichung 15,63%; KI 95%: 17,21%; 22,3%).

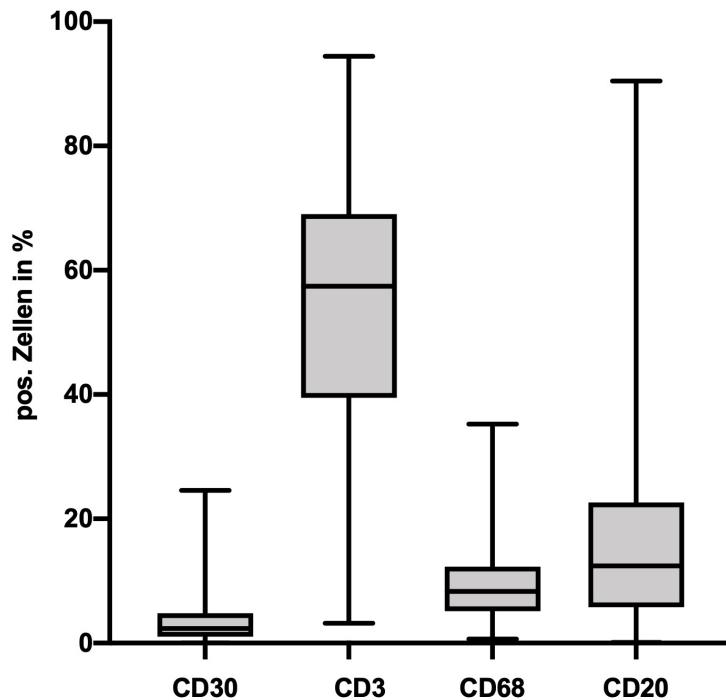


Abbildung 8 Darstellung der erfassten prozentualen Anteile immunhistochemisch pos. Zellen. Box-Whisker-Plots der vier untersuchten Färbungen: CD30 (Makrophagen), CD3 (T-Zellen), CD68 (Makrophagen), CD20 (B-Zellen). n=387, Mittelwert (horizontaler Strich), 95%-Konfidenzintervall (Box), maximaler und minimaler Wert (Ausläufer).

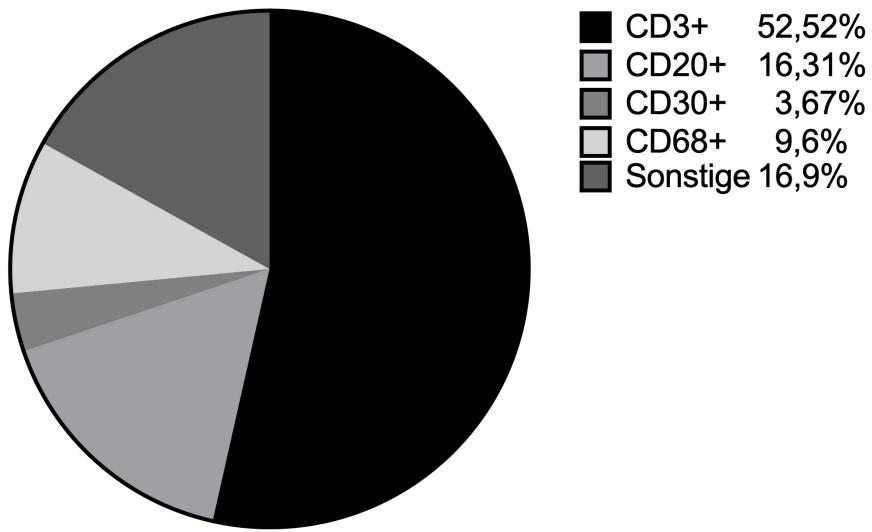


Abbildung 9 Darstellung der durchschnittlichen prozentualen Verteilung (Mittelwerte) der untersuchten Zellarten in einem Lymphompräparat. Kreisdiagramm: CD30 pos. (+) (Makrophagen), CD3 pos. (T-Zellen), CD68 pos. (Makrophagen), CD20 pos. (B-Zellen), Sonstige (nicht durch eine der vier immunhistochemischen Färbungen detektierte Zellen) (n=387).

3.2.2 Unterschiede des Tumormikromilieus zwischen den histologischen Subtypen des klassischen Hodgkin-Lymphoms

In der ersten Kohorte von 387 Patienten/-innen waren die verschiedenen cHL Subtypen in folgenden Anteilen vertreten: Noduläre Sklerose n=246 (63,57%), Mischtyp n=112 (28,94%), lymphozytenreiches cHL n=10 (2,58%), lymphozytenarmes cHL n=4 (1,03%); für n=15 (3,88%) wurde der Subtyp nicht klassifiziert (NOS). Betrachtet man die Zellzusammensetzung der vier erhobenen Zellarten getrennt in den Subtypen des cHL, so zeigten sich große Unterschiede. Der Subtyp lymphozytenreiches cHL zeigte den höchsten Anteil an Lymphozyten (CD3 und CD20 pos. Zellen), der Subtyp lymphozytenarmes cHL den geringsten. Makrophagen und HRSC waren am stärksten im lymphozytenarmen cHL vertreten, am geringsten im lymphozytenreichen cHL. Der höchste Anteil an nicht erfassten Zellen zeigte sich ebenfalls im lymphozytenarmen cHL, gefolgt vom Subtyp Noduläre Sklerose (Abbildung 10). Tabelle 5 zeigt die deskriptive Statistik zur Zellzusammensetzung in den verschiedenen Subtypen. Die beschriebenen Unterschiede in der Zellverteilung zwischen den Subtypen sind signifikant (Tabelle 6, zweiseitiger t-test).

Tabelle 5 Deskriptive Statistik der Zellerfassung in den verschiedenen Subtypen des klassischen Hodgkin Lymphoms

	Noduläre Sklerose	Mischtyp	Lymphozyten-reiches cHL	Lymphozyten-armes cHL
N*¹ (%)	246 (63,57%)	112 (28,94%)	10 (2,58%)	4 (1,03%)
Erfasste Zellen				
Mittelwert	1 290 336	1 499 982	2 049 304	1 011 676
Std* ³	802 437	882 555	1 081 093	730 915
Anteil CD3 pos. Zellen (T-Zellen)				
Mittelw. in %	49,63	63,01	59,38	28,63
Std in %	20,00	16,39	19,00	16,94
Anteil CD20 pos. Zellen (B-Zellen)				
Mittelw. in %	15,39	16,91	36,83	2,66
Std in %	13,84	12,09	12,25	2,45
Anteil CD30 pos. Zellen (HRSC*²)				
Mittelw. in	3,71	3,45	1,88	5,73
Std in %	3,96	3,80	1,81	2,55
Anteil CD68 pos. Zellen (Makrophagen)				
Mittelw. in %	9,38	10,12	5,76	15,47
Std in %	6,33	5,94	3,44	9,68
Gesamt- Erfassung in %	78,11	93,49	103,86	52,49

*¹ N = Anzahl

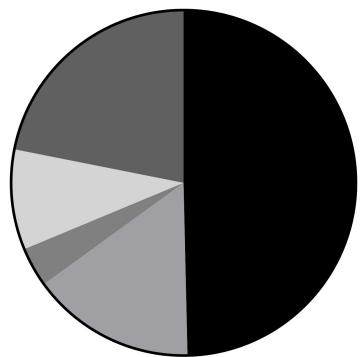
*² HRSC = Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen

*³ Std = Standardabweichung

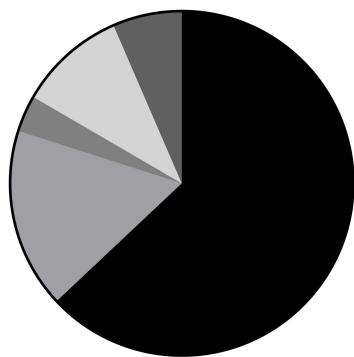
Tabelle 6 Testung der Signifikanz der Unterschiede zwischen dem Anteil der untersuchten Zellarten zwischen den verschiedenen Subtypen des klassischen Hodgkin Lymphoms

Untersuchter Datensatz	Subtypen mit signifikantem Unterschied und Mittelwerten	p-Wert
CD3 pos. (T-Zellen)	Mischtyp (63,01%) vs Noduläre Sklerose (49,63%)	<0,0001
	Lymphozytenarmes cHL (28,63%) vs Noduläre Sklerose (49,63%)	0,0379
	Lymphozytenarmes cHL (28,63%) vs Mischtyp (63,01%)	<0,0001
	Lymphozytenarmes (28,63%) vs Lymphozytenreiches cHL (59,38%)	0,0158
CD20 pos. (B-Zellen)	Lymphozytenreiches cHL (36,83%) vs Noduläre Sklerose (15,39%)	<0,0001
	Lymphozytenreiches cHL (36,83%) vs Mischtyp (16,91%)	<0,0001
	Lymphozytenarmes cHL (2,66%) vs Mischtyp (16,91%)	0,0207
	Lymphozytenarmes (2,66%) vs Lymphozytenreiches cHL (36,83%)	0,0002
CD30 pos. (HRSC^{*1})	Lymphozytenarmes (5,73%) vs Lymphozytenreiches cHL (1,88%)	0,0073
CD68 pos. (Makrophagen)	Lymphozytenarmes cHL (15,47%) vs Noduläre Sklerose (9,38%)	0,0059
	Lymphozytenreiches cHL (5,76%) vs Mischtyp (10,12%)	0,0243

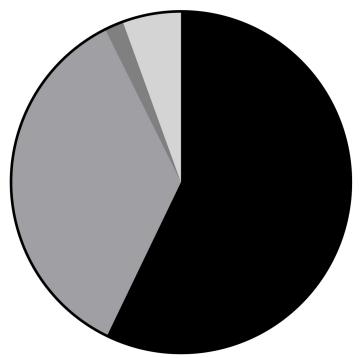
*¹ HRSC = Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen



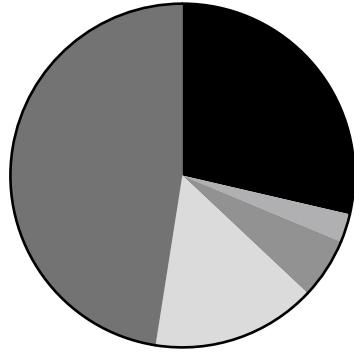
a Noduläre Sklerose (n=246)



b Mischtyp (n=112)



c Lymphozytenreiches cHL (n=10)



d Lymphozytenarmes cHL (n=4)

Legende für Abbildung 10 a-d:

- CD3 pos.(+): T-Zellen
- CD20 pos.(+): B-Zellen
- CD30 pos.(+): Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen
- CD68 pos.(+): Makrophagen
- Sonstige: Nicht erfasste Zellen

Abbildung 10 a-d Darstellung der durchschnittlich erfassten Zusammensetzung des Tumormikromilieus in den verschiedenen Subtypen des klassischen Hodgkin Lymphom (cHL). Kreisdiagramme der vier Subtypen: Verwendung der Mittelwerte der jeweiligen prozentualen Anteile an immunhistochemisch pos.(+) Zellen.

3.3 Korrelationen der verschiedenen erfassten Anteile der Zellarten

Für die Beantwortung der Frage, ob die Anteile der verschiedenen Zellarten untereinander korrelieren, wurde der Pearson Korrelationskoeffizient für die vier verschiedenen erfassten Anteile erhoben und auf Signifikanz getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt und in Abbildung 11 a-f wurde die entsprechende Korrelation zwischen dem Gehalt von je zwei Zellarten als Scatter Plot auf einem Graphen visualisiert. Ein mittlerer Effekt konnte zwischen dem Gehalt an CD68 und CD20 pos. Zellen (-0,304, $p<0,0001$) und ein sehr kleiner Effekt zwischen den übrigen erfassten Anteilen festgestellt werden.

Tabelle 7 Korrelation der Anteile der verschiedenen untersuchten Zellarten nach Pearson.
 CD20 pos. = B-Zellen; CD68 pos. = Makrophagen; CD3 pos. = T-Zellen; CD30 pos. = Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen

	CD30 pos. Zellen in %	CD3 pos. Zellen in %	CD68 pos. Zellen in %	CD20 pos. Zellen in %
CD30 pos. Zellen in %	1	-0,037 ($p=0,47$)	0,2 ($p<0,0001$)	-0,188 ($p=0,0002$)
CD3 pos. Zellen in %	-0,037 ($p=0,47$)	1	-0,111 ($p=0,03$)	0,254 ($p<0,0001$)
CD68 pos. Zellen in %	0,2 ($p<0,0001$)	-0,111 ($p=0,03$)	1	-0,304 ($p<0,0001$)
CD20 pos. Zellen in %	-0,188 ($p=0,0002$)	0,254 ($p<0,0001$)	-0,304 ($p<0,0001$)	1

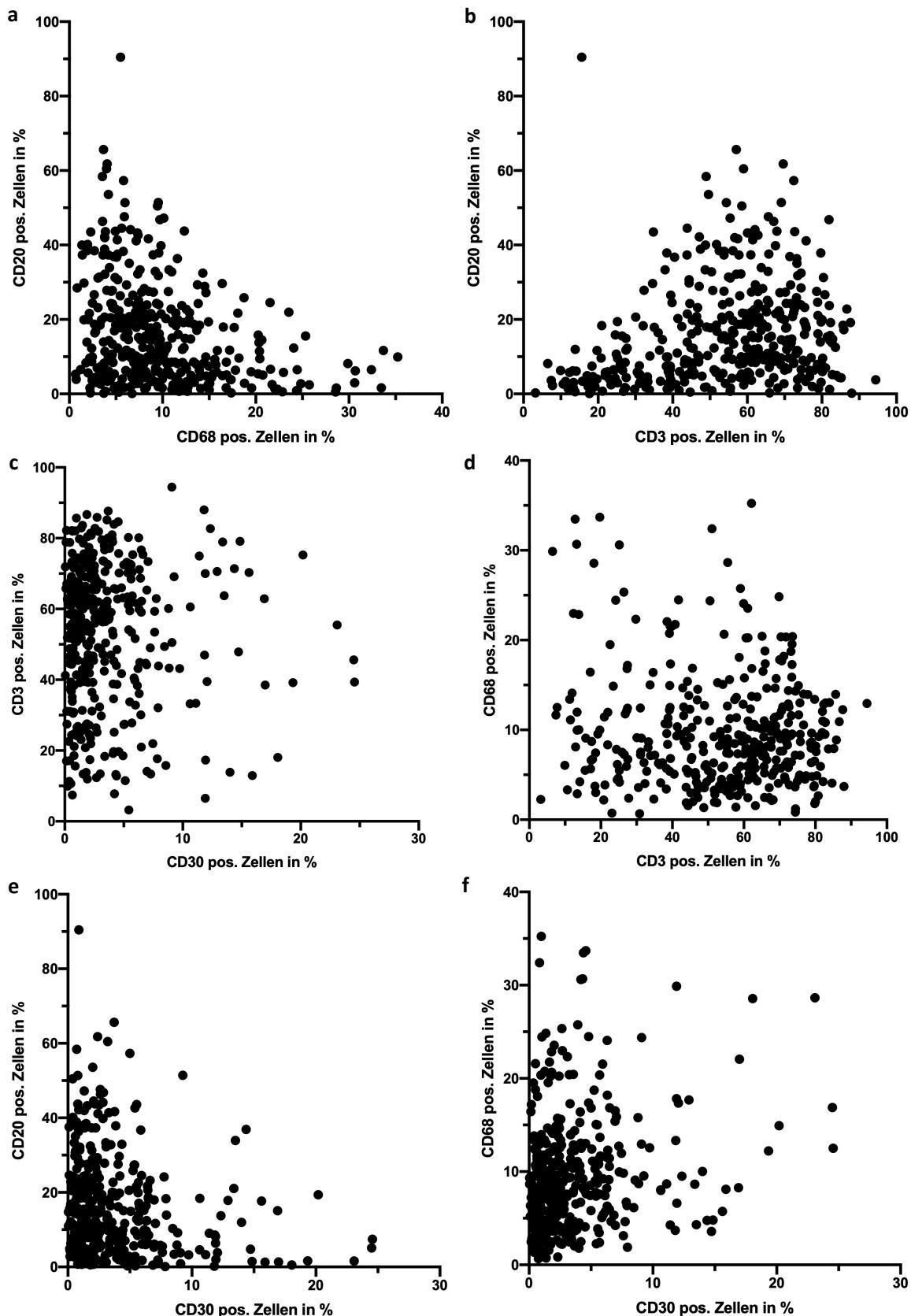


Abbildung 11 a-f Korrelation der Anteile von je zwei Zellarten in einem histologischen Schnitt.
 In den Scatter Plots entspricht ein Punkt dabei dem Anteil der der jeweiligen
 immunhistochemisch pos. Zellen in einer Lymphomprobe: CD20 pos. = B-Zellen; CD68 pos. =
 Makrophagen; CD3 pos. = T-Zellen; CD30 pos. = Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen.

3.4 Die Zusammensetzung des Tumormikromilieus als klinisch prognostischer Marker

Von der GHSG wurden die von uns erhobenen Daten gemeinsam mit den klinischen Daten aus den Studien ausgewertet, um einen Effekt des TME auf den klinischen Verlauf des cHL zu untersuchen.

Zunächst wurde getestet, ob die Anteile der CD20, CD3, CD30 und CD68 pos. Zellen zwischen Patienten/-innen mit kompletter Remission (CR) und solchen mit Erkrankungsprogress oder Rezidiv in einem zweiseitigen t-test sich signifikant unterscheiden.

Ein signifikanter Unterschied lag vor bei Betrachtung des Gehalts an B-Zellen, respektive Anteil an CD20 pos. Zellen. Bei Patienten/-innen in CR lag dieser Gehalt im Mittel bei 17,7%, bei solchen mit Progress oder Rezidiv bei 13,5% ($p=0,0079$). Bei der Analyse in den einzelnen Subtypen, welche in Tabelle 8 dargestellt ist, zeigte sich dieser Unterschied signifikant in den Subtypen Noduläre Sklerose ($p=0,0033$) und Mischtyp ($p=0,0064$). Für die restlichen Zellanteile konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe mit und der Gruppe ohne Progress oder Rezidiv festgestellt werden.

Tabelle 8 Vergleich des B-Zell-Gehalts (Anteil CD20 pos. Zellen) von Patienten/-innen mit progressionsfreiem Überleben und solchen mit Rezidiv oder Progress in den verschiedenen Subtypen des klassischen Hodgkin Lymphoms (cHL) (Jachimowicz et al., 2020)

Subtyp		N ^{*2}	Ø Anteil CD20 pos. Zellen	p-Wert
Alle	PFS ^{*3}	229	17,7 %	0,0079
	PFS failure ^{*3}	111	13,5%	
Mischtyp	PFS	70	19,5%	0,0064
	PFS failure	30	13,3%	
Noduläre Sklerose	PFS	145	16,9%	0,0033
	PFS failure	76	12,1%	
Lymphozytenarmes cHL	PFS	3	2,4%	>0,05
	PFS failure	1	5,5%	
Lymphozytenreiches cHL	PFS	6	32,2%	>0,05
	PFS failure	3	55,7%	

*¹Std. = Standardabweichung

*²N = Anzahl

*³PFS = progression free survival (progressionsfreies Überleben); PFS failure = kein progressionsfreies Überleben

Um den beobachteten signifikanten Unterschied im B-Zell-Gehalt zwischen den Gruppen mit und ohne Krankheitsprogress oder Rezidiv noch näher zu untersuchen, wurde das Verfahren einer ROC-Analyse angewandt. Ziel einer solchen Analyse ist es, einen bestmöglichen cut-off Wert eines Parameters, in diesem Fall der CD20 pos. Zell- bzw. B-Zell-Gehalt in Prozent, zu finden, der es ermöglicht, einen zweiten Parameter, in diesem Fall das PFS, vorherzusagen.

Das Ergebnis dieser ROC-Analyse war ein cut-off Wert für den B-Zell-Gehalt von 21%.

Patienten/-innen, die einen entsprechenden Anteil an CD20 pos. Zellen >21% hatten, hatten ein signifikant längeres PFS also solche mit einem Anteil $\leq 21\%$ (ROC estimate chance = 0,00959, $p<0,0001$). Dieser cut-off-Wert findet in Abbildung 12 Berücksichtigung, in der das PFS dieser zwei Gruppen gegen die Zeit in einer Kaplan-Meier-Kurve aufgetragen wurde.

Dabei wurde das Risiko für ein Ende des PFS in einem Cox-Hazard-Regressionsmodell miteinander verglichen. In diesem Modell hatten Patienten/-innen mit einem B-Zell-Gehalt $\leq 21\%$ ein signifikant kürzeres PFS als solche mit einem B-Zell-Gehalt $>21\%$ ($p=0,0004$, hazard ratio = 2,479, 95%-KI: 1,479 – 4,157). Ebenso war das Gesamtüberleben von Patienten/-innen mit einem B-Zell-Gehalt $\leq 21\%$ signifikant niedriger ($p=0,04$, hazard ratio (HR) = 2,372, 95%-KI: 0,996 – 5,651).

Auch für die übrigen erhobenen Daten wurde das PFS noch einmal für Patienten/-innen mit einem Anteil IHC pos. Zellen jeweils über und unter dem entsprechenden Durchschnittswert analysiert und in Kaplan-Meier-Kurven aufgetragen. Hier zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen (Jachimowicz et al., 2020).

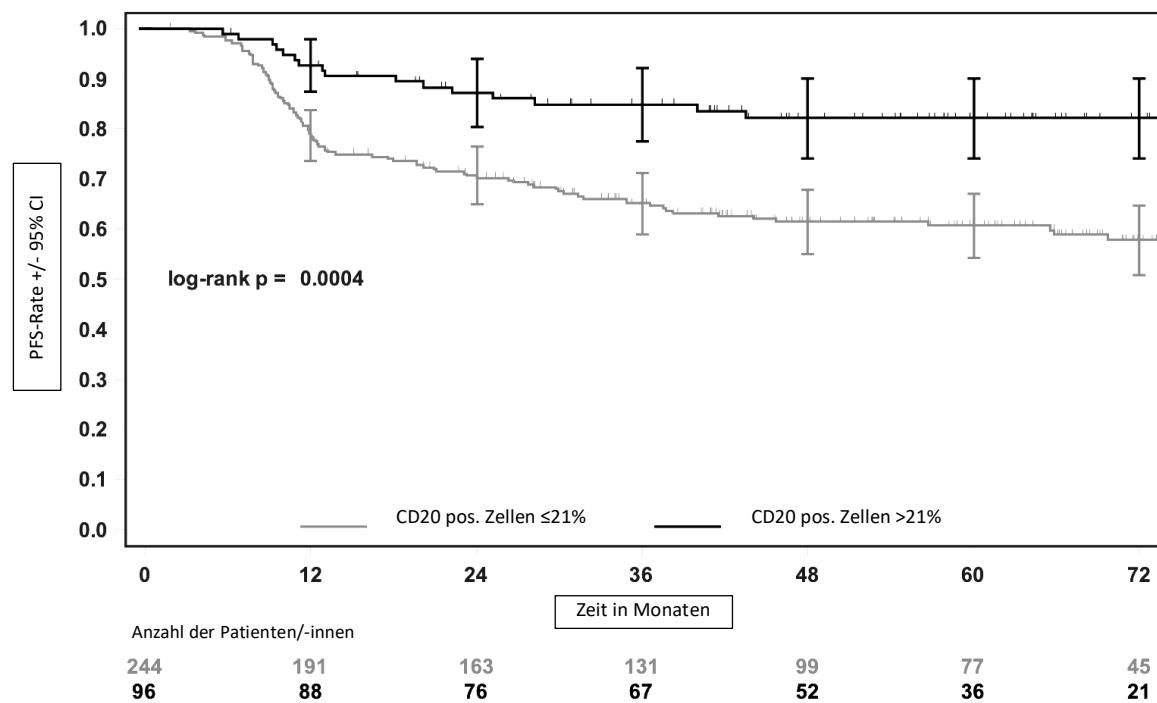


Abbildung 12 Progressionsfreies Überleben (PFS) von Patienten/-innen mit einem CD20 pos. Zellgehalt (B-Zellen) von >21% bzw. ≤21%. Patienten/-innen mit einem niedrigen Anteil an B-Zellen haben ein signifikant ($p=0,0004$) kürzeres PFS (Jachimowicz et al., 2020). Darstellung als Kaplan-Meier-Kurve, cut-off-Wert von 21% wurde in einer ROC-Analyse ermittelt ($n=340$).

3.4.1 Validierung der CD20-Daten

Um diese Ergebnisse zum prognostischen Wert des mit der digitalen Bildanalyse erfassten B-Zell-Anteils zu validieren, erfolgte die Untersuchung einer zweiten, unabhängigen Kohorte aus 190 Patienten/-innen der HD18 Studie. Mit der gleichen Methode wurden die Schnitte auf ihren Anteil an CD20 pos. Zellen hin ausgewertet und die erhobenen Daten mit den klinischen Parametern der Patienten/-innen verglichen. Hierzu wurde das Kollektiv auf wiederum 147 Patienten/-innen verkleinert, deren Zusammensetzung der Primärkohorte entsprach (Tabelle 6). Hier war der B-Zell-Gehalt ebenfalls niedriger in der Gruppe, die einen Progress oder ein Rezidiv erlitt (16,4% zu 21,5%, $p = 0,0616$). Auch hier wurde eine ROC-Analyse zur Findung eines optimalen cut-off-Wertes durchgeführt, dieser lag diesmal bei einem Gehalt von CD20 pos. $\leq 10\%$ (Abbildung 13). Das PFS und das OS in den sich ergebenden Gruppen, aufgetragen in einer Kaplan-Meier-Kurve, waren wiederum signifikant geringer in der Kohorte mit dem niedrigeren B-Zell-Gehalt, was den Beobachtungen in der Primärkohorte entsprach (PFS: $p=0,02$, HR= 1,981, 95%-KI: 1,104 – 3,557; OS: $p=0,01$, HR= 3,598, 95%-KI: 1,205 – 10,739) (Jachimowicz et al., 2020).

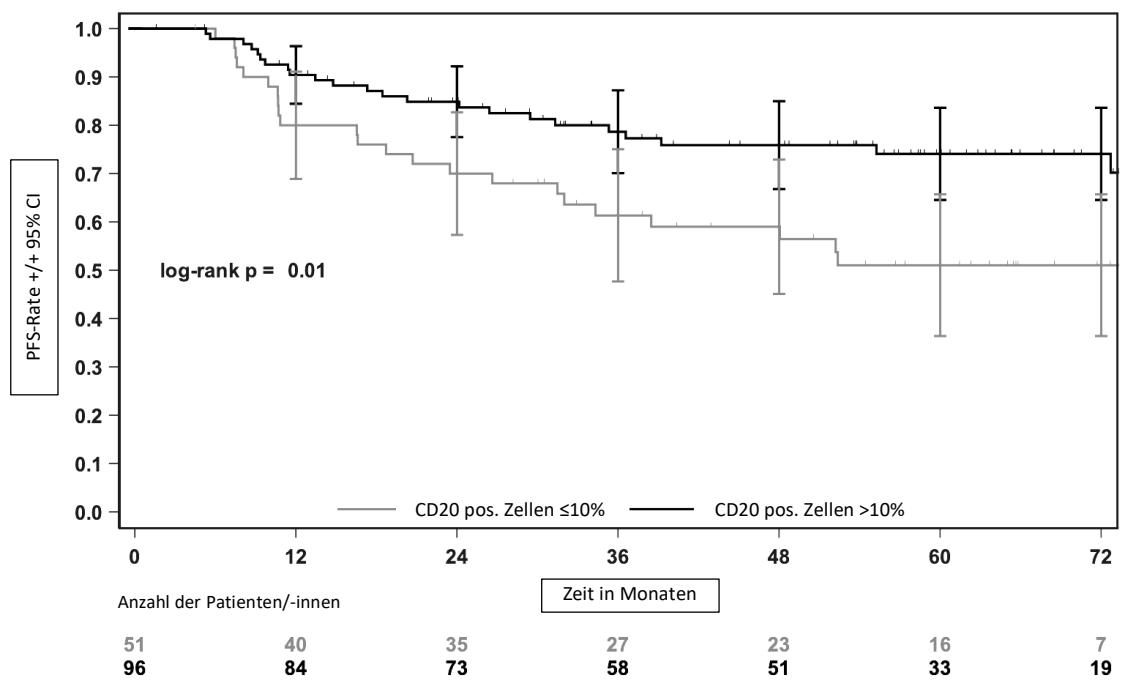


Abbildung 13 Darstellung des progressionsfreien Überlebens (PFS) der Patienten/-innen in der Validierungskohorte mit einem CD20 pos. Zellgehalt (B-Zellen) von $>10\%$ bzw. $\leq 10\%$. Patienten/-innen mit einem niedrigen B-Zellgehalt haben ein signifikant ($p=0,01$) kürzeres PFS (Jachimowicz et al., 2020). Kaplan-Meier-Kurve, $n=147$, cut-off-Wert wurde in ROC-Analyse ermittelt.

4 Diskussion

4.1 Einführung

Das cHL ist dank moderner Polychemo- und Radiotherapien eine Lymphomentität mit exzellenter Prognose (Steidl et al., 2011). Dennoch bleibt noch immer ein Teil der Patienten/-innen therapierefraktär oder erleidet früh ein Rezidiv und hat eine deutlich schlechtere Prognose. Es ist noch weitgehend unklar, welche Erkrankten dafür prädisponiert sind. Ebenso problematisch ist, dass die intensiven Therapien nicht ohne Langzeitfolgen wie Infertilität oder Zweitmalignom bleiben. Es ist in den einzelnen Stadien ungewiss, welche Patienten/-innen von den sehr intensiven Therapien profitieren und welche vielleicht auch mit einem weniger aggressiven Regime in Langzeitremission gebracht werden könnten. Aus diesem Grund liegt ein Fokus der aktuellen Forschung und auch der vorliegenden Arbeit auf der Suche nach zuverlässigen und praktikablen Biomarkern, die es ermöglichen, eine optimale Risikostratifizierung für die Patienten/-innen durchzuführen und ihnen so adaptierte Therapien zukommen zu lassen (Aoki & Steidl, 2018).

Die histologische Besonderheit des cHL besteht im Vergleich zu anderen Lymphomentitäten in der Ausprägung und der inter- und intratumoralen Heterogenität des entzündlichen Begleitinfiltates, dem TME, welches die wenigen neoplastischen HRSC umgibt (Steidl et al., 2011).

Mit Hilfe der digitalen Bildanalyse wurde in der vorliegenden Arbeit dieses TME an einem Kollektiv von knapp 400 Patienten/-innen der GHSG hinsichtlich des Gehalts an CD30 und CD3 pos. Zellen quantifiziert und mit den bereits vorliegenden Daten zum Gehalt an CD20 und CD68 pos. Zellen ein Überblick über die Zusammensetzung des TME gegeben. Die GHSG verglich anschließend die erhobenen Werte mit den klinischen Daten der Patienten/-innen. Ziel dieser Arbeit war es, damit ein umfassendes Bild über die Zusammensetzung TME zu erlangen und zu prüfen, ob sich die individuelle Zusammensetzung als praktikabler Biomarker eignen könnte.

4.2 Digitale Bildanalyse von Ganzschnitten – eine geeignete Methode zur Zellquantifizierung an histologischen Schnitten

Die hier verwendete digitale Bildanalyse von Ganzschnitten ist eine neue Methode zur Quantifizierung von Zellen an histologischen Schnitten. Mit ihr soll es gelingen, gleich zwei Probleme, die in Studien mit manueller Auszählung von IHC gefärbten Schnitten auftreten, zu überwinden (Aeffner et al., 2019). Erstens werden bei manuellen Auszählungen in den meisten Studien Gewebeausschnitte von nur etwa 1 mm^2 ausgewertet und dabei häufig anstatt kontinuierlicher Variablen nur ordinal skalierte Scoring-Systeme, z.B. von 0-3 unter subjektiver Einschätzung der prozentualen Anteile (z.B. 0 = 0-25%, 1 = 26-50%, 2 = 51-75%, 3 = 76-100%), verwendet (Seidal et al., 2001, Webster & Dunstan, 2014). Bei der digitalen Bildanalyse von Ganzschnitten hingegen kann ein gesamter Schnitt sehr viel präziser erfasst werden. In der vorliegenden Arbeit wurden so im Durchschnitt $174 \text{ mm}^2 = 1,74 \text{ cm}^2$ Präparat ausgewertet, was der Erfassung von über 1 Mio. Zellen und damit etwa dem zweihundertfachen manueller Untersuchungen entspricht. Die Anteile der IHC pos. Zellen wurde dabei in Prozent mit 2 Nachkommastellen angegeben. Insbesondere für das cHL, bei dem das TME eine einzigartig ausgeprägte Heterogenität zeigt, ist es womöglich entscheidend, nicht nur einen kleinen Teil eines Schnittes zu scoren, sondern möglichst viele, verschieden zusammengesetzte Bereiche möglichst genau zu erfassen. Durch die automatisierte Auswertung war es möglich, eine sehr viel größere Kohorte zu analysieren, als es bei den meisten vergleichbaren IHC Studien mit manueller oder semiquantitativer Erfassung möglich war. Einzig in der Arbeit von Hollander et al. wurden noch mehr Proben ($n=459$) untersucht, allerdings wurden dort nur HPF von $<1\text{mm}^2$ unter Verwendung von Scoring-Systemen ausgewertet (Hollander et al., 2018). Das zweite Problem der manuellen Auszählung ist die fehlende Reproduzierbarkeit. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die digitale Bildanalyse der manuellen Auszählung bezüglich der Reliabilität und Objektivität weit überlegen ist (Taylor & Levenson, 2006, Webster & Dunstan, 2014). Die Reproduzierbarkeit konnte in der vorliegenden Arbeit mit hohen Inter- und Intraobserverkorrelationen von Pearson $r=0,908$ bis $r=0,996$ bestätigt werden. Auch die Tatsache, dass die Zell- beziehungsweise Kernanzahl in den Folgeschnitten mit Pearson $r=0,92$ und $r=0,909$ korrelierte, unterstützt dies. Die Reproduzierbarkeit lässt sich durch die Verwendung von nahezu standardisierten Algorithmen erklären. In einer digitalen

Bildanalyse müssen nur sehr wenige Entscheidungen zur Detektion von Zellen getroffen werden – zum Beispiel ab welcher Größe eine Zelle als einzelne Zelle bewertet werden soll. Solche Entscheidungen sind zwar ebenfalls subjektiv, aber weniger anfällig für Fehler durch Übermüdung und Tagesform, da sie in der Regel nur einmal für alle in der Studie verwendeten Schnitte getroffen werden müssen. Sie wirken sich daher auch nicht auf den Vergleich der Proben untereinander aus (Webster & Dunstan, 2014). Anzumerken ist, dass die Reproduzierbarkeit in dieser Arbeit zu einem Teil auch auf die automatisierte Färbemethode, aufbereitet nach einem standardisierten Protokoll in einem einzigen Labor, zurückzuführen ist. In der Literatur wird beschrieben, dass sowohl die initiale Probenbehandlung als auch der Prozess der IHC Färbung die Gefahr einer sehr hohen Variabilität im Färbeergebnis und damit auch der folgenden quantitativen digitalen Auswertung mit sich bringt – diese Variabilität wurde für diese Arbeit zuvor minimiert (Seidal et al., 2001, Taylor & Levenson, 2006, Webster & Dunstan, 2014).

Verglichen mit dem Verfahren der Genexpressionsanalyse, welches ebenfalls große Gewebsbereiche erfassen und an großen Kohorten angewendet werden kann, weist die digitale Bildanalyse weitere Vorteile auf. Zu Beginn jeder Analyse kann manuell eingestellt werden, welche Gewebeteile analysiert werden sollen. Es wurde so vermieden, dass zum Beispiel Fett- oder Bindegewebe, welches die diagnostische Lymphomprobe umschließt, in die Analyse eingeschlossen wurde. Auch solche Lymphomteile, die nekrotisch oder anderweitig beschädigt waren, konnten von der Quantifizierung ausgeschlossen werden. Weiterhin ist die digitale Bildanalyse verglichen mit Genexpressionsanalysen unabhängig von der relativen Genexpression pro Zelle. Ohne Validierung durch Untersuchung von IHC Präparaten bleibt bei Genexpressionsanalysen zunächst auch immer unklar, ob erhöhte RNA-Level bestimmter Gene letztlich auch zur erhöhten Expression von entsprechend spezifischen Proteinen in den einzelnen Zellen führen (Scott & Steidl, 2014). Zur Beantwortung der Frage nach der aktuellen Zellkomposition eines Lymphomschnittes ist eine digitale Bildanalyse daher womöglich besser geeignet (Jachimowicz et al., 2020). Jedoch treten auch bei der digitalen Bildanalyse kritische Faktoren auf. Mittlerweile gibt es verschiedenste Anbieter und Softwarelösungen, die eine digitale Quantifizierung von Zellen an histologischen Schnitten ermöglichen sollen. Die Ergebnisse verschiedener Software sind, Stand heute, nur bedingt vergleichbar. Bisher gibt es nur wenige Studien darüber, inwieweit sich die Ergebnisse vergleichbarer Präparate, welche mit verschiedener Software

ausgewertet wurden, unterscheiden (Tadrous, 2010). Selbst innerhalb einer Software ist es problematisch, dass die Auswahl der Einstellungen mannigfaltig ist, was von Tadrous treffend als „inter-algorithm variation“ beschrieben wurde. Die Möglichkeiten reichen von der Auswahl der zu analysierenden Bereiche über die Festlegung einer Analysemethode (zell-, flächen- oder kernbasiert) bis hin zur Einstellung der finalen Detektionsgrenzen (Tadrous, 2010). Die von der Person vor dem Computer getroffenen subjektiven Entscheidungen werden in Algorithmen umgewandelt, welche zwar häufig exakt reproduzierbar sind, jedoch im Endergebnis nicht zwangsläufig als objektiv angesehen werden sollten, sondern vielmehr als eine codierte, nachvollziehbare Subjektivität (Tadrous, 2010). Diese Subjektivität ist jedoch weniger von Bedeutung für den Vergleich von Proben innerhalb einer Studie, sondern vielmehr ein Problem für die Implementierung von digitalen Bildanalysen im klinischen Alltag (Webster & Dunstan, 2014). Die in dieser Arbeit eingeschlossenen Auswertungen der für CD20 und CD68 gefärbten Schnitte, wurden beispielsweise von einem Mitarbeiter des Instituts bereits Monate zuvor vorgenommen. Um letztlich eine Gesamterfassung des TME in den zur Verfügung stehenden Präparaten zu erstellen und auch die verschiedenen Zellarten untereinander vergleichbar zu halten, wurden die Grundeinstellungen exakt übernommen, auch wenn sie subjektiv gesehen nicht dem Optimum dessen entsprachen, was an Analysegenauigkeit und Output mit der verwendeten Software möglich gewesen wäre. So wurde beispielsweise für die Erfassung der HRSC und der Makrophagen ein flächenbasiertes Verfahren, für die B- und T-Zellen hingegen ein zellbasiertes Verfahren gewählt. Es bleibt jedoch unklar, inwieweit eine anders gewählte Einstellung im Sinne einer „inter-algorithm variation“ (Tadrous, 2010) auch die Ergebnisse signifikant verändert hätte. Da jedes Analyseergebnis noch einmal optisch in Stichproben beurteilt und bei unzureichenden Einstellungen erneut mit anderen Detektionseinstellungen analysiert wurde, würden die Ergebnisse auch mit anderen Einstellungen vermutlich nicht stark differieren. Bei der Auswertung von IHC Präparaten ist auch zu bedenken, dass lediglich zwei Dimensionen erfasst werden können und eine andere Zellzusammensetzung an anderer Stelle des Lymphknotens nicht auszuschließen ist. Ein möglicher Ansatz zur Lösung dieses Problems ist die Stereologie und Multiplex-Bildanalyse. Diese Technik ist jedoch noch sehr zeitaufwendig und technisch anspruchsvoll und daher bei einer großen Kohorte, wie der hier vorliegenden, kaum anwendbar (Aeffner et al., 2019).

4.3 Umfassende Deskription des Tumormikromilieus im klassischen Hodgkin Lymphom

Die untersuchte und 387 Patienten/-innen umfassende Kohorte ist die größte uns bekannte Arbeit über cHL, in der histologische Ganzschnitte derartig detailliert und präzise bezüglich der Zusammensetzung des TME untersucht wurde.

Im Durchschnitt konnten etwa 80% aller detektierten Zellen in den Lymphomschnitten einer der vier untersuchten Zellarten zugeordnet werden. Wie in der Literatur beschrieben (Liu et al., 2014), war dabei die dominierende Zellpopulation in den Lymphomschnitten die der T-Zellen (CD3 pos. Zellen) und nur ein Bruchteil der Zellen waren neoplastische HRSC (CD30 pos. Zellen). Gemessen an den hohen Standardabweichungen von bis zu 20% zeigte sich bei allen vier Zellarten eine extrem hohe Variabilität, die die Heterogenität des TME widerspiegelt.

Für die von der WHO definierten Subtypen des cHL konnten genaue Angaben über die vier am häufigsten vorkommenden Zellarten generiert werden.

Der am häufigsten diagnostizierte cHL Subtyp ist Noduläre Sklerose, in unserer Kohorte mit 64% vertreten und in der Literatur mit etwa 70% Inzidenz für Industrieländer angegeben. Er ist definiert durch dicke, zellarme Fibrosebänder, die sich durch den betroffenen Lymphknoten ziehen und die zellreichen Gebiete in Knoten umschließen. Die übrigen Zellen des TME und auch die HRSC selbst finden sich in sehr variablen Anteilen wieder (Swerdlow et al., 2008). In den Erhebungen dieser Arbeit waren die Schnitte mit dem Subtyp Noduläre Sklerose deutlich zellärmer als die Schnitte der Subtypen Mischtyp und lymphozytenreiches cHL, was sich durch die vielen zellarmen Fibrosebänder der entsprechenden Präparate erklären lässt. Die Standardabweichungen, als Maß für die Variabilität der Zusammensetzung, für den Gehalt an B-Zellen, T-Zellen und HRSC, waren in diesem Subtyp am höchsten.

Die Inzidenz des zweithäufigsten Subtyp Mischtyp wird mit 20-25% angegeben und war in unserer Kohorte mit knapp 30% etwas häufiger vertreten. Er zeichnet sich durch ein zellreiches, inflammatorisches TME aus, welches die normale Lymphknotenarchitektur völlig verdrängt hat (Swerdlow et al., 2008, Eberle et al., 2009). In den analysierten Schnitten spiegelte sich das insbesondere in einem hohen Anteil an T-Zellen (63,01%) wider, der in keinem anderen Subtyp größer war.

Das lymphozytenreiche cHL wird in etwa 5% der Fälle diagnostiziert und lag in unserer Kohorte bei 2,58% der Patienten/-innen vor. Es ist definiert durch entweder noch intakt erscheinende Lymphfollikel, in denen HRSC nur am Rand der Mantelzone, nicht aber im Keimzentrum eines Lymphfollikels zu finden sind, oder sehr viel seltener durch eine diffuse von kleinen Lymphozyten geprägte Zellverteilung. Verglichen mit den anderen Subtypen hat das lymphozytenreiche cHL charakteristischerweise weniger nicht-lymphozytäre Immunzellen (Swerdlow et al., 2008, Eberle et al., 2009). Auch diese histologische Beschreibung konnte mit der digitalen Bildanalyse bestätigt werden. Verglichen mit den anderen Subtypen wurden sehr viel mehr Zellen pro Schnitt detektiert. Insbesondere der B-Zellgehalt war in den analysierten Fällen im Durchschnitt mehr als doppelt so hoch wie in den übrigen Subtypen. Ebenfalls bemerkenswert ist, dass der Anteil der HRSC mit nur 1,8% deutlich niedriger ausfiel (übrige Subtypen 3,7-5,7%) und auch die Makrophagen mit 5,76% (übrige Subtypen 9,38-15,47%) nur spärlich vertreten waren. Diese Beschreibungen bestätigen damit die Arbeit von Nam Cha et al., der die Zellzusammensetzung von lymphozytenreichen cHL in kleinen Ausschnitten sehr detailliert analysiert hat und zu dem Schluss kam, dass das TME im lymphozytenreichen cHL der Außenzone von Keimzentren reaktiver Lymphknoten ähnelt, gekennzeichnet von B-Zellansammlungen, die von einigen T-Zellen umrandet sind (Nam-Cha et al., 2009).

Das TME des sehr selten lymphozytenarmen cHL wird als eine relative Häufung an HRSC in einer lymphozytenarmen Umgebung beschrieben (Swerdlow et al., 2008, Eberle et al., 2009). In den vorliegenden vier Fällen war insbesondere die fast vollständige Abwesenheit von B-Zellen (2,8%) auffällig. Darüber hinaus waren die Makrophagen (15,73%) und HRSC (5,73%), verglichen mit den anderen Subtypen, ungewöhnlich stark vertreten.

All diese Ergebnisse zusammengenommen zeigen, dass die auf pathologischer Expertise beruhende Subtypisierung des cHL erstmals mit Hilfe der digitalen Bildanalyse von histologischen Ganzschnitten in einer sehr großen Kohorte quantifiziert und auch verifiziert werden konnte.

Die übrigen 20% der Zellen, die keiner der untersuchten Zellart zugeordnet werden konnten, beinhalteten vermutlich stromale Zellen sowie weitere Immunzellen, wie Plasmazellen und Eosinophile. Da auch deren Funktion im TME nicht unerheblich ist, wären auch hier Quantifizierungen durchaus interessant (Bussard et al., 2016, Varricchi et al., 2017).

4.4 Lineare Korrelationen sind unzureichend für die Beschreibung des Tumormikromilieus

Weiterhin wurde untersucht, ob der Anteil an Zellen der untersuchten Zellarten in einem bestimmten Zusammenhang zueinander steht. Ein nennenswerter Effekt konnte nur für den Zusammenhang zwischen B-Zellen und Makrophagen mit einem Korrelationskoeffizient von -0,304 ($p<0,0001$) zwischen dem Gehalt an CD20 pos. Zellen und CD68 pos. Zellen festgestellt werden. Das kann bedeuten, dass tendenziell mehr Makrophagen in einem Schnitt zu erwarten sind, je weniger B-Zellen vorhanden sind und umgekehrt. Da den B-Zellen überwiegend tumorsupprimierenden (Greaves et al., 2013b, Panico et al., 2015, Tudor et al., 2013) und den Makrophagen überwiegend tumorfördernde Eigenschaften zugesprochen werden (Guo et al., 2016), erscheint dieser Zusammenhang nachvollziehbar. Dennoch handelt es sich hierbei nur um eine Korrelation mittleren Effektes, die keine sichere Vorhersage erlaubt. Vermutlich ist das Zusammenspiel der einzelnen Zellreihen im TME des cHL sehr viel komplexer als ein linearer Zusammenhang es darzustellen vermag, insbesondere, da die vier Zellarten, die untersucht wurden, sich noch einmal in verschiedenste Untergruppen aufspalten.

4.5 Nutzen der Ganzschnittanalyse – B-Zellen als potentieller prognostischer Biomarker

Dank der Kooperation mit der GHSG konnten die umfangreichen klinischen Daten, die zu allen Patienten/-innen der vorliegenden Arbeit vorlagen, mit den entsprechenden Daten der digitalen Bildanalyse verglichen werden.

Das untersuchte erste Kollektiv wie auch das Validierungskollektiv setzten sich im Verhältnis 1:2 aus Patienten/-innen mit und ohne Rezidiv oder Erkrankungsprogress zusammen und sind damit als eine für Patienten/-innen mit schlechter Prognose stark angereicherte Kohorte anzusehen. Die randomisierten, prospektiven GHSG Studien, denen diese Patienten/-innen angehörten, waren allesamt speziell für cHL Patienten/-innen, die eine Erkrankung im fortgeschrittenen Stadium hatten (Ann-Arbor IIb mit Mediastinalbefall oder Tumorbalk, Ann-Arbor III-IV), wobei in den Studien selbst nur 8% bzw. 10% der Patienten/-innen einen Progress unter der Therapie oder ein Rezidiv erlitten. Verglichen mit allen Patienten/-innen der GHSG-Studien waren die Patienten/-innen, deren Proben für diese

Arbeit untersucht wurden, im Durchschnitt etwa 2 Jahre jünger und hatten etwas häufiger ≥ 3 betroffene Lymphknotenareale oder ein Ann-Arbor-Stadium IV. Das angewendete Therapieregime BEACOPP ist intensiver und toxischer als das für frühe Stadien angewandte ABVD-Schema (Engert et al., 2012, Borchmann et al., 2011). Bei der Bewertung der Ergebnisse dieser Arbeit und bei der Übertragung auf den klinischen Alltag ist die Zusammensetzung der Kohorte daher zu berücksichtigen.

Um die klinische Relevanz und das Potenzial als Biomarker der mit der digitalen Bildanalyse erhobenen Werte zu testen, wurden die Daten zu den Anteilen der Zellarten von Patienten/-innen mit und ohne Komplettremission verglichen.

Der Anteil an HRSC als kleinste erfasste Zellpopulation zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung zwischen den Patientengruppen. Lediglich ein Trend im PFS zwischen Patienten/-innen mit einem CD30 pos. Zellgehalt über beziehungsweise unter dem Durchschnittswert wurde beobachtet. Hier war das PFS von Patienten/-innen mit höheren CD30 pos. Zellanteilen (HRSC) kürzer ($p=0.07$). Diese Ergebnisse decken sich mit einer Arbeit von Steidl et al., in denen der Gehalt an HRSC ebenfalls keine prognostische Signifikanz zugesprochen wurde. (Steidl et al., 2010). Grund hierfür mag die Tatsache sein, dass HRSC zwar die neoplastischen Zellen sind, jedoch nicht ohne das von ihnen geformte TME überleben können. Die Malignität der Erkrankung wird daher vielmehr durch das Zusammenspiel und Orchestrierung des Begleitinfiltates und weniger durch die Masse der HRSC selbst definiert, wie es bei vielen soliden Tumoren der Fall ist (Aldinucci et al., 2019). Qualitative genetische Untersuchungen an HRSC sind daher womöglich besser als Quantifizierungen geeignet, die HRSC allein als prognostischen Biomarker zu nutzen. So wurde beispielsweise in einer anderen Arbeit von Steidl et al. das genetische Profil der HRSC näher untersucht und dabei wurden signifikante Auswirkungen bestimmter Mutationen auf die Prognose beobachtet (Steidl et al., 2012).

Die größte Zellpopulation im TME des cHL sind die T-Zellen, welche in der vorliegenden Arbeit mit dem Pan-T-Zellmarker CD3 quantifiziert wurden. Dabei konnte keine prognostische Signifikanz des Gehalts an T-Zellen hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens der Patienten/-innen festgestellt werden, welches sich wiederum mit den Ergebnissen der Arbeiten von Steidl et al. und Greaves et al. deckt (Steidl et al., 2010, Greaves et al., 2013b). Weniger die absolute Anzahl an T-Zellen im TME scheint für die Prognose des cHL von Bedeutung zu sein, als vielmehr die Zusammensetzung aus den

verschiedenen T-Zell-Subpopulationen. Die bisherigen Studien dazu kamen jedoch zu keinem einheitlichen Schluss, welche Subpopulation von entscheidender Bedeutung dabei ist (Mottok, 2020). Neben uneinheitlichen Methoden und Kollektiven ist ein Grund hierfür vermutlich die Komplexität der T-Zell-Funktionen. Grundsätzlich wird zwischen einer Th1- und Th2-gerichteten Immunantwort und den immunsuppressiven Treg unterschieden. Lange akzeptiert wurde die Hypothese, dass die Th1-Zellen unter anderem durch Sekretion von Interferon- γ ein überwiegend proinflammatorisches Milieu mit vielen CD8 pos. CTL und Makrophagen begünstigen, die eine zellvermittelte Immunantwort gegen intrazelluläre Antigene und damit auch gegen Tumore auslösen können (Ellyard et al., 2007, Zhu & Paul, 2008). Die Th2-Zellen wiederum sollen in Interaktion mit den B-Zellen zur Stärkung der humoralen Immunantwort, insbesondere gegen Parasiten, führen und eine Rolle in der Entwicklung von Allergien spielen. Darüber hinaus könnten sie durch Sekretion von IL-10 zur Hemmung der Th1-Immunantwort führen und dadurch indirekt eine tumorfördernde Funktion haben (Zhu & Paul, 2008). Da im cHL eine Th1-Antwort offensichtlich nicht effektiv genug ist, um das Lymphom am Progress zu hindern, wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Tumormikromilieu insbesondere aus den Th2-Zellen besteht. Auf der Grundlage von neuen Forschungsarbeiten, sowohl zur Funktion der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen als auch zur Zusammensetzung der T-Zellen im cHL, wird heute jedoch vermutet, dass für die antitumorale Antwort nicht nur Th1-, sondern auch partiell Th2-Zellen verantwortlich sind und dass das TME im cHL nicht zwangsläufig von Th2-Zellen geprägt ist (Ellyard et al., 2007, Greaves et al., 2013a, Schreck et al., 2009). Die Th2-Zellen sollen dabei beispielsweise über die Ausschüttung von Zytokinen wie IL-4 und IL-13 Eosinophile, Neutrophile und Makrophagen anlocken, die zu einer zellulären Antitumorantwort fähig sind (Ellyard et al., 2007). Treg-Zellen haben zwar in der Forschung den Status einer antitumoralen T-Zellpopulation erlangt, doch bleibt im cHL unklar, ob eine hohe Anzahl an Treg-Zellen einen entsprechend positiven prognostischen Einfluss hat. Angesichts dieser komplexen Verknüpfung von verschiedenen T-Zell-Populationen ist es nicht überraschend, dass weder die Gesamtzahl an T-Zellen noch der Gehalt einer einzelnen T-Zellsubpopulation einen signifikanten und konsistenten Effekt auf die Prognose des cHL hat. Die neuen Techniken der digitalen Multiplex-Bildanalyse von IHC Präparaten und die single-cell analysis Genexpressionsanalyse eröffnen hier Möglichkeiten der Identifizierung und Quantifizierung einzelner Subtypen. So konnten Aoki et al. erstmals eine definierte T-Zell-Subpopulation

unter den CD4 pos. Zellen ausmachen, welche spezifische immunsuppressive und damit womöglich tumorfördernde Funktionen aufwies (Aoki et al., 2020). Um T-Zellen als möglichen Biomarker noch näher zu untersuchen, wäre es interessant zu erfahren, wie sich bestimmte Subpopulationen in der Ganzschnittanalyse verhalten. Hierfür müssten jedoch aufwendige Mehrfachfärbungen und -analysen durchgeführt werden, da einzelne IHC Marker nur bedingt spezifisch für die Subgruppen sind.

Zu den Makrophagen des TME und ihrer prognostischen Bedeutung sind vergleichsweise viele Studien zu finden. Obgleich viele unabhängige Studien einen Zusammenhang mit der Prognose darlegen konnten, gibt es auch einige kontroverse Literatur (Guo et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit konnte keinerlei Auswirkung des Gehalts an CD68 pos. Zellen auf die Prognose der Patienten/-innen festgestellt werden. Neben der Tatsache, dass die Methoden zur Quantifizierung der Studien zu Makrophagen stark variieren (Kollektivzusammensetzung, verwendete Antikörper, semiquantitative Auswertung von kleinen Ausschnitten von IHC Präparaten, Genexpressionsanalysen), sind die Patienten/-innen aus der Kohorte der hier vorliegenden Arbeit mit einem BEACOPP-Regime sehr viel intensiver behandelt worden als die Patienten/-innen fast aller übrigen Arbeiten, denen Studien mit ABVD-Therapie zugrunde lagen (Guo et al., 2016). Der mögliche negativ prognostische Effekt von einem erhöhten Gehalt an Makrophagen, sofern er sich auch in der Quantifizierung an Ganzschnitten bewahrheiten würde, könnte also auch von dem Vorteil der intensiven BEACOPP-Therapie überdeckt worden sein (Scott & Steidl, 2014). Es ist weitgehend gesichert, dass Makrophagen im Tumormikromilieu verschiedenster Krebsarten eine immunsuppressive und damit den Tumor schützende Funktion übernehmen und die antitumorale Immunantwort hemmen. Entsprechende Hinweise für diese Funktion und Erklärung für den vermuteten negativ prognostischen Einfluss von Makrophagen im cHL liefert unter anderem die Arbeit von Carey et al. Dort konnte nachgewiesen werden, dass viele Makrophagen in naher Umgebung von T-Zellen den PD-1-Liganden aufweisen, ein Hinweis darauf, dass sie zur Hemmung der T-Zell-Antwort gegen den Tumor fähig sein könnten (Carey et al., 2017). Ähnlich wie bei den T-Zellen sollte daher auch bei den Makrophagen ein Augenmerk darauf liegen, dass ihre Funktionen innerhalb des Tumormikromilieus sehr komplex sind. Makrophagen in direkter Umgebung der T-Zellen haben womöglich andere Funktionen als solche in direkter Umgebung der HRSC und wiederum andere als solche in der Peripherie (Yang et al., 2018). Eine genauere Phänotypisierung und standardisierte Methoden, wie die

digitale Ganzschnittanalyse, zur Quantifizierung dieser verschiedenen Populationen könnten daher hilfreich sein, um den Gehalt an Makrophagen als Biomarker erfolgreich zu etablieren. Mit den in der Bildanalyse generierten Daten zum Gehalt an B-Zellen konnte ein starker Zusammenhang mit der Prognose der Patienten/-innen hergestellt werden. Patienten/-innen, die einen hohen B-Zell-Gehalt haben, blieben länger im PFS, sowohl in der ersten als auch in der Validierungskohorte, und hatten ein längeres OS (Jachimowicz et al., 2020). Diese Erkenntnisse decken sich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten, in denen ein hoher Anteil von B-Zellen im Lymphomgewebe durchweg als prognostisch günstig angesehen wurde, sowohl in IHC Untersuchungen an TMA Stanzen (Chetaille et al., 2009, Steidl et al., 2010, Tudor et al., 2013, Greaves et al., 2013b, Panico et al., 2015) als auch in Genexpressionsanalysen (Chetaille et al., 2009, Steidl et al., 2010). Gegenteilige Ergebnisse sind in der Literatur nicht zu finden. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt in einer deutlich größeren Kohorte, die intensiver therapiert wurde, mit einer Methode bestätigt werden, die nicht nur eine deutlich höhere Reproduzierbarkeit hat, sondern auch die intratumorale Heterogenität, insbesondere der B-Zellen, besser berücksichtigt. Um herauszufinden, wodurch die B-Zellen im TME einen positiven Einfluss auf die Prognose haben, bedarf es weiterer Forschung. Derzeit werden mehrere Hypothesen diskutiert. Ein TME, welches stark angereichert für B-Zellen ist, könnte ein Zeichen dafür sein, dass das Lymphom noch nicht weit fortgeschritten ist und noch immer ein Teil der ursprünglichen Lymphknotenarchitektur mit entsprechend vielen B-Zellen vorhanden ist. Ebenso könnten B-Zellen aber auch aktiver Teil der Immunantwort gegen den Tumor sein, sei es humoral oder auch durch Stärkung der zellulären T-Zell-Antwort. Diskutiert wird auch, ob die B-Zellen ebenfalls differenziert in verschiedenen Subpopulationen eingeteilt und untersucht werden sollten. So wäre es beispielsweise möglich, dass B-Zellen, die sich follikulär anordnen, anders verhalten als solche, die sich gleichmäßig im TME verteilen (Tudor et al., 2013). Ebenso konnte kein gemeinsamer cut-off-Wert für den Anteil an B-Zellen, der für beide Kollektive gültig war gefunden werden. Für eine Etablierung eines solchen cut-off-Wertes bedarf es noch größerer, prospektiver Studien, die auch alle klinischen Stadien des cHL einschließen.

4.6 Einordnung der Ergebnisse und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit den in der digitalen Bildanalyse generierten Daten die Zusammensetzung des TME des cHL in bisher nicht beschriebener Form und Größe quantifiziert werden konnte. Die bisherigen auf subjektiven Beschreibungen beruhenden Daten konnten quantifiziert und bestätigt werden. Ebenso ist es gelungen, in zwei sehr groß angelegten Studienkohorten, die in vorherigen Arbeiten beschriebene Rolle der B-Zellen als potentiellen prognostischen Biomarker zu festigen. Die dafür angewandte Methode wäre noch dazu auch im klinischen Alltag praktikabel, da die dafür notwendigen Schnitte und Färbungen ohnehin für die Diagnostik angefertigt werden. Die digitale Bildanalyse ist leicht zu erlernen und könnte ohne viel Aufwand an dafür spezialisierte Zentren delegiert werden, da die gefärbten Schnitte, ausschließlich in digitaler Form vorliegen müssen.

Es bedarf weiterer Studien an noch größeren und vor allem prospektiven Kohorten, in denen auch Patienten/-innen in frühen Stadien eingeschlossen werden sollten, um die Ergebnisse zu bestätigen, beispielsweise in künftigen Studien der GHSG (Jachimowicz et al., 2020).

Ebenso sollte die Nutzung der Multiplex-Bildanalyse und Stereologie von Ganzschnitten in Betracht gezogen werden. Hier können mehrere Färbungen gleichzeitig untersucht werden und nicht nur Quantifizierungen, sondern auch räumliche Beziehungen erhoben werden. Diese Technik ist allerdings noch sehr aufwendig und erfordert neben kostspieligem technischen Equipment auch ein speziell ausgebildetes interdisziplinäres Team von Pathologen, Biologen, Informatikern und technischen Assistenten (Parra et al., 2019). Für die verschiedenen Subgruppen der untersuchten Zellreihen könnten ebenfalls weitere Quantifizierungen hilfreich sein, sofern es ausreichend spezifische IHC Marker gibt. So könnte insgesamt ein tieferes biologisches Verständnis über die Zellzusammensetzung des TME erlangt werden.

5 Zusammenfassung

Das klassische Hodgkin Lymphom ist eine Krebserkrankung, welche heute dank intensiver Therapien eine exzellente Prognose hat. Dennoch bleiben noch immer einige Patienten/-innen therapierefraktär oder erleiden Rezidive und haben dadurch eine erheblich schlechtere Prognose (Steidl et al., 2011). Darüber hinaus bergen die angewandten intensiven Chemo- und Radiotherapien eine nicht unerhebliche gesundheitliche Gefahr, sowohl akut als auch viele Jahre später. Bis heute fehlen praktikable Biomarker, die eine optimale Risikostratifizierung und Therapieadaptierung innerhalb der etablierten Risikogruppen ermöglichen (Shanbhag & Ambinder, 2018).

Die histologische Besonderheit des klassischen Hodgkin-Lymphoms besteht in dem entzündlichen Begleitinfiltrat, welches die nur vereinzelt liegenden neoplastischen Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen umgibt. Dieses Tumormikromilieu ist im klassischen Hodgkin Lymphom einzigartig stark ausgeprägt und heterogen zusammengesetzt. Die individuelle Komposition des Tumormikromilieus wurde schon in verschiedensten Studien als potentieller Biomarker untersucht. Diese blieben aber bisher ohne klinische Konsequenz, da die Ergebnisse sich zum Teil widersprachen und die Methoden für den klinischen Alltag nicht praktikabel waren (Steidl et al., 2011).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, an einem Kollektiv von knapp 400 Patienten/-innen zunächst die vier größten Zellarten des Tumormikromilieus mittels digitaler Bildanalyse umfassend zu quantifizieren und anschließend mit den klinischen Daten der Patienten/-innen zu vergleichen, die aus randomisierten klinischen Studien der German Hodgkin Study Group stammten.

Vorteil dieser Methode war die Erfassung von Ganzschnitten mit jeweils über 1 Mio. Zellen, wodurch die intratumorale Heterogenität des Tumormikromilieus Berücksichtigung fand. Die digitale Bildanalyse ist zudem einfach zu standardisieren, reliabel und in den klinischen Alltag implementierbar.

Insgesamt wurden so etwa 80% aller detektierten Zellen einer der vier untersuchten Zellarten, B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen, Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen, zugeordnet.

Die Ergebnisse konnten die auf pathologischer Expertise beruhenden Beschreibungen der vier Subtypen des klassischen Hodgkin Lymphoms quantifizieren und verifizieren.

Von den vier erhobenen Zellarten erwies sich der Anteil an B-Lymphozyten dabei als potentieller prognostischer Biomarker. Diejenigen Patienten/-innen, die einen niedrigen Gehalt an B-Lymphozyten hatten, hatten ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben. Dieses Ergebnis konnte auch in der Untersuchung eines zweiten Kollektivs von knapp 150 Patienten/-innen bestätigt werden und deckt sich mit den Ergebnissen voriger Studien (Jachimowicz et al., 2020).

Die digitale Bildanalyse hat sich als ein praktikables Verfahren für die Quantifizierung des Tumormikromilieus erwiesen. Für die Nutzung des Gehalts an B-Zellen als prognostischer Biomarker für das klassische Hodgkin Lymphom bedarf es nur der digitalisierten Analyse ohnehin angefertigter Routineschnitte. Dies könnte ohne viel Aufwand überregional in qualifizierten Zentren erfolgen, da das Präparat dafür nur als Bilddatei vorliegen muss. Um die Ergebnisse der Arbeit zu bestätigen und womöglich auch im klinischen Alltag zu nutzen, muss auch in prospektiven klinischen Studien der B-Zell-Gehalt bei Diagnosestellung mit Hilfe der digitalen Bildanalyse ausgewertet und mit den klinischen Verläufen verglichen werden. So könnte der prognostische Nutzen validiert und auch ein prädiktiver Effekt der Bestimmung des Anteils der B-Zellen untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

- Aeffner, F., Zarella, M. D., Buchbinder, N., Bui, M. M., Goodman, M. R., Hartman, D. J., Lujan, G. M., Molani, M. A., Parwani, A. V., Lillard, K., Turner, O. C., Vemuri, V. N. P., Yuil-Valdes, A. G. & Bowman, D. (2019). Introduction to digital image analysis in whole-slide imaging: A white paper from the digital pathology association. *J Pathol Inform*, 10, 9-9
- Al-Zoughbi, W., Huang, J., Paramasivan, G. S., Till, H., Pichler, M., Guertl-Lackner, B. & Hoefler, G. (2014). Tumor macroenvironment and metabolism. *Semin Oncol*, 41, 281-295
- Aldinucci, D., Borghese, C. & Casagrande, N. (2019). Formation of the immunosuppressive microenvironment of classic Hodgkin lymphoma and therapeutic approaches to counter it. *Int J Mol Sci*, 20, 2416
- Álvaro, T., Lejeune, M., Salvadó, M. T., Bosch, R., García, J. F., Jaén, J., Banham, A. H., Roncador, G., Montalbán, C. & Piris, M. A. (2005). Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 11, 1467
- Ansell, S. M., Lesokhin, A. M., Borrello, I., Halwani, A., Scott, E. C., Gutierrez, M., Schuster, S. J., Millenson, M. M., Cattray, D., Freeman, G. J., Rodig, S. J., Chapuy, B., Ligon, A. H., Zhu, L., Gross, J. F., Kim, S. Y., Timmerman, J. M., Shipp, M. A. & Armand, P. (2014). PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, 372, 311-319
- Ansell, S. M. (2016). Hodgkin lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 91, 434-442
- Aoki, T. & Steidl, C. (2018). Novel biomarker approaches in classic Hodgkin lymphoma. *Cancer J*, 24, 206-214
- Aoki, T., Chong, L. C., Takata, K., Milne, K., Hav, M., Colombo, A., Chavez, E. A., Nissen, M., Wang, X., Miyata-Takata, T., Lam, V., Viganò, E., Woolcock, B. W., Telenius, A., Li, M. Y., Healy, S., Ghesquiere, C., Kos, D., Goodyear, T., Veldman, J., Zhang, A. W., Kim, J., Saberi, S., Ding, J., Farinha, P., Weng, A. P., Savage, K. J., Scott, D. W., Krystal, G., Nelson, B. H., Mottok, A., Merchant, A., Shah, S. P. & Steidl, C. (2020). Single-cell transcriptome analysis reveals disease-defining T-cell subsets in the tumor microenvironment of classic Hodgkin lymphoma. *Cancer Discov*, 10, 406
- Azambuja, D., Natkunam, Y., Biasoli, I., Lossos, I. S., Anderson, M. W., Morais, J. C. & Spector, N. (2012). Lack of association of tumor-associated macrophages with clinical outcome in patients with classical Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*, 23, 736-42

Banerjee, D. (2011). Recent advances in the pathobiology of Hodgkin's lymphoma: Potential impact on diagnostic, predictive, and therapeutic strategies. *Adv Hematol*, 2011, 439456-439456

Borchmann, P., Haverkamp, H., Diehl, V., Cerny, T., Markova, J., Ho, A. D., Eich, H.-T., Mueller-Hermelink, H. K., Kanz, L., Greil, R., Rank, A., Paulus, U., Smardova, L., Huber, C., Dörken, B., Nerl, C., Krause, S. W., Mueller, R.-P., Fuchs, M. & Engert, A. (2011). Eight cycles of escalated-dose BEACOPP compared with four cycles of escalated-dose BEACOPP followed by four cycles of baseline-dose BEACOPP with or without radiotherapy in patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: Final analysis of the HD12 trial of the German Hodgkin Study Group. *J Clin Oncol*, 29, 4234-4242

Borchmann, P., Goergen, H., Kobe, C., Lohri, A., Greil, R., Eichenauer, D. A., Zijlstra, J. M., Markova, J., Meissner, J., Feuring-Buske, M., Hüttmann, A., Dierlamm, J., Soekler, M., Beck, H.-J., Willenbacher, W., Ludwig, W.-D., Pabst, T., Topp, M. S., Hitz, F., Bentz, M., Keller, U. B., Kühnhardt, D., Ostermann, H., Schmitz, N., Hertenstein, B., Aulitzky, W., Maschmeyer, G., Vieler, T., Eich, H., Baues, C., Stein, H., Fuchs, M., Kuhnert, G., Diehl, V., Dietlein, M. & Engert, A. (2017). PET-guided treatment in patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma (HD18): Final results of an open-label, international, randomised phase 3 trial by the German Hodgkin Study Group. *Lancet*, 390, 2790-2802

Bröckelmann, P. J. & Engert, A. (2015). The GHSG approach to treating Hodgkin's lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep*, 10, 256-265

Bussard, K. M., Mutkus, L., Stumpf, K., Gomez-Manzano, C. & Marini, F. C. (2016). Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res* 18, 84-84

Carey, C. D., Gusenleitner, D., Lipschitz, M., Roemer, M. G. M., Stack, E. C., Gjini, E., Hu, X., Redd, R., Freeman, G. J., Neuberg, D., Hodi, F. S., Liu, X. S., Shipp, M. A. & Rodig, S. J. (2017). Topological analysis reveals a PD-L1-associated microenvironmental niche for Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphoma. *Blood*, 130, 2420-2430

Chetaille, B., Bertucci, F., Finetti, P., Esterni, B., Stamatoullas, A., Picquenot, J. M., Copin, M. C., Morschhauser, F., Casasnovas, O., Petrella, T., Molina, T., Vekhoff, A., Feugier, P., Bouabdallah, R., Birnbaum, D., Olive, D. & Xerri, L. (2009). Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood*, 113, 2765-2775

Cirillo, M., Reinke, S., Klapper, W. & Borchmann, S. (2019). The translational science of Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*, 184, 30-44

- De Palma, M. & Lewis, Claire E. (2013). Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell*, 23, 277-286
- Eberle, F. C., Mani, H. & Jaffe, E. S. (2009). Histopathology of Hodgkin's lymphoma. *Cancer J*, 15, 129-37
- Ellyard, J. I., Simson, L. & Parish, C. R. (2007). Th2-mediated anti-tumour immunity: Friend or foe? *Tissue Antigens*, 70, 1-11
- Engert, A., Haverkamp, H., Kobe, C., Markova, J., Renner, C., Ho, A., Zijlstra, J., Král, Z., Fuchs, M., Hallek, M., Kanz, L., Döhner, H., Dörken, B., Engel, N., Topp, M., Klutmann, S., Amthauer, H., Bockisch, A., Kluge, R., Kratochwil, C., Schober, O., Greil, R., Andreesen, R., Kneba, M., Pfreundschuh, M., Stein, H., Eich, H. T., Müller, R.-P., Dietlein, M., Borchmann, P. & Diehl, V. (2012). Reduced-intensity chemotherapy and PET-guided radiotherapy in patients with advanced stage Hodgkin's lymphoma (HD15 trial): A randomised, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*, 379, 1791-1799
- Engert, A. (2019). Treatment of elderly Hodgkin lymphoma patients. *Hematol Oncol*, 37, 92-94
- Greaves, P., Clear, A., Owen, A., Iqbal, S., Lee, A., Matthews, J., Wilson, A., Calaminici, M. & Gribben, J. G. (2013a). Defining characteristics of classical Hodgkin lymphoma microenvironment T-helper cells. *Blood*, 122, 2856-2863
- Greaves, P., Clear, A., Coutinho, R., Wilson, A., Matthews, J., Owen, A., Shanyinde, M., Lister, T. A., Calaminici, M. & Gribben, J. G. (2013b). Expression of FOXP3, CD68, and CD20 at diagnosis in the microenvironment of classical Hodgkin lymphoma is predictive of outcome. *J Clin Oncol*, 31, 256-62
- Guo, B., Cen, H., Tan, X. & Ke, Q. (2016). Meta-analysis of the prognostic and clinical value of tumor-associated macrophages in adult classical Hodgkin lymphoma. *BMC Medicine*, 14, 159-159
- Hanahan, D. & Weinberg, Robert A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144, 646-674
- Hasenclever, D. & Diehl, V. (1998). A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International prognostic factors project on advanced Hodgkin's disease. *N Engl J Med*, 339, 1506-14
- Hermann, S. & Kraywinkel, K. (2018). Faktenblatt: Epidemiologie der Hodgkin-Lymphome in Deutschland. *Der Onkologe*, 24, 280-285

Hollander, P., Rostgaard, K., Smedby, K. E., Molin, D., Loskog, A., de Nully Brown, P., Enblad, G., Amini, R. M., Hjalgrim, H. & Glimelius, I. (2018). An anergic immune signature in the tumor microenvironment of classical Hodgkin lymphoma is associated with inferior outcome. *Eur J Haematol*, 100, 88-97

Hui, L. & Chen, Y. (2015). Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett*, 368, 7-13

Jachimowicz, R. D., Pieper, L., Reinke, S., Gontarewicz, A., Plütschow, A., Haverkamp, H., Frauenfeld, L., Fend, F., Overkamp, M., Jochims, F., Thorns, C., Hansmann, M. L., Möller, P., Rosenwald, A., Stein, H., Reinhardt, H. C., Borchmann, P., von Tresckow, B., Engert, A. & Klapper, W. (2020). Analysis of the tumor microenvironment by whole-slide image analysis identifies low B cell content as a predictor of adverse outcome in advanced-stage classical Hodgkin lymphoma treated with BEACOPP. *Haematologica*,

Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H. & Isaacson, P. G. (2008). Classification of lymphoid neoplasms: The microscope as a tool for disease discovery. *Blood*, 112, 4384-4399

Kamper, P., Bendix, K., Hamilton-Dutoit, S., Honore, B., Nyengaard, J. R. & d'Amore, F. (2011). Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, 96, 269-76

Kayal, S., Mathur, S., Karak, A. K., Kumar, L., Sharma, A., Bakhshi, S. & Raina, V. (2014). CD68 tumor-associated macrophage marker is not prognostic of clinical outcome in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 55, 1031-7

Kim, K., Zakharkin, S. O. & Allison, D. B. (2010). Expectations, validity, and reality in gene expression profiling. *J Clin Epidemiol*, 63, 950-959

Küppers, R. (2009). The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer*, 9, 15-27

Küppers, R., Engert, A. & Hansmann, M. L. (2012). Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest*, 122, 3439-47

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF). 2019. Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Hodgkin Lymphoms bei erwachsenen Patienten, Langversion 2.1, AWMF Registernummer: 018/029 ol [Online]. Link: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hodgkin-lymphom/> [letzter Aufruf 24.05.2020].

Liu, Y., Sattarzadeh, A., Diepstra, A., Visser, L. & van den Berg, A. (2014). The microenvironment in classical Hodgkin lymphoma: An actively shaped and essential tumor component. *Semin Cancer Biol*, 24, 15-22

Mottok, A. (2020). Tumormikromilieu im klassischen Hodgkin-Lymphom. *Der Pathologe*, 41, 254-260

Nam-Cha, S. H., Montes-Moreno, S., Salcedo, M. T., Sanjuan, J., Garcia, J. F. & Piris, M. A. (2009). Lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma: Distinctive tumor and microenvironment markers. *Mod Pathol*, 22, 1006-1015

Pals, S. T., de Gorter, D. J. J. & Spaargaren, M. (2007). Lymphoma dissemination: The other face of lymphocyte homing. *Blood*, 110, 3102-3111

Panico, L., Tenneriello, V., Ronconi, F., Lepore, M., Cantore, N., Dell'Angelo, A. C., Ferbo, L. & Ferrara, F. (2015). High CD20+ background cells predict a favorable outcome in classical Hodgkin lymphoma and antagonize CD68+ macrophages. *Leuk Lymphoma*, 56, 1636-42

Parra, E. R., Francisco-Cruz, A. & Wistuba, I. I. (2019). State-of-the-art of profiling immune contexture in the era of multiplexed staining and digital analysis to study paraffin tumor tissues. *Cancers*, 11, 247

Reed, D. (1902). On the pathological changes in Hodgkin's disease with special reference to its relation to tuberculosis. *John Hopkins Hosp. Rep.*, 10

Rengstl, B., Newrzela, S., Heinrich, T., Weiser, C., Thalheimer, F. B., Schmid, F., Warner, K., Hartmann, S., Schroeder, T., Küppers, R., Rieger, M. A. & Hansmann, M.-L. (2013). Incomplete cytokinesis and re-fusion of small mononucleated Hodgkin cells lead to giant multinucleated Reed–Sternberg cells. *Proc Natl Acad Sci* 110, 20729-20734

Sánchez-Espíridión, B., Sánchez-Aguilera, A., Montalbán, C., Martín, C., Martínez, R., González-Carrero, J., Poderos, C., Bellas, C., Fresno, M. F., Morante, C., Mestre, M. J., Méndez, M., Mazorra, F., Conde, E., Castaño, A., Sánchez-Godoy, P., Tomás, J. F., Morente, M. M., Piris, M. A. & García, J. F. (2009). A taqman low-density array to predict outcome in advanced Hodgkin's lymphoma using paraffin-embedded samples. *Clin Cancer Res*, 15, 1367

Sánchez-Espíridión, B., Montalbán, C., López, Á., Menárguez, J., Sabín, P., Ruiz-Marcellán, C., López, A., Ramos, R., Rodríguez, J., Cánovas, A., Camarero, C., Canales, M., Alves, J., Arranz, R., Acevedo, A., Salar, A., Serrano, S., Bas, Á., Moraleda, J. M., Sánchez-Godoy, P., Burgos, F., Rayón, C., Fresno, M. F., Laraña, J. G., García-Cosío, M., Santonja, C., López, J. L., Llanos, M., Mollejo, M., González-Carrero, J., Marín, A., Forteza, J., García-Sanz, R., Tomás, J. F., Morente, M. M., Piris, M. A., García, J. F. & Group, o. b. o. t. S. H. L. S. (2010). A molecular risk score based on 4 functional pathways for advanced classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 116, e12-e17

- Sánchez-Espiridián, B., Martín-Moreno, A. M., Montalbán, C., Medeiros, L. J., Vega, F., Younes, A., Piris, M. A. & García, J. F. (2012). Immunohistochemical markers for tumor associated macrophages and survival in advanced classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, 97, 1080-1084
- Schreck, S., Friebel, D., Buettner, M., Distel, L., Grabenbauer, G., Young, L. S. & Niedobitek, G. (2009). Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol*, 27, 31-9
- Scott, D. W. & Steidl, C. (2014). The classical Hodgkin lymphoma tumor microenvironment: Macrophages and gene expression-based modeling. *Hematology*, 2014, 144-150
- Seidal, T., Balaton, A. J. & Battifora, H. (2001). Interpretation and quantification of immunostains. *Am J Surg Path*, 25, 1204-1207
- Shanbhag, S. & Ambinder, R. F. (2018). Hodgkin lymphoma: A review and update on recent progress. *CA Cancer J Clin*, 68, 116-132
- Shimabukuro-Vornhagen, A., Haverkamp, H., Engert, A., Balleisen, L., Majunke, P., Heil, G., Eich, H. T., Stein, H., Diehl, V. & Josting, A. (2005). Lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma: Clinical presentation and treatment outcome in 100 patients treated within German Hodgkin's Study Group trials. *J Clin Oncol*, 23, 5739-5745
- Steidl, C., Lee, T., Shah, S. P., Farinha, P., Han, G., Nayar, T., Delaney, A., Jones, S. J., Iqbal, J., Weisenburger, D. D., Bast, M. A., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, H. K., Rimsza, L. M., Campo, E., Delabie, J., Braziel, R. M., Cook, J. R., Tubbs, R. R., Jaffe, E. S., Lenz, G., Connors, J. M., Staudt, L. M., Chan, W. C. & Gascoyne, R. D. (2010). Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, 362, 875-85
- Steidl, C., Connors, J. M. & Gascoyne, R. D. (2011). Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: Increasing evidence of the importance of the microenvironment. *J Clin Oncol*, 29, 1812-26
- Steidl, C., Diepstra, A., Lee, T., Chan, F. C., Farinha, P., Tan, K., Telenius, A., Barclay, L., Shah, S. P., Connors, J. M., van den Berg, A. & Gascoyne, R. D. (2012). Gene expression profiling of microdissected Hodgkin Reed-Sternberg cells correlates with treatment outcome in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 120, 3530-40
- Sternberg, C. (1898). Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. *Heilkunde*, 19
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Sein, H., Thiele, J. & Vardiman, J. W. 2008. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, International Agency for Research on Cancer (IARC) Lyon, France.

Tadrous, P. J. (2010). On the concept of objectivity in digital image analysis in pathology. *Pathology*, 42, 207-211

Tan, K. L., Scott, D. W., Hong, F., Kahl, B. S., Fisher, R. I., Bartlett, N. L., Advani, R. H., Buckstein, R., Rimsza, L. M., Connors, J. M., Steidl, C., Gordon, L. I., Horning, S. J. & Gascoyne, R. D. (2012). Tumor-associated macrophages predict inferior outcomes in classic Hodgkin lymphoma: A correlative study from the e2496 intergroup trial. *Blood*, 120, 3280-7

Taylor, C. R. & Levenson, R. M. (2006). Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology*, 49, 411-424

Townsend, W. & Linch, D. (2012). Hodgkin's lymphoma in adults. *Lancet*, 380, 836-847

Tudor, C. S., Distel, L. V., Eckhardt, J., Hartmann, A., Niedobitek, G. & Buettner, M. (2013). B cells in classical Hodgkin lymphoma are important actors rather than bystanders in the local immune reaction. *Hum Path*, 44, 2475-2486

Vardhana, S. & Younes, A. (2016). The immune microenvironment in Hodgkin lymphoma: T cells, B cells, and immune checkpoints. *Haematologica*, 101, 794-802

Varricchi, G., Galdiero, M. R., Loffredo, S., Lucarini, V., Marone, G., Mattei, F., Marone, G. & Schiavoni, G. (2017). Eosinophils: The unsung heroes in cancer? *Oncoimmunology*, 7, e1393134-e1393134

Vassilakopoulos, T. P., Chatzidimitriou, C., Asimakopoulos, J. V., Arapaki, M., Tzoras, E., Angelopoulou, M. K. & Konstantopoulos, K. (2019). Immunotherapy in Hodgkin lymphoma: Present status and future strategies. *Cancers*, 11, 1071

Venkataraman, G., Mirza, M. K., Eichenauer, D. A. & Diehl, V. (2014). Current status of prognostication in classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*, 165, 287-99

Webster, J. D. & Dunstan, R. W. (2014). Whole-slide imaging and automated image analysis: Considerations and opportunities in the practice of pathology. *Vet Pathol*, 51, 211-223

Yang, M., McKay, D., Pollard, J. W. & Lewis, C. E. (2018). Diverse functions of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 78, 5492-5503

Zaucha, J. M., Chauvie, S., Zaucha, R., Biggii, A. & Gallamini, A. (2019). The role of PET/CT in the modern treatment of Hodgkin lymphoma. *Cancer Treat Rev*, 77, 44-56

Zhu, J. & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: Fates, functions, and faults. *Blood*, 112, 1557-1569

7 Publikation der Ergebnisse

Publizierte Abstracts

DGP 2018: Vortrag AG14.06

Computerassistierte digitale Bildanalysen zur Untersuchung des Mikromilieus von klassischen Hodgkin-Lymphomen

L. Pieper, S. Reinke, A. Gontarevicz, R. Jachimowicz, A. Plütschow, A. Engert, W. Klapper

ISHL 2018: Poster P008 (0053)

Whole-slide-image analysis of the tumormicronenvironment in classical Hodgkin lymphoma

L. Pieper, S. Reinke, R. Jachimowicz, A. Plütschow, A. Engert, W. Klapper

Publizierte Originalarbeiten

Jachimowicz, R. D., Pieper, L., Reinke, S., Gontarewicz, A., Plütschow, A., Haverkamp, H., Frauenfeld, L., Fend, F., Overkamp, M., Jochims, F., Thorns, C., Hansmann, M. L., Möller, P., Rosenwald, A., Stein, H., Reinhardt, H. C., Borchmann, P., von Tresckow, B., Engert, A. & Klapper, W. (2020). Analysis of the tumor microenvironment by whole-slide image analysis identifies low B cell content as a predictor of adverse outcome in advanced-stage classical Hodgkin lymphoma treated with BEACOPP. *Haematologica* (Online ahead of print)

8 Danksagungen

Bei Herrn Prof. Dr. med. W. Klapper bedanke ich mich für die Überlassung des Themas, die mehr als umfangreiche Betreuung über den gesamten Zeitraum der Erarbeitung, die Bemühungen für die Publikation und das mir damit entgegebrachte Vertrauen.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeiter/-innen der Sektion Hämatopathologie für die Unterstützung und die herzliche Aufnahme in das Team. Dr. rer. nat. Sarah Reinke danke ich hier insbesondere für die Einarbeitung in die digitale Bildanalyse und für die Zeit, die sie mir bei allen Fragen und Problemen gewidmet hat. Charlotte Botz-von Drathen und Dana Germer danke ich für die hervorragende technische Aufarbeitung der Präparate und die Hilfe beim Auffinden und Sortieren aller verlorengegangenen Dingen.

Den kooperierenden pathologischen Instituten gilt mein Dank für die Überlassung der Präparate. Bei Dr. Artur Gontarewicz bedanke ich mich für die Vorarbeit an den ersten Bildanalysen.

Für die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich bei der German Hodgkin Study Group, insbesondere bei Annette Plütschow für die umfangreiche statistische Aufarbeitung und Hilfe bei der Interpretation der klinischen Daten, bei Dr. Ron Jachimowicz für die Publikation der Ergebnisse und bei Dr. Andreas Engert und Michael Fuchs für die bereitwillige Kooperation.

Danke für das Korrekturlesen an Christian. Danke an Franzi für die vielen Stunden, die wir gemeinsam an unseren Arbeiten, Prism und Definiens verbracht haben.

10 Eidesstattliche Erklärung

Mit meiner Unterschrift erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig, ohne unzulässige Hilfe und nur unter Verwendung der im Literaturverzeichnis angeführten Quellen erarbeitet worden ist. Die Stellen, Tabellen und Grafiken meiner Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, habe ich unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Ich versichere, dass die vorgelegte elektronische mit der schriftlichen Version der Dissertation übereinstimmt. Die Abhandlung wurde in dieser oder ähnlicher Form noch nicht anderweitig als Promotionsleistung vorgelegt und bewertet.

Ort, Datum

Unterschrift