

Medizinische Hochschule Hannover

Institut für Pathologie

**Präzisierte Diagnostik von Nierentumoren:
Einfluss von Immunzellinfiltraten auf
Therapieansprechen und Langzeitprognose**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

- Doctor rerum naturalium -

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Nikolaos Vasileiadis

Thessaloniki

Hannover 2024

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule am 19.07.2024

Präsident:	Prof. Dr. med. Michael P. Manns
Wissenschaftliche Betreuung:	Prof. Dr. med. Jan Hinrich Bräsen
Wissenschaftliche Zweitbetreuung:	Prof. Dr. rer. nat. Doris Steinemann

1. Referent/in:	Prof. Dr. rer. nat. Doris Steinemann
2. Referent/in:	PD. Dr. med. Thomas Wirth

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2024

Prüfungsausschuss

Vorsitz:	Prof. Dr. rer. nat. Doris Steinemann
1. Prüfer/in:	Prof. Dr. med. Jan Hinrich Bräsen
2. Prüfer/in:	Prof. Dr. rer. nat. Doris Steinemann
3. Prüfer/in:	PD. Dr. med. Thomas Wirth

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Zusammenfassung	9
Abstract	11
1. Einleitung	13
1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren des Nierenzellkarzinoms	13
1.2 Subtypen vom Nierenzellkarzinom nach WHO 2016	13
1.2.1 Klarzelliges Nierenzellkarzinom.....	13
1.2.2 Papilläres Nierenzellkarzinom	14
1.2.3 Chromophobes Nierenzellkarzinom	14
1.2.4 Andere RCC-Subtypen	14
1.3 Anti-Tumor Immunantwort	15
1.4 Das Tumormikromilieu	16
1.4.1 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM).....	16
1.4.2 Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL)	17
1.4.3 PD-L1-Expression im Tumormikromilieu.....	18
1.5 Therapie des metastasierten RCC.....	19
1.6 Digitale Pathologie	21
2. Zielsetzung	22
3. Material und Methoden	23
3.1 Chemikalien.....	23
3.2 Geräte.....	23
3.3 Patientenkollektiv	23
3.4 Kriterien für die Patientenauswahl	23
3.5 (Immun)histochemische Färbungen	24
3.5.1 Etablierung der CD204 Immunfärbung	25
3.6 Digitalisierung der Schnittpräparate	25
3.7 Erzeugung von manuellen Annotationen	25
3.8 Übertragung der Annotationen auf digitalisierte Immunschnitte	30
3.9 Makrophagen-Detektion und Quantifizierung.....	30
3.10 Objekt-Detektion und Quantifizierung mittels CNN-Classifier	33
3.11 Strukturerkennung mittels CNN	34
3.12 CNN-Training.....	34

3.13 PD-L1-Expression	35
3.14 Reklassifikation der Nierentumore gemäß WHO 2016.....	36
3.15 Differenzierungsgrad (ISUP/WHO)	36
3.16 Statistische Auswertung und Evaluierung des CNN	36
3.17 Ethikvotum	38
4. Ergebnisse	39
4.1 Charakteristika des Patientenkollektivs.....	39
4.1.1 Histologische Reklassifikation nach WHO 2016	39
4.2 Vergleich des Pixel-basierten mit dem CNN-basierten Classifier	39
4.3 Räumliche Verteilung der Immunzellinfiltrate.....	42
4.3.1 Makrophagen-Infiltration (CD68)	42
4.3.2 Infiltration durch Tumor-assoziierte Makrophagen (CD204).....	43
4.3.3 Infiltration durch zytotoxische T-Lymphozyten (CD8).....	44
4.3.4 Infiltration durch B-Lymphozyten (CD20).....	45
4.4 PD-L1 Expression im ccRCC.....	46
4.5 Zusammenhang von Immunzellinfiltraten mit Tumor-Charakteristika.....	48
4.6 Zusammenhang der PD-L1-Expression mit Tumor-Charakteristika.....	51
4.7 Zusammenhang der PD-L1-Expression mit der Leukozyten-Dichte	52
4.8 Überlebensanalyse: Gesamtüberlebenszeit (OS).....	53
4.8.1 Einfluss von Patienten-/Tumor-Charakteristika.....	53
4.8.2 Einfluss von Leukozyten-Dichten.....	53
4.8.3 Einfluss der PD-L1-Expression	54
4.8.4 Multivariate Cox-Regressionsanalyse im Bezug zum Gesamtüberleben (OS)	56
4.9 Immunzellen und PD-L1-Expression beeinflussen das Gesamtüberleben.....	57
4.10 Biomarkeranalyse unter einer immunonkologischen (IO)-Therapie.....	61
4.10.1 Einfluss von Tumor-Charakteristika, Leukozyten und PD-L1 auf das PFS.....	61
4.10.2 Multivariate Cox-Regressionsanalyse im Bezug zum PFS.....	62
4.11 Identifizierung prädiktiver Biomarker des IO-Therapieansprechens	63
4.12 Clusterbildung von B-Lymphozyten	64
4.13 Ergebnisse der Strukturerkennung.....	65
5. Diskussion	68
5.1 Prognostische Bedeutung von potentiellen Biomarkern	68
5.1.1 Patienten-/Tumor-Charakteristika.....	69
5.1.2 Makrophagen	69
5.1.3 Lymphozyten	70

5.1.4 PD-L1- Expression.....	72
5.1.5 PD-L1-Expression und Leukozyten-Dichten.....	73
5.1.6 Prädiktive Faktoren für das Ansprechen auf eine IO-Therapie	76
5.2 Strukturerkennung mittels künstlicher Intelligenz	79
5.3 Limitationen dieser Studie.....	80
5.4 Schlussfolgerung	80
Literaturverzeichnis.....	81
Danksagung	98
Abbildungsverzeichnis	99
Tabellenverzeichnis.....	101
Anhang	102
Lebenslauf	128
Publikationen.....	130
Präsentationen	130
Erklärung gem. § 6 Abs. 2 Nr. 8 der Promotionsordnung	131

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
ADCP	Antibody-dependent cellular phagocytosis
AMACR	Alpha-methylacyl-CoA racemase
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zelle (Antigen presenting cell)
b2M	Beta-2-Mikroglobulin
Breg	Regulatorische B-Zelle
bzw.	Beziehungsweise
CA-IX	Carboanhydrase-9
CCL2	CC-Chemokinligand 2
CCR	Chemokinrezeptor
ccRCC	Klarzelliges Nierenzellkarzinom
CD	Cluster of differentiation
chRCC	Chromophobes Nierenzellkarzinom
CK	Zytokeratin (Cytokeratin)
cm	Zentimeter (Centimeter)
CNN	Convolutional neural network
CPS	Combined positivity score
CSF	Kolonien-stimulierender Faktor (Colony stimulating factor)
CSS	Krebs-spezifisches Überleben (Cancer-specific survival)
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt (Cytotoxic T-lymphocyte)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zelle (Dendritic cell)
ECM	Extrazelluläre Matrix (Extracellular matrix)
FasL	Fas-Ligand
FN	Falsch-negativ (False negative)
FP	Falsch-positiv (False positive)
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
HE-EI	Hämatoxylin-Eosin und Elastica van Gieson
HIER	Hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (Heat induced epitope retrieval)
HIF	Hypoxia-inducible factor
ho	Hoch
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horseradish peroxidase)
IC	Inflammatory cell scoring
ICOS	Inducible T-cell costimulator
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IO-Therapie	Immunonkologische Therapie

IoU	Intersection over Union
ISUP	International Society of Urological Pathology
JAK	Januskinase
KI	Künstliche Intelligenz bzw. Konfidenzintervall
LAG-3	Lymphocyte-activation gene-3
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major histocompatibility complex)
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
MIC	Mononukleäre Immunzellen (Mononuclear inflammatory cell)
ML	Maschinelles Lernen (Machine learning)
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mRCC	Metastasiertes Nierenzellkarzinom
MSR	Macrophage scavenger receptor
mTOR	Mammalian target of rapamycin
neg	Negativ
ni	Niedrig
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle (Natural killer cell)
NOS	Not otherwise specified
OS	Gesamtüberleben (Overall survival)
PAX	Paired box
PC	Plasmazelle (Plasma cell)
PD-1	Programmed death 1
PD-L1	Programmed death ligand 1
PFS	Progressionsfreies Überleben (Progression-free survival)
pos	Positiv
pRCC	Papilläres Nierenzellkarzinom
RCC	Nierenzellkarzinom (Renal cell carcinoma)
RGB-Kanal	Rot-, Grün-, Blau-Kanal
ROI	Region of interest
RTU	Ready to use
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (Standard error of the mean)
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen (Tumor-associated macrophages)
TZR (TCR)	T-Zell-Rezeptor (T-cell receptor)
TFEB	Transcription factor EB
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (Transforming growth factor)
Th	T-Helfer-Zelle
TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten (Tumor-infiltrating lymphocytes)
TIM-3	T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TKI	Tyrosine kinase inhibitor

TLS	Tertiäre lymphatische Struktur (Tertiary lymphoid structures)
TMA	Tissue microarray
TMB	Tumormutationslast (Tumor mutational burden)
TNF	Tumornekrosefaktor (Tumor necrosis factor)
TP	Richtig-positiv (True positive)
TPS	Tumor proportion score
Treg	Regulatorische T-Zelle
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	Von-Hippel-Lindau-Protein
VISTA	V-domain Ig suppressor of T cell activation
WHO	World health organisation
WSI	Whole slide image
µm	Mikrometer

Zusammenfassung

Nikolaos Vasileiadis

Präzisierte Diagnostik von Nierentumoren: Einfluss von Immunzellinfiltraten auf Therapieansprechen und Langzeitprognose

Die Inzidenz des Nierenzellkarzinoms hat in den letzten Jahren besonders in Ländern mit hohem sozioökonomischen Niveau zugenommen. Wichtige Risikofaktoren für die Entstehung des Nierenzellkarzinoms sind Rauchen, Bluthochdruck und chronische Nierenerkrankungen. Die WHO-Klassifikation von 2016 teilt die Nierenzellkarzinome in drei Hauptgruppen ein: Das am häufigsten vorkommende klarzellige Nierenzellkarzinom (ccRCC), das papilläre Nierenzellkarzinom (pRCC) und das chromophobe Nierenzellkarzinom (chRCC). Nicht metastasierte Nierenzellkarzinome werden durch operative Eingriffe wie eine Nephrektomie oder eine Nierenteilresektion behandelt. Metastasen wurden in der Vergangenheit meist mittels Chemo- und Strahlentherapie behandelt, es zeigten sich jedoch keine durchgängigen Effekte. Zytokin-Therapien und zielgerichtete Therapien (VEGF, mTOR) ergaben ebenfalls keine Verbesserung. In den letzten Jahren ist die Therapie der metastasierten Erkrankung durch die Verwendung von Immuncheckpoint-Inhibitoren vielversprechend und mit einem guten Überleben der RCC-Patienten assoziiert. Allerdings spricht auf eine immunonkologische Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren nur ein kleiner Anteil der Patienten an, wobei es unklar ist, welche Patienten von dieser Therapie profitieren. Das Tumormikromilieu kann bei Nierenzellkarzinomen, wie auch bei anderen Tumorarten, das Überleben der Patienten beeinflussen. In den letzten Jahren hat das Gebiet der künstlichen Intelligenz in der Krebsforschung an Bedeutung gewonnen. Die neuronalen Netze, welche die menschliche Intelligenz imitieren, können zu einer rechtzeitigen und zuverlässigen Diagnose und Prognose sowie zur Prädiktion des Ansprechens auf eine Therapie beitragen.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war, die prognostische/prädiktive Bedeutung von Immunzellpopulationen in Primärtumoren und die PD-L1-Expression bei Patienten mit metastasiertem RCC zu evaluieren. In wie weit Methoden der künstlichen Intelligenz eine zuverlässige Erkennung vom Tumorgewebe erlauben, war ein weiteres Ziel.

Die Leukozyten-Dichte in primären klarzelligen Nierenzellkarzinomen wurde in verschiedenen „Regions of interest“ mittels digitaler Bildanalyse quantifiziert, um anschließend die prognostische Wertigkeit von Makrophagen (CD68), Tumor-assoziierten Makrophagen (CD204), zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8) und B-Lymphozyten (CD20) im Bezug zum Gesamtüberleben bzw. zum progressionsfreien Überleben unter einer IO-Therapie der ccRCC-Patienten zu analysieren. Es gab einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer positiven PD-L1-Expression mit einer schlechten Differenzierung der Tumorzellen und einem Anstieg vom Tumor Stadium. Eine hohe intratumorale CD68- und CD204-Dichte assoziierte mit schlechter Differenzierung, großen Tumoren und dem Auftreten von Nekrosen. Darüber hinaus war die Dichte aller untersuchten Leukozyten-Marker im vitalen Tumor bei vorhandener Expression des PD-L1-Markers in Tumorzellen signifikant erhöht. Ein ungünstiger prognostischer Einfluss war eine erhöhte intratumorale CD68-Dichte. Zudem zeigte eine positive PD-L1-Expression einen Zusammenhang mit signifikant verkürztem Gesamtüberleben der Patienten. Eine hohe CD20-Dichte im vitalen Tumor war mit einem längeren Gesamtüberleben bzw. mit einem längeren progressionsfreien Überleben unter einer IO-Therapie assoziiert. Die multivariate Analyse identifizierte erhöhte CD20-Dichten im vitalen Tumor als unabhängigen günstigen prognostischen Faktor sowohl im Bezug zum Gesamtüberleben als auch zum progressionsfreien Überleben unter IO-Therapie. Eine positive PD-L1-Expression in Tumorzellen erwies sich in der multivariaten Analyse als ungünstiger Faktor für das Gesamtüberleben der Patienten. Unter den untersuchten Leukozyten-Markern konnte nur eine hohe CD20-Dichte im vitalen Tumor signifikanter Prädiktor für ein gutes Ansprechen auf eine IO-Therapie identifiziert werden. Bezüglich der Gewebeerkennung mittels künstlicher Intelligenz war die Pixeltrefferquote auf 139 histologischen Schnitten für alle annotierten Klassen 90,05 %. Zudem war die Erkennung des vitalen Tumors von einer sehr hohen Präzision (98,7 %) und Sensitivität (90,7 %) gekennzeichnet.

Die Daten der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die Dichte der Immunzellinfiltrate und die PD-L1-Expression im Tumormikromilieu der ccRCC-Patienten mit metastasierter Erkrankung als prognostische Marker des Überlebens bzw. als prädiktive Marker für das Ansprechen auf eine IO-Therapie verwendet werden können. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass neuronale Netze Tumorgewebe von RCC zuverlässig detektieren können.

Abstract

Nikolaos Vasileiadis

Precise diagnosis of kidney tumours: influence of immune cell infiltrates on therapy response and long-term prognosis

The incidence of renal cell carcinoma has increased in recent years, particularly in countries with a high socio-economic level. Important risk factors for the development of renal cell carcinoma are smoking, high blood pressure and chronic kidney disease. The 2016 WHO classification divides renal cell carcinomas into three main groups that are most common, namely clear cell renal cell carcinoma, papillary renal cell carcinoma and chromophobe renal cell carcinoma. Non-metastatic renal cell carcinoma is treated with surgical interventions such as nephrectomy or partial kidney resection. In the past, metastases of the disease were usually treated with chemotherapy and radiation therapy, but there were no consistent effects. Cytokine therapy and targeted therapies (VEGF, mTOR) also showed no improvement. In recent years, combating metastatic disease using immune checkpoint inhibitors have shown promising results and are associated with a favorable outcome in RCC patients. However, only a small proportion of patients respond to immuno-oncological therapy with checkpoint inhibitors, so it is unclear which patients can benefit from this therapy. As with other tumour types, the tumour microenvironment can affect patient survival in renal cell carcinoma. In addition, the field of artificial intelligence related to cancer research has increased in recent years. Neural networks that mimic human intelligence can contribute to timely and reliable diagnosis and prognosis, as well as predicting response to therapy.

The main aim of the present work was to evaluate the prognostic/predictive importance of immune cell populations found in primary tumours and PD-L1 expression of tumour in patients with metastatic RCC. Another goal was the reliable detection of tumour tissue using methods of artificial intelligence.

The leukocyte density in primary clear cell renal cell carcinoma was quantified in various "regions of interest" using digital image analysis in order to determine the prognostic value of macrophages (CD68), tumour-associated macrophages (CD204), cytotoxic T-lymphocytes (CD8) and B-lymphocytes (CD20) in relation to overall survival or progression-free survival of immuno-oncological therapy in ccRCC patients. There was a significant association of

positive PD-L1 expression with poor differentiation and an increase in tumour stage. High intratumoral CD68 and CD204 density associated with dedifferentiation, large tumours and the presence of necrosis. In addition, the density of all investigated leukocyte markers in the vital tumour was significantly increased in PD-L1 positive tumours. An unfavorable prognostic influence was demonstrated by increased intratumoral CD68 densities. In addition, positive PD-L1 expression was associated with a significantly shortened overall survival of the patients. A high CD20 density in the vital tumour was associated with a longer overall survival as well as with a longer progression-free survival under immune-oncological therapy. The multivariate analysis of both overall survival and progression-free survival of immune-oncological therapy identified a high CD20 density in the vital tumour as an independent favorable prognostic factor. Positive PD-L1 expression in tumour cells was shown in the multivariate analysis to be an unfavorable factor in the overall survival of the patients. Among the leukocyte markers examined, only high CD20 density in the vital tumour could serve as a significant predictor for a good response to immune-oncological therapy. Regarding tissue recognition using artificial intelligence, the pixel hit rate on 139 histological sections for all annotated classes was 90.05%. In addition, the detection of the vital tumour was characterized by a very high precision (98.7%) and sensitivity (90.7%).

The data of the present work indicate that the density of immune cell infiltrates and PD-L1 expression in the tumour microenvironment of ccRCC patients with metastatic disease can be used as prognostic markers of survival and predictive markers of response to immune-oncological therapy. In addition, it was proven that the neural networks can reliably detect the tumour tissue.

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren des Nierenzellkarzinoms

Die Inzidenz des Nierenzellkarzinoms (RCC) ist in den letzten zwei Jahrzehnten weltweit gestiegen (Capitanio et al., 2019). Neu diagnostizierte Erkrankungen betreffen besonders Länder mit hohem sozioökonomischen Niveau (Znaor et al., 2015). Besonders Männer und Individuen mit Alter von über 60 Jahren sind von der Krankheit betroffen (Ferlay et al., 2015; Znaor et al., 2015). Wichtige Risikofaktoren, die eine Rolle zur Entstehung der Krankheit spielen, sind vor allem Rauchen, Adipositas, Bluthochdruck und chronische Nierenerkrankungen (Capitanio et al., 2019). Darüber hinaus hat das RCC eine höhere Mortalitätsrate im Vergleich zu anderen Urogenitalkrebsarten, wie Prostatakarzinom und Urothelkarzinom (Cairns, 2010).

1.2 Subtypen vom Nierenzellkarzinom nach WHO 2016

Das RCC ist in unterschiedliche histologische Typen unterteilt. Am häufigsten ist das klarzellige Nierenzellkarzinom (ccRCC, 70 - 90 %), gefolgt vom papillären Nierenzellkarzinom (pRCC, 10 - 15 %) und dem chromophoben Nierenzellkarzinom (chRCC, 3 - 5 %) (Cohen & McGovern, 2005; Moch et al., 2016; Warren & Harrison, 2018).

1.2.1 Klarzelliges Nierenzellkarzinom

Patienten mit ccRCC haben eine schlechtere Prognose im Vergleich zu Patienten, bei denen ein pRCC oder chRCC diagnostiziert wurde. Es gibt zudem eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass das ccRCC bei Erstdiagnose bereits metastasiert ist (Leibovich et al., 2010; Steffens et al., 2014). Das ccRCC entsteht aus dem Epithel des proximalen Tubulus des Nephrons (Chen et al., 2016; Díaz-Montero et al., 2020) und kommt in den meisten Fällen in sporadischer, aber auch in hereditärer Form vor (Macklin et al., 2020). Beide Formen des ccRCC sind durch einen Verlust der chromosomalen 3p Untereinheit (Jonasch et al., 2021) sowie durch den Verlust bzw. eine Mutation des Tumor-Suppressor-Gens von Hippel-Lindau (VHL) charakterisiert (Latif et al., 1993; Nickerson et al., 2008). Der Verlust des VHL-Proteins verhindert den biologischen Abbau des HIF- α -Proteins durch das Proteasom. Anschließend bildet HIF- α mit HIF- β im Zytoplasma Dimere, die in den Kern wandern und Gene aktivieren, welche mit der Entstehung des ccRCC assoziiert sind (Clark, 2009). Makroskopisch weist das ccRCC solide gelbe Bereiche auf, bei denen häufig Zystenbildungen, Nekrosen und Blutungen vorkommen. Mikroskopisch imponieren die Zellen des ccRCC meist klar. Allerdings können Zellen vom

ccRCC bei höherer Gradierung durch ein eosinophiles und granuläres Zytoplasma charakterisiert sein (Reuter et al., 2014; Warren & Harrison, 2018).

1.2.2 Papilläres Nierenzellkarzinom

Das papilläre Nierenzellkarzinom (pRCC) ist durch solide, braune Bereiche charakterisiert, bei denen Zystenbildungen und Blutungen häufig vorkommen. Es entsteht aus Zellen der distalen Tubuli. Unter mikroskopischer Ansicht wurden pRCCs anhand der Zytomorphologie in 2 Kategorien unterteilt, nämlich Typ I pRCC und Typ II pRCC (Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2016; Díaz-Montero et al., 2020; Warren & Harrison, 2018). Diese Unterteilung wurde allerdings mit der neuen Klassifikation der WHO 2022 abgeschafft.

Der frühere Typ I des pRCC kommt in den meisten Fällen sporadisch vor. Allerdings gibt es auch eine hereditäre Form, die durch die Mutation des MET-Gens auf dem Chromosom 7 charakterisiert ist (Adeniran et al., 2015; Cohen & McGovern, 2005). Typ I pRCC war durch papilläre Strukturen charakterisiert, die quaderförmige Tumorzellen enthalten und eine gute Differenzierung aufwiesen. Charakteristisch bei diesen Tumoren war die Ansammlung von Schaumzellen in den Zentren der Papillen (Warren & Harrison, 2018). Im Gegensatz zu Typ I pRCC wurde Typ II pRCC durch Zellen mit eosinophilem Zytoplasma und schlechter Differenzierung charakterisiert (Reuter et al., 2014; Warren & Harrison, 2018).

1.2.3 Chromophobes Nierenzellkarzinom

Das chromophobe Nierenzellkarzinom (chRCC) ist eine in den meisten Fällen sporadisch vorkommende Form des RCC und hat eine eher gute Prognose. Das chRCC stammt aus Zellen der distalen Tubuli des Nephrons (Díaz-Montero et al., 2020). Makroskopisch handelt es sich um Tumoren mit brauner Schnittfläche und mikroskopisch bestehen diese aus großen Tumorzellen mit prominenten Zellmembranen und einem hellen Zytoplasma. Es gibt allerdings eine Variante, bei der die Tumorzellen sich durch ein eosinophiles Zytoplasma auszeichnen (Reuter et al., 2014; Warren & Harrison, 2018).

1.2.4 Andere RCC-Subtypen

Nach der Klassifikation der WHO 2016 existieren weitere neue Tumor Entitäten: Das Succinat-Dehydrogenase-defiziente RCC und das tubulozystische RCC. Darüber hinaus zählen zu den RCC-Subtypen das Sammelrohrkarzinom, das Hereditäre-Leiomyomatose- und Nierenzellkarzinom-assoziierte RCC, das medulläre Karzinom, die MiT-Familie der

Translokationskarzinome und das nicht klassifizierte RCC (Moch et al., 2016; Warren & Harrison, 2018).

1.3 Anti-Tumor Immunantwort

Damit das Immunsystem effektiv Tumorzellen eliminieren kann, sind mehrere Schritte seitens des Immunsystems nötig. Voraussetzung dafür ist die Neoantigen-Bildung der Tumorzellen, die von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) aufgenommen werden. Neoantigene sind eine Klasse potenzieller Krebsabwehrantigene und werden von Peptiden gebildet, die im normalen humanen Genom vollständig fehlen (Schumacher & Schreiber, 2015). Als APCs werden Zellen myeloiden Ursprungs, wie dendritische Zellen (DCs) und Makrophagen, und B-Lymphozyten bezeichnet, die dafür zuständig sind, T-Lymphozyten zu aktivieren. Nach der Aufnahme durch die APCs werden die Tumor-spezifischen Antigene prozessiert und anschließend auf der Oberfläche der Zellmembran am Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II) gebunden. Die APCs wandern zu den sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten) und präsentieren dort den T-Lymphozyten die Tumor-spezifischen Antigene. Erkennen T-Lymphozyten ein spezifisches Tumor-Antigen, werden sie in den Lymphknoten aktiviert und entwickeln sich zu Effektorzellen. Effektorzellen sind unter anderem zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), welche die Fähigkeit besitzen, Tumorzellen Antigen-spezifisch zu eliminieren (Chen & Mellman, 2013). Die CTLs infiltrieren den Tumor (Harlin et al., 2009) und erkennen dort die entsprechenden Tumor-spezifischen Antigene, die am Haupthistokompatibilitätskomplex I (MHC I) auf der Oberfläche der Tumorzellen verankert sind, indem der T-Zell-Rezeptor (TZR) spezifisch am MHC I-Antigen Komplex bindet mit anschließender Elimination der Zielzelle (Chen & Mellman, 2013). Die Anti-Tumor Immunreaktion kann durch mehrere Mechanismen gestört sein. Eine fehlerhafte Detektion der Tumor-spezifischen Antigene kann dazu führen, dass regulatorische T-Lymphozyten (Tregs) aktiviert werden. Darüber hinaus kann die Infiltration des Tumors durch CTLs verhindert sein bzw. kann das Tumormikromilieu zur Suppression der Funktion der CTLs führen (Motz & Coukos, 2013).

1.4 Das Tumormikromilieu

In den letzten Jahren rückte das Tumormikromilieu in den Fokus der Krebsforschung (Du et al., 2020). Das Tumormikromilieu besteht aus nicht tumorösen Zellen und Molekülen (Zytokine und Chemokine), die die Tumorzellen umgeben. Diese nicht tumorösen Zellen sind Leukozyten (Lymphozyten und mononukleäre Phagozyten), Fibroblasten und Adipozyten. Weiterhin zählen zum Tumormikromilieu noch Blutgefäße und extrazelluläre Matrix (ECM) (Cui & Guo, 2016; Denton et al., 2018). Die Komponenten des Tumormikromilieus beeinflussen signifikant das Ansprechen auf eine Krebs-Therapie und den klinischen Verlauf (Wu & Dai, 2017). Durch den Cross-Talk der Immuninfiltrate mit den Tumorzellen wird das Wachstum und die Metastasierung beeinflusst (Haykal et al., 2020).

1.4.1 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM)

Makrophagen sind Leukozyten des angeborenen Immunsystems und kommen im Tumormikromilieu der meisten Tumore vor (Davidsson et al., 2020). Diese Zellen bilden unterschiedliche Subtypen aus und werden grob und modellhaft in M1- und M2-Makrophagen eingeteilt (Wang et al., 2019). M1-Makrophagen verfügen über einen immunstimulierenden und antitumoralen Phänotyp, während M2-Makrophagen eine immunsuppressive und protumorale Wirkung besitzen (Murray & Wynn, 2011). Die Aktivierung der beiden Phänotypen erfordert besondere Stimuli. „Klassisch“ aktivierte M1-Makrophagen werden in der Regel durch Lipopolysaccharide (LPS), Interferon-Gamma (IFN- γ) und Tumor-Nekrose-Faktor Alpha (TNF- α) aktiviert und sind an der Aktivierung der Th1 Immunantwort beteiligt, während „alternativ“ aktivierte M2-Makrophagen durch die Zytokine IL-4, IL-10, IL-13 und den transformierenden Wachstumsfaktor Beta (TGF- β) induziert werden. Makrophagen vom M2-Phänotyp sind an der Aktivierung vom Th2 Immunantwort beteiligt (Hu et al., 2017; Wu et al., 2020). Innerhalb eines Tumors werden üblicherweise Makrophagen als Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) bezeichnet, die ähnliche Funktionen wie M2-Makrophagen ausüben (Lin et al., 2019; Wang et al., 2019). TAMs vom M1-Phänotyp verfügen über eine Vielfalt von Funktionen. Sie sind in der Lage, sowohl Mikroorganismen als auch Tumorzellen zu eliminieren und sezernieren hohe Mengen an immunstimulierenden Zytokinen wie IL-12 (Qian & Pollard, 2010; Tamma et al., 2019). Auf der anderen Seite sezernieren TAMs vom M2-Phänotyp immunsupprimierende Zytokine wie IL-10 und für die Angiogenese Faktoren wie VEGF und Matrix-Metalloproteasen (MMP). Somit fördern TAMs vom M2-Phänotyp den Umbau von geschädigtem Gewebe, die Angiogenese, die Suppression der adaptiven Immunität,

das Tumorwachstum, die Tumorprogression und die Metastasierung (Akkari et al., 2014; Hu et al., 2017; Kovaleva et al., 2016; Muhitch et al., 2019; Wu et al., 2020).

Eine hohe Infiltration durch TAMs vom M2-Typ ist bei einer Reihe von malignen Erkrankungen wie RCC, Mammakarzinom, Pankreaskarzinom, Magenkarzinom und Ösophagus Karzinom mit einer schlechten Prognose assoziiert (Chakiryan et al., 2021; Chevrier et al., 2017; Cowman et al., 2020; Komohara et al., 2011; Kovaleva et al., 2016; Muhitch et al., 2019; Shen et al., 2021; Su et al., 2018; Wu et al., 2020; Yagi et al., 2019; Yang et al., 2015; Zhang et al., 2019). Andere Studien haben allerdings gezeigt, dass bei kolorektalem Karzinom TAMs mit einer besseren Prognose assoziiert sind (Koelzer et al., 2015; Nagorsen et al., 2007). Übliche Marker für die TAMs sind die Antigene CD68, CD163 und CD204, wobei CD68 als Pan-Makrophagen Marker bezeichnet wird (Komohara et al., 2008; Komohara et al., 2011). Die Antigene CD163 und CD204 werden als Marker für M2 TAMs verwendet (Gordon, 2003; Komohara et al., 2008).

1.4.2 Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL)

RCCs weisen eine hohe Anzahl infiltrierender Lymphozyten auf (Xu et al., 2020). Diese bestehen häufig aus zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs), T-Helfer-Zellen und „natural killer cells“ (NK-Zellen). Marker für CTLs ist das CD8-Antigen und für T-Helfer-Zellen das CD4-Antigen (Díaz-Montero et al., 2020; Kopecký et al., 2007). Tumoren mit hoher Infiltration durch TILs werden als immunologisch heiße Tumoren („hot tumors“) bezeichnet (Maleki 2018). CTLs beherrschen zwei unabhängige Mechanismen zur Eliminierung der Tumorzellen, die Sekretion von Perforinen und Granzymen sowie den FAS/FAS-Liganden Weg. Beide Mechanismen führen zur Aktivierung der Caspase-Kaskade, die zur Apoptose der Tumorzellen führt (Xie et al., 2021; Zhang & Bevan, 2011).

Eine hohe CTL-Infiltration ist bei einer Reihe von Tumoren wie Mammakarzinom, kolorektalen Karzinom, Ösophagus-Karzinom und Ovarialkarzinom mit einer guten Prognose assoziiert (Denkert et al., 2018; Galon et al., 2006; Jakubowska et al., 2017; Yagi et al., 2019; Zhang et al., 2003). Im Gegensatz dazu, zeigte eine höhere CTL-Infiltration im RCC eine schlechte Prognose (Giraldo et al., 2017; Nakano et al., 2001). Es gab allerdings Studien, bei denen hohe CTL-Dichte im RCC mit einem längeren Patientenüberleben assoziiert war (Giraldo et al., 2015).

Zu den TILs gehören zusätzlich B-Lymphozyten, deren Hauptfunktion die Produktion von Antikörpern ist. Intratumorale B-Lymphozyten und Plasmazellen (PCs) werden gemeinsam als Tumordinfiltrierende B-Lymphozyten (TIL-Bs) bezeichnet. Bei immunologisch heißen Tumoren befinden sie sich meist zusammen mit Makrophagen, DCs und T-Lymphozyten in tertiären lymphoiden Strukturen (TLS) (Laumont et al., 2022). TLSs ähneln strukturell den Lymphknoten und entstehen de novo in der Tumor Matrix als Reaktion auf Antigene (Domblides et al., 2021; Sautès-Fridman et al., 2019). Zusammen mit DCs und Makrophagen dienen B-Lymphozyten als professionelle APCs, die die Fähigkeit besitzen, MHC I und II verankerte Antigene T-Lymphozyten (jeweils CD8 und CD4) zu präsentieren (Hua & Hou, 2020). Ähnlich wie bei T-Lymphozyten besitzen TIL-Bs verschiedene funktionelle Phänotypen. B-Lymphozyten können einen Effektor-Phänotyp wie auch regulatorische Funktionen (regulatorische B-Lymphozyten (Bregs)) aufweisen (Laumont et al., 2022). Konventionelle B-Lymphozyten wirken immunstimulierend, indem sie Zytokine wie IL-6, IFN- γ , TNF und IL-2 sezernieren (Shen & Fillatreau, 2015). Dagegen exprimieren Bregs regulatorische Zytokine wie IL-10, IL-35 und TGF- β , was zu einer Immunsuppression führt, indem IL-12- und TNF- α -produzierende Monozyten und CTLs unterdrückt werden, während die Funktion von Tregs induziert wird (Rosser & Mauri, 2015; Shen & Fillatreau, 2015).

Ähnlich wie bei den T-Lymphozyten ist ein Anstieg von TIL-Bs mit einer guten Prognose bei den meisten Tumoren wie auch bei RCC assoziiert (Stenzel et al., 2020; Tsou et al., 2016). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass eine hohe Infiltration von CD20-positiven B-Lymphozyten im RCC auch zu einer schlechten Prognose führt (Sjöberg et al., 2018). Mit Ausnahme von PCs wird das CD20 Antigen als Pan-Marker für die B-Lymphozyten bezeichnet (Gunderson & Coussens, 2013).

1.4.3 PD-L1-Expression im Tumormikromilieu

Das „programmed death 1“ (PD-1) Protein ist ein inhibitorischer Rezeptor, der auf aktivierten und „exhausted“ T-Lymphozyten (T-Lymphozyten mit Funktionsverlust) exprimiert wird (Grosso et al., 2013; Thompson et al., 2007; Wang et al., 2021). Unter normalen Konditionen sind diese Rezeptoren, die auch als Immuncheckpoint bezeichnet werden, entscheidend für die Selbsttoleranz und Verhinderung von Autoimmunität (Wang et al., 2021). Der Ligand des PD-1 Rezeptors ist das „programmed death ligand 1“ (PD-L1 oder CD274 oder B7-H1)-Protein und wird in verschiedenen Tumoren und in APCs exprimiert, darunter auch im RCC. 10 - 25 % der Tumorzellen im ccRCC exprimieren PD-L1 (Messai et al., 2016; Porta et al.,

2021; Ueda et al., 2018; Wang et al., 2021). Die Bindung des auf Tumorzellen befindlichen PD-L1 Liganden an den PD-1 Rezeptor auf CTLs führt zu einer negativen Regulation der CTL-Funktion mit anschließender Einstellung ihrer Proliferation, Reduzierung der Sekretion immunstimulierender Zytokine und Inhibition ihrer zytotoxischen Aktivität (Harshman et al., 2014). Es wurde nachgewiesen, dass eine hohe PD-L1-Expression im RCC einen negativen Einfluss auf das Überleben der Patienten hat (Iacovelli et al., 2016; Montemagno et al., 2020; Shin et al., 2016; Stenzel et al., 2020; Thompson et al., 2006). Zudem assoziierte die PD-L1-Expression mit Aggressivität des Tumors (Stenzel et al., 2020; Ueda et al., 2018).

1.5 Therapie des metastasierten RCC

Das nicht metastasierte RCC wird aktuell kurativ durch Nephrektomie oder Tumorentfernung durch Nierenteilresektion behandelt (Escudier et al., 2019). Trotzdem ist die Anzahl der durch RCC gestorbenen Patienten aufgrund von Rezidiven und Metastasen nicht zurückgegangen (Zhu et al., 2019). Die Behandlung des metastasierten RCC (mRCC) mittels Chemo- und Strahlentherapie zeigte keine Verbesserung des Ansprechens oder des Überlebens, da die RCCs resistent gegen diese Therapien sind (Baine et al., 2015; Harris, 1983). Die Therapie des mRCC mit den Zytokinen IL-2 und IFN- α wurde in den 1990er Jahren verwendet, war allerdings nur bei ca. 10 % der Patienten wirksam und zeigte eine signifikante Toxizität (Biswas & Eisen, 2009; Harshman et al., 2014; Wang et al., 2021). Zielgerichtete Therapien des mRCC gegen VEGF (Anti-Angiogenese Therapie) und „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) wurden von deutlich geringeren Nebenwirkungen charakterisiert, zeigten allerdings keine dauerhafte Verbesserung des Überlebens (Hudes et al., 2011; Lalani et al., 2019; Stenzel et al., 2020).

Als Innovation der letzten Jahre ist die immunonkologische Therapie (IO-Therapie) des mRCC sehr erfolgreich. Die IO-Therapie erfolgt mit der Verwendung von Immuncheckpoint-Inhibitoren. Diese sind monoklonale Antikörper gegen den Rezeptor PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab) bzw. gegen den Liganden PD-L1 (Atezolizumab), die als Ziel haben, die PD-1/PD-L1 Bindung zu blockieren und die Effektor-Funktion der CTLs zu aktivieren (Abbildung 1). Klinische Studien haben gezeigt, dass die Blockierung der PD-1/PD-L1-Achse häufiger bei Patienten mit metastasiertem ccRCC erfolgreich war, bei denen eine positive PD-L1-Expression auf Tumorzellen nachweisbar war (Zhu et al., 2019). Trotz des Erfolgs der IO-Therapie profitierte nur die Minderheit der Patienten mit mRCC und positiver Expression des PD-L1-Markers dauerhaft, während andere Patienten ohne nachweisbare PD-L1-Expression in Tumorzellen auch von der IO-Therapie profitierten, sodass es unklar ist, welche Patienten tatsächlich von den IO-Therapien profitieren können (Ribas & Hu-Lieskovan, 2016; Alsaab et

al., 2017; Díaz-Montero et al., 2020; Grünwald, 2016). Für einen bisher ungeklärten Mechanismus spricht auch, dass RCCs keine hohe Mutationslast („tumor mutational burden“, TMB) aufweisen (Alexandrov et al., 2013; Yakirevich & Patel, 2020). Obwohl die IO-Therapie erfolgreich mit dauerhaftem Ansprechen bei metastasierten Karzinomen eingesetzt wurde, gibt es dennoch Patienten bei denen eine Krankheitsprogression feststellbar war. Während der IO-Therapie werden CTLs durch die TZR-MHC I Bindung reaktiviert und die Tumorzellen erkannt. Infolgedessen produzieren T-Lymphozyten IFN- γ , das an den IFN- γ -Rezeptor auf Tumorzellen bindet und zur Aktivierung von JAK1 und JAK2 (Janus Kinasen 1 und 2) und anschließender Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT („signal transducers and activators of transcription“) in den Tumorzellen führt. Die IFN-stimulierenden Gene werden somit induziert, was zu antitumoralen Effekten führt (Marabelle et al., 2017; Shin et al., 2017). Studien zeigten, dass Mutationen der JAK1 und JAK2 bzw. der Verlust des Beta-2-Mikroglobulin Proteins (b2M) des MHC I in Tumorzellen als Mechanismen einer erworbenen Resistenz gegen die IO-Therapie fungierten (Zaretsky et al., 2016).

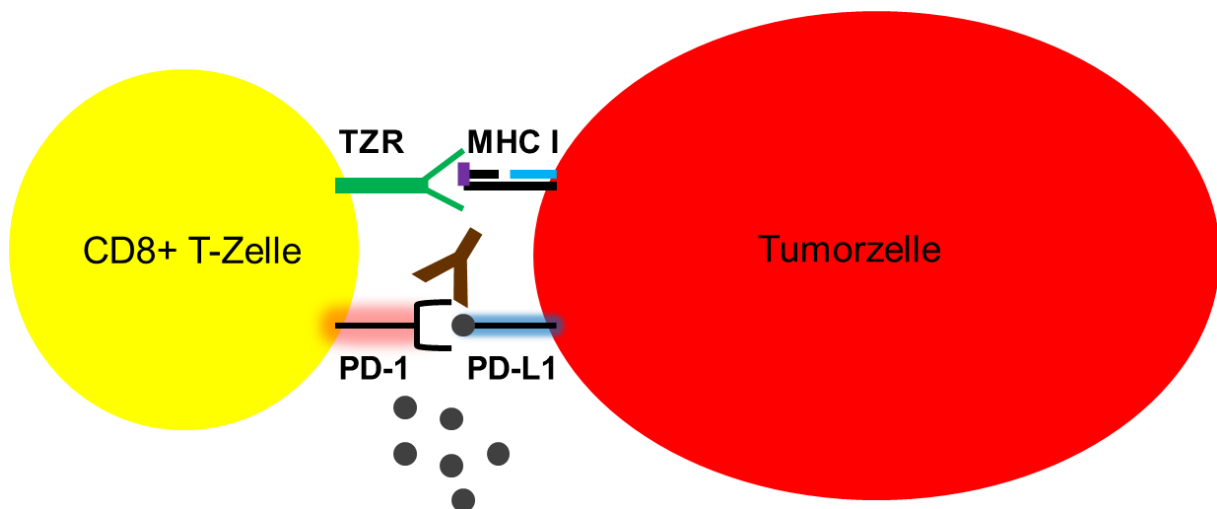


Abbildung 1: Mechanismus der Wirkung von Immuncheckpoint-Inhibitoren. Die Blockierung der PD-1/PD-L1-Bindung führt zur Reaktivierung der erschöpften CD8-positiven T-Lymphozyten (CTLs). Diese sezernieren Perforine und Granzyme, um die Tumorzellen zu eliminieren.

1.6 Digitale Pathologie

Die digitale Pathologie als Teilgebiet der Pathologie beschäftigt sich mit der Analyse von Daten und Informationen, die aus digitalisierten Schnittpräparaten erzeugt werden. Glasobjektträger-Scanner dienen dazu, aus Schnittpräparaten „whole slide images“ (WSI) zu erzeugen (Pantanowitz et al., 2018). Der erste kommerzielle Glasobjektträger-Scanner wurde von der Firma BLISS (Bacus Laboratories Inc., Slide Scanner) im Jahr 1994 entwickelt (Pantanowitz et al., 2018). Die digitale Pathologie findet Anwendung in der Diagnostik, in klinischen Studien und in der Wissenschaft (Barisoni et al., 2020; Pantanowitz et al., 2011). Histologische Bilder enthalten Marker für den Krankheitsverlauf von Patienten und verfügen über eine wichtige diagnostische und prädiktive Wertigkeit (Tabibu et al., 2019). Die Digitalisierung von histologischen Schnitten ermöglicht durch den Einsatz des Computers die Durchführung von quantitativen und reproduzierbaren Messungen an histologischen Schnitten (Deroulers et al., 2016). Bei der explorativen Biomarker-Analyse zur Diagnose, Prognose und Kontrolle eines Therapieansprechens können aus den digitalisierten histologischen Schnitten bestimmte histologische Bereiche extrahiert werden, indem zuvor eine präzise Segmentierung stattfand (Miao et al., 2021). Geeignete Bildanalyse-Software wie das Programm QuPath ermöglichen die digitale Bearbeitung von histologischen Schnitten, indem sie anschließend auf dem Bildschirm des Computers in „regions of interest“ (ROIs) annotiert und klassifiziert werden (Bankhead et al., 2017). Das maschinelle Lernen (ML) ist ein Gebiet der künstlichen Intelligenz, das auf einer Computersoftware beruht, die die Fähigkeit besitzt, aus einem Satz von manuell erstellten Trainingsdaten zu lernen, um Prädiktionen über Datenpunkte außerhalb des ursprünglichen Trainingsdatensatzes zu treffen (Wang & Li, 2021; Erickson et al., 2017; Ting et al., 2023). Deep learning ist ein neuer Bereich des ML, das neuronale Netze verwendet, die die menschliche Intelligenz imitieren und detaillierte Charakteristika aus den digitalisierten Bildern extrahieren, wobei Bildinformationen in Ergebnisse umgewandelt werden (Barisoni et al., 2020; Tran et al., 2021). Unter den Veröffentlichungen zu deep learning in der Krebsdiagnostik finden sich einzelne, in denen diese Systeme vergleichbare oder sogar bessere Leistungen als humane Spezialisten erbrachten (Kleppe et al., 2021).

2. Zielsetzung

Bis heute gibt es wenige Studien, welche die prognostische Bedeutung der Immunzellinfiltrate des metastasierten ccRCC untersucht haben. Zusätzlich fehlen Biomarker, die das Ansprechen einer IO-Therapie zuverlässig voraussagen können. Zudem verwenden viele Studien „tissue microarrays“ (TMA), welche nicht die Heterogenität der RCCs abbilden können. Die Erkennung des Tumorgewebes mittels Methoden der künstlichen Intelligenz im RCC befindet sich in frühen Stadien, sodass es weitere Studien zur Bewertung und Optimierung notwendig sind.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- Sind Immunzellinfiltrate und die PD-L1-Expression im primären ccRCC prognostisch/prädiktiv für den Krankheitsverlauf und das spätere Therapieansprechen bei einer immunonkologischen Therapie (IO-Therapie) der metastasierten Erkrankung?
- Können neuronale Netze zuverlässig den vitalen Tumor im RCC detektieren?

Kern-Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

- Charakterisierung von Immunzellinfiltraten im ccRCC (Menge, Lokalisation, Zusammensetzung).
- Identifizierung von Biomarkern, welche prognostisch für den Krankheitsverlauf bzw. das Therapieansprechen einer IO-Therapie des metastasierten ccRCC nutzbar sind.
- die Entwicklung von neuronalen Netzen mit dem Ziel, vitales Tumorgewebe zuverlässig digital zu identifizieren.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden in dieser Arbeit verwendet (Tabelle S1 im Anhang).

3.2 Geräte

Die im Rahmen der Experimente verwendete Geräte sind in der Tabelle S2 im Anhang aufgelistet.

3.3 Patientenkollektiv

Die vorliegende retrospektive Studie enthielt insgesamt 171 Patienten, bei denen zwischen 1992 und 2018 an der Medizinischen Hochschule Hannover ein metastasiertes Nierenzellkarzinom (mRCC) diagnostiziert bzw. behandelt wurde. Zusätzlich wurden fünf Patienten aus dem Uniklinikum Essen eingeschlossen. Bei allen Patienten erfolgte initial eine Nephrektomie (89,63 %) bzw. eine Nierenteilresektion (10,37 %). Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose waren 44 % der Nierenzellkarzinome bereits metastasiert (synchrone Metastasierung). Es erfolgte keine Neo-Adjuvante Therapie. Paraffinblöcke mit den entsprechenden primären Tumoren stammten aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover bzw. wurden aus externen Instituten angefordert oder aus dem Uniklinikum Essen gesendet. Wichtige Charakteristika (Alter, Geschlecht, Differenzierungsgrad, T Status, N Status) waren für alle Patienten der Kohorte verfügbar. Außerdem waren bei allen Patienten Daten zur Therapie (Zytokin-, IO-, mTOR und TKI-Therapie) sowie auch der klinische Verlauf und Daten zum progressionsfreien Überleben (PFS) verfügbar. Alle Tumoren wurden gemäß den Richtlinien der WHO-Klassifikation 2016 reklassifiziert und nach WHO/ISUP bewertet.

3.4 Kriterien für die Patientenauswahl

Eingeschlossen wurden Patienten, welche in der Datenbank der Klinik für Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und Stammzelltransplantation mit metastasiertem RCC erfasst waren und von denen Material der Nephrektomie im Archiv des Instituts für Pathologie der MHH verfügbar war bzw. aus externen Instituten angefordert werden konnte. Außerdem sollte bei jedem/r Patient/in das vitale Tumorgewebe nach Möglichkeit gut abgrenzbar zum erhaltenen Nierengewebe sein. So wurden repräsentative Paraffinblöcke bei jedem/r Patient/in ausgewählt, von denen anschließend Serienschnitten ausgefertigt und gefärbt wurden.

3.5 (Immun)histochemische Färbungen

Die Färbungen an den Serienschnitten wurden in festgelegter Reihenfolge durchgeführt:

1. CA-IX Färbung, 2. AMACR Färbung, 3. CK7 Färbung, 4. CD117 Färbung,
5. PD-L1 Färbung, 6. CD68 Färbung, 7. CD204 Färbung, 8. HE-EI Färbung,
9. CD8/CD20 Doppelfärbung.

Hämatoxylin-Eosin und Elastika van Gieson (HE-EI) und immunhistochemische Färbungen wurden für die Reklassifikation der RCCs durchgeführt. Diese beinhalteten zunächst CA-IX, AMACR, CK7, CD117 und es wurden bei Bedarf zusätzliche immunhistochemische Färbungen für seltene RCCs eingeschlossen. Dazu gehörten PAX8, CD10, GATA3, AE1/AE3, TFE3, SDHA, SDHB. Durchführung der histochemischen HE-Elastika-Färbung erfolgte vollautomatisiert (Leica Histocore Spectra). Das entsprechende Protokoll ist im Anhang aufgelistet (Protokoll 1). Durch die Färbung erscheinen die Zellkerne blau, die elastischen Fasern schwarz-braun und das Zytoplasma und Bindegewebe pink. Antikörper für die Immunhistochemie sind in der Tabelle 1 aufgelistet. Diese Färbungen wurden im Immunlabor des Instituts für Pathologie der MHH vollautomatisiert (Ventana) durchgeführt. Für die immunhistochemische Färbung der mit CD204 markierten Makrophagen wurden zunächst Austestungen durchgeführt, um ein Färbeprotokoll zu etablieren. Eine Übersicht der durchgeführten Immunhistochemischen Färbungen ist in der Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie.

Antikörper	Hersteller
Monoklonal Maus Anti-CD8 (Klon: 144B)	Dako-Agilent, Santa Clara, Vereinigte Staaten von Amerika
Monoklonal Maus Anti-CD20 (Klon: L26)	Dako-Agilent, Santa Clara, Vereinigte Staaten von Amerika
Monoklonal Maus Anti-CD68 (Klon: PG-M1)	Dako-Agilent, Santa Clara, Vereinigte Staaten von Amerika
Monoklonal Maus Anti-MSR1 (CD204) (Klon: OTI9E5)	OriGene Technologies, Rockville, Vereinigte Staaten von Amerika
Monoklonal Kaninchen Anti-PD-L1 (Klon: SP263)	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Monoklonal Kaninchen Anti-AMACR (Klon: 13H4)	Dako-Agilent, Santa Clara, Vereinigte Staaten von Amerika
Polyklonal Kaninchen Anti-CA-IX	Novus Biologicals, Centennial, Vereinigte Staaten von Amerika
Monoklonal Kaninchen Anti-CD117 (Klon: YR145)	Cell Marque, Rocklin, Vereinigte Staaten von Amerika
Monoklonal Maus Anti-CK7 (Klon: OV-TL 12/30)	Dako-Agilent, Santa Clara, Vereinigte Staaten von Amerika
Esel Anti-Maus-HRP	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Cambridgeshire, Vereinigtes Königreich

Tabelle 2: Übersicht von durchgeführten immunhistochemischen Färbungen im Ventana System.

Primär-Antikörper	Vorbehandlung/Inkubationszeit/Verdünnung	Sekundär-System
CD8/CD20 Doppelfärbung	CD8: Tris-EDTA pH 7,8/32 Minuten/1:25	UltraView Universal HRP-DAB Detection Kit (CD8)
	CD20: Tris-EDTA pH 7,8/32 Minuten/1:500	UltraView Universal AP-Red Detection Kit (CD20)
CD68	Tris-EDTA pH 7,8/32 Minuten/1:200	UltraView Universal HRP-DAB Detection Kit
PD-L1	Tris-EDTA pH 7,8/32 Minuten/RTU	
AMACR	Citrat pH 6/32 Minuten/1:50	
CA-IX	Tris-EDTA pH 7,8/32 Minuten/1:1000	
CD117	Tris-EDTA pH 7,8/32 Minuten/1:100	
CK7	Tris-EDTA pH 7,8/32 Minuten/1:800	

3.5.1 Etablierung der CD204 Immunfärbung

Während alle anderen immunhistochemischen Färbungen verfügbare und etablierte Routine-Färbeprotokolle hatten, musste die CD204-Färbung neu etabliert werden. Das essentielle Ziel dieser Immunfärbung war eine höhere Spezifität der Immunmarkierung. Zudem musste eine unspezifische Färbung vermieden werden. Austestungen erfolgten in Testschnitten mit RCC-Tumorgewebe und mit Plazentagewebe als Kontrolle. Sowohl die Test-Reihen für CD204 als auch das etablierte Färbeprotokoll der CD204 Serien-Immunfärbungen wurden semiautomatisiert durchgeführt: die Vorbehandlungen wurden manuell durchgeführt, während die Inkubation vom Primär- und Sekundär-Antikörper automatisiert in einem Färbeautomaten (InsituPro VSI) erfolgten. Das entsprechende Protokoll ist im Anhang aufgelistet (Protokoll 2).

3.6 Digitalisierung der Schnittpräparate

Die gefärbten Schnittpräparate wurden mithilfe des Objektträger-Scanners Metafer (MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlußheim, Deutschland) digitalisiert, um weitere Arbeiten mittels Bildanalyse-Software durchzuführen. Die Schnittpräparate wurden mit einer 20-fachen Vergrößerung und einer Pixelauflösung von 0,1729 µm gescannt und als WSI (svs-Format) digitalisiert.

3.7 Erzeugung von manuellen Annotationen

WSI wurden mit der Bildanalyse-Software QuPath Version 0.2.3 bearbeitet (Bankhead et al., 2017). Prinzipiell wurden folgende Areale („regions of interest“, ROIs) annotiert: Vitaler Tumor, Tumor-Regression, Tumor-Nekrose, intratumorale Blutung, Tumor-Kapsel, Angioinvasion, intratumorale Zystenbildungen und dazu extratumorale Areale: Cortex, atrophisches kortikales Gewebe, Nierenmark und extrarenales Gewebe. Ein komplett

annotierter Schnitt wurde anschließend nach dem 4-Augen Prinzip bezüglich der Richtigkeit der Annotationen überprüft, um mögliche Fehler zu korrigieren.

Größe der Annotationen

Die zu annotierenden Objekte mussten größer als ein Kästchen mit einer Größe von 1152 X 1152 Pixel sein. Sollte sich ein Objekt vollständig im Kästchen mit der oben genannten Größe befinden, wurde es von einer Annotation ausgeschlossen.

Die ROIs wurden folgendermaßen definiert:

Vitaler Tumor

Aus vitalen Tumorzellen bestehendes Tumorgewebe wurde als vitaler Tumor definiert. Dieser Bereich wurde mit möglichst präziser Abgrenzung zum umliegenden Gewebe annotiert. Der vitale Tumor wird meist von einer Kapsel (vom Normalgewebe ausgehend) und/oder Regression umgeben. Wenn innerhalb der Fläche des zu annotierenden vitalen Tumors Regression und/oder Blutung und/oder Nekrose auftrat, wurden Grenzwerte festgelegt, unterhalb derer letztere ignoriert wurden: Vitaler Tumor mit einem Flächenanteil von $\geq 50\%$ innerhalb des betreffenden Areals (in diesem Fall Fläche des vitalen Tumors) wurde trotz Regression und/oder Blutung und/oder Nekrose als vitaler Tumor gewertet. Abbildungen 2 - 4 illustrieren die unterschiedlichen ROIs bzw. Klassen.

Regression

Die Regression bezeichnet Tumorregionen, in welchen Tumorzellen durch oft myxoides Gewebe bzw. zellarmes kollagenes Narbengewebe ohne sichtbare Nekrose ersetzt sind. Ein Übergang zur Nekrose ist hier fließend möglich. Darüber hinaus sind Makrophagen mit Hämosiderin (Eisen-Speicherung) oft mit einer Regression assoziiert. Auch hier wurden oben genannte Grenzwerte berücksichtigt: Regression mit einem Flächenanteil von $\geq 50\%$ innerhalb des betreffenden Areals (in diesem Fall Fläche der Regression) wurde trotz vitalen Tumors und/oder Blutung und/oder Nekrose als Regression gewertet (Abbildung 3B).

Nekrose

Unter Nekrose versteht man eine definierte Form des Zelltods, der durch pathologische Prozesse ausgelöst wird (Elmore et al., 2016). Histologische Charakteristika einer Nekrose sind Detritus, Kernauflösung und Kernfragmentierung. Darüber hinaus sind nekrotische Tumorzellen durch pyknotische Kerne, fehlende Intaktheit der Zellmembran, Eosinophile des Zytoplasmas sowie auch „ghost“ Zellen charakterisiert (Elmore et al., 2016) (Abbildung 3C). Zu annotierenden Objekte als Nekrose mussten größer als ein Kästchen mit einer Größe von 1152 X 1152 Pixel sein.

Blutung

Die intratumorale Blutung wurde definiert als zusammenhängendes Areal dicht gelagerter Erythrozyten. Laut der Größendefinition mussten zu annotierenden Blutungen größer als ein Kästchen mit einer Größe von 1152 X 1152 Pixel sein.

Angioinvasion

Angioinvasion wurde definiert als innerhalb von Endothel-abgeleiteten Hohlräumen/Gewebsspalten gelagerte vitale Tumorverbände (Abbildung 4A). Zu annotierenden Objekte als Angioinvasion mussten laut Größendefinition größer als ein Kästchen mit einer Größe von 1152 X 1152 Pixel sein.

Kapsel

Die Tumorkapsel umschließt den Tumor ganz oder nur teilweise (Abbildung 2B). Sie wurde definiert als aus parallelen kollagenen und elastischen Lamellen aufgebaute Struktur mit einzelnen spindeligen Zellen. Häufig waren atrophische Bestandteile des Nierenparenchyms in der Kapsel enthalten. In der Regel grenzte die Tumor-Kapsel den Tumor zum Nierengewebe bzw. extrarenalen Gewebe ab. Wenn eine Kapsel in Regression überging, wurde dann dieser Kapselteil als Regression definiert.

Nierenparenchym

Das Nierenparenchym wurde in der Form von Cortex und Nierenmark annotiert, wobei atrophisches kortikales Gewebe gesondert annotiert wurde. Große Gefäße im Bereich der Cortex-Mark-Grenze wurden dem Cortex zugeordnet (Abbildungen 2C und 2D).

Extrarenal

Zur Klasse Extrarenal gehörten perirenales Fettgewebe, das extrarenale hiläre Gewebe mit dazugehörigen Gefäßscheiden, das Nierenbecken, der Harnleiter und die Organkapsel (Abbildung 3D).

Zystenbildungen

Zystenbildungen wurden intratumoral annotiert. Abbildung 4B stellt eine repräsentative Zystenbildung dar. Laut der Größendefinition mussten zu annotierenden Zystenbildungen größer als ein Kästchen mit einer Größe von 1152 X 1152 Pixel sein.

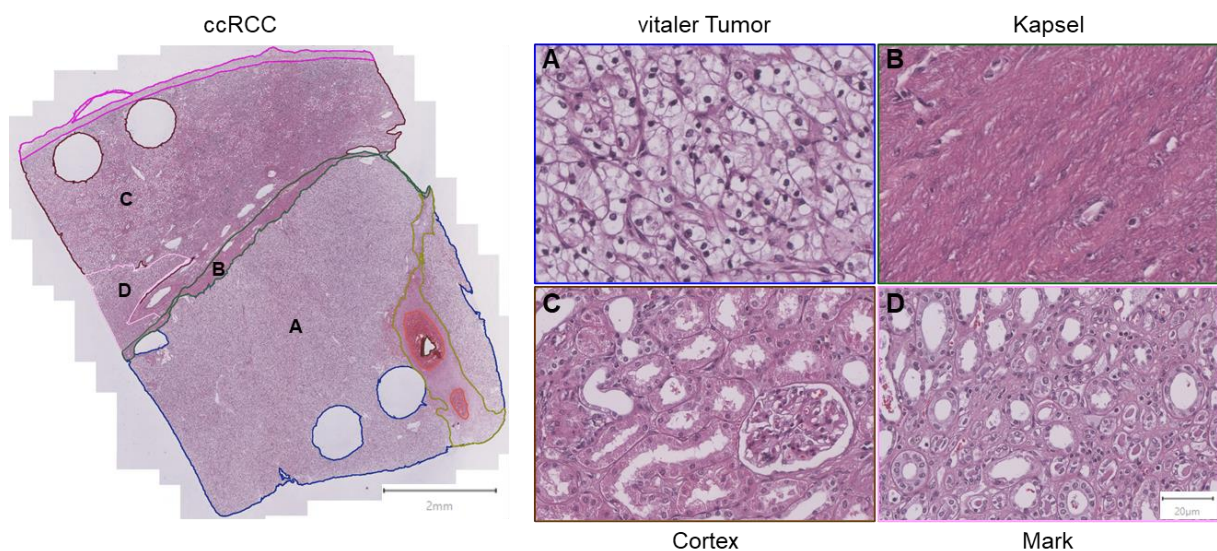


Abbildung 2: HE-EI gefärbter Nieren-Tumor Schnitt mit entsprechenden Annotationen. Manuelle Annotationen der „regions of interest“ (ROIs) wurden auf einem HE-EI gefärbten Schnitt erzeugt. Folgende repräsentative Bereiche sind erkennbar: **A:** vitaler (G2) Tumor, **B:** Kapsel, die den Tumor umschließt, **C und D:** jeweils repräsentative kortikale und medulläre Bereiche des erhaltenen Nierenparenchyms. Die Löcher im Übersichtsbild (links) sind durch Gewebeentnahme mittels Stanzbiopsie entstanden (vorherige Studien).

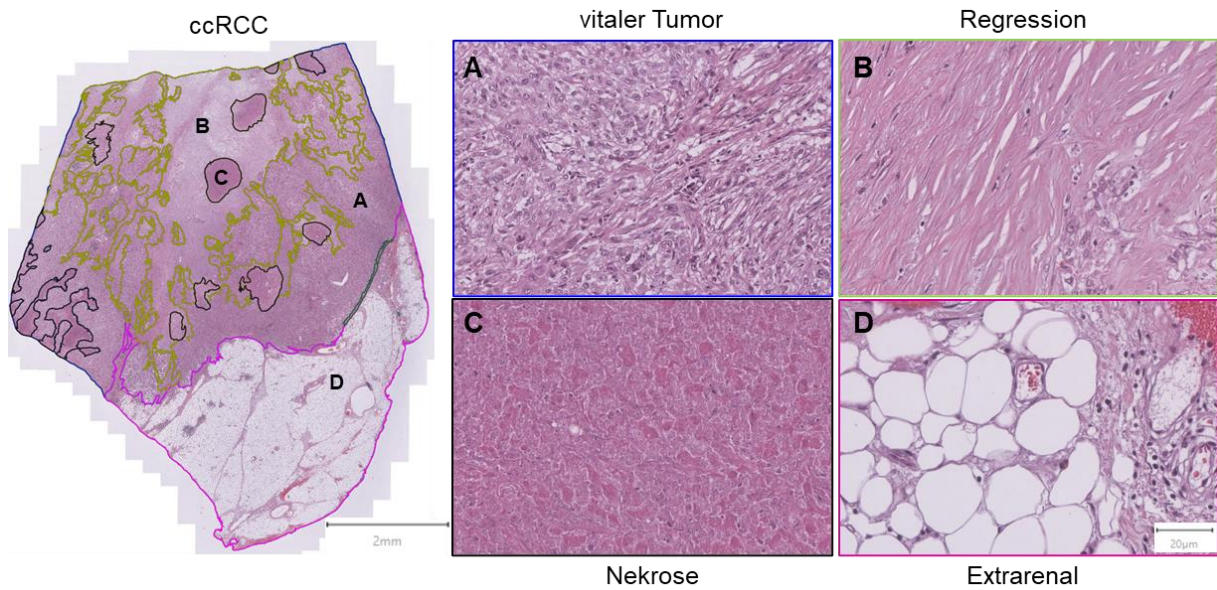


Abbildung 3: HE-EI gefärbter Nieren-Tumor Schnitt mit entsprechenden Annotationen. Manuelle Annotationen der „regions of interest“ (ROIs) wurden auf einem HE-EI gefärbten Schnitt erzeugt. Folgende repräsentative Bereiche sind erkennbar: **A:** vitaler (G4) Tumor, **B:** Regression, **C:** Nekrose und **D:** extrarenales Gewebe.

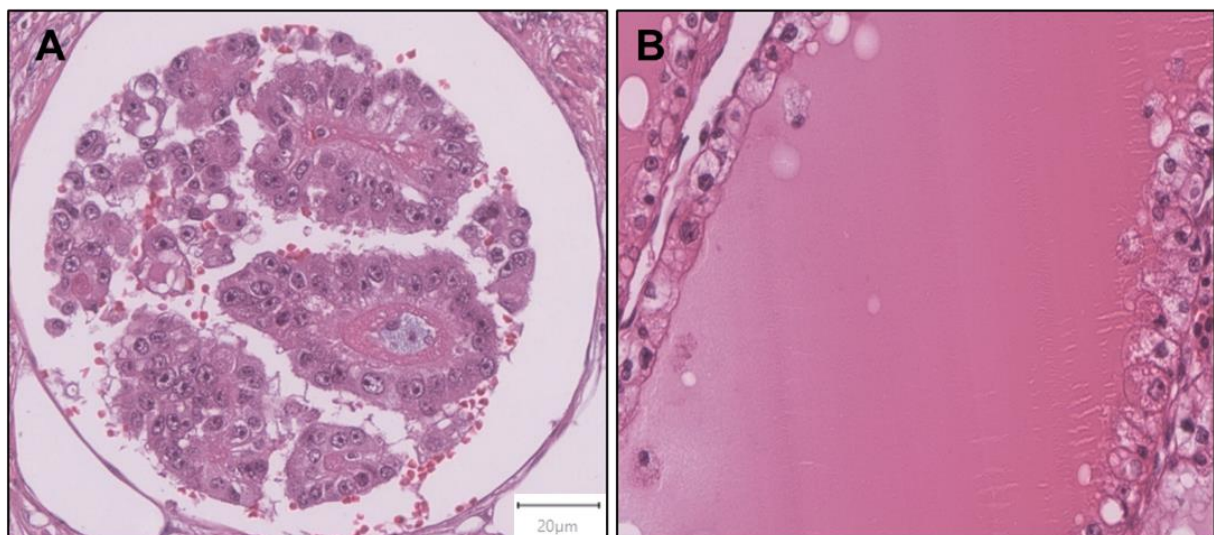


Abbildung 4: HE-EI gefärbter Nieren-Tumor. **A:** Darstellung einer Angioinvasion durch vitale Tumorzellen. **B:** Darstellung einer Zystenbildung im vitalen Tumor.

3.8 Übertragung der Annotationen auf digitalisierte Immunschnitte

Nachdem HE-El gefärbte Schnitte annotiert waren, wurden Annotationen auf konsekutive Serienschnitte mit Immunfärbungen möglichst präzise übertragen bzw. entsprechend korrigiert. QuPath verfügt über die Funktion des „interactive image alignment“, die bei der Übertragung hilft. Nach einer Positionierung der beiden Bilder übereinander, mussten noch Annotationen auf dem Zielschnitt manuell korrigiert werden, sodass sichergestellt werden konnte, dass Immuninfiltrate auch korrekt in den jeweiligen ROIs quantifiziert wurden.

3.9 Makrophagen-Detektion und Quantifizierung

Für die Detektion und anschließende Quantifizierung der Makrophagen (CD68 und CD204) war es essentiell, einen Makrophagen-Classifer mittels maschinellen Lernens zu entwickeln. Zunächst wurde ein Bild-Mosaik zusammengestellt, welches aus 145 Regionen bestand. Diese Regionen wurden aus einer Vielfalt von digitalisierten Immunschnitten extrahiert, welche mit den Makrophagen Markern CD68, CD204, CD206 und CD163 gefärbt waren. Die digitalisierten Immunschnitte stammten in der Regel aus Nieren-Biopsien und Nieren-Tumoren mit erhaltenem Normalgewebe. Anschließend wurden ca. 600 Objekte unter der Klasse „Makrophagen“ möglichst in allen Regionen des Bild-Mosaiks annotiert. So konnte sichergestellt werden, dass Makrophagen mit unterschiedlichen Farbeintensitäten und Größen im Material für das Training enthalten waren. Parallel dazu wurden unspezifisch gefärbte Bereiche unter der Klasse „Ignore“ manuell annotiert. Solche Bereiche waren Eisen-Ablagerungen, Tusche-Markierungen, Artefakte und Formalin-Pigment. Bei der Klasse „Ignore“ wurden ca. 300 Annotationen erstellt, die „abtrainiert“ werden mussten. Danach wurde die Funktion „train pixel classifier“ im QuPath ausgeführt, wodurch eine große Anzahl von Beispielen einen Algorithmus trainierte, um die Klasse „Makrophagen“ und nicht die Klasse „Ignore“ zu detektieren. Beim Training des Pixel-Classifiers wurde der Algorithmus „random trees“ und alle drei RGB-Kanäle und zusätzlich der DAB-Kanal verwendet. Darüber hinaus wurde der Pixel-Classifer mit dem verfügbaren Gaussian Merkmal gespeist, berechnet auf 0,52 µm Auflösung mit zusätzlicher Skalierung von 0,5, 1 und 4. Abbildung 5 illustriert den Prozess des Trainings.

Zusätzlich zum Pixel-basierten Makrophagen Classifier wurde noch ein Objekt-Classifer entwickelt, um gegebenenfalls nach der Ausführung des Pixel-basierten Classifiers falsch positive Signale nicht der Klasse „Makrophagen“ zuzuordnen. Da der Pixel-basierte Classifier eine braune Färbung detektierte, war es möglich, dass auch braune Artefakte weiterhin

inkorrekt als Makrophagen klassifiziert würden. Es war essentiell, diese falsch positiven Signale nach Möglichkeit zu minimieren. Dazu wurden Bereiche mit falsch positiven Signalen als „Other“ und Bereiche, die richtig positive Signale enthielten, als „Makrophagen“ annotiert und klassifiziert. Dabei wurden die besten Ergebnisse mit dem Algorithmus „random trees“ und mit der Auswahl der Merkmale Fläche („area“), Länge („length“), Kreisfähigkeit („circularity“), maximaler Diameter und minimaler Diameter erzielt.

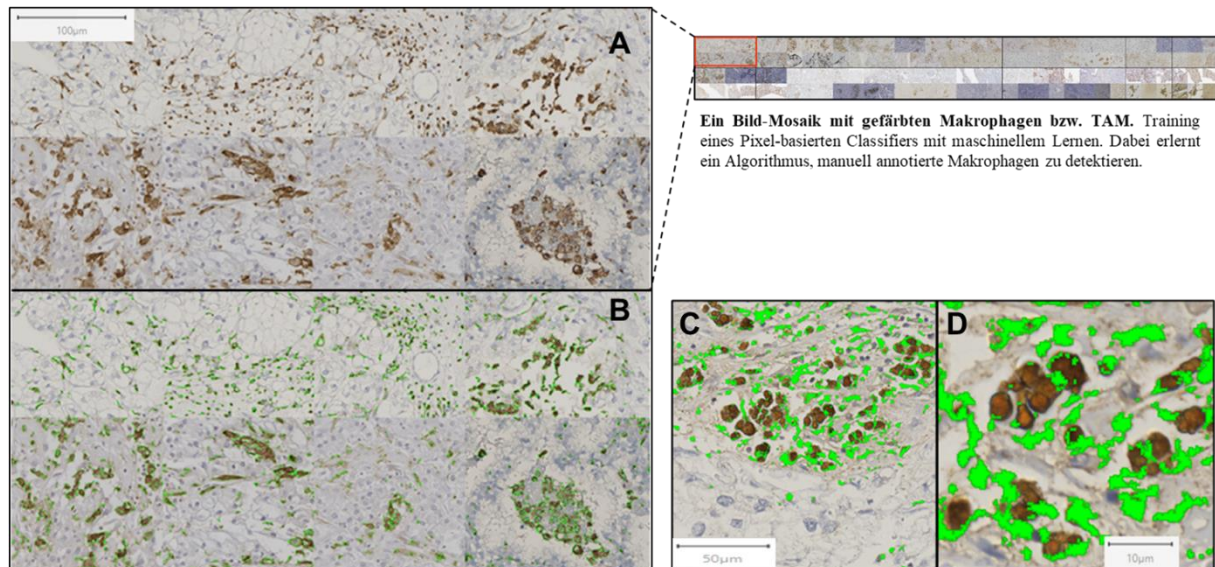


Abbildung 5: Training eines Pixel-basierten Makrophagen Classifiers. **A:** Gefärbte Makrophagen in einem Bild-Mosaik. **B:** Ergebnis des trainierten Pixel-Classifiers im gleichen Bild-Mosaik. **C:** „Abtrainieren“ einer unspezifischen Eisen-Markierung. Makrophagen sind grün markiert. **D:** In höherer Vergrößerung erkennt man die nicht detektierten ebenfalls braun gefärbten Eisen-Ablagerungen.

Zum Schluss wurden Makrophagen als prozentualer Flächenanteil der jeweiligen ROIs gemessen. Nach jeder Messung wurden die detektierten Signale auf Korrektheit überprüft. Bei inkorrektur Markierung wurden entsprechende Bereiche ausgeschnitten und die Messung wiederholt. Abbildung 6 zeigt den Prozess der Messung der Makrophagen (CD68 bzw. CD204) in den vorher annotierten ROIs auf den Immunschnitten. Im Anhang ist das Skript zur Ausführung der Makrophagen-Quantifizierung aufgelistet (Skript 1).

Trotz der Entwicklung des Pixel-basierten Classifiers gab es immer noch Makrophagen, die vom Classifier nicht erkannt wurden. Dies führte zum Zweifel bezüglich der Zuverlässigkeit des Pixel-Classifiers, sodass es dafür entschieden wurde, einen CNN (convolutional neural network)-basierten Classifier zur Makrophagen-Detektion zu erzeugen. Trainingsdaten für die Makrophagen-Detektion mittels CNN-Classifier wurden unter Verwendung der Bildanalyse-Software QuPath Version 0.1.2 (Bankhead et al., 2017) auf 55 verschiedenen digitalen

Schnittpräparaten erzeugt. Für das erste CNN-Training wurden alle Makrophagen entweder manuell annotiert oder über eine optische Dichteschwelle für braun nach Anwendung der Farb-Dekonvolutionsmethode detektiert (Ruifrok & Johnston, 2001). Danach wurde die Generierung von Trainingsdaten iterativ fortgesetzt, wobei nur die CNN-Prädiktion des letzten CNN manuell korrigiert wurde. Die CNNs konnten auf immer größere Bereiche und auf immer mehr digitalen Schnittpräparaten angewandt werden, wodurch Bereiche mit einer schlechten Leistung aufgedeckt wurden, die dann manuell wieder korrigiert werden mussten. Nach der vierten und letzten Iteration bestand der Trainingsdatensatz aus 257 markierten Kästchen mit einer Gesamtfläche von 1,194 cm², die Makrophagen mit einer Fläche von 48,3 mm² enthielten. Die Trainingsdaten wurden mit einer Auflösung von 0,1729 µm, einer Kästchengröße von 576 X 576 Pixel und mit einer Überlappung von 50 % bis 80 % extrahiert. Die Datenextraktion aus allen 55 digitalen Schnittpräparaten ergab 23082 Trainingskacheln und 9688 Kacheln zum Testen. Das resultierende CNN erreichte eine Pixel-Trefferquote von 98,71 % auf dem Testdatensatz.

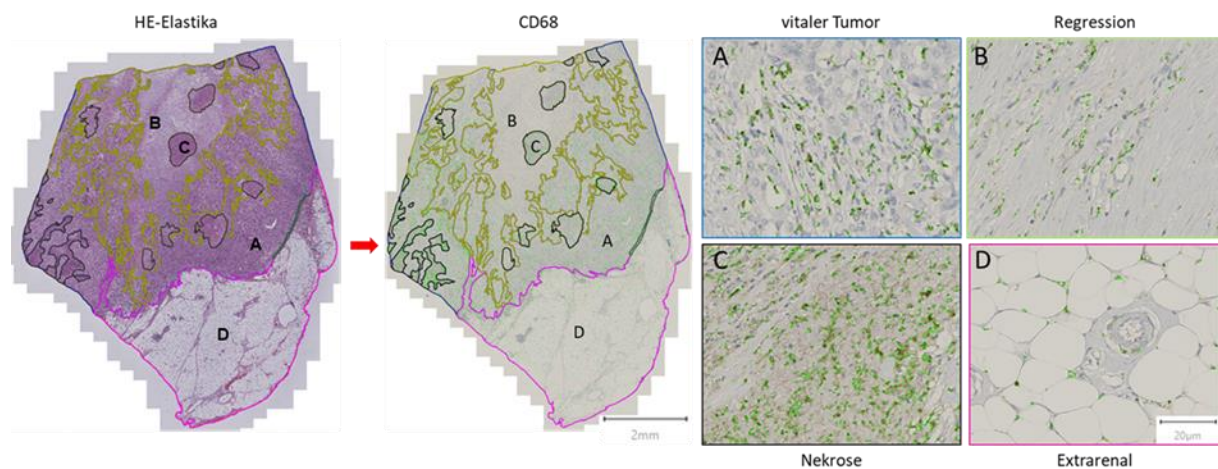


Abbildung 6: Verfahren der Makrophagen-Quantifizierung in den vom HE-El Präparat auf Immunfärbungen übertragenen Annotationen. Manuelle Annotationen der „regions of interest“ (ROIs) wurden auf einen mit CD68 bzw. CD204 gefärbten konsekutiven Schnitt übertragen, indem die Alignment-Funktion (QuPath) genutzt wurde. Anschließend wurden die Annotationen korrigiert und entsprechend angepasst. Auf dem Immunschnitt wurden dann die immunhistochemisch gefärbten Makrophagen (CD68) mit dem Makrophagen Classifier detektiert und als prozentualer Flächenanteil der jeweiligen ROIs gemessen.

3.10 Objekt-Detektion und Quantifizierung mittels CNN-Classifier

Auf 39 digitalen Schnittpräparaten verschiedener Tumorresektionen wurden T- und B-Lymphozyten als runde Punkte mit einem Durchmesser von 14 Pixeln in Originalauflösung von 0,1729 µm mit der QuPath-Software (Version 0.1.2) markiert (Bankhead et al., 2017). Auf den 39 Objektträgern waren insgesamt 245 Kästchen an verschiedenen Stellen vollständig mit den runden Punkten markiert. Insgesamt waren in den 245 Kästchen 23914 T- und 15038 B-Lymphozyten enthalten.

Regeln für eine ausreichende Markierung der Lymphozyten waren wie folgt:

- Der Zellkern musste von einem braunen (T-Lymphozyten) oder roten (B-Lymphozyten) IHC-Ring umgeben sein (Membran- oder Zytoplasmafärbung).
- Die Markierung musste sich in der Mitte des Membranrings befinden.
- Wenn der Zellkern keinen sichtbaren Ring hatte, aber es offensichtlich um einen positiv gefärbten Lymphozyt handelte, befand sich die Markierung in der Mitte des Kerns.
- Die IHC gefärbten Lymphozyten mussten über einen Zellkern mit einem Durchmesser von mindestens 5 µm verfügen.
- Braune Artefakte wie Eisenpartikel wurden nicht markiert.
- IHC gefärbte Lymphozyten, die sich mit anderen Artefakten überschneiden oder sich in Gewebefalten befanden, wurden nicht als Lymphozyten markiert.

Semantische 2D-Trainingsmasken wurden in einer Originalauflösung von 0,1729 µm mit einer Größe von 576 X 576 Pixeln extrahiert. Die Masken hatten drei Klassen: Hintergrund, T-Zelle und B-Zelle. Je nach Kästchengröße wurden Trainingskacheln mit einer Überlappung von entweder 75 % oder 80 % extrahiert. Die Datenextraktion aus allen 39 digitalisierten Schnittpräparaten ergab 22757 Trainingskacheln und 7784 Kacheln zum Testen. Das CNN für die Lymphozyten-Detektion wurde in drei Runden trainiert, die erste mit 40 Epochen mit 6 Schnittpräparaten im Training, 12 Schnittpräparate in der zweiten Runde mit 40 Epochen und 39 Schnittpräparate im dritten Training mit 20 Epochen. Die zweite und dritte Runde startete mit dem besten CNN der letzten Trainingsrunde. Das beste CNN nach der letzten Trainingsrunde erreichte eine Pixel-Trefferquote von 99,72 % im Trainingsdatensatz und 99,48 % auf dem Testdatensatz. Durch das CNN erkannte T- und B-Lymphozyten wurden als Annotationen in QuPath Version 0.3 importiert und in runden Detektionen mit 14 Pixel Durchmesser umgewandelt. Um eine Doppelzählung einer einzelnen Zelle zu vermeiden, falls sie von zwei kleinen Kreisen erfasst wurde, wurde der Mindestabstand eines Kreises zum

nächsten Kreis derselben Klasse berechnet. Wenn der Abstand kleiner als der Durchmesser von 14 Pixeln war, wurden die beiden kleinen Kreise zu einem größeren zusammengeführt. Zelldichten wurden als Zellen/mm² in den verschiedenen ROIs gemessen.

3.11 Strukturerkennung mittels CNN

Auf 179 HE-EI gefärbten Schnitten wurde das komplette Gewebe manuell mit insgesamt 14 verschiedenen Klassen annotiert. Die Klassen, die mittels CNN zu erkennen waren, beinhalteten "Tumor vital", „Tumor regression“, Tumor necrosis“, „Tumor bleeding“, „Capsule“, „Angioinvasion“, „Cyst formation“, „Cortex“, „Cortex atrophy“, „Medulla“, „Extrarenal“, „Diffuse tumor growth in soft tissue“, „Papillom“ und „Medullary spindle cell nodule“. Alle Klassen wurden als semantische 2D-Masken extrahiert. Trainingskacheln sowie Masken wurden mit 25 % Überlappung und einer sechsfachen Verkleinerung extrahiert. Das heißt, dass die ursprünglichen Kästchen mit einer Größe von 3456 X 3456 Pixel und einer Auflösung von 0,1729 µm auf Kästchen mit einer Größe von 576 X 576 Pixel und einer Auflösung von 1,0374 µm verkleinert wurden. Das CNN wurde in zwei Runden trainiert, wobei die erste Runde 100 Schnittpräparate für das Training, 30 für den Test und 10 für die Evaluierung enthielt. Die zweite Runde enthielt 139 digitalisierte Schnittpräparate (174180 Kacheln) für das Training und immer noch die gleichen 30 (35122 Kacheln) für den Test und 10 für die Evaluierung (12670 Kacheln).

3.12 CNN-Training

Für das CNN-Training für die Detektion von Makrophagen, Lymphozyten und Gewebe wurde das Programm Keras Version 2.6.0 (Chollet et al., 2015) mit TensorFlow Version 2.5.0 (Abadi et al., 2015) kombiniert mit dem Programm Image-Segmentation-Keras Version 0.3 (Gupta, 2019) verwendet. Um die Robustheit des CNN gegenüber neuen Bildern zu erhöhen, wurde während des Trainings eine intensive Datenerweiterung auf 40 % aller Bilder angewandt. Die Datenerweiterung umfasste horizontales und vertikales Spiegeln, Zuschneiden, affine Transformation mit Skalierung, Translation, Rotation, Scherung, Schärfen, Einfügen von Rauschen, Anwenden von zufälligem Dropout von Pixeln und/oder Subtrahieren von Graustufenwerten über Kanäle hinweg, Ändern des Farbtons und der Sättigung oder Konvertieren des Bilds in ein Graustufenbild. Bis zu vier Datenerweiterungsmethoden wurden gleichzeitig angewandt. Das Training wurde auf einer separaten Nvidia Geforce RTX 3090 Grafikkarte (Nvidia Corporation, Santa Clara, CA, U.S.A.) durchgeführt.

3.13 PD-L1-Expression

Auswertung der PD-L1-Expression erfolgte sowohl bei Tumor- als auch bei Immunzellen unter Verwendung der in der Routinopathologie üblichen Scoring-Systeme, nämlich „tumor proportion score“ (TPS), „inflammatory cell score“ (IC) und „combined positivity score“ (CPS) (Mazdak et al., 2021; Schildhaus, 2018). Beim TPS wurden positiv gefärbte Tumorzellen berücksichtigt. Dabei wurde eine vollständige oder partielle lineare Membranfärbung der Tumorzellen bei einer 20-fachen Vergrößerung berücksichtigt. Lediglich zytoplasmatische oder granuläre Färbung, sowie auch Färbung in nekrotischen Bereichen wurde ausgeschlossen (Tabelle 3). Die Expressionsrate des PD-L1-Markers auf Tumorzellen (TPS) wurde in einem Bereich von 0 – 100 % gemessen. Beim IC-Scoring wurden positiv gefärbte Immunzellen berücksichtigt. Dabei wurden sowohl die Membran- als auch die Zytoplasmafärbung der Immunzellen bei einer maximalen 20-fachen Vergrößerung gezählt. PD-L1-Expression wurde im Tumorgewebe und Stroma berücksichtigt. Normalgewebe, Granulozyten und Fibroblasten mit PD-L1 Färbung wurden nicht gewertet (Tabelle 3). Die Expressionsrate des PD-L1-Markers auf Immunzellen (IC) wurde in einem Bereich von 0 – 100 % gemessen. PD-L1-Expression auf Tumor- bzw. Immunzellen mit TPS- bzw. IC-Werten ≥ 1 %, ≥ 5 % und ≥ 10 % war als positiv und mit TPS- bzw. IC-Werten < 1 %, < 5 % und < 10 % als negativ definiert. Beim CPS wurden sowohl positiv gefärbte Tumor- als auch Immunzellen berücksichtigt. Dabei wurde eine vollständige oder partielle lineare Membranfärbung der Tumorzellen und sowohl die Membran- als auch die Zytoplasmafärbung der Immunzellen gezählt. PD-L1-Expression wurde bei mononukleären inflammatorischen Zellen (Makrophagen und Lymphozyten) berücksichtigt (Tabelle 3). Die Expressionsrate des PD-L1-Markers auf Tumor- und Immunzellen (CPS) wurde in einem Bereich von 0 – 100 gemessen. PD-L1-Expression auf Tumor- und Immunzellen mit CPS-Werten ≥ 10 war als positiv und mit CPS-Werten < 10 als negativ definiert.

Tabelle 3: Scoring-Systeme der PD-L1-Expression. **TPS:** „tumor proportion score“, **CPS:** „combined positivity score“, **IC:** inflammatorische Zellen, **MIC:** mononukleäre Immunzellen (Lymphozyten und Makrophagen), **TC:** Tumorzellen.

Scoringsystem	Zelltypen	Bestimmungsgrundlage	Bemerkung
TPS	Tumorzellen	$TPS = \frac{\text{Anzahl gefärbter Tumorzellen}}{\text{Tumorzellen}} (\%)$	Nur lineare Membranfärbung zählt
IC-Scoring	Immunzellen	$IC - Scoring = \frac{\text{Anzahl gefärbter IC}}{\text{Tumorphäche}} (\%)$	Jegliche Färbung wird berücksichtigt
CPS	Tumor- und Immunzellen	$CPS = \frac{\text{Anzahl gefärbter TC} + \text{Anzahl gefärbter MIC}}{\text{Tumorphäche}} 100$	Bei TC nur lineare Membranfärbung zählt. Bei MIC Membran- und Zytoplasmafärbung zählt

3.14 Reklassifikation der Nierentumore gemäß WHO 2016

Alle Tumore wurden nach den Richtlinien der WHO 2016 reklassifiziert. Die Tabelle 4 zeigt die immunhistochemischen Marker, die eine Klassifikation der häufigsten Nierenzellkarzinome ermöglichen.

Tabelle 4: Immunhistochemische Marker bei der Klassifikation der Nierenzellkarzinome (WHO 2016).

Nierenzellkarzinom	CA-IX	AMACR	CK7	CD117
klarzelliges Nierenzellkarzinom (ccRCC)	+	-	-	-
papilläres Nierenzellkarzinom (pRCC)	-	+	+	-
chromophobes Nierenzellkarzinom (chRCC)	-	-	+	+

3.15 Differenzierungsgrad (ISUP/WHO)

Das ISUP/WHO Grading-System wird für ccRCC und pRCC, nicht für chRCC angewandt. Es handelt sich um ein vierstufiges System mit folgenden Charakteristika (Moch, 2016):

G1: keine Nukleolen bei einer 400-fachen Vergrößerung identifizierbar.

G2: Prominente eosinophile Nukleolen bei einer 400-fachen Vergrößerung.

G3: Prominente Nukleolen bei einer 100-fachen Vergrößerung.

G4: G4-Tumoren zeigen sarkomatoide und/oder rhabdoide Eigenschaften oder extreme Kernatypien und Tumorriesenzellen.

3.16 Statistische Auswertung und Evaluierung des CNN

Für die statistische Auswertung wurde das statistische Programm IBM SPSS Version 28 verwendet. Charakteristika der Patienten und Ergebnisse der Reklassifikation wurden tabellarisch zusammengefasst. Metrische Variablen wurden auf Normalverteilung geprüft und durch den Median, den Mittelwert und den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) charakterisiert. Für die Testung der Assoziation kategorialer Variablen wurde der Pearson-Chi-Quadrat Test bzw. der exakte Test nach Fischer durchgeführt. Für den Vergleich zweier Gruppen wurde der Mann-Whitney Test und von mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis Test angewandt. p-Werte <0,05 waren als signifikant gewertet.

Für die Überlebensanalyse wurden Kaplan-Meier Kurven erstellt und mit dem log-Rank Test verglichen. Univariate Cox-Regression wurde zur Identifizierung potentieller prognostischer Biomarker im Bezug zum Krankheitsverlauf angewandt. Zur Identifizierung von potentiellen

unabhängigen Biomarkern mit prognostischer Wertigkeit im Bezug zum Gesamtüberleben der Patienten wurde eine multivariate Cox-Regression Überlebensanalyse mit Adjustierung für Differenzierungsgrad, T Status, Nekrose und Tumorgröße bzw. im Bezug zum progressionsfreien Überleben unter einer IO-Therapie mit Adjustierung für Differenzierungsgrad durchgeführt. Ergebnisse wurden tabellarisch mit p-Wert, Hazard-Ratio und 95 % Konfidenzintervall dargestellt. Der Median wurde verwendet, um die Zelldichten in hoch und niedrig zu unterteilen.

Um die Qualität des erzeugten CNN-Modells für die Strukturerkennung zu ermitteln, wurden die Präzision, die Sensitivität, der F1-Score und die „Intersection over Union“ (IoU) berechnet. Diese wurden wie folgend definiert und berechnet:

Präzision: Verhältnis der richtig-positiven Ergebnisse, die vom Modell korrekt vorhergesagt wurden.

$$Präzision = \frac{TP}{TP + FP}$$

Sensitivität: Wahrscheinlichkeit, dass ein positives Objekt richtig als positiv klassifiziert ist.

$$Sensitivität = \frac{TP}{TP + FN}$$

F1-Score: Kombination von Sensitivität und Präzision.

$$F1 - Score = 2 \frac{Präzision * Sensitivität}{Präzision + Sensitivität}$$

IoU: Evaluierungsmethode, um die Genauigkeit eines Objektdetektors für einen bestimmten Datensatz zu messen.

$$IoU = \frac{TP}{TP + FN + FP}$$

3.17 Ethikvotum

Die Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover bewilligte für diese Promotionsarbeit die eingereichten Ethikanträge. Diese wurden unter den Nummern 3599-2017 am 16.08.2017 und 8682_BO_K_2019 am 19.09.2019 genehmigt.

4. Ergebnisse

4.1 Charakteristika des Patientenkollektivs

Das Patientenkollektiv bestand aus 171 RCC-Patienten mit einem Durchschnittsalter von $59,7 \pm 0,7$ Jahren. Ein Viertel (25,1 %) der Nierenzellkarzinome des Kollektivs entsprachen dem Status T1 (Tumor 7 cm oder kleiner, auf Niere begrenzt), 11,1 % T2 (Tumor größer als 10 cm, auf Niere begrenzt), 60,8 % T3 (Venen-Invasion oder Infiltration des perirenenalen Gewebes) und 2,3 % T4 (Ausbreitung über Gerota-Faszie hinaus in Nachbarorgane). Eine Lymphknotenmetastasierung war bei 15,2 % der Nierenzellkarzinome zum Zeitpunkt der Erstdiagnose vorhanden. Bei 38,6 % der Fälle waren Nekrosen mikroskopisch nachweisbar. Die mediane Tumorgröße lag bei 7,0 cm und 47,9 % der Nierenzellkarzinome waren kleiner als 7 cm. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose waren 44 % der Nierenzellkarzinome bereits metastasiert (hierzu zählen sowohl lymphogene als auch hämatogene Metastasen) (Tabelle 5).

4.1.1 Histologische Reklassifikation nach WHO 2016

Die histologische Reklassifikation der 171 eingeschlossenen Nierenzellkarzinome gemäß den Richtlinien der WHO 2016 ergab 90,7 % klarzellige Nierenzellkarzinome (ccRCC), 3,5 % papilläre Nierenzellkarzinome (pRCC), 3,5 % chromophobe Nierenzellkarzinome (chRCC) und 2,3 % unklassifizierte Nierenzellkarzinome (NOS). Bezüglich des Differenzierungsgrades (ISUP) wurden 1,2 % der Nierenzellkarzinome dem Grad 1 (G1), 40,9 % dem Grad 2 (G2), 39,8 % dem Grad 3 (G3) und 14,6 % dem Grad 4 (G4) zugeordnet. Bei den 6 chromophoben Nierenzellkarzinomen entfiel das Grading (Moch, 2016; Samaratunga et al., 2014). Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 dargestellt.

4.2 Vergleich des Pixel-basierten mit dem CNN-basierten Classifier

Die Makrophagendichten wurden mit zwei unterschiedlichen Classifiern (Pixel- bzw. CNN-basiert) detektiert und quantifiziert. Dieser Vergleich wurde durchgeführt, um festzustellen, ob die Performance der beiden Messmethoden qualitativ ähnlich gut war. Die Leistungen der beiden Classifier wurden mit einem Bland-Altman-Plot evaluiert. Der Bland-Altman-Plot basiert auf einer Quantifizierung der Übereinstimmung zwischen zwei quantitativen Messungen, indem die mittlere Differenz der zwei Messmethoden untersucht und Übereinstimmungsgrenzen erzeugt werden (Altman & Bland, 1983). Dabei wurden die beiden Methoden miteinander auf die Quantifizierung der CD68-Dichten im vitalen Tumor und in der

Regression verglichen. Die Diagramme der Abbildung 7 zeigen Messungen außerhalb der Übereinstimmungsgrenzen. Infolgedessen hatten die beiden Messmethoden diskrepante Ergebnisse und quantifizierten die Makrophagen nicht ähnlich.

Tabelle 5: Übersicht klinischer und histologischer Charakteristika.

Klinische und histologische Charakteristika	n (%) bzw. Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM)
Geschlecht	n=171
männlich / weiblich	125 (73,1 %) / 46 (26,9 %)
Alter	59,7 $\pm$ 0,7
Histologie	n=171
ccRCC	155 (90,7 %)
pRCC	6 (3,5 %)
chrom. RCC	6 (3,5 %)
NOS	4 (2,3 %)
Differenzierungsgrad (ISUP)	n=171
G1	2 (1,2 %)
G2	70 (40,9 %)
G3	68 (39,8 %)
G4	25 (14,6 %)
Gx	6 (3,5 %)
T Status	n=171
T1	43 (25,1 %)
T2	19 (11,1 %)
T3	104 (60,8 %)
T4	4 (2,3 %)
Tx	1 (0,6 %)
N Status	n=171
N positiv / N negativ	26 (15,2 %) / 44 (25,7 %)
Nx	101 (59,1 %)
Nekrose	n=171
Ja / Nein	66 (38,6 %) / 105 (61,4 %)
Tumorgroße	n=163
<7 cm / $\geq$ 7 cm	78 (47,9 %) / 85 (52,1 %)
Metastasen	n=166
Synchron / Metachron	73 (44 %) / 93 (56 %)

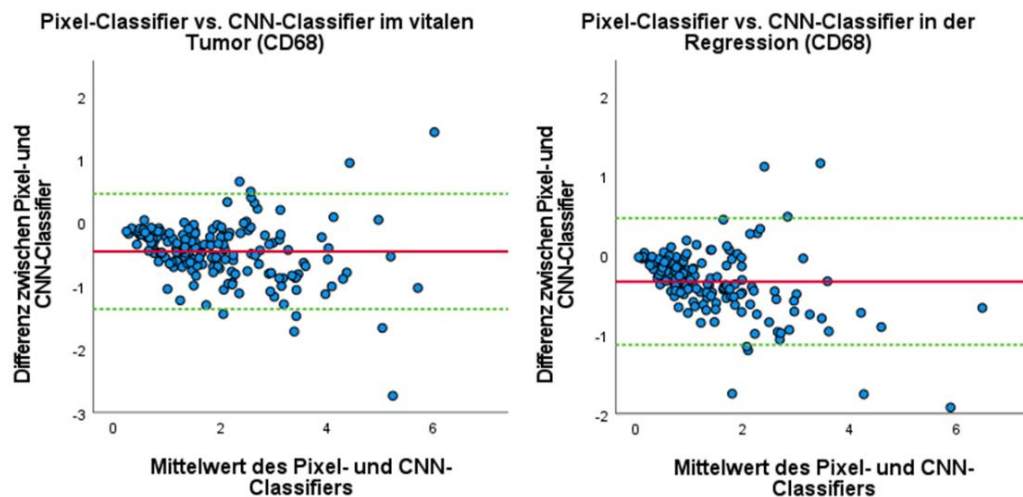


Abbildung 7: Bland-Altman-Plot zum Vergleich des Pixel-basierten mit dem CNN-basierten Classifier. Die oberen und unteren grünen Linien definieren die Übereinstimmungsgrenzen. Die mittleren roten Linien zeigen die mittlere Differenz der beiden Messmethoden. Auf der X-Achse steht der Mittelwert der Messungen mit dem Pixel- und CNN-Classifier. Auf der Y-Achse steht die Differenz zwischen den Messungen mit dem Pixel- und CNN-Classifier. Wenn alle Werte innerhalb der Übereinstimmungsgrenzen liegen, sind die beiden Messmethoden qualitativ ähnlich. Wenn Werte außerhalb der Übereinstimmungsgrenzen liegen, sind die beiden Messmethoden nicht qualitativ ähnlich.

Anschließend wurden die gleichen Stellen auf den digitalisierten Schnitten bezüglich der Leistung der beiden Messmethoden verglichen. Bei der Pixel-basierten Messmethode waren zahlreiche Bereiche mit falsch-positiven Signalen nachweisbar (zum Beispiel Formalinpigment), die mit dem CNN-Classifier erfolgreich ausgeschlossen wurden. Zusätzlich wurden durch den Pixel-basierten Classifier eindeutige Makrophagen-Signale nicht detektiert und somit nicht gemessen. Diese wurden mittels CNN-basiertem Classifier korrekt als Makrophagen erkannt und gemessen (Abbildung 8). Bei der Makrophagen-Detektion erreichte der CNN-Classifier eine Pixel-Trefferquote von 98,71 %. Aufgrund der höheren Präzision und Sensitivität wurden alle Analysen die Makrophagendichten betreffend, mit dem CNN-basierten Classifier durchgeführt.

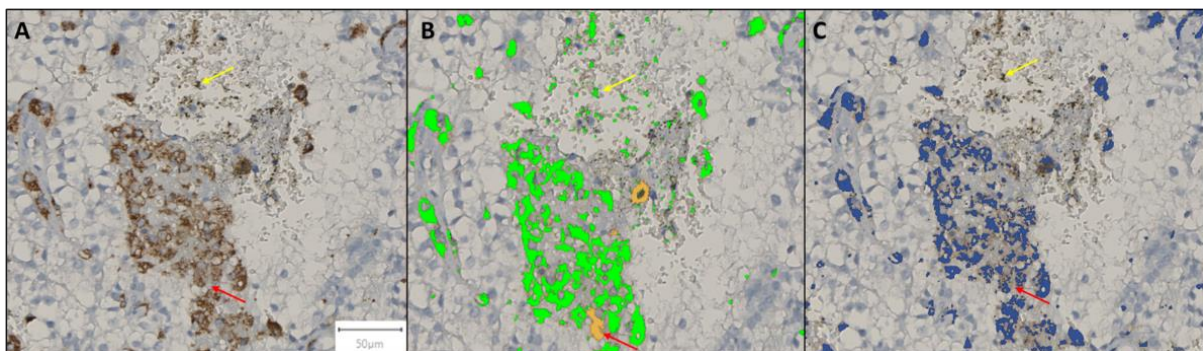


Abbildung 8: Vergleich des Pixel-basierten mit dem CNN-basierten Classifier auf dem identischen digitalisierten Schnittpräparat. **A:** Vitaler Tumor mit immunhistochemisch gefärbten Makrophagen (CD68, braun). **B:** Mit Pixel-basiertem Classifier detektierte Makrophagen. **C:** Mit CNN-basiertem Classifier detektierte Makrophagen. Gelbe Pfeile zeigen Formalinpigment. Rote Pfeile zeigen durch den Pixel-basierten Classifier nicht erfasste Makrophagen.

4.3 Räumliche Verteilung der Immunzellinfiltrate

Die räumliche Verteilung von Leukozyten (Makrophagen, TAM, T- und B-Lymphozyten) wurde in den entsprechenden Regionen (vitaler Tumor, Regression, Nekrose, Blutung, Kapsel, Angioinvasion, Zystenbildung, Cortex, atrophierter Cortex, Mark und extrarenales Gewebe) untersucht.

4.3.1 Makrophagen-Infiltration (CD68)

Die mittleren CD68-Dichten lagen bei 1,97 % im gesamten Tumor und bei 2,20 % im vitalen Tumor. Zusätzlich betrug die mittlere CD68-Dichte in der Regression 1,57 %, im nekrotischen Gewebe 2,44 %, in der Blutung 1,18 % und in der Kapsel 0,96 %. Im Normalgewebe war die Makrophagen-Dichte niedriger im Vergleich zum Tumorgewebe. Eine Übersicht der räumlichen Verteilung von Makrophagen (CD68) ist der Tabelle S3 (Anhang) zu entnehmen. In der Abbildung 9 sind Makrophagen (CD68) in verschiedenen Regionen dargestellt.

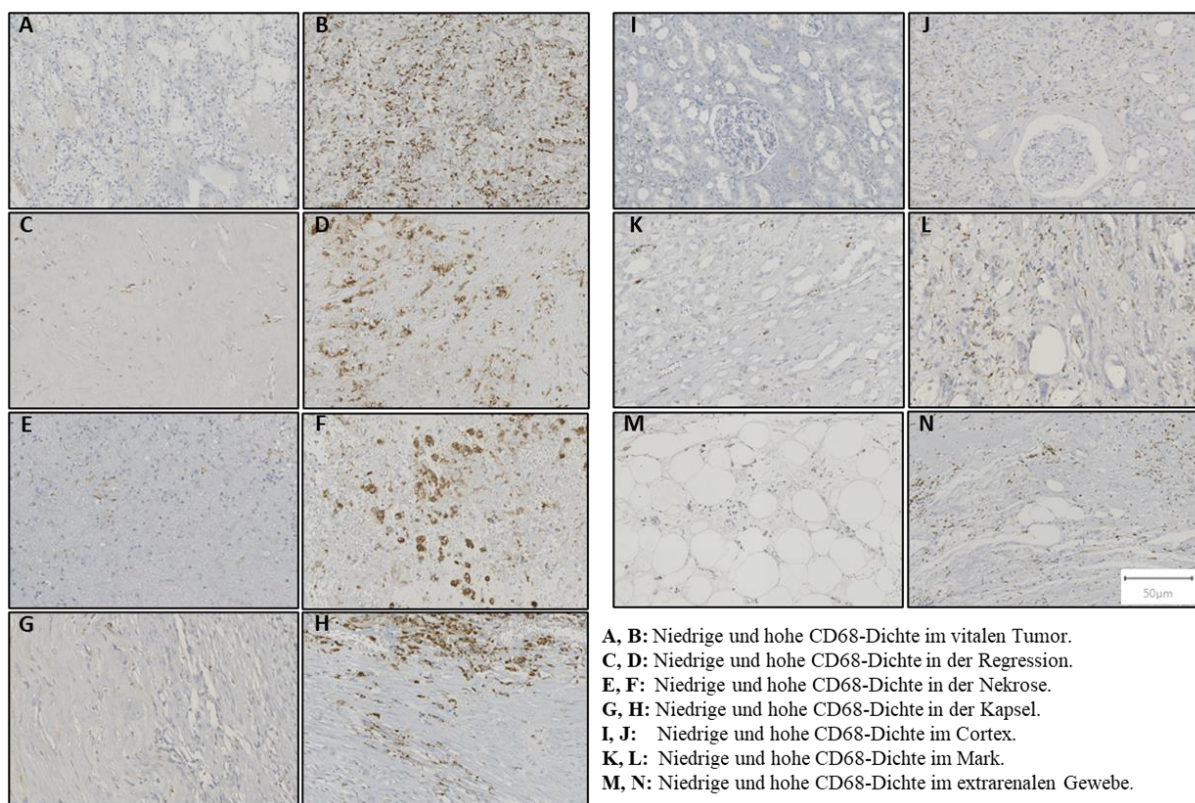


Abbildung 9: Repräsentative Darstellung der Dichten von Makrophagen (CD68) in verschiedenen Regionen.

4.3.2 Infiltration durch Tumor-assoziierte Makrophagen (CD204)

Bezüglich der alternativ aktivierten Makrophagen lagen die mittleren CD204-Dichten bei 0,66 % im gesamten Tumor und bei 0,77 % im vitalen Tumor, während in der Regression die CD204-Dichte 0,42 % betrug. Im Tumorgewebe wurden die höchsten CD204-Dichten in der Nekrose gefunden (1,51 %), während in der Kapsel die niedrigsten Dichten nachgewiesen wurden (0,20 %). Im Normalgewebe waren die mittleren CD204-Dichten deutlich niedriger im Vergleich zum Tumorgewebe. Eine Übersicht der räumlichen Verteilung von TAMs (CD204) ist der Tabelle S4 (Anhang) zu entnehmen. In der Abbildung 10 sind TAMs (CD204) in verschiedenen Regionen dargestellt.

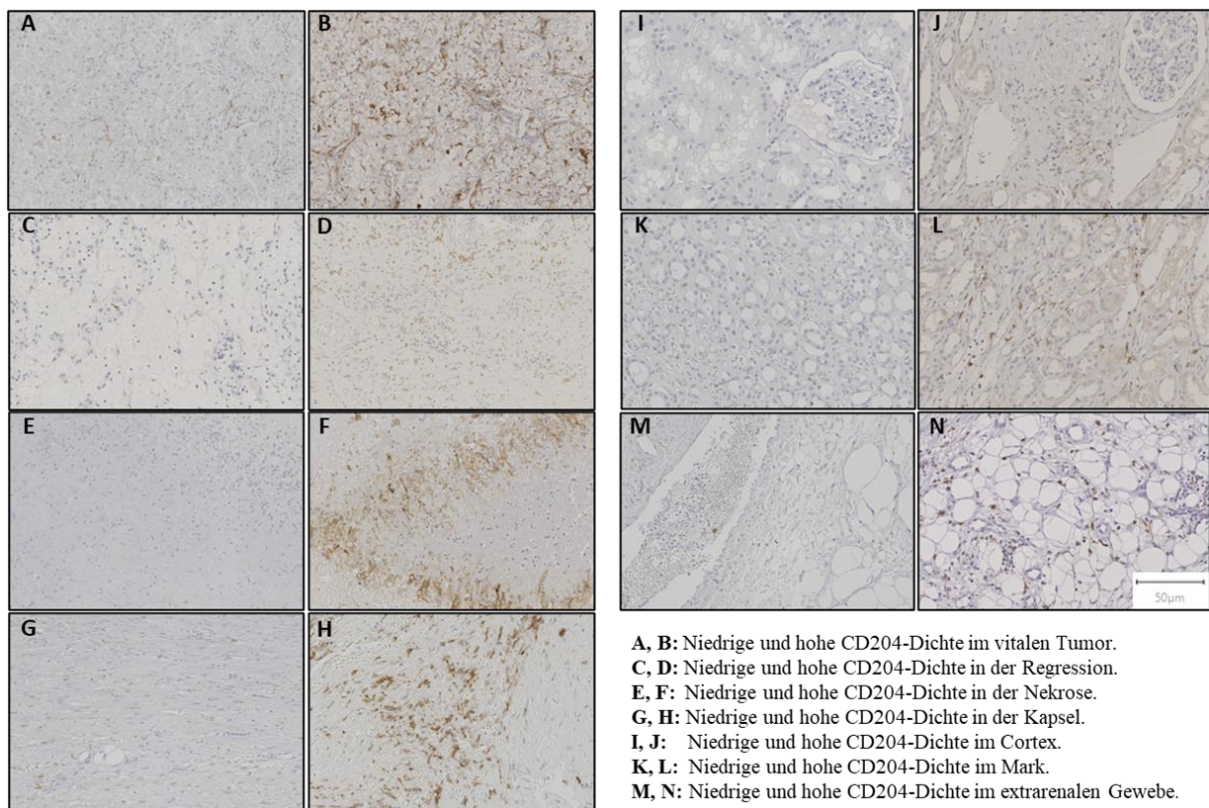


Abbildung 10: Repräsentative Darstellung der Dichten von alternativ aktivierten Makrophagen (CD204) in verschiedenen Regionen.

4.3.3 Infiltration durch zytotoxische T-Lymphozyten (CD8)

Bei den CTLs (CD8) lagen die mittleren Dichten bei 268,18 Zellen/mm² im gesamten Tumor, bei 286,84 Zellen/mm² im vitalen Tumor und bei 252,39 Zellen/mm² in der Regression. Die höchsten Dichten von CTLs im Tumorgewebe wurden in der Kapsel und in der Angioinvasion gefunden (jeweils 338,78 Zellen/mm² und 339,69 Zellen/mm²), während im nekrotischen Gewebe die niedrigste Anzahl von CTLs nachgewiesen wurde (17,80 Zellen/mm²). Im Normalgewebe waren vergleichbare mittlere Dichten von CTLs feststellbar (308,84 Zellen/mm²). Eine Übersicht der räumlichen Verteilung von T-Lymphozyten ist der Tabelle S5 (Anhang) zu entnehmen. In der Abbildung 11 sind zytotoxische T-Lymphozyten in verschiedenen Regionen dargestellt.

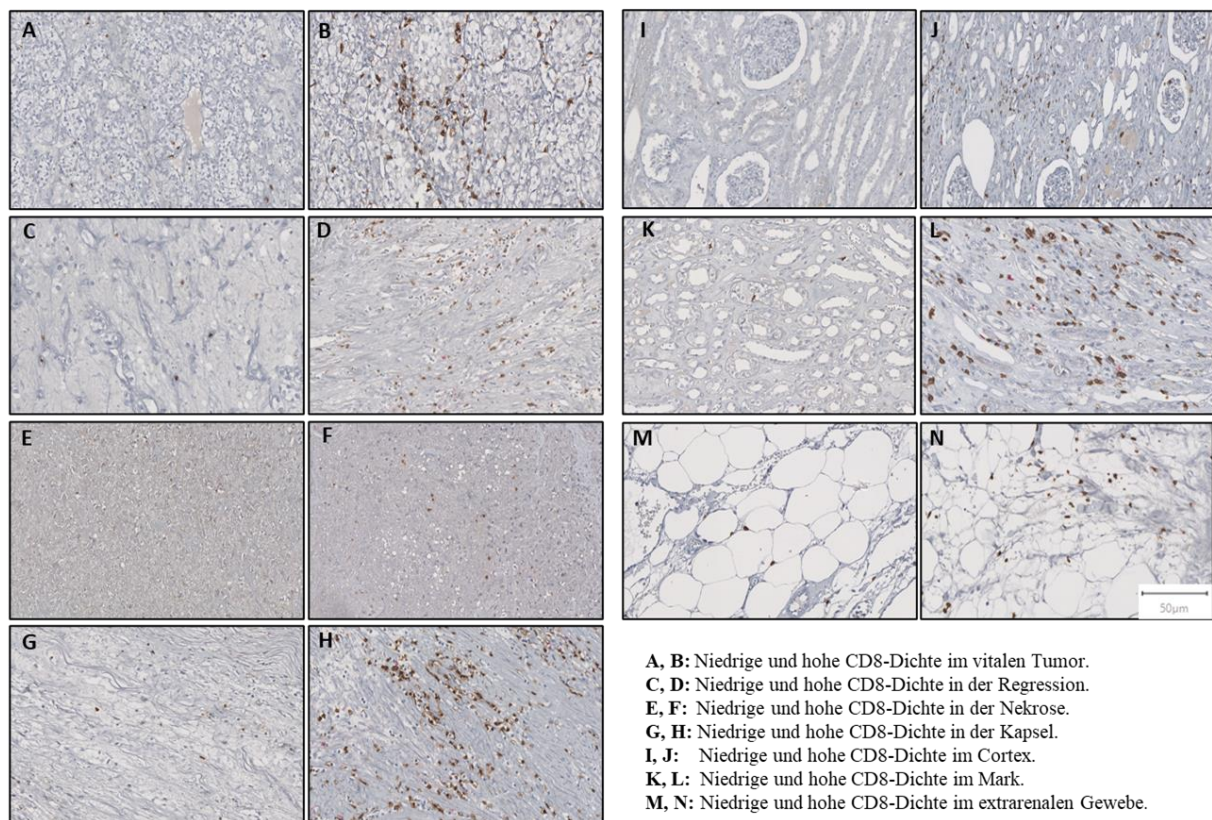


Abbildung 11: Repräsentative Darstellung von unterschiedlichen CD8-Dichten in verschiedenen Regionen.

4.3.4 Infiltration durch B-Lymphozyten (CD20)

Die mittleren CD20-Dichten lagen bei 35,28 Zellen/mm² im gesamten Tumor und bei 18,47 Zellen/mm² im vitalen Tumor. Im Tumorgewebe wurden in der Kapsel und in der Regression die höchsten mittleren Dichten von B-Lymphozyten gefunden (jeweils 110,24 Zellen/mm² und 82,60 Zellen/mm²), während sie im nekrotischen Gewebe am niedrigsten waren (0,59 Zellen/mm²). Im Normalgewebe waren die mittleren CD20-Dichten deutlich höher im Vergleich zum Tumorgewebe und lagen bei 223,70 Zellen/mm². Eine Übersicht der räumlichen Verteilung von B-Lymphozyten ist der Tabelle S6 (Anhang) zu entnehmen. In der Abbildung 12 sind B-Lymphozyten in verschiedenen Regionen dargestellt.

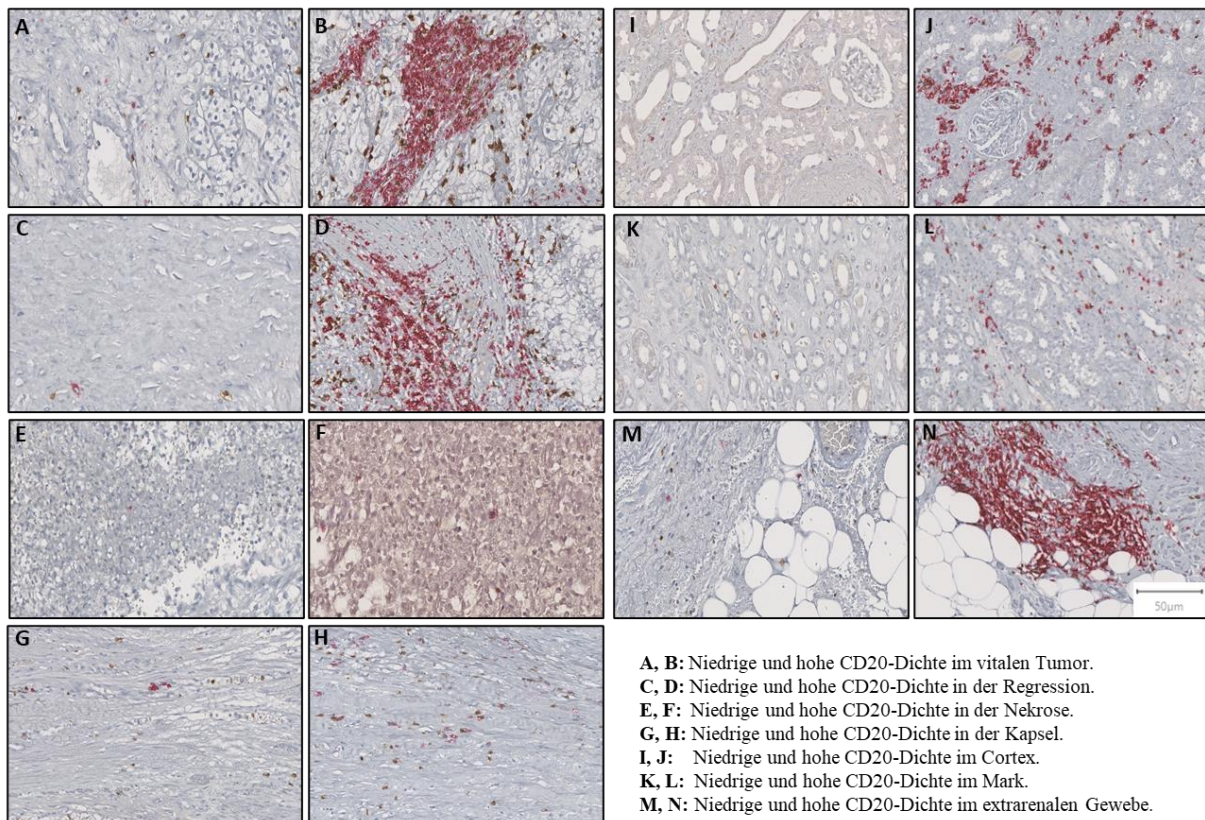


Abbildung 12: Repräsentative Darstellung von unterschiedlichen CD20-Dichten in verschiedenen Regionen.

4.4 PD-L1 Expression im ccRCC

Die PD-L1-Expression wurde im Hinblick auf die prognostische/prädiktive Wertigkeit als Biomarker für das Therapieansprechen untersucht. Die Abbildung 13 zeigt repräsentative Beispiele für PD-L1 positive bzw. negative Tumoren.

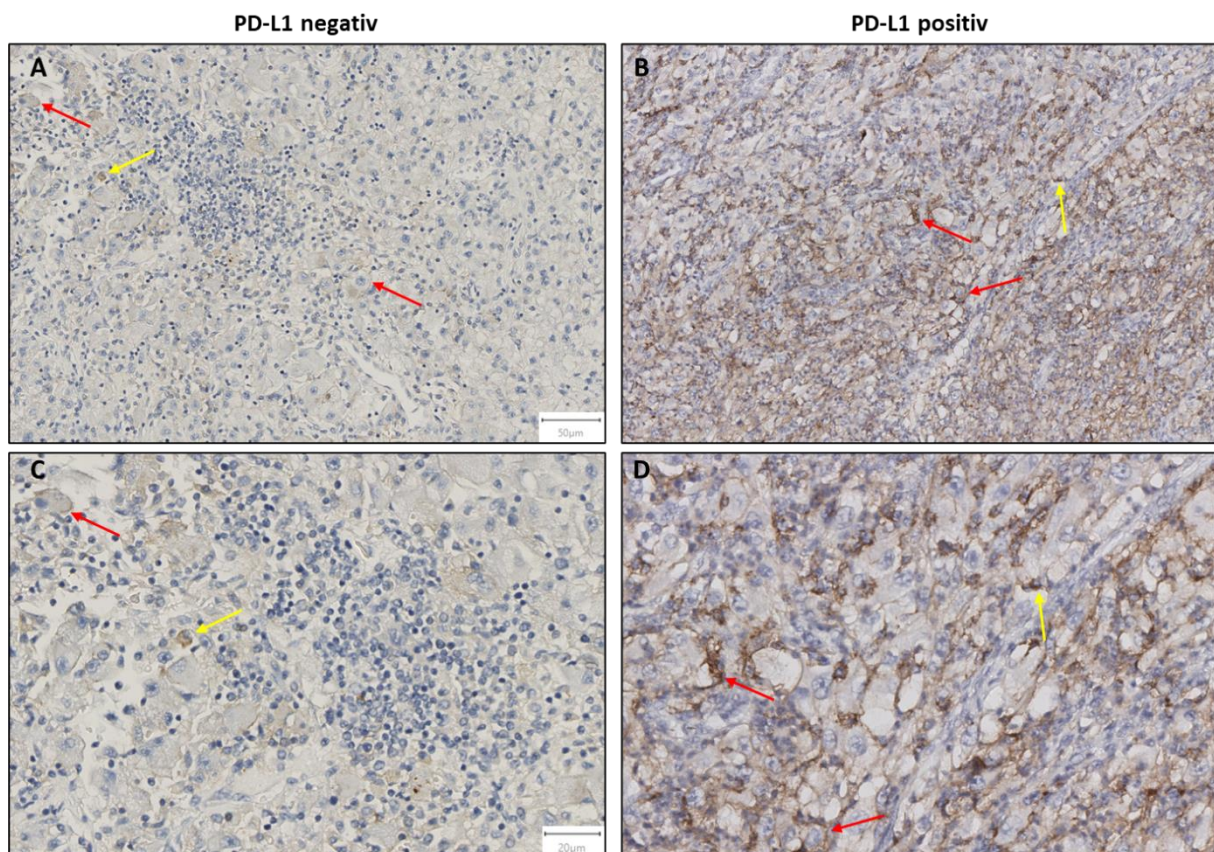


Abbildung 13: PD-L1-Expression im ccRCC. **A:** PD-L1 negativer Tumor. **B:** PD-L1 positiver Tumor (rote Pfeile zeigen Tumorzellen, gelbe Pfeile zeigen Immunzellen). **C** und **D** zeigen jeweils die gleichen Fälle in höherer Vergrößerung.

Der mittlere Wert der PD-L1-Expression von Tumorzellen betrug 3,2 % (0 - 70 %) und von Immunzellen 3,8 % (0 - 80 %). Der Median lag jeweils bei 0 und 0,2 % (Tabelle 6).

Tabelle 6: PD-L1-Expression von Tumor- und Immunzellen.

PD-L1 Scoring	n	Mittelwert/Median (%) ± SEM (min. - max.)
TPS	155	3,2 / 0 % ± 0,8 (0 - 70)
IC-Scoring	155	3,8 / 0,2 % ± 0,8 (0 - 80)
CPS	155	6,6 / 0 ± 1,4 (0 - 100)

Bei einem cut-off-Wert der PD-L1-Positivität der Tumorzellen (TPS, „tumor proportion score“) von ≥ 1 % waren 29 % der Fälle positiv. Mit einem cut-off-Wert von ≥ 5 % waren 13,5 % der Fälle positiv und mit ≥ 10 % 7,1 %. Mit einem cut-off-Wert der PD-L1-Positivität der Immunzellen (IC-Scoring, „inflammatory cell score“) von ≥ 1 % waren 41,3 % der Fälle positiv für PD-L1. Mit dem cut-off-Wert von ≥ 5 % waren 22,6 % der Fälle positiv und bei einem cut-off ≥ 10 % waren 11,6 % der Fälle positiv für PD-L1. In der Tabelle 7 sind die beschriebenen Auswertungen zusammengefasst.

Tabelle 7: Häufigkeit der PD-L1-Expression in Abhängigkeit zum cut-off-Wert.

PD-L1-Expression von Tumorzellen (TPS) n=155	%	n
cut-off-Wert der PD-L1-Positivität ≥ 1 %	29	45
cut-off-Wert der PD-L1-Positivität ≥ 5 %	13,5	21
cut-off-Wert der PD-L1-Positivität ≥ 10 %	7,1	11
PD-L1-Expression von Immunzellen (IC-Scoring) n=155	%	n
cut-off-Wert der PD-L1-Positivität ≥ 1 %	41,3	64
cut-off-Wert der PD-L1-Positivität ≥ 5 %	22,6	35
cut-off-Wert der PD-L1-Positivität ≥ 10 %	11,6	18
PD-L1-Expression von Tumor- und Immunzellen (CPS) n=155	%	n
cut-off-Wert der PD-L1-Positivität ≥ 10	16,1	25

4.5 Zusammenhang von Immunzellinfiltraten mit Tumor-Charakteristika

Zunächst wurden intratumorale CD68-Dichten im Bezug zu den Tumor-Charakteristika evaluiert. Eine hohe CD68-Dichte im ccRCC assoziierte mit schlechter Differenzierung und Lymphknotenmetastasen. Zusätzlich wiesen große Tumoren höhere intratumorale CD68-Dichten auf. Intratumorale CD68-Dichten waren höher bei Patienten mit nachweisbaren Nekrosen (Abbildung 14).

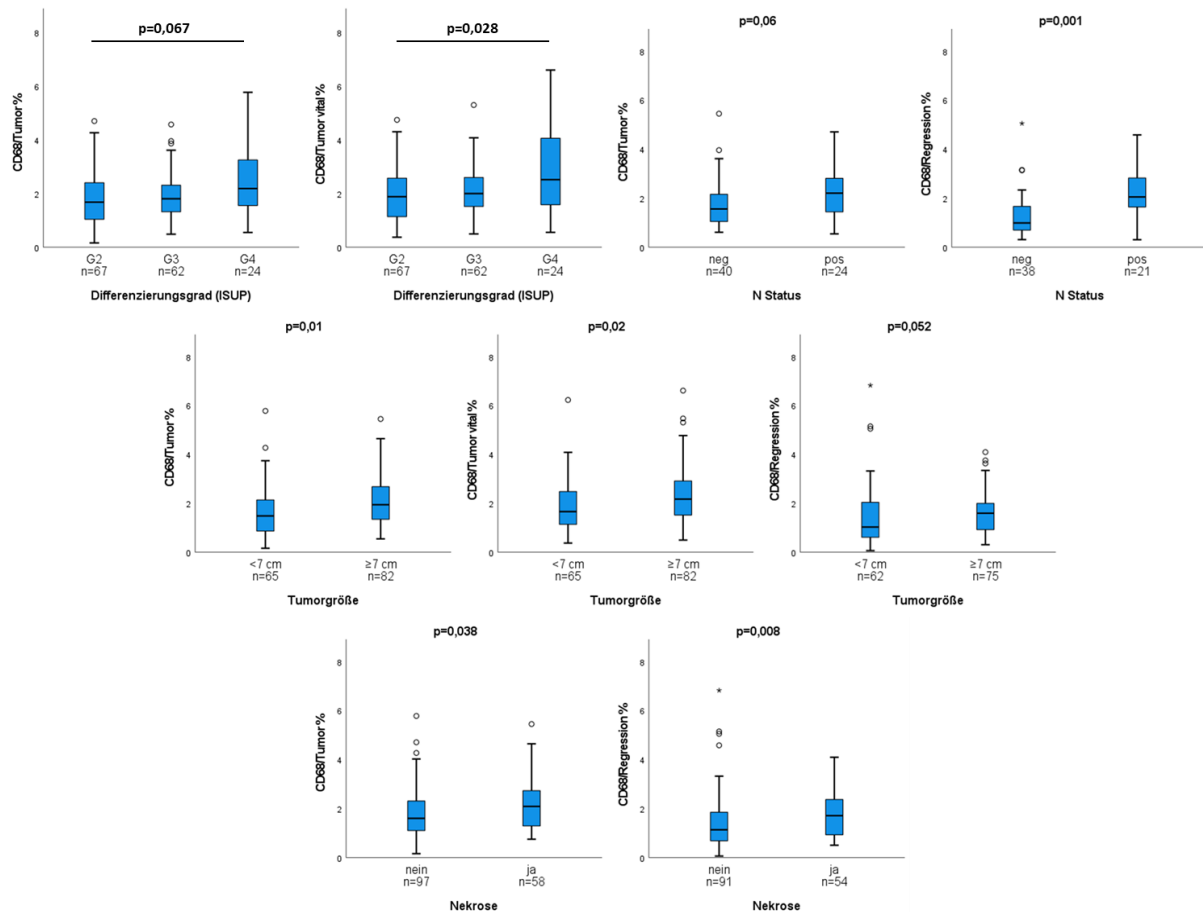


Abbildung 14: CD68-Dichten in verschiedenen Regionen im Bezug zu den Tumor-Charakteristika. Mann-Whitney Test bzw. Kruskal-Wallis Test. Punkte und Sternchen in den Diagrammen bezeichnen jeweils Ausreißer und extreme Ausreißer.

Anschließend wurden intratumorale CD204-Dichten im Bezug zu den Tumor-Charakteristika evaluiert. Bei schlecht differenzierten ccRCCs waren intratumorale CD204-Dichten signifikant höher. Bei großen Tumoren war ein tendenzieller Anstieg der CD204-Dichte im gesamten Tumor festzustellen. Tumoren mit nachweisbaren Nekrosen wiesen intratumoral eine signifikant höhere CD204-Dichte auf (Abbildung 15).

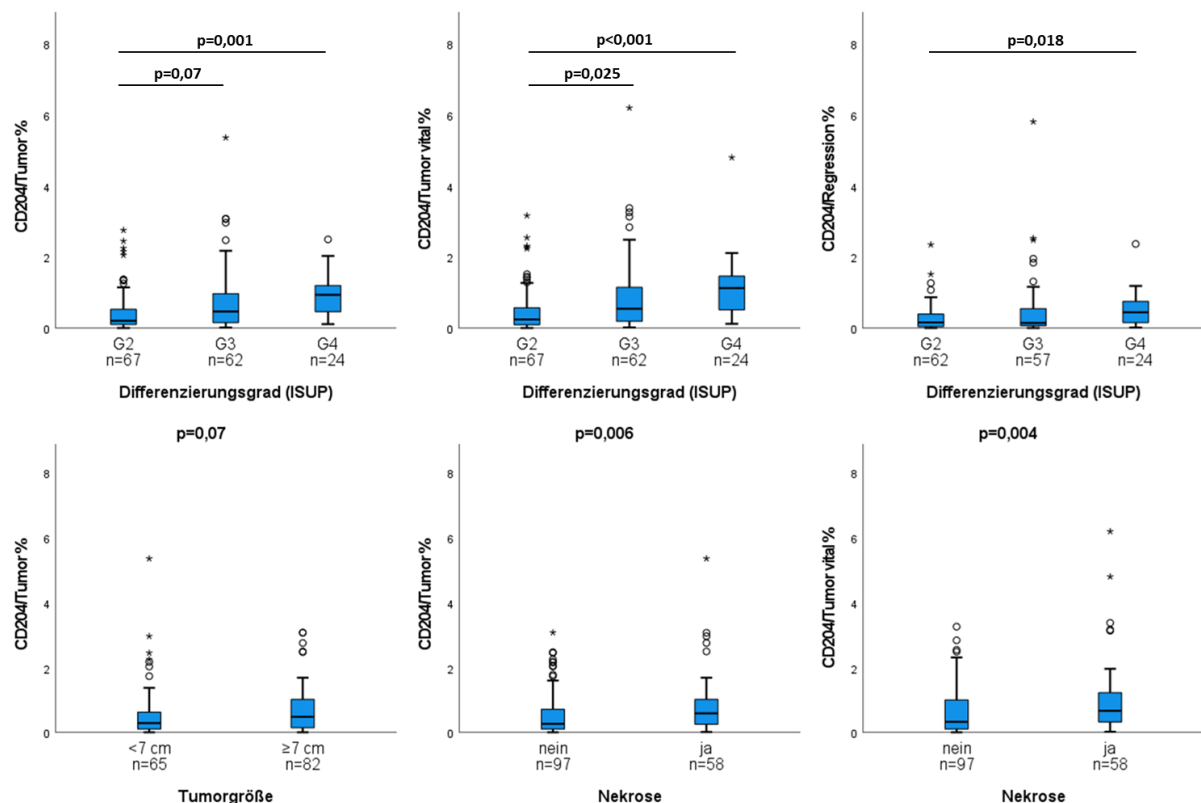


Abbildung 15: CD204-Dichten in verschiedenen Regionen im Bezug zu den Tumor-Charakteristika. Mann-Whitney Test bzw. Kruskal-Wallis Test. Punkte und Sternchen in den Diagrammen bezeichnen jeweils Ausreißer und extreme Ausreißer.

Schließlich wurden intratumorale Lymphozyten-Dichten im Bezug zu den Tumor-Charakteristika ausgewertet. Bei Lymphknotenmetastasierung waren intratumorale CD8-Dichten im Primärtumor signifikant verringert. Zusätzlich war bei großen Tumoren eine Reduzierung der CD20-Dichte im vitalen Tumor nachweisbar (Abbildung 16).

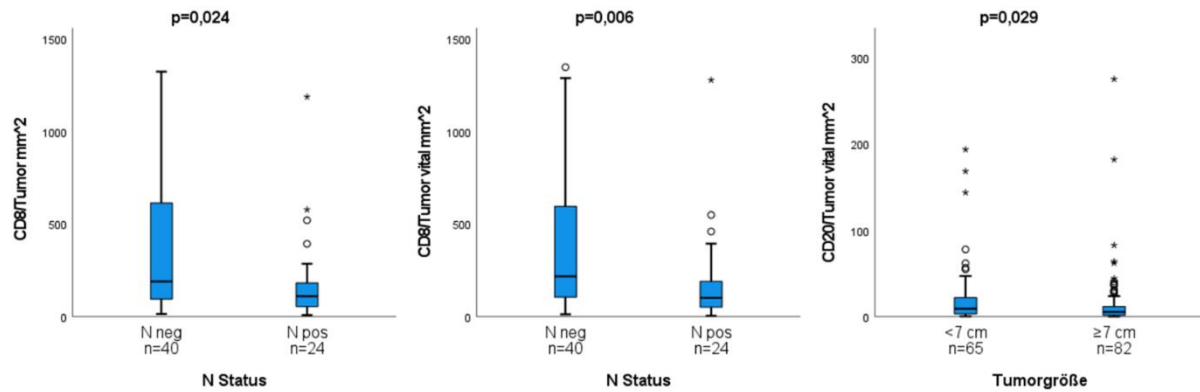


Abbildung 16: Intratumorale CD8- und CD20-Dichten im Bezug zu den Tumor-Charakteristika. Mann-Whitney Test. Punkte und Sternchen in den Diagrammen bezeichnen jeweils Ausreißer und extreme Ausreißer.

4.6 Zusammenhang der PD-L1-Expression mit Tumor-Charakteristika

Die PD-L1-Expression war signifikant höher bei Tumoren mit schlechter Differenzierung. Darüber hinaus war die PD-L1-Expression von Tumor- und Immunzellen signifikant höher bei steigendem T Status (Abbildung 17).

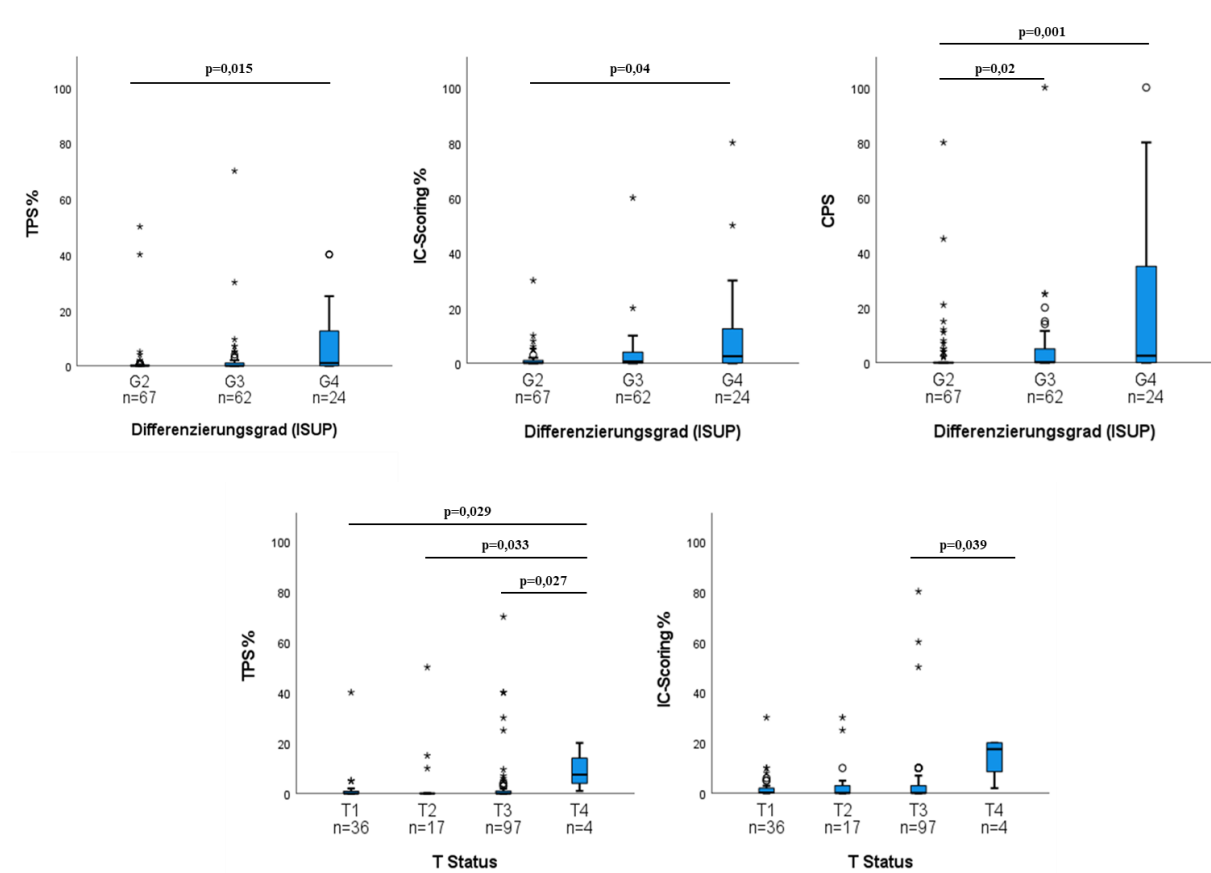


Abbildung 17: PD-L1-Expression im Bezug zu den Tumor-Charakteristika. Kruskal-Wallis Test. Punkte und Sternchen in den Diagrammen bezeichnen jeweils Ausreißer und extreme Ausreißer.

4.7 Zusammenhang der PD-L1-Expression mit der Leukozyten-Dichte

Die Leukozyten-Dichten im vitalen Tumor waren signifikant höher bei positiver PD-L1-Expression der Tumorzellen (Abbildung 18 und Tabelle S7 im Anhang).

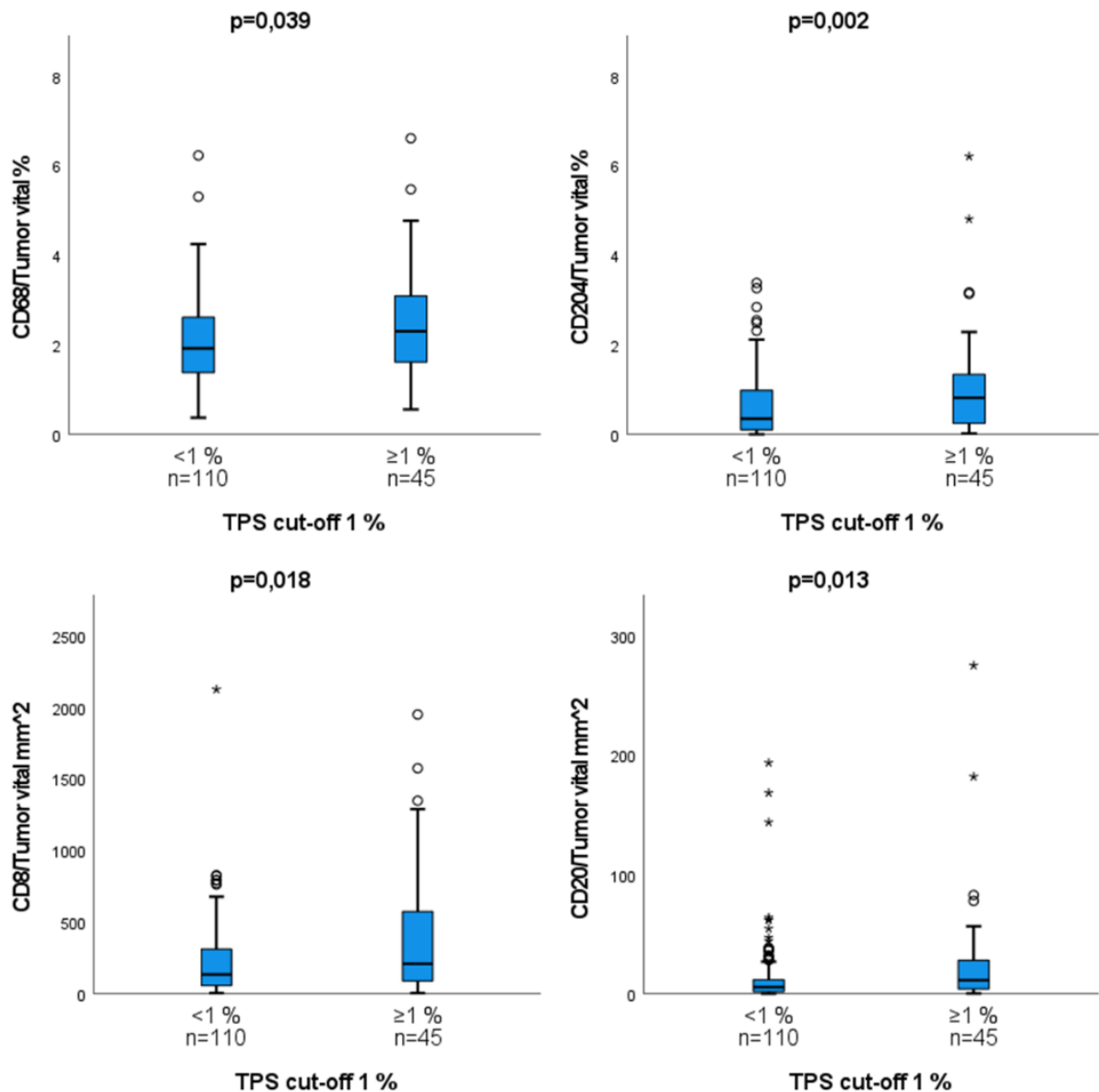


Abbildung 18: Intratumorale Leukozyten-Dichten im Bezug zur PD-L1-Expression der Tumorzellen. Mann-Whitney Test. Punkte und Sternchen in den Diagrammen bezeichnen jeweils Ausreißer und extreme Ausreißer.

4.8 Überlebensanalyse: Gesamtüberlebenszeit (OS)

Für 153 Patienten mit ccRCC waren die klinischen Daten verfügbar. Durchschnittlich dauerte der klinische Verlauf $62,1 \pm 4,9$ Monate (0,9 - 290,5). Das Gesamtüberleben wurde als die Zeit ab Erstdiagnose der Krankheit bis zum letzten Follow-up bzw. bis zum Tod der Patienten definiert.

4.8.1 Einfluss von Patienten-/Tumor-Charakteristika

Es konnte gezeigt werden, dass Frauen eine kürzere Überlebenszeit im Vergleich zu Männern hatten ($p=0,007$), während das Alter der Patienten keine Rolle im Krankheitsverlauf spielte. Eine schlechte Differenzierung, höherer T Status, eine Lymphknotenmetastasierung, große Tumoren und das Vorhandensein von Nekrose waren Charakteristika, die mit einer ungünstigen Prognose assoziiert waren (Tabelle S8 Anhang).

4.8.2 Einfluss von Leukozyten-Dichten

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die CD68-Dichte im Tumorgewebe als Biomarker für den Krankheitsverlauf genutzt werden kann. Hohe CD68-Dichten im gesamten Tumor ($p=0,006$), im vitalen Tumor ($p=0,003$) und in der Regression ($p<0,001$) hingen mit einer signifikant kürzeren Überlebensdauer zusammen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 19 und Tabelle S9 im Anhang detailliert mit den entsprechenden Überlebenskurven dargestellt.

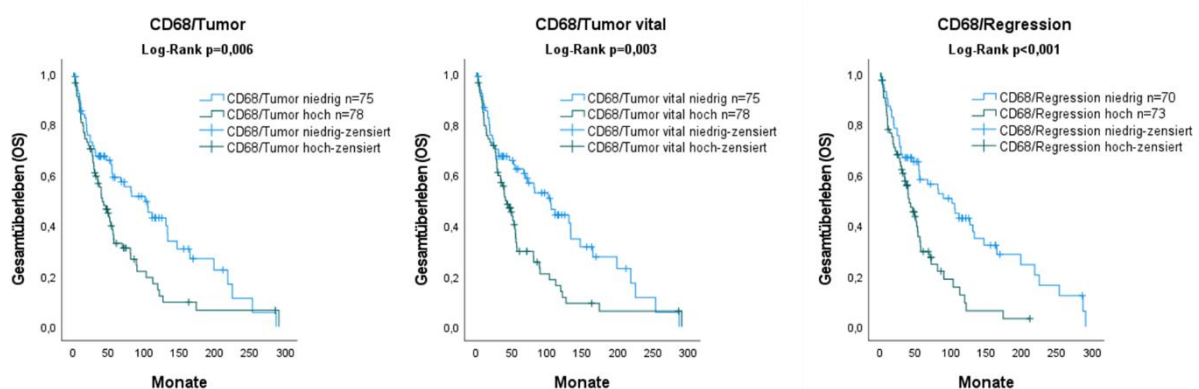


Abbildung 19: Zusammenhang des Gesamtüberlebens von ccRCC-Patienten mit der CD68-Dichte (OS, Kaplan-Meier Überlebenskurven, CNN-Classifizier).

Es wurde anschließend untersucht, ob die Dichten von TAMs (CD204) im Tumorgewebe als Biomarker für den klinischen Verlauf der ccRCC-Patienten genutzt werden können. Die CD204-Dichten im gesamten Tumor, im vitalen Tumor und in der Regression zeigten keinen Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben (Abbildung S1 und Tabelle S10, Anhang). Die intratumoralen CD8-Dichten zeigten auf das Gesamtüberleben der ccRCC-Patienten keinen signifikanten Einfluss. Allerdings standen hohe CD8-Dichten im gesamten Tumor ($p=0,09$) tendenziell mit einem längeren Überleben der Patienten in Zusammenhang (Abbildung S2 und Tabelle S11, Anhang). Schließlich war eine hohe Dichte von CD20-positiven B-Lymphozyten im vitalen Tumor mit einer längeren Überlebensdauer grenzwertig assoziiert ($p=0,053$) (Abbildung 20 und Tabelle S12 im Anhang).

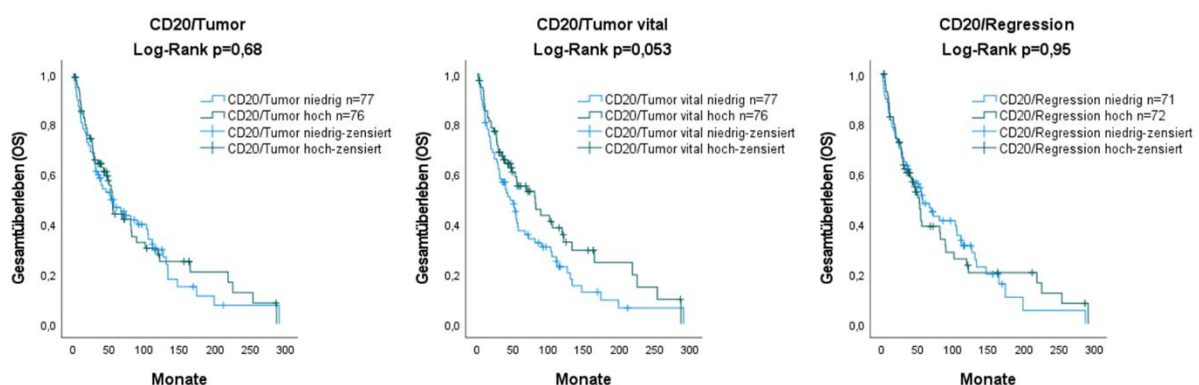


Abbildung 20: Zusammenhang des Gesamtüberlebens von ccRCC-Patienten mit der CD20-Dichte (OS, Kaplan-Meier Überlebenskurven).

4.8.3 Einfluss der PD-L1-Expression

Unabhängig vom cut-off Wert der PD-L1-Positivität war die Prognose der Patienten ungünstig, wenn eine PD-L1-Expression der Tumorzellen nachgewiesen werden konnte (TPS cut-off 1 %: $p<0,001$, cut-off 5 %: $p<0,001$, cut-off 10 %: $p=0,017$). Patienten mit einer PD-L1-Expression der Immunzellen wiesen ebenfalls eine schlechtere Prognose auf (IC-Scoring cut-off 5 %: $p=0,045$, cut-off 10 %: $p<0,001$). Schließlich ging die Expression des PD-L1-Markers von Tumor- und Immunzellen mit einem signifikant kürzeren Überleben der Patienten einher (CPS cut-off 10: $p<0,001$) (Abbildung 21 und Tabelle S13 im Anhang).

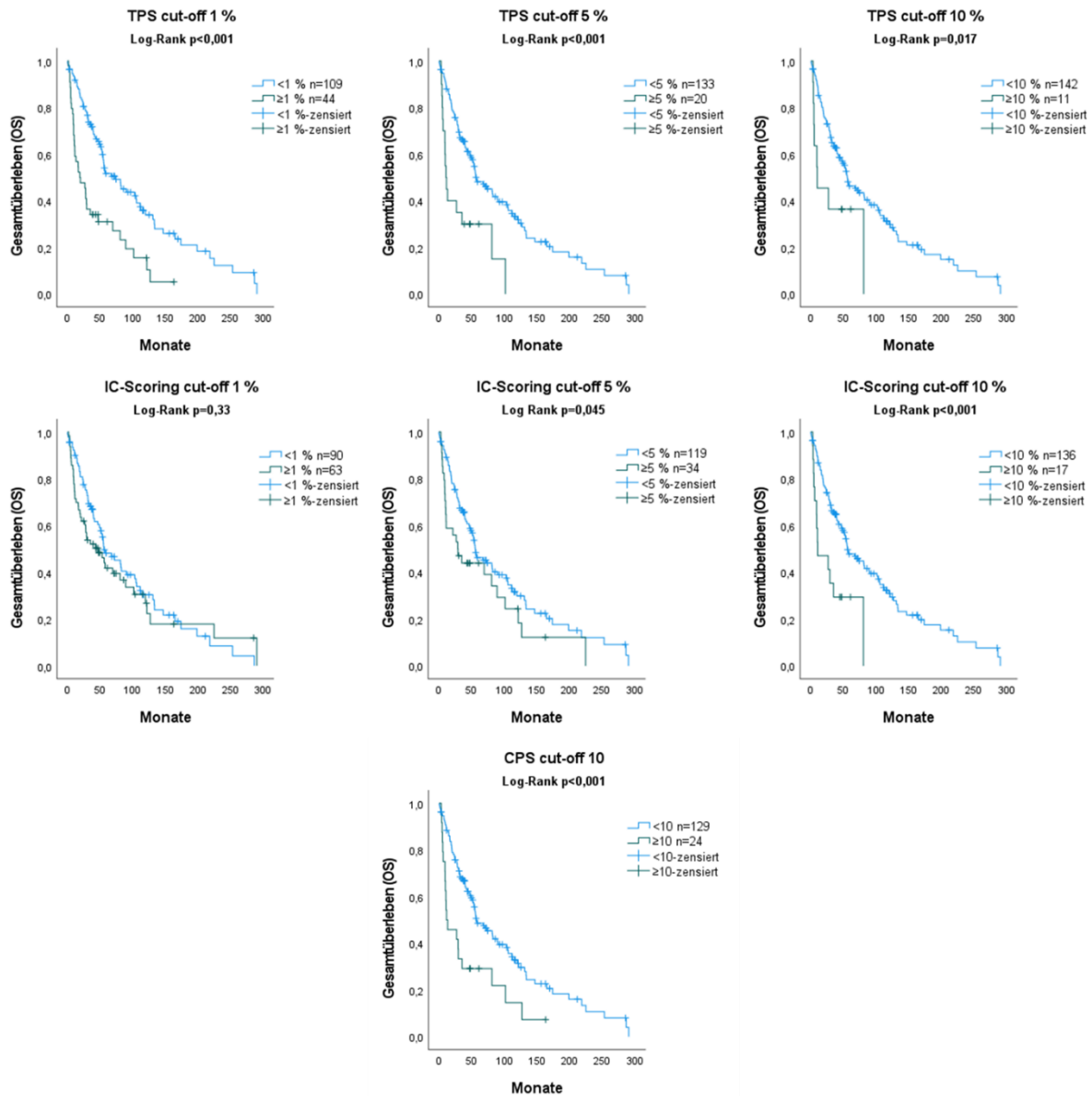


Abbildung 21: Zusammenhang des Gesamtüberlebens von ccRCC-Patienten mit der PD-L1-Expression in Abhängigkeit von verschiedenen cut-off-Werten (OS, Kaplan-Meier Überlebenskurven).

4.8.4 Multivariate Cox-Regressionsanalyse im Bezug zum Gesamtüberleben (OS)

Eine schlechte Differenzierung und ein höherer T Status waren unabhängige Biomarker eines ungünstigen klinischen Verlaufs von ccRCC-Patienten. Als unabhängiger Faktor eines ungünstigen Überlebens von ccRCC-Patienten wurde eine positive PD-L1-Expression auf Tumorzellen nur bei dem TPS mit cut-off 1 % identifiziert. Hohe CD68- und CD8-Dichten in der Regression wurden als unabhängige Faktoren eines kürzen Überlebens identifiziert, während eine hohe CD20-Dichte sowohl im vitalen Tumor als auch in der Regression als unabhängige Faktoren eines günstigen Patientenüberlebens dienten (Tabelle 8 und im Detail Tabelle S14 im Anhang).

Tabelle 8: Multivariate Cox-Regressionsanalyse im Bezug zum Gesamtüberleben (OS).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
Differenzierungsgrad (ISUP)	134			
G2	58	1 (Referenz)		
G3	53	2,16	1,24 - 3,77	0,006
G4	23	1,63	0,59 - 4,47	0,34
T Status	134			
T1	31	1 (Referenz)		
T2	15	1,04	0,39 - 2,77	0,93
T3	85	0,87	0,44 - 1,72	0,69
T4	3	5,02	1,08 - 23,24	0,039
TPS cut-off 1 %	134			
<1 %	97	1 (Referenz)		
≥1 %	37	2,61	1,34 - 5,07	0,005
CD68/Regression	134			
niedrig	65	1 (Referenz)		
hoch	69	2,14	1,23 - 3,72	0,007
CD8/Regression	134			
niedrig	65	1 (Referenz)		
hoch	69	2,33	1,24 - 4,39	0,009
CD20/Tumor vital	134			
niedrig	67	1 (Referenz)		
hoch	67	0,44	0,25 - 0,75	0,003
CD20/Regression	134			
niedrig	67	1 (Referenz)		
hoch	67	0,45	0,24 - 0,85	0,014

4.9 Immunzellen und PD-L1-Expression beeinflussen das Gesamtüberleben

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Bildung von Gruppen aus Leukozyten-Markern und dem PD-L1-Marker (TPS, cut-off-Wert 1 %), um zu untersuchen, welche Kombination Einfluss auf das Gesamtüberleben der ccRCC-Patienten (OS) hat. Folgende Gruppen wurden erzeugt:

Gruppe 1: CD68/CD204/CD8/CD20 (ROI) hoch (ho) + PD-L1 positiv (pos) (TPS ≥ 1 %)

Gruppe 2: CD68/CD204/CD8/CD20 (ROI) hoch (ho) + PD-L1 negativ (neg) (TPS < 1 %)

Gruppe 3: CD68/CD204/CD8/CD20 (ROI) niedrig (ni) + PD-L1 positiv (pos) (TPS ≥ 1 %)

Gruppe 4: CD68/CD204/CD8/CD20 (ROI) niedrig (ni) + PD-L1 negativ (neg) (TPS < 1 %)

Die simultane Analyse der intratumoralen CD68-Dichte (Makrophagen) und der PD-L1-Expression der Tumorzellen ergab, dass Patienten der Gruppe 4 (Markerkonstellation CD68ni/PD-L1neg) ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben im Vergleich zu den anderen drei Gruppen zeigten (Abbildung 22 und Tabelle 9).

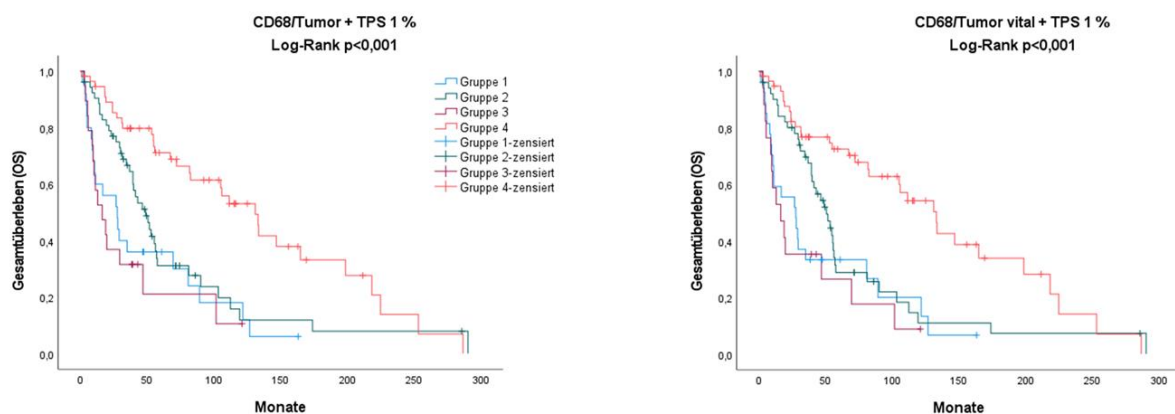


Abbildung 22: Niedrige CD68-Dichte und negative PD-L1-Expression im vitalen Tumor (Gruppe 4) gingen mit längerem Gesamtüberleben einher (OS, Kaplan-Meier Überlebenskurven, CNN-Classifizier).

Tabelle 9: Kombinierte Untersuchung der CD68-positiven Makrophagen mit der Expression des PD-L1-Markers im Hinblick auf das Gesamtüberleben (OS) der ccRCC-Patienten (OS, univariate Cox-Regressionsanalyse, CNN-Classifizier, ho=hoch, ni=niedrig, pos=positiv, neg=negativ).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
CD68/Tumor + TPS 1 %	153			
CD68/Tumor ho + TPS 1 % pos (1)	25	3,19	1,82 - 5,60	<0,001
CD68/Tumor ho + TPS 1 % neg (2)	53	2,03	1,25 - 3,28	0,004
CD68/Tumor ni + TPS 1 % pos (3)	19	4,28	2,27 - 8,10	<0,001
CD68/Tumor ni + TPS 1 % neg (4)	56	1 (Referenz)		
CD68/Tumor vital + TPS 1 %	153			
CD68/Tumor vital ho + TPS 1 % pos (1)	27	3,28	1,88 - 5,72	<0,001
CD68/Tumor vital ho + TPS 1 % neg (2)	51	2,04	1,26 - 3,30	0,004
CD68/Tumor vital ni + TPS 1 % pos (3)	17	4,13	2,16 - 7,89	<0,001
CD68/Tumor vital ni + TPS 1 % neg (4)	58	1 (Referenz)		

Eine geringe CD204-Dichte (TAMs) im gesamten Tumor und im vitalen Tumor bei PD-L1-negativen Tumoren (Gruppe 4, Markerkonstellation CD204ni/PD-L1neg) assoziierte mit einem günstigen Patientenüberleben im Vergleich zu den Gruppen 1 und 3 (Abbildung 23 und Tabelle 10).

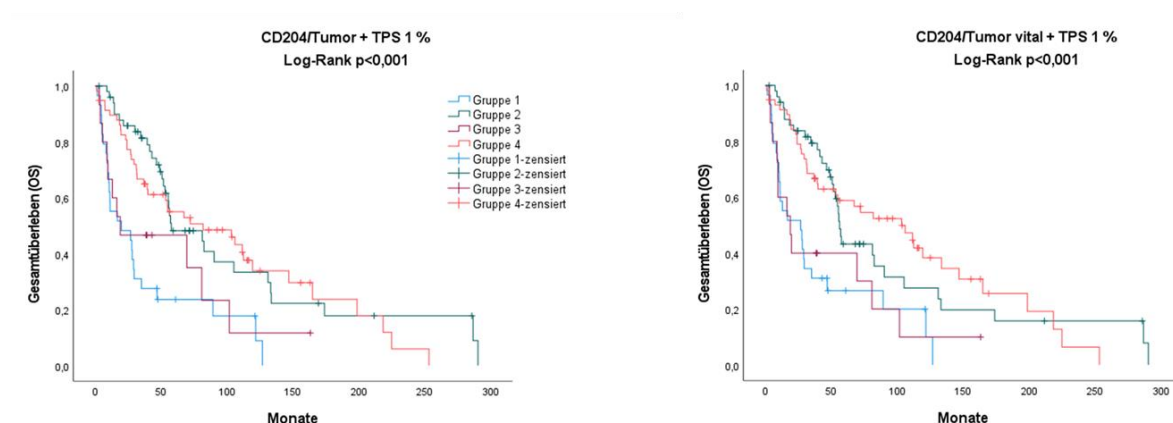


Abbildung 23: Niedrige CD204-Dichte und negative PD-L1-Expression im vitalen Tumor (Gruppe 4) gingen mit längerem Gesamtüberleben einher (OS, Kaplan-Meier Überlebenskurven, CNN-Classifier).

Tabelle 10: Kombinierte Untersuchung der CD204-positiven TAMs mit der Expression des PD-L1-Markers im Hinblick auf das Gesamtüberleben (OS) der ccRCC-Patienten (OS, univariate Cox-Regressionsanalyse, CNN-Classifer, ho=hoch, ni=niedrig, pos=positiv, neg=negativ).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
CD204/Tumor + TPS 1 %	153			
CD204/Tumor ho + TPS 1 % pos (1)	29	2,66	1,59 - 4,45	<0,001
CD204/Tumor ho + TPS 1 % neg (2)	51	0,87	0,54 - 1,40	0,57
CD204/Tumor ni + TPS 1 % pos (3)	15	1,94	0,99 - 3,81	0,054
CD204/Tumor ni + TPS 1 % neg (4)	58	1 (Referenz)		
CD204/Tumor vital + TPS 1 %	153			
CD204/Tumor vital ho + TPS 1 % pos (1)	29	2,69	1,59 - 4,54	<0,001
CD204/Tumor vital ho + TPS 1 % neg (2)	51	1,04	0,64 - 1,68	0,87
CD204/Tumor vital ni + TPS 1 % pos (3)	15	2,40	1,24 - 4,62	0,009
CD204/Tumor vital ni + TPS 1 % neg (4)	58	1 (Referenz)		

Bei der simultanen Analyse von intratumoralen CD8-Dichten (CTLs) und der PD-L1-Expression auf Tumorzellen zeigten Patienten der Gruppen 2 (CD8ho/PD-L1neg) und 4 (CD8ni/PD-L1neg) ein signifikant besseres Überleben im Vergleich zu Patienten der Gruppe 1 (CD8ho/PD-L1pos) (Abbildung 24 und Tabelle 11).

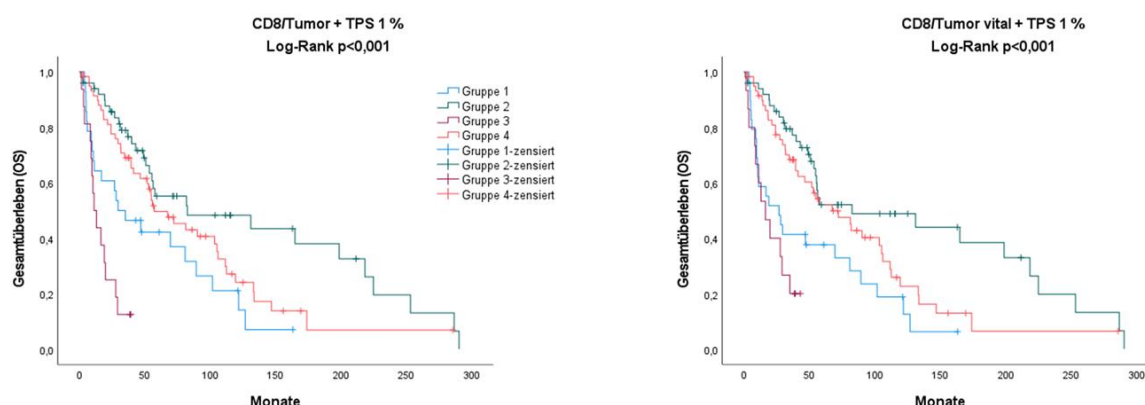


Abbildung 24: Hohe CD8-Dichte und negative PD-L1-Expression im vitalen Tumor (Gruppe 2) gingen mit längerem Gesamtüberleben einher (OS, Kaplan-Meier Überlebenskurven).

Tabelle 11: Kombinierte Untersuchung der CD8-positiven T-Lymphozyten mit der Expression des PD-L1-Markers im Hinblick auf das Gesamtüberleben (OS) der ccRCC-Patienten (OS, univariate Cox-Regressionsanalyse, ho=hoch, ni=niedrig, pos=positiv, neg=negativ).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
CD8/Tumor + TPS 1 %	153			
CD8/Tumor ho + TPS 1 % pos (1)	28	1 (Referenz)		
CD8/Tumor ho + TPS 1 % neg (2)	50	0,40	0,22 - 0,71	0,002
CD8/Tumor ni + TPS 1 % pos (3)	16	3,12	1,54 - 6,33	0,002
CD8/Tumor ni + TPS 1 % neg (4)	59	0,63	0,38 - 1,06	0,08
CD8/Tumor vital + TPS 1 %	153			
CD8/Tumor vital ho + TPS 1 % pos (1)	29	1 (Referenz)		
CD8/Tumor vital ho + TPS 1 % neg (2)	50	0,36	0,20 - 0,63	<0,001
CD8/Tumor vital ni + TPS 1 % pos (3)	15	1,97	0,96 - 4,04	0,06
CD8/Tumor vital ni + TPS 1 % neg (4)	59	0,57	0,34 - 0,94	0,028

Schließlich konnte die Markerkonstellation CD20ho/PD-L1neg (Gruppe 2) im vitalen Tumor eine signifikant bessere Prognose im Vergleich zu den anderen drei Gruppen aufweisen (Abbildung 25 und Tabelle 12).

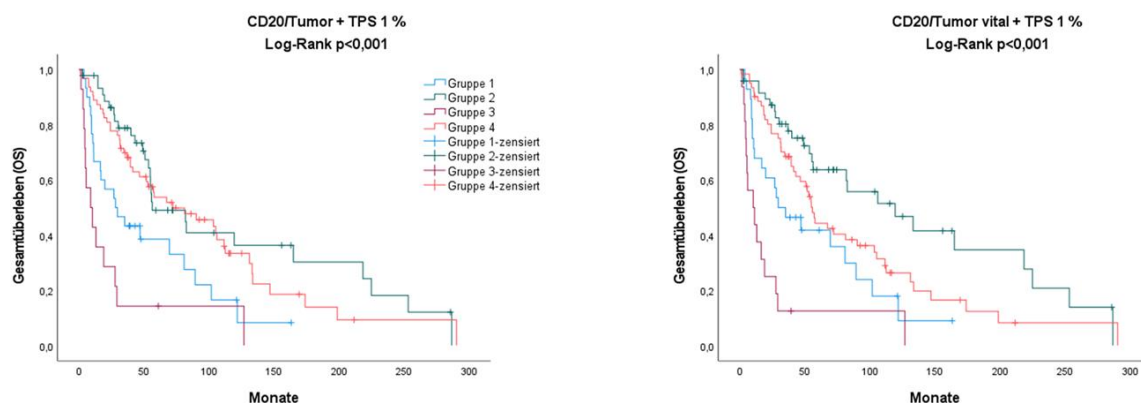


Abbildung 25: Hohe CD20-Dichte und negative PD-L1-Expression im vitalen Tumor (Gruppe 2) gingen mit längerem Gesamtüberleben einher (OS, Kaplan-Meier Überlebenskurven).

Tabelle 12: Kombinierte Untersuchung der CD20-positiven B-Lymphozyten mit der Expression des PD-L1-Markers im Hinblick auf das Gesamtüberleben (OS) der ccRCC-Patienten (OS, univariate Cox-Regressionsanalyse, ho=hoch, ni=niedrig, pos=positiv, neg=negativ).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
CD20/Tumor + TPS 1 %	153			
CD20/Tumor ho + TPS 1 % pos (1)	30	1 (Referenz)		
CD20/Tumor ho + TPS 1 % neg (2)	46	0,43	0,24 - 0,76	0,004
CD20/Tumor ni + TPS 1 % pos (3)	14	2,17	1,09 - 4,29	0,027
CD20/Tumor ni + TPS 1 % neg (4)	63	0,53	0,32 - 0,88	0,014
CD20/Tumor vital + TPS 1 %	153			
CD20/Tumor vital ho + TPS 1 % pos (1)	28	1 (Referenz)		
CD20/Tumor vital ho + TPS 1 % neg (2)	48	0,39	0,21 - 0,70	0,002
CD20/Tumor vital ni + TPS 1 % pos (3)	16	2,73	1,39 - 5,34	0,003
CD20/Tumor vital ni + TPS 1 % neg (4)	61	0,65	0,38 - 1,09	0,10

4.10 Biomarkeranalyse unter einer immunonkologischen (IO)-Therapie

In einem weiteren Schritt der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Biomarker mit prognostischer Aussagekraft für den klinischen Verlauf von mit IO-Therapie behandelten Patienten identifiziert werden konnten. Bei 40 Patienten mit metastasiertem ccRCC, die eine IO-Therapie erhielten, waren klinische Daten verfügbar. Das mittlere progressionsfreie Überleben (PFS) betrug $14,99 \pm 2,53$ (1 - 62,5) Monate. Das progressionsfreie Überleben wurde als die Zeit ab Beginn der IO-Therapie bis zur Progression der Krankheit bzw. bis zum Tod der Patienten definiert. Es wurde der Einfluss von Charakteristika der Patienten, Leukozyten-Dichten und PD-L1-Expression auf das progressionsfreie Überleben unter IO-Therapie der ccRCC-Patienten untersucht.

4.10.1 Einfluss von Tumor-Charakteristika, Leukozyten und PD-L1 auf das PFS

Das Alter der Patienten, der Differenzierungsgrad, die Tumorgroße und das Vorhandensein von mikroskopischer Nekrose hatten das PFS der Patienten nicht beeinflusst (Tabelle S15, Anhang). Es wurde weiterhin gezeigt, dass weder intratumorale CD68- (Makrophagen) (Abbildung S3 und Tabelle S16 im Anhang) noch CD204-Dichten (TAMs) (Abbildung S4 und Tabelle S17 im Anhang) eine prognostische Rolle im progressionsfreien Überleben (PFS) der ccRCC-Patienten spielten. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass hohe CD204-Dichten im gesamten Tumor mit einem tendenziell längeren progressionsfreien Überleben assoziierten ($p=0,08$). Im Anschluss daran wurde gezeigt, dass die intratumoralen CD8-Dichten (CTLs) ebenfalls nicht mit der progressionsfreien Überlebenszeit assoziierten (Abbildung S5 und Tabelle S18 im Anhang). Anschließend wurde der Einfluss der intratumoralen CD20-Dichten (B-Lymphozyten) auf das progressionsfreie Überleben untersucht. Im vitalen Tumor war eine hohe CD20-Dichte als günstiger prognostischer Faktor des PFS identifiziert ($p=0,003$) (Abbildung 26 und Tabelle S19 im Anhang). Schließlich führte positive PD-L1-Expression auf Tumorzellen mit cut-off 5 % (TPS 5 %) zu einem tendenziell besseren progressionsfreien Überleben ($p=0,065$) (Abbildung S6 und Tabelle S20 im Anhang).

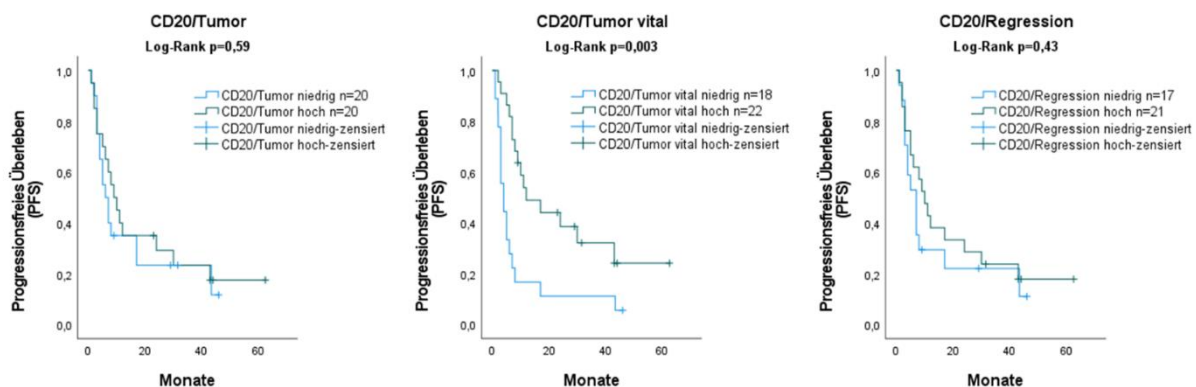


Abbildung 26: Zusammenhang des progressionsfreien Überlebens von ccRCC-Patienten mit der CD20-Dichte (PFS einer IO-Therapie, Kaplan-Meier Überlebenskurven).

4.10.2 Multivariate Cox-Regressionsanalyse im Bezug zum PFS

Eine positive PD-L1-Expression von Tumorzellen mit cut-off 5 % und eine hohe CD20-Dichte im vitalen Tumor wurden als unabhängige günstige prognostische Faktoren im Bezug zum PFS unter einer IO-Therapie identifiziert, während eine schlechte Differenzierung der Tumorzellen als unabhängiger ungünstiger prognostischer Faktor identifizierte (Tabelle 13 und im Detail Tabelle S21 im Anhang).

Tabelle 13: Multivariate Cox-Regressionsanalyse im Bezug zum progressionsfreien Überleben (PFS).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
Differenzierungsgrad (ISUP)	38			
G2	12	1 (Referenz)		
G3	14	3,58	0,98 - 13,06	0,053
G4	12	5,16	1,12 - 23,68	0,035
TPS cut-off 5 %	38			
<5 %	31	1 (Referenz)		
≥5 %	7	0,06	0,01 - 0,56	0,014
CD20/Tumor vital	38			
niedrig	17	1 (Referenz)		
hoch	21	0,22	0,07 - 0,67	0,008

4.11 Identifizierung prädiktiver Biomarker des IO-Therapieansprechens

Um herauszufinden welche Faktoren überhaupt ein gutes Ansprechen auf eine IO-Therapie des metastasierten ccRCC voraussagen, wurde auf diejenigen Patienten fokussiert, die überproportional gut bzw. überproportional schlecht auf die IO-Therapie angesprochen hatten. Bei 24 ccRCC-Patienten des Kollektivs, die eine IO-Therapie erhielten, hatten 9 (37,5 %) gut (guter Responder) und 15 (62,5 %) schlecht (schlechter Responder) auf die IO-Therapie angesprochen. Als gute Responder waren alle Patienten definiert, die über 24 Monate von einer IO-Therapie profitiert hatten. Als schlechte Responder waren dagegen alle Patienten definiert, die in einem Zeitraum von 0 bis 6 Monaten von einer IO-Therapie profitierten. Patienten mit einem Ansprechen von 6 bis 24 Monate waren als intermediäre Responder bezeichnet und wurden nicht berücksichtigt.

Es wurden keine Assoziationen zwischen IO-Therapieansprechen und Patienten-/Tumor-Charakteristika nachgewiesen (Tabellen S22 und S28, Anhang). Ein Vergleich beider Gruppen zeigte keine Assoziation zwischen IO-Therapieansprechen und intratumoralen CD68-Dichten (Makrophagen) (Tabelle S23 und S29, Anhang), CD204-Dichten (TAMs) (Tabelle S24 und S30, Anhang) und CD8-Dichten (CTLs) (Tabelle S25 und S31, Anhang). Im Anschluss daran wurde eine Assoziation zwischen CD20-Dichte (B-Lymphozyten) und IO-Therapieansprechen untersucht. Eine hohe CD20-Dichte im vitalen Tumor assoziierte signifikant mit einem guten IO-Therapieansprechen ($p=0,01$) (Tabelle 14 und Tabelle S26 im Anhang).

Tabelle 14: Zusammenhang von IO-Therapieansprechen mit CD20-Dichte (exakter Test nach Fisher*).

	n	guter Responder	schlechter Responder	p-Wert
CD20/Tumor	24			0,67 *
niedrig	13	4 (30,8 %)	9 (69,2 %)	
hoch	11	5 (45,5 %)	6 (54,5 %)	
CD20/Tumor vital	24			0,01 *
niedrig	14	2 (14,3 %)	12 (85,7 %)	
hoch	10	7 (70 %)	3 (30 %)	
CD20/Regression	24			0,42 *
niedrig	11	3 (27,3 %)	8 (72,7 %)	
hoch	13	6 (46,2 %)	7 (53,8 %)	

Schließlich wurde die potentielle Assoziation zwischen dem IO-Therapieansprechen und der PD-L1-Expression evaluiert. Es konnten keine Assoziationen identifiziert werden (Tabelle S27 und S32, Anhang).

4.12 Clusterbildung von B-Lymphozyten

Bei den Patienten unter IO-Therapie (9 gute Responder und 15 schlechte Responder) wurde untersucht, ob B-Zellen im vitalen Tumor Cluster bilden. Wenn bei einem Fall mindestens eine B-Zell-Clusterbildung im vitalen Tumor nachweisbar war, wurde der entsprechende Tumor als positiv definiert. Die Analyse der digitalisierten Schnitte zeigte, dass von den 15 Tumoren der schlechten Responder nur bei einem Fall (1/15, 6,7 % der Fälle) Cluster von B-Lymphozyten im vitalen Tumor nachweisbar waren. Die Cluster befanden sich auf der Grenze zwischen dem vitalen Tumor und der Regression. Bei den guten Respondern waren B-Zell-Clusterbildungen im vitalen Tumor bei 67 % der Fälle (6/9 Tumoren) nachweisbar. Bei den restlichen 3 Tumoren waren B-Lymphozyten im vitalen Tumor nicht zu finden bzw. sie waren spärlich verteilt. Darüber hinaus war in den Clustern der B-Lymphozyten eine Kolokalisation mit CD8-positiven T-Lymphozyten nachweisbar. Eine Illustration der B-Zell-Clusterbildung im vitalen Tumor guter Responder sowie die Kolokalisation mit den zytotoxischen T-Lymphozyten ist in der Abbildung 27 zu sehen.

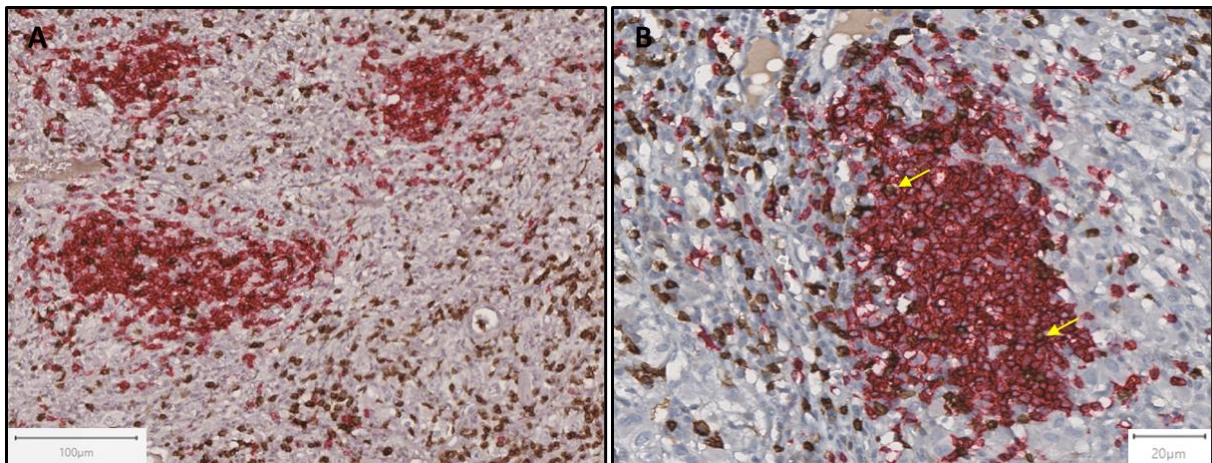


Abbildung 27: Clusterbildung von B-Lymphozyten im vitalen Tumor eines guten Responders. **A:** Cluster von B-Zellen im vitalen Tumor. **B:** Cluster von B-Zellen in Vergrößerung. Mit gelben Pfeilen werden zytotoxische CD8-positive T-Lymphozyten gezeigt, die mit B-Lymphozyten in den Clustern kolokalisieren. Die rote Immunfärbung markiert B-Lymphozyten. Die braune Immunfärbung markiert zytotoxische T-Lymphozyten.

4.13 Ergebnisse der Strukturerkennung

Die Strukturerkennung mittels künstlicher Intelligenz wurde prinzipiell auf die Erkennung der Klasse „Tumor vital“ fokussiert. Tabelle 15 listet die Klassen, die Häufigkeit jeder Klasse über alle digitalisierten Schnitte, die Gesamtfläche jeder Klasse im gesamten Datensatz (Training, Test und Evaluierung) sowie den Flächenanteil jeder Klasse im Vergleich zu der 42480,20 mm² Gesamtgewebefläche über alle 179 Schnitten auf. Die Klasse „Tumor vital“ wies die höchste Abundanz und den höchsten prozentualen Flächenanteil von 43,70 % im gesamten Datensatz auf. Im Trainingsdatensatz mit insgesamt 139 Schnitten zeigte ebenfalls die Klasse „Tumor vital“ die höchste Abundanz sowie den höchsten Flächenanteil von 43,92 % (Tabelle S33, Anhang).

Tabelle 15: Abundanz der Klassen im gesamten Datensatz (n=Anzahl der Schnitte, die die Klasse enthalten).

Klasse	n	Fläche (in mm ²)	% Fläche-Anteil im Datensatz
Tumor vital	178	18564,908	43,70 %
Tumor regression	163	4705,824	11,08 %
Tumor necrosis	68	1326,987	3,12 %
Tumor bleeding	82	562,105	1,32 %
Capsule	152	1110,102	2,61 %
Angioinvasion	10	13,396	0,03 %
Cyst formation	32	104,551	0,25 %
Cortex	65	2875,164	6,77 %
Cortex atrophy	101	2833,573	6,67 %
Medulla	75	2465,719	5,80 %
Extrarenal	156	7702,786	18,13 %
Diffuse tumor growth in soft tissue	1	161,779	0,38 %
Medullary spindle cell nodule	1	4,320	0,01 %
Papillom	1	2,780	0,01 %
Gesamtgewebefläche		42480,203	100 %

Aufgrund der Größe des Trainingsdatensatzes dauerte eine vollständige Epoche sehr lange. Dafür wurde zunächst eine kurze Trainingsrunde von zwei Epochen gewählt, was zu einer Pixeltrefferquote für alle Klassen von 85,25 % auf 100 Trainingsschnitten und 82,67 % auf den 30 Testschnitten führte. Nachdem die Schnitte im Training auf 139 erhöht wurden, wurden 14 weitere Epochen trainiert, was zu einer Pixeltrefferquote für alle Klassen von 90,05 % auf 139 Trainingsschnitten und 85,76 % auf den 30 Testschnitten führte. Bezüglich der Evaluierung des Trainings, wurden die 30 Testschnitte und die 10 Evaluierungsschnitte für jede Klasse über die „Intersection over Union“ (IoU) getestet. Die Tabelle 16 zeigt den IoU-Wert für jede Klasse der 30 Testschnitte. Die IoU-Werte pro Klasse zeigten, dass die am häufigsten vorkommenden Klassen mit hohem prozentualen Flächenanteil in den Trainingsdaten die höchsten IoU-Werte

erreichten. Die Klasse „Tumor vital“ erreichte mit dem höchsten Flächenanteil einen hohen IoU-Wert von 0,89. Die Klassen „Capsule“, „Tumor bleeding“, „Angioinvasion“ und „Cyst formation“ erreichten niedrige IoU-Werte zwischen 0 und 0,38.

Tabelle 16: IoU-Wert der Klassen im Testdatensatz (n=Anzahl der Schnitte, die die Klasse enthalten).

Klasse	n	Fläche (in mm ²)	% Fläche-Anteil im Datensatz	IoU-Wert
Tumor vital	30	2653,86	38,99 %	0,89
Tumor regression	30	786,16	11,55 %	0,54
Tumor necrosis	9	137,57	2,02 %	0,65
Tumor bleeding	16	103,92	1,53 %	0,38
Capsule	24	149,40	2,20 %	0,28
Angioinvasion	1	0,61	0,01 %	0
Cyst formation	3	13,20	0,19 %	0,17
Cortex	12	529,37	7,78 %	0,62
Cortex atrophy	17	505,65	7,43 %	0,46
Medulla	16	586,84	8,62 %	0,73
Extrarenal	27	1336,64	19,64 %	0,86
Diffuse tumor growth in soft tissue	0	0	0 %	-
Medullary spindle cell nodule	0	0	0 %	-
Papillom	1	2,78	0,04 %	0
Gesamtgewebefläche		6806,02	100 %	

Die IoU-Werte mit bis zu 10 Evaluierungsschnitten zeigten, dass die Klasse „Tumor vital“ mit dem höchsten Flächenanteil einen sehr hohen IoU-Wert von 0,93 erreichte (Tabelle 17). Die Klassen „Capsule“, „Tumor bleeding“, „Cyst formation“ und „Medulla“ erreichten dagegen niedrige IoU-Werte zwischen 0,11 und 0,34. Ein „-“ markiert das Fehlen einer Klasse.

Tabelle 17: IoU-Wert der Klassen im Evaluierungsdatensatz (n=Anzahl der Schnitte, die die Klasse enthalten).

Klasse	n	Fläche (in mm ²)	% Fläche-Anteil im Datensatz	IoU-Wert
Tumor vital	10	1297,39	54,03 %	0,93
Tumor regression	7	203,89	8,49 %	0,56
Tumor necrosis	3	51,84	2,16 %	0,67
Tumor bleeding	4	14,40	0,60 %	0,18
Capsule	10	81,55	3,40 %	0,34
Angioinvasion	0	0	0 %	-
Cyst formation	1	3,95	0,16 %	0,14
Cortex	3	176,19	7,34 %	0,53
Cortex atrophy	3	136,68	5,69 %	0,47
Medulla	2	7,43	0,31 %	0,11
Extrarenal	9	427,93	17,82 %	0,89
Diffuse tumor growth in soft tissue	0	0	0 %	-
Medullary spindle cell nodule	0	0	0 %	-
Papillom	0	0	0 %	-
Gesamtgewebefläche		2401,25	100 %	

Um die Erkennung des vitalen Tumors im Detail zu untersuchen, wurden zusätzliche Analysen auf ausgewählten Testbildern durchgeführt. Die Ergebnisse ergaben eine sehr hohe Präzision von 98,7 % sowie eine hohe Sensitivität von 90,7 %. Die Abbildung 28 illustriert die Prädiktion des erzeugten CNN-Classifiers bezüglich der Erkennung der Klasse „Tumor vital“ auf einem Testbild sowie auch die Kombination der manuellen Annotation mit dem Netzvorschlag. Die obigen Werte für Präzision und Sensitivität beruhen auf einem mit 100 Trainingsschnitten erzeugten CNN-Classifizier.

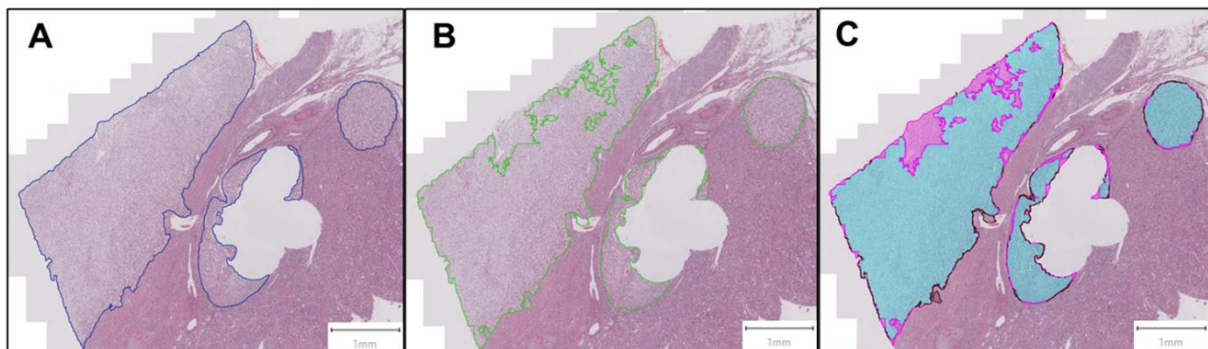


Abbildung 28: Strukturerkennung der Klasse „Tumor vital“. **A:** Manuelle Annotation der Klasse „Tumor vital“. **B:** Prädiktion der Klasse „Tumor vital“ (Netzvorschlag). **C:** Kombination der manuellen Annotation mit dem Netzvorschlag. Dabei entstehen folgende Flächen: **richtig-positive** Fläche („true positive“), **falsch-positive** Fläche („false positive“) und **falsch-negative** Fläche („false negative“). Es lassen sich Präzision, Sensitivität und F1-Score berechnen. Präzision beträgt 98,7 %, Sensitivität beträgt 90,7 % und F1-Score beträgt 94,5 %.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die prognostische Bedeutung von Immunzellinfiltraten in verschiedenen ROIs (vor allem intratumoral) und die Expression des PD-L1-Markers bei Patienten mit metastasiertem ccRCC untersucht. Ein weiteres Ziel des Vorhabens war die zuverlässige Erkennung vom Tumorgewebe mittels Methoden der künstlichen Intelligenz.

Um den Zusammenhang von Immunzellinfiltraten mit dem Überleben der RCC-Patienten zu untersuchen, wurde digitale Pathologie angewandt. An ausgewählten HE-EI gefärbten Schnittpräparaten wurden möglichst präzise händisch Bereiche annotiert, um ROIs (z. B. vitaler, regressiv veränderter und nekrotischer Tumor) zu erzeugen, innerhalb derer anschließend Immunzellinfiltrate quantifiziert wurden. Zu diesem Zweck wurden Proben von 171 Patienten mit metastasiertem RCC analysiert. Eine Besonderheit des Vorhabens war die Quantifizierung der Leukozyten in den gesamten digitalisierten histologischen Schnittpräparaten im Gegensatz zu anderen Studien, die ausschließlich „tissue microarrays“ (TMA) untersucht haben (Cros et al., 2016). Das Tumormikromilieu der RCCs ist heterogen (Beksac et al., 2017), sodass die Anwendung von TMAs, die kleine gestanzte Bereiche des Tumors repräsentieren, nicht die Heterogenität des Tumormikromilieus abbilden können, welches entscheidend für das Patientenüberleben sein kann.

5.1 Prognostische Bedeutung von potentiellen Biomarkern

Die Immunzellinfiltrate, welche im Hinblick auf die prognostische Nutzbarkeit untersucht wurden, beinhalteten TAMs und TILs. TAMs wurden mit den Makrophagen-Markern CD68 und CD204 angefärbt. Bei den TILs wurden CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten und CD20-positive B-Lymphozyten nachgewiesen. Zunächst wurden potentielle Zusammenhänge der Leukozyten-Dichten und des PD-L1-Markers mit Patienten-/Tumor-Charakteristika (Geschlecht, Alter, Differenzierungsgrad, T Status, N Status, Nachweis von Nekrose und Tumorgroße) analysiert. Anschließend wurde der Zusammenhang der Leukozyten-Dichte und der PD-L1-Expression mit dem Gesamtüberleben (OS) der Patienten untersucht, sowie auch mit dem progressionsfreien Überleben (PFS) der Patienten, die eine IO-Therapie erhielten. Letztlich wurde eine potentielle Assoziation zwischen den Leukozyten-Dichten im Tumorgewebe und der Expression des PD-L1-Markers mit dem IO-Therapieansprechen untersucht.

5.1.1 Patienten-/Tumor-Charakteristika

Die univariate Überlebensanalyse von üblichen Patienten-/Tumor-Charakteristika (Differenzierungsgrad, T Status, N Status, Nachweis von Nekrose und Tumorgröße) im Bezug zum Gesamtüberleben (OS) zeigte, dass schlechte Differenzierung, hoher T Status/Tumorgröße, Lymphknotenmetastasierung bei Erstdiagnose und nachweisbare mikroskopische Nekrose ungünstige prognostische Faktoren darstellen. In der multivariaten Analyse sind eine schlechte Differenzierung und ein hoher T Status der Tumoren als unabhängige ungünstige prognostische Faktoren für das Gesamtüberleben (OS) identifiziert worden. Eine andere Studie zeigte ebenfalls, dass eine schlechte Differenzierung, große Tumoren und Lymphknotenmetastasen mit ungünstiger Überlebensdauer von ccRCC-Patienten assoziierten (Stenzel et al., 2020). Bezüglich des Zusammenhangs der Tumor-Charakteristika mit dem progressionsfreien Überleben unter IO-Therapie identifizierte die univariate Überlebensanalyse keine prognostische Wertigkeit der oben genannten Charakteristika.

5.1.2 Makrophagen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass TAMs im vitalen Tumor sowohl mit dem Marker CD68 als auch mit CD204 eine hohe Prävalenz im ccRCC aufweisen. Es konnte ein Zusammenhang zwischen höheren Dichten CD68-positiver TAMs mit einem kürzeren Gesamtüberleben (OS) gezeigt werden. Andere Studien im ccRCC konnten ebenfalls zeigen, dass hohe CD68-Dichten mit einer schlechten Prognose assoziierten (Cros et al., 2016; Dannenmann et al., 2013; Shen et al., 2021; Stenzel et al., 2020; Toge et al., 2009). Diese Ergebnisse weisen auf eine unterstützende Rolle von TAMs bei der Tumorentwicklung hin. Weitere Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass CD68-Dichten im vitalen Tumor höher bei schlecht differenzierten ccRCCs waren. Studien im ccRCC zeigten bereits, dass hohe CD68- bzw. CD204-Dichten mit schlechterem Differenzierungsgrad zusammenhingen (Komohara et al., 2011; Xu et al., 2014). Möglicherweise exprimieren TAMs in Tumoren mit schlechter Differenzierung Chemokine (z. B. CCL2), welche die Rekrutierung von weiteren Makrophagen induzieren. Bei Patienten mit Lymphknotenmetastasierung bei der Erstdiagnose wurden hohe CD68-Dichten in der Regression nachgewiesen. Eine Studie bei Zervixkarzinom zeigte, dass VEGF-C-exprimierende TAMs, identifiziert mit dem CD68 Marker, eine Rolle bei der peritumoralen Lymphangiogenese spielten (Schoppmann et al., 2002). Ob VEGF-C-exprimierende TAMs in regressiv veränderten ccRCCs existieren, ist noch unklar.

Intratumorale Dichten von TAMs, identifiziert mit dem CD204 Marker, assoziierten in der vorliegenden Studie nicht mit dem Gesamtüberleben. Bereits publizierte Ergebnisse im ccRCC

konnten ebenfalls zeigen, dass CD204-Dichten keine prognostische Bedeutung haben (Komohara et al., 2011). In anderen Untersuchungen beeinflussten hohe Dichten von alternativ aktivierten Makrophagen (CD204, CD163) das Gesamtüberleben der ccRCC-Patienten negativ. Eine Reihe von Studien im ccRCC konnte bereits zeigen, dass hohe Dichten von CD163-positiven TAMs mit einer ungünstigen Prognose assoziierten (Chakiryan et al., 2021; Cros et al., 2016; Dannenmann et al., 2013). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass hohe intratumorale CD204-Dichten tendenziell zu einem verbesserten PFS der ccRCC-Patienten führten. TAMs können selbst PD-L1 exprimieren. Es wurde bereits bei anderen Tumorarten nachgewiesen, dass TAMs PD-L1-Expression auf Tumorzellen induzieren können (Gulay et al., 2022; Nagano et al., 2021; Xia et al., 2022). PD-L1-exprimierende TAMs können somit ein Ziel der IO-Therapie sein und dies kann ein Grund dafür sein, warum IO-behandelte Patienten mit hohen intratumoralen TAM-Dichten eine tendenziell längere progressionsfreie Überlebenszeit hatten.

5.1.3 Lymphozyten

Diese Arbeit konnte zeigen, dass die CD8-Dichte im vitalen Tumor höher im Vergleich zu den CD20-Dichten waren. Bereits publizierte Daten konnten ebenfalls zeigen, dass CTLs (CD8) eine höhere Prävalenz im Tumormikromilieu des ccRCC im Gegensatz zu den B-Zellen aufweisen (Geissler et al., 2015). In der Regression und im Normalgewebe war die CD8-Dichte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls hoch. Zudem waren intratumorale Dichten von B-Lymphozyten niedriger im Vergleich zu den Dichten im Normalgewebe.

In der vorliegenden Arbeit waren die CD8-Dichten im vitalen Tumor signifikant niedriger in Tumoren mit Lymphknotenmetastasierung im Vergleich zu nicht metastasierten RCCs zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Dies kann darauf hinweisen, dass CTLs die Wanderung der Tumorzellen in die regionalen Lymphknoten verhindern, indem sie die Tumorzellen abtöten. Ein Zusammenhang der CD8-positiven T-Lymphozyten mit anderen Tumor-Charakteristika (Differenzierungsgrad, Tumorgroße) wurde in dieser Arbeit nicht nachgewiesen. In einer anderen Arbeit wurde ebenfalls keine Assoziation der CD8-Dichten mit dem Differenzierungsgrad und mit der Tumorgroße beim RCC nachgewiesen (Baine et al., 2015). Studien von anderen Arbeitsgruppen konnten jedoch nachweisen, dass eine schlechte Tumor-Differenzierung mit einem vermehrten Nachweis von CTLs einhergeht (Blessin et al., 2021; Nakano et al., 2001; Webster et al., 2006). Allerdings wurde in diesen Studien eine Quantifizierung der CTLs mittels TMAs durchgeführt und es handelte sich um mehrere histologische RCC-Typen (nicht ausschließlich um ccRCC).

Eine univariate Überlebensanalyse in der vorliegenden Arbeit zeigte, dass hohe intratumorale CD8-Dichten im ccRCC tendenziell mit einem längeren Gesamtüberleben assoziierten. Die Studie von Giraldo et al. im RCC zeigte keine prognostische Wertigkeit der CD8-Dichten im Tumorgewebe. Bei anderen Tumorarten sind intratumorale CD8-Dichten als günstiger prognostischer Faktor publiziert worden (Fridman et al., 2012). Dagegen ist bei dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom, dem Hodgkin-Lymphom und dem ccRCC eine hohe intratumorale CD8-Dichte mit einer ungünstigen Prognose im Zusammenhang gebracht worden (Muris et al., 2004; Nakano et al., 2001; Rozsypalova et al., 2019; Scott et al., 2013; Stenzel et al., 2020). Im Bezug zum PFS unter einer IO-Therapie hatten in der vorliegenden Studie intratumorale CD8-Dichten keine prädiktive Wertigkeit. Diese Befunde spiegeln möglicherweise die Komplexität der heterogenen ccRCCs wider. Eine Erklärung für diese Ergebnisse könnte sein, dass intratumorale CTLs den sogenannten Erschöpfungs-Phänotyp („exhausted“) annehmen. Unter ständiger Präsenz von Immunzellen können Tumorzellen Mechanismen entwickeln, um dem Angriff des Immunsystems zu entgehen (Immunevasion), indem sie Inhibitionsrezeptoren auf der Oberfläche der CD8-positiven T-Lymphozyten induzieren (Harshman et al., 2014). Solche Inhibitionsrezeptoren auf den Oberflächen der erschöpften CD8 T-Lymphozyten sind unter anderem PD-1, Lymphozyten-Aktivierungsgen 3 (LAG-3) und T-Zell-Immunglobulin- und -Muzin-Domäne-3 (Tim-3) (Aggen et al., 2020; Woo et al., 2012). Der Erschöpfungs-Phänotyp von CTLs im ccRCC wurde allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und sollte Inhalt einer fortführenden Studie sein.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Studie ein Zusammenhang zwischen einer hohen Dichte CD20-positiver Zellen (B-Lymphozyten) im vitalen Tumor mit einem längeren Gesamtüberleben (OS) sowie mit einem längeren PFS unter IO-Therapie gezeigt werden. In der multivariaten Analyse dieser Arbeit war eine hohe B-Zell-Infiltration im vitalen Tumor immer noch signifikant sowohl mit einem günstigen Gesamtüberleben (HR=0,44, p=0,003, 95 % KI 0,25 - 0,75) als auch mit einem längeren progressionsfreien Überleben (HR=0,22, p=0,008, 95 % KI 0,07 - 0,67) assoziiert. Tatsächlich zeigten Stenzel et al. ebenfalls, dass hohe Dichten von TIL-Bs im ccRCC mit einem günstigen Patientenüberleben zusammenhingen. Bei anderen Tumorarten wurde ebenfalls ein Zusammenhang von hohen TIL-B-Dichten mit einer günstigen Prognose berichtet (Tsou et al., 2016).

5.1.4 PD-L1- Expression

Die Expressionsrate des PD-L1-Markers im ccRCC wurde in der vorliegenden Arbeit in einem Bereich von 0 - 70 % auf den Tumorzellen nachgewiesen. Die Studie von Dogan et al. im ccRCC zeigte ebenfalls eine Expressionsrate des PD-L1-Markers in Tumorzellen von 0 - 90 %. Bei den untersuchten cut-off-Werten der PD-L1-Positivität der Tumorzellen von $\geq 1\%$, $\geq 5\%$ und $\geq 10\%$ waren jeweils 29 %, 13,5 % und 7,1 % der Fälle positiv. Tatsächlich wurden mit einem cut-off Wert der PD-L1-Positivität von $\geq 5\%$ vergleichbare Ergebnisse in der Literatur publiziert, die zeigen konnten, dass 11 % bzw. 12,9 % bzw. 13,8 % der Tumoren PD-L1-positiv waren (Callea et al., 2014; Möller et al., 2021; Dogan et al., 2018). Es muss hier aber betont werden, dass die Studie von Möller et al. neben ccRCCs auch Tumore vom pRCC-Typ beinhaltete. Andere Studien im ccRCC sind zu abweichenden Ergebnissen gekommen. Eine Studie bei metastasiertem ccRCC demonstrierte, dass mit einem cut-off Wert der PD-L1-Positivität von $\geq 5\%$ verglichen zu der vorliegenden Arbeit doppelt so viele ccRCCs den PD-L1-Marker exprimierten (27,3 % der Fälle) (Ueda et al., 2018). Gründe für diskrepante Ergebnisse bezüglich der PD-L1-Expression zwischen Studien können die Verwendung von unterschiedlichen Antikörpern (unterschiedliche Klone wie z. B. EPR1161), die unterschiedlichen Färbeprotokollen und/oder die Größe und Zusammensetzung der Patientenkohorten sein. Die Verwendung von unterschiedlichen primären Antikörpern (Klonen) kann aufgrund der variablen Bindungsaffinität an den entsprechenden Epitopen auf dem PD-L1-Molekül zu einer Vielfalt der PD-L1-Expression zwischen Studien führen (Kerr & Hirsch, 2016). Ein weiterer möglicher Grund, der ebenfalls zu diskrepanten Ergebnissen zwischen den einzelnen Studien beitragen kann, könnte die schwierige Unterscheidung zwischen PD-L1-positiven Makrophagen, die zwischen Tumorzellen vorkommen, und PD-L1-positiven Tumorzellen sein (Möller et al., 2021). Die Expression des PD-L1-Markers sowohl auf Tumor- als auch auf Immunzellen stand in der vorliegenden Arbeit mit einer schlechten Tumor-Differenzierung und mit einem hohen T Status in Zusammenhang. In Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen waren bereits andere Studien, die einen Zusammenhang einer erhöhten PD-L1-Expression der Tumorzellen mit einer schlechten Differenzierung von ccRCC Tumoren nachweisen konnten (Möller et al., 2021; Ueda et al., 2018). Zudem ging in der Studie von Abbas et al. eine positive PD-L1-Expression mit einem erhöhten T Status einher. Dieser signifikante Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression auf Tumorzellen und der schlechten Differenzierung bzw. dem hohen T Status kann dafür sprechen, dass die PD-L1-Expression der Tumorzellen relevant für die Tumorentwicklung sein kann. Univariate Überlebensanalysen in dieser Arbeit konnten zeigen, dass eine positive PD-

L1-Expression der Tumorzellen das Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit metastasiertem ccRCC unabhängig von cut-off Werten der PD-L1-Positivität (1 %, 5 % und 10 %) ungünstig beeinflusste. In der multivariaten Überlebensanalyse der vorliegenden Arbeit blieb der PD-L1-Marker mit cut-off Wert 1 % statistisch signifikant und war daher als unabhängiger prognostischer Marker für eine schlechte Prognose identifiziert (HR=2,61, p=0,005, 95 % KI 1,34 - 5,07). Eine positive PD-L1-Expression (cut-off ≥ 5 % und ≥ 10 %) auf den Immunzellen stand ebenfalls mit einer verkürzten Überlebenszeit der ccRCC-Patienten in Zusammenhang. Andere Forschungsgruppen konnten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen erhöhter PD-L1-Expression mit einer ungünstigen Prognose der Patienten nachweisen (Abbas et al., 2016; Carlsson et al., 2020; Leite et al., 2015; Möller et al., 2021; Shen et al., 2020; Stenzel et al., 2020; Dogan et al., 2018; Thompson et al., 2006; Xiao et al., 2019). Für die schlechte Prognose von ccRCC-Patienten mit PD-L1-positiven Tumoren spricht, dass eine Überexpression des PD-L1-Markers auf Tumorzellen die Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten hemmen kann, sodass die Immunantwort unterdrückt und eine Eliminierung der malignen Zellen durch das Immunsystem vermieden wird (Ueda et al., 2018). Tatsächlich können Wechselwirkungen zwischen CD8-positiven T-Lymphozyten mit PD-1-Expression auf ihren Oberflächen und Tumorzellen mit PD-L1-Expression die Progression der Krankheit fördern und somit zu der schlechten Prognose beitragen (Dogan et al., 2018). Auf diesen Mechanismus wird weiter unten noch näher eingegangen.

5.1.5 PD-L1-Expression und Leukozyten-Dichten

Eine positive PD-L1-Expression von Tumorzellen (cut-off Wert von 1 %) assoziierte mit einem Anstieg von intratumoralen CD68-, CD204-, CD8- und CD20-Dichten. Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits bezüglich des signifikanten Anstiegs von CD8-positiven T-Lymphozyten bei PD-L1-positiven ccRCCs publiziert (Möller et al., 2021; Dogan et al., 2018; Ueda et al., 2018). Diese signifikante Assoziation zwischen der PD-L1-Expression auf Tumorzellen und einer erhöhten intratumoralen CD8-Dichte kann ein Indikator dafür sein, dass die Induktion der Überexpression des PD-L1-Markers auf den Tumorzellen durch ein Lymphozyten-reiches Tumormikromilieu gesteuert wird (Möller et al., 2021). Eine Aktivierung CD8-positiver T-Lymphozyten über die TZR-MHC I Bindung induziert eine Sekretion von IFN- γ durch die T-Lymphozyten und eine Hochregulierung des PD-1-Proteins auf den T-Zellen (Marabelle et al., 2017). Bei einer Exposition von IFN- γ wird das PD-L1 Protein auf den Oberflächen von Tumorzellen durch den JAK/STAT-Signalweg hochreguliert. Durch die anschließende PD1/PD-L1-Bindung wird eine CD8-vermittelte Eliminierung der Tumorzellen verhindert (Garcia-Diaz et al., 2017; Han et al., 2020; Marabelle et al., 2017).

In der vorliegenden Arbeit assoziierten hohe CD20-Dichten im vitalen Tumor mit einer positiven PD-L1-Expression. Es wurde nachgewiesen, dass B-Lymphozyten proinflammatorische Zytokine, darunter auch IFN- γ , im Tumormikromilieu sezernieren können (Shen & Fillatreau, 2015). Eine Studie im metastasiertem ccRCC konnte allerdings keine Ansammlung von B-Zellen bei PD-L1-positiven ccRCCs nachweisen (Ueda et al., 2018). Jedoch verwendete die betreffende Studie eine sehr kleine Anzahl an Patienten (n=33) verglichen zu der vorliegenden Arbeit (n=155 ccRCC-Patienten).

Hohe TAM-Dichten detektiert sowohl mit dem CD68 (Makrophagen)- als auch mit dem CD204 (alternativ aktivierte Makrophagen)-Marker assoziierten in der vorliegenden Arbeit mit positiver PD-L1-Expression der Tumorzellen. Dies kann darauf hinweisen, dass ein mit alternativ aktivierten Makrophagen-reiches Tumormikromilieu eine Überexpression des PD-L1 Proteins auf Tumorzellen treibt. Dennoch ist es noch unklar, welcher Mechanismus dafür zuständig ist, dass TAMs eine Überexpression von PD-L1 im ccRCC induzieren können. Bei Nasopharynxkarzinom, Adenokarzinom des Magens, duktalem Adenokarzinom des Pankreas und Ösophaguskarzinom wurde tatsächlich eine Assoziation der TAM-Infiltration mit einer Überexpression der PD-L1-Marker auf den Tumorzellen berichtet (Deng et al., 2020; Harada et al., 2018; Xia et al., 2022; Yagi et al., 2019). TAMs sind in der Lage Zytokine zu sezernieren, darunter IFN- γ und TGF- β , die zur Induktion der PD-L1-Expression auf Tumorzellen führen können (Deng et al., 2020). Bei dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas war die TGF- β Sekretion durch TAMs essentiell für eine Induktion der PD-L1-Expression auf Tumorzellen (Xia et al., 2022).

In einem weiteren Schritt dieser Arbeit wurde der Zusammenhang von Makrophagen und der PD-L1-Expression im vitalen Tumor analysiert. Eine CD68ⁿⁱ/PD-L1^{neg} Markerkonstellation (Patienten der Gruppe 4) im vitalen Tumor war in dieser Arbeit mit einem günstigen Verlauf der Krankheit assoziiert. Dagegen ging die Markerkonstellation CD68^{ho}/PD-L1^{pos} (Patienten der Gruppe 1) im vitalen Tumor mit einem verkürzten Gesamtüberleben der ccRCC-Patienten einher. Bezüglich der alternativ aktivierten Makrophagen (CD204) wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Patienten der Gruppe 4 (CD204ⁿⁱ/PD-L1^{neg}) wiesen eine verlängerte Überlebenszeit im Gegensatz zu Patienten der Gruppe 1 (CD204^{ho}/PD-L1^{pos}) auf. Die obigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die ungünstige Markerkonstellation CD68^{ho}/PD-L1^{pos} bzw. CD204^{ho}/PD-L1^{pos} therapeutisch bedeutsam sein kann. Tatsächlich haben aktuell laufende klinische Studien bei soliden Tumoren, darunter RCC, die TAMs als therapeutisches Ziel. Diese Therapien beruhen auf dem Targeting des Kolonie-stimulierenden

Faktors 1 (CSF1) und des Chemokinrezeptors 2 (CCR2) allein oder in Kombination mit einer IO-Therapie und haben als primäres Ziel, TAMs mit einem ungünstigen Phänotyp in TAMs mit einem günstigen Phänotyp zu repolarisieren bzw. ihre Rekrutierung in das Tumormikromilieu zu verhindern (Arakaki et al., 2016; Xiang et al., 2021).

Im Anschluss daran wurde der Einfluss der CTLs und der PD-L1-Expression im vitalen Tumor analysiert. Die erzielten Ergebnisse konnten zeigen, dass Patienten der Gruppe 2 (CD8ho/PD-L1neg) ein signifikant längeres Überleben im Vergleich zu Patienten der Gruppe 1 (CD8ho/PD-L1pos) und Gruppe 3 (CD8ni/PD-L1pos) hatten. Möglicherweise handelt es sich um die Eliminierungsphase der Immunoediting-Theorie im Tumormikromilieu von Patienten der Gruppe 2 (CD8ho/PD-L1neg) (Kim et al., 2007). Bei dieser Phase handelt es sich um die frühe Erkennung und Zerstörung der Tumorzellen durch das angeborene und das adaptive Immunsystem (Mittal et al., 2014). Der Nachweis einer erhöhten PD-L1-Expression der Tumorzellen von Patienten der Gruppe 1 (CD8ho/PD-L1pos) und Gruppe 3 (CD8ni/PD-L1pos) bestätigt die ungünstige Prognose des PD-L1-Markers. Die ungünstige Prognose von ccRCC-Patienten mit der Markerkonstellation CD8ho/PD-L1pos (Gruppe 1) spricht möglicherweise für eine adaptive Immunresistenz, bei der die CTLs anergisch sind (Erschöpfungs-Phänotyp). Bei der Markerkonstellation CD8ni/PD-L1pos (Gruppe 3) handelt es sich um eine potentiell fehlende Immunantwort aufgrund einer verringerten Immunogenität der Tumorzellen (Gennen et al., 2020). Die Gruppe 3 kann somit eine mögliche Erklärung liefern, dass infolge einer fehlenden CTL-Infiltration des vitalen Tumors ccRCC-Patienten nicht auf eine IO-Therapie ansprechen, obwohl eine erhöhte PD-L1-Expression nachweisbar war.

Die kombinierte Untersuchung der CD20-positiven B-Lymphozyten mit der Expression des PD-L1-Markers im vitalen Tumor im Hinblick auf das Gesamtüberleben (OS) der ccRCC-Patienten konnte eine günstige Prognose der Gruppe 2 (CD20ho/PD-L1neg) verglichen zu den anderen drei Gruppen zeigen (Gruppe 1: CD20ho/PD-L1pos, Gruppe 3: CD20ni/PD-L1pos, Gruppe 4: CD20ni/PD-L1neg). Ähnlich wie bei der Markerkonstellation CD8ho/PD-L1neg (zytotoxische T-Lymphozyten) weist die Markerkonstellation CD20ho/PD-L1neg (B-Lymphozyten) auf eine antitumorale Wirkung der B-Zellen hin. Eine Synergie der beiden Lymphozyten-Populationen (T- und B-Zellen) ist nicht auszuschließen. Tatsächlich konnten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine Koexistenz von CTLs mit den B-Zellen in B-Zell-Clustern zeigen. Tumore der Gruppe 1 (CD20ho/PD-L1pos) waren mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. B-Zellen wirken nicht nur antitumoral, sondern sie können auch die

Progression von Tumoren unterstützen (Rosser & Mauri, 2015; Shen & Fillatreau, 2015). Es wurde für das ccRCC publiziert, dass eine Infiltration des Tumors durch B-Lymphozyten mit einem kürzeren Patientenüberleben zusammenhing (Sjöberg et al., 2018). Zudem konnte eine Subpopulation von IL-35-produzierenden B-Lymphozyten beim Pankreas-Karzinom das Tumorstadium fördern (Pylayeva-Gupta et al., 2016). Diese Erkenntnisse können auf die Anwesenheit von regulatorischen B-Lymphozyten (Bregs) in Tumoren der Gruppe 1 (CD20^{ho}/PD-L1^{pos}) hinweisen, die zur Erzeugung eines immunsupprimierenden Tumormikromilieus beitragen, indem sie unter anderem die immunsupprimierenden Zytokine IL-10, IL-35 und TGF- β sezernieren (Rosser & Mauri, 2015).

5.1.6 Prädiktive Faktoren für das Ansprechen auf eine IO-Therapie

Die Suche nach potentiellen Biomarkern für das Ansprechen der Tumoren auf eine IO-Therapie gewinnt an Bedeutung. In diesem Kontext wurden in der vorliegenden Arbeit entsprechende Analysen durchgeführt, um solche potentiellen Prädiktoren zu entdecken. Es konnte gezeigt werden, dass intratumorale CD68-, CD204- und CD8-Dichten sowie die PD-L1-Expression keine prognostische Aussagekraft für das Ansprechen auf eine IO-Therapie haben. Dagegen wurde eine hohe CD20-Dichte im vitalen Tumor als Prädiktor für ein gutes Ansprechen auf IO-Therapie nachgewiesen. In einer weiteren Studie wurde im metastasierten RCC eine signifikant höhere Expression von relevanten Genen der B-Lymphozyten in Respondern unter IO-Therapie im Vergleich zu non-Respondern in einer Genexpressionsanalyse demonstriert (Helmink et al., 2020). Zudem waren in der betreffenden Studie die B-Zell relevanten Gene prädiktiv für das Ansprechen auf eine IO-Therapie (Helmink et al., 2020). In der Studie von Stenzel et al. konnten CD68- und CD8-Dichten im Tumorzentrum sowie eine positive PD-L1-Expression in Tumorzellen ebenfalls nicht als Prädiktoren für das Ansprechen auf eine IO-Therapie identifiziert werden. Interessanterweise konnten aber in der betreffenden Studie intratumorale CD20-Dichten im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit auch keine prädiktive Aussage liefern. Diese Diskrepanz könnte dadurch erklärt werden, dass die betreffende Studie ausschließlich TMAs zur Analyse verwendete, anstatt einer Auswertung größerer Gewebeprobe.

Die prognostisch günstige Bedeutung der B-Zell-Infiltration ist durch die vielfältigen Effektor-Mechanismen der B-Lymphozyten zu erklären. B-Lymphozyten produzieren Zytokine, die immunstimulierend wirken wie IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6 und GM-CSF, die anschließend Makrophagen, T-Lymphozyten, DCs und NK-Zellen stimulieren und rekrutieren (Helmink et al., 2020; Shen & Fillatreau, 2015). Darüber hinaus werden Tumorzellen direkt durch Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) bzw. Antikörper-abhängige

zellvermittelte Phagozytose (ADCP) abgetötet (Laumont et al., 2022). Dabei erkennen NK-Zellen (ADCC) bzw. Makrophagen (ADCP) durch ihre Fc-Rezeptoren Antikörper-Antigen-Komplexe auf den Tumorzellen und diese werden somit entsprechend lysiert bzw. phagozytiert (Laumont et al., 2022). Außerdem fungieren B-Lymphozyten als APCs. Sie können Antigene prozessieren und sie den CD4- bzw. CD8-positiven T-Lymphozyten mittels MHC präsentieren (Hua & Hou, 2020). B-Zellen haben zudem den Vorteil, Antigene in geringeren Konzentrationen effizienter im Vergleich zu den anderen APCs (DCs und Makrophagen) den T-Zellen zu präsentieren (Rivera et al., 2001). B-Lymphozyten können in humanen Tumoren über einen APC-Phänotyp verfügen, indem sie MHC-I und -II sowie die kostimulatorischen Marker CD80, CD86 und ICOSL (ICOS-Ligand) auf ihre Oberfläche exprimieren (Bruno et al., 2017; Wennhold et al., 2021). Auf diese Weise verstärken und induzieren die B-Lymphozyten die T-Zell-Antwort (Hua & Hou, 2020).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass bei der Mehrheit der guten Responder unter IO-Therapie mindestens ein B-Zell-Cluster im vitalen Tumor histologisch nachweisbar war (67 % der Fälle). B-Lymphozyten können tatsächlich im Tumormikromilieu TLS bilden (Masuda et al., 2022). Diese B-Zell-Follikel im ccRCC ähneln denjenigen, die sich in sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten) befinden. Eine Studie bei Lungenkarzinomen kam zu der Schlussfolgerung, dass TLS, inklusive B-Zell-Follikel, funktionell den Lymphknoten ähneln (Germain et al., 2014). Laut einer strengen Definition von reifen TLS ist für deren Bildung minimale Voraussetzung die Anwesenheit von B-Zell-Follikeln, in denen sich CD21-positive follikuläre DCs und abzugrenzende CD3-positive T-Zell-Zonen befinden, erforderlich (Laumont et al., 2022). Im Vergleich zu den sekundären lymphatischen Organen fehlt bei den TLS eine Kapsel (Laumont et al., 2022). Die Abwesenheit der Kapsel ermöglicht die Aufnahme und Prozessierung von Tumor-Antigenen in geringerer Konzentration (Laumont et al., 2022). B-Lymphozyten in den TLS können als APCs zur Aktivierung von T-Zellen beitragen (Guo & Cui, 2019; Masuda et al., 2022; Tsou et al., 2016). Eine Kolokalisation von zytotoxischen CD8-positiven T-Lymphozyten in den B-Zell-Clustern war in der vorliegenden Arbeit nachweisbar. Tatsächlich können die B-Lymphozyten den CTLs direkt Antigene präsentieren, ohne die Antigene zunächst den CD4-positiven T-Zellen zu präsentieren (Wu et al., 2022). Somit können B-Zell-Cluster mit Kolokalisation von CD8-positiven T-Zellen die anti-Tumor-Immunantwort letzterer aktivieren. Interessanterweise assoziiert die Kolokalisation von CD20-positiven B-Zellen mit CD8-positiven T-Zellen mit einem verlängertem Patientenüberleben bei einer Reihe von humanen Tumoren (Wouters & Nelson, 2018). Die Formierung von TLS ist bei unterschiedlichen Tumorarten mit einer

günstigen Prognose assoziiert (Sautès-Fridman et al., 2019; Sautès-Fridman et al., 2016; Trüb & Zippelius, 2021). Korrespondierend wäre die günstige Prognose der hohen B-Lymphozyten-Dichte in der vorliegenden Arbeit interpretierbar. Eine Studie bei ccRCC konnte bereits nachweisen, dass TLS-positive Tumoren mit einem verlängerten PFS und gutem Ansprechen auf eine IO-Therapie assoziierten (Meylan et al., 2022). Bei der betreffenden Studie wurde mittels Transkriptomik und Immunhistochemie gezeigt, dass intratumorale TLS eine in-situ B-Lymphozyten-Reifung ermöglichen. Zudem war eine ansteigende klonale Expansion und somatische Hypermutation der B-Zellen nachweisbar und das Tumor-Epithel mit Antikörperproduzierenden Plasmazellen (PCs) infiltriert, welche aus Differenzierung von B-Lymphozyten in den TLS stammten. Die sezernierten Antikörper der PCs können Tumorzellen markieren, die anschließend mittels ADCC bzw. ADCP eliminiert werden (Meylan et al., 2022). In einem Fall der schlechten Responder (6,7 % der Fälle) wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls B-Zell-Cluster gefunden, die allerdings nicht direkt im vitalen Tumor lagen, sondern in der Zone zwischen dem vitalen Tumor und der Regression. Interessanterweise wurde in einer publizierten Studie bei ccRCC gezeigt, dass die TLS-positiven Tumoren mit einer ungünstigen Prognose der ccRCC-Patienten zusammenhingen (Masuda et al., 2022). Allerdings wurden bei der betreffenden Studie ausschließlich TMAs untersucht. Außerdem wurde die Mehrheit der nachweisbaren TLS nicht im vitalen Tumor, sondern im invasiven Rand des Tumors detektiert. Zudem verfügten die detektierten TLS in der betreffenden Studie über keine follikuläre Struktur (Masuda et al., 2022). Möglicherweise handelte es sich in der hier vorliegenden Arbeit bei dem schlechten Responder um die Anwesenheit von unreifen B-Zell-Aggregaten.

Ein weiterer potentieller Mechanismus, der die günstige Prognose der im vitalen Tumor hohen B-Lymphozyten-Dichten erklären kann, ist die Epitop-Ausbreitung („epitope spreading“) (Laumont et al., 2022). Die Epitop-Ausbreitung beschreibt den Prozess, durch den eine Immunantwort auf ein Epitop eines bestimmten Antigens sich auf weitere Epitope des gleichen Antigens ausbreitet (Laumont et al., 2022). Bei der Epitop-Ausbreitung spielen B-Lymphozyten als APCs eine bedeutende Rolle, indem sie zunächst CD4-positiven T-Lymphozyten Antigene präsentieren. Die CD4-positiven T-Lymphozyten können wiederum B-Lymphozyten unterstützen, die für ein anderes Epitop desselben Antigens spezifisch sind. In Tumoren könnte die Epitop-Ausbreitung ermöglichen, eine initiale CD4 T-Zell-Antwort auf ein Neoantigen zu einer B- und T-Zell-Antwort auf ein flankierendes Wildtyp-Epitop des gleichen Antigens auszulösen, was den durch das Immunoediting induzierten Verlust der Neoantigene abmildern könnte (Laumont et al., 2022).

Studien bei Lungenkarzinom und malignem Melanom haben bereits nachgewiesen, dass eine Neoantigen-Bildung mit einer Verbesserung des Gesamtüberlebens und einem guten Ansprechen der Patienten auf eine IO-Therapie assoziierte (Rizvi et al., 2015; Snyder et al., 2014). Dagegen wurde bei ccRCC kein Zusammenhang einer Neoantigen-Bildung mit der Prognose der Erkrankung gefunden (Matsushita et al., 2016). Neoantigene sind ideale Ziele einer anti-Tumor-Immunantwort (Schumacher & Schreiber, 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die intratumorale Dichte der CD8-positiven T-Lymphozyten nicht mit dem Patientenüberleben einherging. Trotzdem wäre es möglich, dass bei einer potentiellen Neoantigen-Bildung im ccRCC die potentielle Synergie von CTLs und B-Lymphozyten in den B-Zell-Clustern zu der günstigen Prognose beiträgt. Insgesamt können alle bisherigen Erkenntnisse für die gute prognostische/prädiktive Aussagekraft der B-Zellen sprechen. Dennoch ist derzeit der präzise Mechanismus, mit dem B-Zellen als Prädiktor eines guten Ansprechens unter IO-Therapie fungieren, noch unklar.

5.2 Strukturerkennung mittels künstlicher Intelligenz

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Strukturerkennung mittels künstlicher Intelligenz. Das Interesse lag prinzipiell an der Erkennung des Tumorgewebes. Zunächst wurde ein neuronales Netz (CNN) entwickelt, das durch extensiv annotierte Bilder mit allen Klassen („Tumor vital“, „Tumor regression“, „Tumor necrosis“, „Tumor bleeding“, „Capsule“, „Angioinvasion“, „Cyst formation“, „Cortex“, „Cortex atrophy“, „Medulla“, „Extrarenal“, „Diffuse tumor growth in soft tissue“, „Papillom“ und „Medullary spindle cell nodule“) trainiert wurde. Die Rückprojektion des trainierten Netzes ergab eine Pixel-Trefferquote von 85,25 % für alle Klassen und die Validierung ergab eine Pixel-Trefferquote von 82,67 %. Anschließend wurden Analysen auf Testbilder ausschließlich zur Erkennung des vitalen Tumors durchgeführt. Das erzeugte CNN-Modell konnte den vitalen Tumor sehr zuverlässig erkennen und ergab eine hohe Präzision von 98,7 % sowie eine Sensitivität von 90,7 %. Zwei weitere Forschergruppen zeigten bereits das Erkennungspotential des Tumorbereichs im RCC mit Hilfe von CNNs und konnten ebenfalls eine hohe Präzision und Sensitivität erzielen (Tabibu et al., 2019; Zhu et al., 2021). In der vorliegenden Arbeit ergab die Analyse mit einer erhöhten Anzahl der für das Training verwendeten Bilder mit Annotationen tatsächlich eine zuverlässige Erkennungsrate mit einer Pixel-Trefferquote von 90,05 % für alle Klassen. Die Validierung ergab eine Pixel-Trefferquote von 85,76 %. Es muss unterstrichen werden, dass der vitale Tumor die Klasse war, die die höchste Abundanz im Vergleich zu den anderen Klassen aufwies. Klassen mit einer sehr niedrigen Repräsentation wie beispielsweise die Angioinvasion konnten

nicht trainiert werden. Die zuverlässige Erkennung des vitalen Tumors durch CNNs ist in der Ära der IO-Therapie so essentiell wie nie zuvor. Prognostische/prädiktive Marker für das Gesamtüberleben und für das Ansprechen auf eine IO-Therapie sind unter anderem in histologischen Bildern enthalten. Somit kann eine schnelle und zuverlässige Erkennung von Strukturen (wie dem vitalen Tumor) und präzise Quantifizierung von Markern auf digitalisierten histologischen Bildern den Spezialisten eine Erweiterung der diagnostischen Qualität liefern und zur Patienten-Stratifizierung für eine optimale Therapieoption führen.

5.3 Limitationen dieser Studie

Eine Limitation der vorliegenden Studie war die relativ kleine Fallzahl von mit IO-Therapie behandelten Patienten. Es muss jedoch erwähnt werden, dass metastasierte RCCs nicht so oft wie andere Tumorarten (Bronchial-Ca, Mamma-Ca) vorkommen und nicht allen Patienten eine IO-Therapie angeboten wird. Eine weitere Limitation hatte mit der niedrigen Anzahl von annotierten Bereichen zu tun, die bei der Strukturerkennung eine niedrige Präzision und Sensitivität aufwiesen. Dennoch war zunächst Hauptziel dieser Arbeit die Erkennung des vitalen Tumors, bei dem es sich um die am häufigsten auftretende Klasse handelte, die vielversprechende Ergebnisse lieferte.

5.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Immunzellinfiltrate und die PD-L1-Expression im Tumormikromilieu als prognostische Biomarker für die Langzeitprognose von Patienten mit metastasiertem ccRCC qualifizierten. Im vitalen Tumor wurden hohe Dichten der CD20-positiven B-Lymphozyten als signifikanter Prädiktor für ein gutes Ansprechen der ccRCC-Patienten auf eine IO-Therapie identifiziert. Zudem waren im vitalen Tumor guter Responder B-Zell-Cluster nachweisbar. Künftige Studien sollten die günstige prognostische/prädiktive Aussagekraft der CD20-positiven B-Lymphozyten im vitalen Tumor validieren. Diese Erkenntnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass B-Zellen als prognostischer/prädiktiver Biomarker des Ansprechens auf eine IO-Therapie fungieren. Somit können Patienten selektiert werden, die möglicherweise von einer IO-Therapie profitieren. Zusätzlich wurde der vitale Tumor mittels neuronaler Netze erfolgreich detektiert. Alle diese Ergebnisse können künftig zur Erstellung eines Immunoscores beitragen, um letztendlich eine zuverlässige personalisierte Therapie den Patienten mit metastasiertem ccRCC anbieten zu können.

Literaturverzeichnis

- Abadi, M. et al., “TensorFlow: Large-scale machine learning on heterogeneous systems”, 2015. Software available from tensorflow.org
- Abbas, M., Steffens, S., Bellut, M., Eggers, H., Großhennig, A., Becker, J. U., Wegener, G., Schrader, A. J., Grünwald, V., & Ivanyi, P. (2016). Intratumoral expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) in patients with clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 33(7), 80-0. Epub 2016 Jun 17. 10.1007/s12032-016-0794-0 [doi]
- Adeniran, A. J., Shuch, B., & Humphrey, P. A. (2015). Hereditary Renal Cell Carcinoma Syndromes: Clinical, Pathologic, and Genetic Features. *The American Journal of Surgical Pathology*, 39(12)
- Aggen, D. H., Drake, C. G., & Rini, B. I. (2020). Targeting PD-1 or PD-L1 in Metastatic Kidney Cancer: Combination Therapy in the First-Line Setting. *Clinical Cancer Research*, 26(9), 2087-2095. 10.1158/1078-0432.CCR-19-3323
- Akkari, L., Gocheva, V., Kester, J. C., Hunter, K. E., Quick, M. L., Sevenich, L., Wang, H. W., Peters, C., Tang, L. H., Klimstra, D. S., Reinheckel, T., & Joyce, J. A. (2014). Distinct functions of macrophage-derived and cancer cell-derived cathepsin Z combine to promote tumor malignancy via interactions with the extracellular matrix. *Genes & Development*, 28(19), 2134-2150. 10.1101/gad.249599.114 [doi]
- Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A. J. R., Behjati, S., Biankin, A. V., Bignell, G. R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A., Boyault, S., Burkhardt, B., Butler, A. P., Caldas, C., Davies, H. R., Desmedt, C., Eils, R., Eyfjörd, J. E., Foekens, J. A., . . . PedBrain, I. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500(7463), 415-421. 10.1038/nature12477
- Alsaab, H. O., Sau, S., Alzhrani, R., Tatiparti, K., Bhise, K., Kashaw, S. K., & Iyer, A. K. (2017). PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 561. 10.3389/fphar.2017.00561
- Altman, D. G., & Bland, J. M. (1983). Measurement in Medicine: The Analysis of Method Comparison Studies. *Journal of the Royal Statistical Society. Series D (the Statistician)*, 32(3), 307-317. 10.2307/2987937
- Arakaki, R., Yamasaki, T., Kanno, T., Shibasaki, N., Sakamoto, H., Utsunomiya, N., Sumiyoshi, T., Shibuya, S., Tsuruyama, T., Nakamura, E., Ogawa, O., & Kamba, T. (2016). CCL2 as a potential therapeutic target for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Medicine*, 5(10), 2920-2933. 10.1002/cam4.886 [doi]

- Baine, M. K., Turcu, G., Zito, C. R., Adeniran, A. J., Camp, R. L., Chen, L., Kluger, H. M., & Jilaveanu, L. B. (2015). Characterization of tumor infiltrating lymphocytes in paired primary and metastatic renal cell carcinoma specimens. *Oncotarget*, 6(28), 24990-25002. 10.18632/oncotarget.4572 [doi]
- Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernández, J. A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., Dunne, P. D., McQuaid, S., Gray, R. T., Murray, L. J., Coleman, H. G., James, J. A., Salto-Tellez, M., & Hamilton, P. W. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*, 7(1), 16878. 10.1038/s41598-017-17204-5
- Barisoni, L., Lafata, K. J., Hewitt, S. M., Madabhushi, A., & Balis, U. G. J. (2020). Digital pathology and computational image analysis in nephropathology. *Nature Reviews Nephrology*, 16(11), 669-685. 10.1038/s41581-020-0321-6
- Beksac, A. T., Paulucci, D. J., Blum, K. A., Yadav, S. S., Sfakianos, J. P., & Badani, K. K. (2017). Heterogeneity in renal cell carcinoma. *Urologic Oncology*, 35(8), 507-515. S1078-1439(17)30216-8 [pii]
- Biswas, S., & Eisen, T. (2009). Immunotherapeutic strategies in kidney cancer—when TKIs are not enough. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6(8), 478-487. 10.1038/nrclinonc.2009.91
- Blessin, N. C., Li, W., Mandelkow, T., Jansen, H. L., Yang, C., Raedler, J. B., Simon, R., Büscheck, F., Dum, D., Luebke, A. M., Hinsch, A., Möller, K., Menz, A., Bernreuther, C., Lebok, P., Clauditz, T., Sauter, G., Marx, A., Uhlig, R., . . . Steurer, S. (2021). Prognostic role of proliferating CD8(+) cytotoxic Tcells in human cancers. *Cellular Oncology (Dordrecht)*, 44(4), 793-803. 10.1007/s13402-021-00601-4
- Bruno, T. C., Ebner, P. J., Moore, B. L., Squalls, O. G., Waugh, K. A., Eruslanov, E. B., Singhal, S., Mitchell, J. D., Franklin, W. A., Merrick, D. T., McCarter, M. D., Palmer, B. E., Kern, J. A., & Slansky, J. E. (2017). Antigen-Presenting Intratumoral B Cells Affect CD4(+) TIL Phenotypes in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Cancer Immunology Research*, 5(10), 898-907. 10.1158/2326-6066.CIR-17-0075
- Cairns, P. (2010). Renal cell carcinoma. *Cancer Biomarkers : Section A of Disease Markers*, 9(1-6), 461-473. 10.3233/CBM-2011-0176
- Callea, M., Genega, E. M., Gupta, M., Fay, A. P., Song, J., Carvo, I., Bhatt, R. S., McDermott, D. F., Atkins, M. B., Choueiri, T. K., Freeman, G. J., & Signoretti, S. (2014). PD-L1 expression in primary clear cell renal cell carcinomas (ccRCCs) and their metastases. *Jco*, 32(4), 467. 10.1200/jco.2014.32.4_suppl.467
- Cancer Genome Atlas Research Network et al. (2016). Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, 374(2), 135-145. 10.1056/NEJMoa1505917
- Capitanio, U., Bensalah, K., Bex, A., Boorjian, S. A., Bray, F., Coleman, J., Gore, J. L., Sun, M., Wood, C., & Russo, P. (2019). Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *European Urology*, 75(1), 74-84. 10.1016/j.eururo.2018.08.036

- Carlsson, J., Sundqvist, P., Kosuta, V., Fält, A., Giunchi, F., Fiorentino, M., & Davidsson, S. (2020). PD-L1 Expression is Associated with Poor Prognosis in Renal Cell Carcinoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology : AIMM*, 28(3), 213-220. 10.1097/PAI.0000000000000766 [doi]
- Chakiryan, N. H., Kimmel, G. J., Kim, Y., Hajiran, A., Aydin, A. M., Zemp, L., Katende, E., Nguyen, J., Lopez-Blanco, N., Chahoud, J., Spiess, P. E., Fournier, M., Dhillon, J., Wang, L., Moran-Segura, C., El-Kenawi, A., Mulé, J., Altrock, P. M., & Manley, B. J. (2021). Spatial clustering of CD68⁺ tumor associated macrophages with tumor cells is associated with worse overall survival in metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Plos One*, 16(4), e0245415.
- Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity*, 39(1), 1-10. 10.1016/j.immuni.2013.07.012
- Chen, F., Zhang, Y., Şenbabaoğlu, Y., Ciriello, G., Yang, L., Reznik, E., Shuch, B., Micevic, G., De Velasco, G., Shinbrot, E., Noble, M. S., Lu, Y., Covington, K. R., Xi, L., Drummond, J. A., Muzny, D., Kang, H., Lee, J., Tamboli, P., . . . Creighton, C. J. (2016). Multilevel Genomics-Based Taxonomy of Renal Cell Carcinoma. *Cell Reports*, 14(10), 2476-2489. S2211-1247(16)30127-9 [pii]
- Chevrier, S., Levine, J. H., Zanotelli, V. R. T., Silina, K., Schulz, D., Bacac, M., Ries, C. H., Ailles, L., Jewett, M. A. S., Moch, H., van den Broek, M., Beisel, C., Stadler, M. B., Gedy, C., Reis, B., Pe'er, D., & Bodenmiller, B. (2017). An Immune Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell*, 169(4), 736-749.e18. S0092-8674(17)30429-4 [pii]
- Chollet, F. & others, 2015. Keras. Available at: <https://github.com/fchollet/keras>
- Clark, P. E. (2009). The role of VHL in clear-cell renal cell carcinoma and its relation to targeted therapy. *Kidney International*, 76(9), 939-945. 10.1038/ki.2009.296
- Cohen, H. T., & McGovern, F. J. (2005). Renal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 353(23), 2477-2490. 353/23/2477 [pii]
- Cowman, S. J., Fuja, D. G., Liu, X. D., Tidwell, R. S. S., Kandula, N., Sirohi, D., Agarwal, A. M., Emerson, L. L., Tripp, S. R., Mohlman, J. S., Stonhill, M., Garcia, G., Conley, C. J., Olalde, A. A., Sargis, T., Ramirez-Torres, A., Karam, J. A., Wood, C. G., Sircar, K., . . . Koh, M. Y. (2020). Macrophage HIF-1 α Is an Independent Prognostic Indicator in Kidney Cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 26(18), 4970-4982. 10.1158/1078-0432.CCR-19-3890 [doi]
- Cros, J., Sbidian, E., Posseme, K., Letierce, A., Guettier, C., Benoît, G., & Ferlicot, S. (2016). Nestin expression on tumour vessels and tumour-infiltrating macrophages define a poor prognosis subgroup of pt1 clear cell renal cell carcinoma. *Virchows Archiv : An International Journal of Pathology*, 469(3), 331-337. 10.1007/s00428-016-1973-2 [doi]
- Cui, Y., & Guo, G. (2016). Immunomodulatory Function of the Tumor Suppressor p53 in Host Immune Response and the Tumor Microenvironment10.3390/ijms17111942

- Dannenmann, S. R., Thielicke, J., Stöckli, M., Matter, C., von Boehmer, L., Cecconi, V., Hermanns, T., Hefermehl, L., Schraml, P., Moch, H., Knuth, A., & van den Broek, M. (2013). Tumor-associated macrophages subvert T-cell function and correlate with reduced survival in clear cell renal cell carcinoma. *Null*, 2(3), e23562. 10.4161/onci.23562
- Davidsson, S., Fiorentino, M., Giunchi, F., Eriksson, M., Erlandsson, A., Sundqvist, P., & Carlsson, J. (2020). Infiltration of M2 Macrophages and Regulatory T Cells Plays a Role in Recurrence of Renal Cell Carcinoma. *European Urology Open Science*, 20, 62-71. 10.1016/j.euros.2020.06.003
- Deng, R., Lu, J., Liu, X., Peng, X., Wang, J., & Li, X. (2020). PD-L1 Expression is Highly Associated with Tumor-Associated Macrophage Infiltration in Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer Management and Research*, 12, 11585-11596. 10.2147/CMAR.S274913
- Denkert, C., von Minckwitz, G., Darb-Esfahani, S., Lederer, B., Heppner, B. I., Weber, K. E., Budczies, J., Huober, J., Klauschen, F., Furlanetto, J., Schmitt, W. D., Blohmer, J. U., Karn, T., Pfitzner, B. M., Kümmel, S., Engels, K., Schneeweiss, A., Hartmann, A., Noske, A., . . . Loibl, S. (2018). Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *The Lancet.Oncology*, 19(1), 40-50. S1470-2045(17)30904-X [pii]
- Denton, A. E., Roberts, E. W., & Fearon, D. T. (2018). Stromal Cells in the Tumor Microenvironment. In B. M. J. Owens, & M. A. Lakins (Eds.), *Stromal Immunology* (pp. 99-114). Springer International Publishing. 10.1007/978-3-319-78127-3_6
- Deroulers, C., Dangouloff-Ros, V., Badoual, M., Varlet, P., & Boddaert, N. (2016). Automatic quantification of the microvascular density on whole slide images, applied to paediatric brain tumours. *Diagnostic Pathology; Vol 2 no 1 (2016): 2016*, 10.17629/
- Díaz-Montero, C. M., Rini, B. I., & Finke, J. H. (2020). The immunology of renal cell carcinoma. *Nature Reviews Nephrology*, 16(12), 721-735. 10.1038/s41581-020-0316-3
- Domblides, C., Rochefort, J., Riffard, C., Panouillot, M., Lescaille, G., Teillaud, J. L., Mateo, V., & Dieu-Nosjean, M. C. (2021). Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures: From Basic and Clinical Knowledge to Therapeutic Manipulation. *Frontiers in Immunology*, 12, 698604. 10.3389/fimmu.2021.698604 [doi]
- Du, B., Zhou, Y., Yi, X., Zhao, T., Tang, C., Shen, T., Zhou, K., Wei, H., Xu, S., Dong, J., Qu, L., He, H., & Zhou, W. (2020). Identification of Immune-Related Cells and Genes in Tumor Microenvironment of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 10, 1770. 10.3389/fonc.2020.01770 [doi]
- Elmore, S. A., Dixon, D., Hailey, J. R., Harada, T., Herbert, R. A., Maronpot, R. R., Nolte, T., Rehg, J. E., Rittinghausen, S., Rosol, T. J., Satoh, H., Vidal, J. D., Willard-Mack, C. L., & Creasy, D. M. (2016). Recommendations from the INHAND Apoptosis/Necrosis Working Group. *Toxicologic Pathology*, 44(2), 173-188. 10.1177/0192623315625859

- Erickson, B. J., Korfiatis, P., Akkus, Z., & Kline, T. L. (2017). Machine Learning for Medical Imaging. *Radiographics : A Review Publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 37(2), 505-515. 10.1148/rg.2017160130
- Escudier, B., Porta, C., Schmidinger, M., Rioux-Leclercq, N., Bex, A., Khoo, V., Grünwald, V., Gillessen, S., Horwich, A., & ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. (2019). Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 30(5), 706-720. S0923-7534(19)31157-3 [pii]
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-E386.
- Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., & Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 298-306. 10.1038/nrc3245
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoué, F., Bruneval, P., Cugnenc, P. H., Trajanoski, Z., Fridman, W. H., & Pagès, F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5795), 1960-1964. 313/5795/1960 [pii]
- Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Moreno, B. H., Saco, J., Escuin-Ordinas, H., Rodriguez, G. A., Zaretsky, J. M., Sun, L., Hugo, W., Wang, X., Parisi, G., Saus, C. P., Torrejon, D. Y., Graeber, T. G., Comin-Anduix, B., Hu-Lieskovan, S., Damoiseaux, R., Lo, R. S., & Ribas, A. (2017). Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Reports*, 19(6), 1189-1201. 10.1016/j.celrep.2017.04.031
- Geissler, K., Fornara, P., Lautenschläger, C., Holzhausen, H., Seliger, B., & Riemann, D. (2015). Immune signature of tumor infiltrating immune cells in renal cancer. *Null*, 4(1), e985082. 10.4161/2162402X.2014.985082
- Gennen, K., Käsmann, L., Taugner, J., Eze, C., Karin, M., Roengvoraphoj, O., Neumann, J., Tufman, A., Orth, M., Reu, S., Belka, C., & Manapov, F. (2020). Prognostic value of PD-L1 expression on tumor cells combined with CD8+ TIL density in patients with locally advanced non-small cell lung cancer treated with concurrent chemoradiotherapy. *Radiation Oncology (London, England)*, 15(1), 5. 10.1186/s13014-019-1453-3
- Germain, C., Gnjjatic, S., Tamzalit, F., Knockaert, S., Remark, R., Goc, J., Lepelley, A., Becht, E., Katsahian, S., Bizouard, G., Validire, P., Damotte, D., Alifano, M., Magdeleinat, P., Cremer, I., Teillaud, J., Fridman, W., Sautès-Fridman, C., & Dieu-Nosjean, M. (2014). Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 189(7), 832-844. 10.1164/rccm.201309-1611OC

- Giraldo, N. A., Becht, E., Pagès, F., Skliris, G., Verkarre, V., Vano, Y., Mejean, A., Saint-Aubert, N., Lacroix, L., Natario, I., Lupo, A., Alifano, M., Damotte, D., Cazes, A., Triebel, F., Freeman, G. J., Dieu-Nosjean, M. C., Oudard, S., Fridman, W. H., & Sautès-Fridman, C. (2015). Orchestration and Prognostic Significance of Immune Checkpoints in the Microenvironment of Primary and Metastatic Renal Cell Cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(13), 3031-3040. 10.1158/1078-0432.CCR-14-2926 [doi]
- Giraldo, N. A., Becht, E., Vano, Y., Petitprez, F., Lacroix, L., Validire, P., Sanchez-Salas, R., Ingels, A., Oudard, S., Moatti, A., Buttard, B., Bourass, S., Germain, C., Cathelineau, X., Fridman, W. H., & Sautès-Fridman, C. (2017). Tumor-Infiltrating and Peripheral Blood T-cell Immunophenotypes Predict Early Relapse in Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(15), 4416-4428. 10.1158/1078-0432.CCR-16-2848 [doi]
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 3(1), 23-35. 10.1038/nri978
- Grosso, J., Inzunza, D., Wu, Q., Simon, J., Singh, P., Zhang, X., Phillips, T., Simmons, P., & Cogswell, J. (2013). Programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in various tumor types. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 1(1), P53. 10.1186/2051-1426-1-S1-P53
- Grünwald, V. (2016). Checkpoint Blockade - a New Treatment Paradigm in Renal Cell Carcinoma. *Oncology Research and Treatment*, 39(6), 353-358. 10.1159/000446718
- Gulay, K. C. M., Aoshima, K., Maekawa, N., Suzuki, T., Konnai, S., Kobayashi, A., & Kimura, T. (2022). Hemangiosarcoma cells induce M2 polarization and PD-L1 expression in macrophages. *Scientific Reports*, 12(1), 2124. 10.1038/s41598-022-06203-w
- Gunderson, A. J., & Coussens, L. M. (2013). B cells and their mediators as targets for therapy in solid tumors. *Experimental Cell Research*, 319(11), 1644-1649. S0014-4827(13)00113-4 [pii]
- Guo, F. F., & Cui, J. W. (2019). The Role of Tumor-Infiltrating B Cells in Tumor Immunity. *Journal of Oncology*, 2019, 2592419. 10.1155/2019/2592419
- Gupta, D., Github, "Image Segmentation Keras : Implementation of Segnet, FCN, UNet, PSPNet and other models in Keras." <https://divamgupta.com/image-segmentation/2019/06/06/deep-learning-semantic-segmentation-keras.html>
- Han, Y., Liu, D., & Li, L. (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American Journal of Cancer Research*, 10(3), 727-742.
- Harada, K., Dong, X., Estrella, J. S., Correa, A. M., Xu, Y., Hofstetter, W. L., Sudo, K., Onodera, H., Suzuki, K., Suzuki, A., Johnson, R. L., Wang, Z., Song, S., & Ajani, J. A. (2018). Tumor-associated macrophage infiltration is highly associated with PD-L1 expression in gastric adenocarcinoma. *Gastric Cancer : Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*, 21(1), 31-40. 10.1007/s10120-017-0760-3 [doi]

- Harlin, H., Meng, Y., Peterson, A. C., Zha, Y., Tretiakova, M., Slingluff, C., McKee, M., & Gajewski, T. F. (2009). Chemokine Expression in Melanoma Metastases Associated with CD8+ T-Cell Recruitment. *Cancer Research*, 69(7), 3077-3085. 10.1158/0008-5472.CAN-08-2281
- Harris, D. T. (1983). Hormonal therapy and chemotherapy of renal-cell carcinoma. *Seminars in Oncology*, 10(4), 422-430. 0093-7754(83)90052-0 [pii]
- Harshman, L. C., Drake, C. G., & Choueiri, T. K. (2014). PD-1 blockade in renal cell carcinoma: to equilibrium and beyond. *Cancer Immunology Research*, 2(12), 1132-1141. 10.1158/2326-6066.CIR-14-0193
- Haykal, M. M., Nahmias, C., Varon, C., & Martin, O. C. B. (2020). Organotypic Modeling of the Tumor Landscape. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8
- Helmink, B. A., Reddy, S. M., Gao, J., Zhang, S., Basar, R., Thakur, R., Yizhak, K., Sade-Feldman, M., Blando, J., Han, G., Gopalakrishnan, V., Xi, Y., Zhao, H., Amaria, R. N., Tawbi, H. A., Cogdill, A. P., Liu, W., LeBleu, V. S., Kugeratski, F. G., . . . Wargo, J. A. (2020). B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature*, 577(7791), 549-555. 10.1038/s41586-019-1922-8
- Hu, J. M., Liu, K., Liu, J. H., Jiang, X. L., Wang, X. L., Chen, Y. Z., Li, S. G., Zou, H., Pang, L. J., Liu, C. X., Cui, X. B., Yang, L., Zhao, J., Shen, X. H., Jiang, J. F., Liang, W. H., Yuan, X. L., & Li, F. (2017). CD163 as a marker of M2 macrophage, contribute to predict aggressiveness and prognosis of Kazakh esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 8(13), 21526-21538. 10.18632/oncotarget.15630 [doi]
- Hua, Z., & Hou, B. (2020). The role of B cell antigen presentation in the initiation of CD4+ T cell response. *Immunological Reviews*, 296(1), 24-35. 10.1111/imr.12859
- Hudes, G. R., Carducci, M. A., Choueiri, T. K., Esper, P., Jonasch, E., Kumar, R., Margolin, K. A., Michaelson, M. D., Motzer, R. J., Pili, R., Roethke, S., & Srinivas, S. (2011). NCCN Task Force Report: Optimizing Treatment of Advanced Renal Cell Carcinoma with Molecular Targeted Therapy. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network J Natl Compr Canc Netw*, 9, S-29. 10.6004/jnccn.2011.0124
- Iacovelli, R., Nolè, F., Verri, E., Renne, G., Paglino, C., Santoni, M., Cossu Rocca, M., Giglione, P., Aurilio, G., Cullurà, D., Cascinu, S., & Porta, C. (2016). Prognostic Role of PD-L1 Expression in Renal Cell Carcinoma. A Systematic Review and Meta-Analysis. *Targeted Oncology*, 11(2), 143-148. 10.1007/s11523-015-0392-7 [doi]
- Jakubowska, K., Kisielewski, W., Kańczuga-Koda, L., Koda, M., & Famulski, W. (2017). Stromal and intraepithelial tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinoma. *Oncology Letters*, 14(6), 6421-6432. 10.3892/ol.2017.7013 [doi]
- Jonasch, E., Walker, C. L., & Rathmell, W. K. (2021). Clear cell renal cell carcinoma ontogeny and mechanisms of lethality. *Nature Reviews.Nephrology*, 17(4), 245-261. 10.1038/s41581-020-00359-2 [doi]

- Kerr, K. M., & Hirsch, F. R. (2016). Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemistry: Friend or Foe? *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 140(4), 326-331. 10.5858/arpa.2015-0522-SA
- Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1), 1-14.
- Kleppe, A., Skrede, O. J., De Raedt, S., Liestøl, K., Kerr, D. J., & Danielsen, H. E. (2021). Designing deep learning studies in cancer diagnostics. *Nature Reviews.Cancer*, 21(3), 199-211. 10.1038/s41568-020-00327-9 [doi]
- Koelzer, V. H., Canonica, K., Dawson, H., Sokol, L., Karamitopoulou-Diamantis, E., Lugli, A., & Zlobec, I. (2015). Phenotyping of tumor-associated macrophages in colorectal cancer: Impact on single cell invasion (tumor budding) and clinicopathological outcome. *Oncoimmunology*, 5(4), e1106677. e1106677
- Komohara, Y., Ohnishi, K., Kuratsu, J., & Takeya, M. (2008). Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *The Journal of Pathology*, 216(1), 15-24. 10.1002/path.2370 [doi]
- Komohara, Y., Hasita, H., Ohnishi, K., Fujiwara, Y., Suzu, S., Eto, M., & Takeya, M. (2011). Macrophage infiltration and its prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Science*, 102(7), 1424-1431.
- Kopecký, O., Lukesová, S., Vroblová, V., Vokurková, D., Morávek, P., Safránek, H., Hlávková, D., & Soucek, P. (2007). Phenotype analysis of tumour-infiltrating lymphocytes and lymphocytes in peripheral blood in patients with renal carcinoma. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 50(3), 207-212.
- Kovaleva, O. V., Samoilova, D. V., Shitova, M. S., & Gratchev, A. (2016). Tumor Associated Macrophages in Kidney Cancer. *Analytical Cellular Pathology*, 2016, 9307549. 10.1155/2016/9307549
- Lalani, A. A., McGregor, B. A., Albiges, L., Choueiri, T. K., Motzer, R., Powles, T., Wood, C., & Bex, A. (2019). Systemic Treatment of Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma in 2018: Current Paradigms, Use of Immunotherapy, and Future Directions. *European Urology*, 75(1), 100-110.
- Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F. M., Orcutt, M. L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., & Geil, L. (1993). Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5112), 1317-1320. 10.1126/science.8493574 [doi]
- Laumont, C. M., Banville, A. C., Gilardi, M., Hollern, D. P., & Nelson, B. H. (2022). Tumour-infiltrating B cells: immunological mechanisms, clinical impact and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 22(7), 414-430. 10.1038/s41568-022-00466-1
- Leibovich Bradley, C., Lohse Christine, M., Crispin Paul, L., Boorjian Stephen, A., Houston, T. R., Blute Michael, L., & Cheville John, C. (2010). Histological Subtype is an Independent Predictor of Outcome for Patients with Renal Cell Carcinoma. *Journal of Urology*, 183(4), 1309-1316. 10.1016/j.juro.2009.12.035

- Leite, K. R. M., Reis, S. T., Junior, J. P., Zerati, M., Gomes, D. d. O., Camara-Lopes, L., & Srougi, M. (2015). PD-L1 expression in renal cell carcinoma clear cell type is related to unfavorable prognosis. *Diagnostic Pathology*, 10(1), 189. 10.1186/s13000-015-0414-x
- Lin, Y., Xu, J., & Lan, H. (2019). Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), 76. 10.1186/s13045-019-0760-3
- Macklin, P. S., Yamamoto, A., Browning, L., Hofer, M., Adam, J., & Pugh, C. W. (2020). Recent advances in the biology of tumour hypoxia with relevance to diagnostic practice and tissue-based research. *The Journal of Pathology*, 250(5), 593-611.
- Maleki Vareki, S. (2018). High and low mutational burden tumors versus immunologically hot and cold tumors and response to immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer*, 6(1), 157. 10.1186/s40425-018-0479-7
- Marabelle, A., Aspeslagh, S., Postel-Vinay, S., & Soria, J. C. (2017). JAK Mutations as Escape Mechanisms to Anti-PD-1 Therapy. *Cancer Discovery*, 7(2), 128-130. 10.1158/2159-8290.CD-16-1439 [doi]
- Masuda, T., Tanaka, N., Takamatsu, K., Hakozaiki, K., Takahashi, R., Anno, T., Kufukihara, R., Shoji, K., Mikami, S., Shinojima, T., Kakimi, K., Tsunoda, T., Aimonio, E., Nishihara, H., Mizuno, R., & Oya, M. (2022). Unique characteristics of tertiary lymphoid structures in kidney clear cell carcinoma: prognostic outcome and comparison with bladder cancer. *J Immunother Cancer*, 10(3), e003883. 10.1136/jitc-2021-003883
- Matsushita, H., Sato, Y., Karasaki, T., Nakagawa, T., Kume, H., Ogawa, S., Homma, Y., & Kakimi, K. (2016). Neoantigen Load, Antigen Presentation Machinery, and Immune Signatures Determine Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunology Research*, 4(5), 463-471. 10.1158/2326-6066.CIR-15-0225
- Mazdak, M., Ringlstetter, R., Tabrizi, P. F., Akkoyun, M., Wolters, M., Schmitz, J., Bräsen, J. H., Peters, I., Kuczyk, M. A., & Tezval, H. (2021). Comparison of PD-L1 Scores in Primary Kidney Tumors Versus Accompanying Venous Tumor Thrombi: Retrospective, Comparative, Monocentric Study in Treatment-Naive Patients. *Advances in Therapy*, 38(6), 3373-3388. 10.1007/s12325-021-01737-3
- Messai, Y., Gad, S., Noman, M. Z., Le Teuff, G., Couve, S., Janji, B., Kammerer, S. F., Rioux-Leclerc, N., Hasmim, M., Ferlicot, S., Baud, V., Mejean, A., Mole, D. R., Richard, S., Eggermont, A. M., Albiges, L., Mami-Chouaib, F., Escudier, B., & Chouaib, S. (2016). Renal Cell Carcinoma Programmed Death-ligand 1, a New Direct Target of Hypoxia-inducible Factor-2 Alpha, is Regulated by von Hippel-Lindau Gene Mutation Status. *European Urology*, 70(4), 623-632. S0302-2838(15)01200-2 [pii]
- Meylan, M., Petitprez, F., Becht, E., Bougoüin, A., Pupier, G., Calvez, A., Giglioli, I., Verkarre, V., Lacroix, G., Verneau, J., Sun, C., Laurent-Puig, P., Vano, Y., Elaidi, R., Méjean, A., Sanchez-Salas, R., Barret, E., Cathelineau, X., Oudard, S., . . . Fridman, W. H. (2022). Tertiary lymphoid structures generate and propagate anti-tumor antibody-producing plasma cells in renal cell cancer. *Immunity*, 55(3), 527-541.e5. 10.1016/j.immuni.2022.02.001

- Miao, R., Toth, R., Zhou, Y., Madabhushi, A., & Janowczyk, A. (2021). Quick Annotator: an open-source digital pathology based rapid image annotation tool. *The Journal of Pathology: Clinical Research*, 7(6), 542-547.
- Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, 16-25. 10.1016/j.coi.2014.01.004
- Moch, H. (2016). WHO-ISUP-Graduierungssystem für Nierenkarzinome. *Der Pathologe*, 37(4), 355-360. 10.1007/s00292-016-0171-y
- Moch, H., Cubilla, A. L., Humphrey, P. A., Reuter, V. E., & Ulbright, T. M. (2016). The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *European Urology*, 70(1), 93-105. S0302-2838(16)00206-2 [pii]
- Möller, K., Fraune, C., Blessin, N. C., Lennartz, M., Kluth, M., Hube-Magg, C., Lindhorst, L., Dahlem, R., Fisch, M., Eichenauer, T., Riechardt, S., Simon, R., Sauter, G., Büscheck, F., Höppner, W., Matthies, C., Doh, O., Krech, T., Marx, A. H., . . . Clauditz, T. S. (2021). Tumor cell PD-L1 expression is a strong predictor of unfavorable prognosis in immune checkpoint therapy-naïve clear cell renal cell cancer. *International Urology and Nephrology*, 53(12), 2493-2503. 10.1007/s11255-021-02841-7
- Montemagno, C., Hagege, A., Borchiellini, D., Thamphy, B., Rastoin, O., Ambrosetti, D., Iovanna, J., Rioux-Leclercq, N., Porta, C., Negrier, S., Ferrero, J., Chamorey, E., Pagès, G., & Dufies, M. (2020). Soluble forms of PD-L1 and PD-1 as prognostic and predictive markers of sunitinib efficacy in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Oncoimmunology*, 9(1), 1846901. 10.1080/2162402X.2020.1846901
- Motz, G. T., & Coukos, G. (2013). Deciphering and Reversing Tumor Immune Suppression. *Immunity*, 39(1), 61-73. 10.1016/j.immuni.2013.07.005
- Muhitch, J. B., Hoffend, N. C., Azabdaftari, G., Miller, A., Bshara, W., Morrison, C. D., Schwaab, T., & Abrams, S. I. (2019). Tumor-associated macrophage expression of interferon regulatory Factor-8 (IRF8) is a predictor of progression and patient survival in renal cell carcinoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1), 155. 10.1186/s40425-019-0630-0
- Muris, J. J., Meijer, C. J., Cillessen, S. A., Vos, W., Kummer, J. A., Bladergroen, B. A., Bogman, M. J., MacKenzie, M. A., Jiwa, N. M., Siegenbeek van Heukelom, L. H., Ossenkoppele, G. J., & Oudejans, J. J. (2004). Prognostic significance of activated cytotoxic T-lymphocytes in primary nodal diffuse large B-cell lymphomas. *Leukemia*, 18(3), 589-596. 2403240 [pii]
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(4), 557-563.

- Nagano, M., Saito, K., Kozuka, Y., Ichishi, M., Yuasa, H., Noro, A., Imai, N., Shibusawa, M., Kimoto, M., Ishitobi, M., Tono, Y., Oda, H., Ishihara, M., Mizuno, T., Ogawa, T., & Katayama, N. (2021). CD204-positive macrophages accumulate in breast cancer tumors with high levels of infiltrating lymphocytes and programmed death ligand-1 expression. *Oncology Letters*, 21(1), 36. 10.3892/ol.2020.12297 [doi]
- Nagorsen, D., Voigt, S., Berg, E., Stein, H., Thiel, E., & Loddenkemper, C. (2007). Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival. *Journal of Translational Medicine*, 5, 62-62. 1479-5876-5-62 [pii]
- Nakano, O., Sato, M., Naito, Y., Suzuki, K., Orikasa, S., Aizawa, M., Suzuki, Y., Shintaku, I., Nagura, H., & Ohtani, H. (2001). Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Research*, 61(13), 5132-5136.
- Nickerson, M. L., Jaeger, E., Shi, Y., Durocher, J. A., Mahurkar, S., Zaridze, D., Matveev, V., Janout, V., Kollarova, H., Bencko, V., Navratilova, M., Szeszenia-Dabrowska, N., Mates, D., Mukeria, A., Holcatova, I., Schmidt, L. S., Toro, J. R., Karami, S., Hung, R., . . . Moore, L. E. (2008). Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(15), 4726-4734. 10.1158/1078-0432.CCR-07-4921 [doi]
- Pantanowitz, L., Valenstein, P. N., Evans, A. J., Kaplan, K. J., Pfeifer, J. D., Wilbur, D. C., Collins, L. C., & Colgan, T. J. (2011). Review of the current state of whole slide imaging in pathology. *Journal of Pathology Informatics*, 2, 36-3539.83746. Epub 2011 Aug 13. 10.4103/2153-3539.83746 [doi]
- Pantanowitz, L., Sharma, A., Carter, A. B., Kurc, T., Sussman, A., & Saltz, J. (2018). Twenty Years of Digital Pathology: An Overview of the Road Travelled, What is on the Horizon, and the Emergence of Vendor-Neutral Archives. *Journal of Pathology Informatics*, 9, 40. 10.4103/jpi.jpi_69_18
- Porta, C., Cosmai, L., & Rizzo, M. (2021). Individualizing renal cell carcinoma treatment through biomarkers discovery in the era of immune checkpoint inhibitors: where do we stand? *Current Opinion in Urology*, 31(3), 236-241. 10.1097/MOU.0000000000000870 [doi]
- Pylayeva-Gupta, Y., Das, S., Handler, J. S., Hajdu, C. H., Coffre, M., Koralov, S. B., & Barsagi, D. (2016). IL35-Producing B Cells Promote the Development of Pancreatic Neoplasia. *Cancer Discovery*, 6(3), 247-255. 10.1158/2159-8290.CD-15-0843 [doi]
- Qian, B., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*, 141(1), 39-51.

- Reuter, V. E., Argani, P., Zhou, M., Delahunt, B., & Members of the ISUP Immunohistochemistry in Diagnostic Urologic Pathology Group. (2014). Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in the kidney tumors: report from the International Society of Urologic Pathology consensus conference. *The American Journal of Surgical Pathology*, 38(8), 35. 10.1097/PAS.0000000000000258 [doi]
- Ribas, A., & Hu-Lieskovan, S. (2016). What does PD-L1 positive or negative mean? The Journal of Experimental Medicine, 213(13), 2835-2840. 10.1084/jem.20161462
- Rivera, A., Chen, C. C., Ron, N., Dougherty, J. P., & Ron, Y. (2001). Role of B cells as antigen-presenting cells in vivo revisited: antigen-specific B cells are essential for T cell expansion in lymph nodes and for systemic T cell responses to low antigen concentrations. *International Immunology*, 13(12), 1583-1593. 10.1093/intimm/13.12.1583
- Rizvi, N. A., Hellmann, M. D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J. J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T. S., Miller, M. L., Rekhtman, N., Moreira, A. L., Ibrahim, F., Bruggeman, C., Gasmi, B., Zappasodi, R., Maeda, Y., Sander, C., . . . Chan, T. A. (2015). Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6230), 124-128. 10.1126/science.aaa1348
- Rosser, E. C., & Mauri, C. (2015). Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*, 42(4), 607-612. S1074-7613(15)00134-X [pii]
- Rozsypalova, A., Rosova, B., Filipova, A., Nikolov, D. H., Chloupkova, R., Richter, I., Proks, J., Zachoval, R., Matej, R., Melichar, B., Buchler, T., & Dvorak, J. (2019). Negative prognostic significance of primary cilia, CD8+ tumor infiltrating lymphocytes and PD1+ cells expression in clear cell renal cancer. *Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 24(4), 1644-1651.
- Ruifrok, A. C., & Johnston, D. A. (2001). Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 23(4), 291-299.
- Samaratunga, H., Gianduzzo, T., & Delahunt, B. (2014). The ISUP system of staging, grading and classification of renal cell neoplasia. *Journal of Kidney Cancer and VHL*, 1(3), 26-39. 10.15586/jkcvhl.2014.11
- Sautès-Fridman, C., Petitprez, F., Calderaro, J., & Fridman, W. H. (2019). Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nature Reviews.Cancer*, 19(6), 307-325. 10.1038/s41568-019-0144-6 [doi]
- Sautès-Fridman, C., Lawand, M., Giraldo, N. A., Kaplon, H., Germain, C., Fridman, W. H., & Dieu-Nosjean, M. (2016). Tertiary Lymphoid Structures in Cancers: Prognostic Value, Regulation, and Manipulation for Therapeutic Intervention. *Frontiers in Immunology*, 7, 407. 10.3389/fimmu.2016.00407
- Schildhaus, H. -. (2018). Der prädiktive Wert der PD-L1-Diagnostik. *Der Pathologe*, 39(6), 498-519. 10.1007/s00292-018-0507-x

- Schoppmann, S. F., Birner, P., Stöckl, J., Kalt, R., Ullrich, R., Caucig, C., Kriehuber, E., Nagy, K., Alitalo, K., & Kerjaschki, D. (2002). Tumor-Associated Macrophages Express Lymphatic Endothelial Growth Factors and Are Related to Peritumoral Lymphangiogenesis. *The American Journal of Pathology*, 161(3), 947-956. 10.1016/S0002-9440(10)64255-1
- Schumacher, T. N., & Schreiber, R. D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6230), 69-74. 10.1126/science.aaa4971 [doi]
- Scott, D. W., Chan, F. C., Hong, F., Rogic, S., Tan, K. L., Meissner, B., Ben-Neriah, S., Boyle, M., Kridel, R., Telenius, A., Woolcock, B. W., Farinha, P., Fisher, R. I., Rimsza, L. M., Bartlett, N. L., Cheson, B. D., Shepherd, L. E., Advani, R. H., Connors, J. M., . . . Gascoyne, R. D. (2013). Gene expression-based model using formalin-fixed paraffin-embedded biopsies predicts overall survival in advanced-stage classical Hodgkin lymphoma. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(6), 692-700. 10.1200/JCO.2012.43.4589 [doi]
- Shen, H., Liu, J., Chen, S., Ma, X., Ying, Y., Li, J., Wang, W., Wang, X., & Xie, L. (2021). Prognostic Value of Tumor-Associated Macrophages in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology*, 11
- Shen, M., Chen, G., Xie, Q., Li, X., Xu, H., Wang, H., & Zhao, S. (2020). Association between PD-L1 Expression and the Prognosis and Clinicopathologic Features of Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Urologia Internationalis*, 104(7-8), 533-541. 10.1159/000506296 [doi]
- Shen, P., & Fillatreau, S. (2015). Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nature Reviews.Immunology*, 15(7), 441-451. 10.1038/nri3857 [doi]
- Shin, D. S., Zaretsky, J. M., Escuin-Ordinas, H., Garcia-Diaz, A., Hu-Lieskovan, S., Kalbasi, A., Grasso, C. S., Hugo, W., Sandoval, S., Torrejon, D. Y., Palaskas, N., Rodriguez, G. A., Parisi, G., Azhdam, A., Chmielowski, B., Cherry, G., Seja, E., Berent-Maoz, B., Shintaku, I. P., . . . Ribas, A. (2017). Primary Resistance to PD-1 Blockade Mediated by JAK1/2 Mutations. *Cancer Discovery*, 7(2), 188-201. 10.1158/2159-8290.CD-16-1223
- Shin, S. J., Jeon, Y. K., Kim, P. J., Cho, Y. M., Koh, J., Chung, D. H., & Go, H. (2016). Clinicopathologic Analysis of PD-L1 and PD-L2 Expression in Renal Cell Carcinoma: Association with Oncogenic Proteins Status. *Annals of Surgical Oncology*, 23(2), 694-702. 10.1245/s10434-015-4903-7 [pii]
- Sjöberg, E., Frödin, M., Lövrot, J., Mezheyeuski, A., Johansson, M., Harmenberg, U., Egevad, L., Sandström, P., & Östman, A. (2018). A minority-group of renal cell cancer patients with high infiltration of CD20+B-cells is associated with poor prognosis. *British Journal of Cancer*, 119(7), 840-846. 10.1038/s41416-018-0266-8
- Snyder, A., Makarov, V., Merghoub, T., Yuan, J., Zaretsky, J. M., Desrichard, A., Walsh, L. A., Postow, M. A., Wong, P., Ho, T. S., Hollmann, T. J., Bruggeman, C., Kannan, K., Li, Y., Elipenahli, C., Liu, C., Harbison, C. T., Wang, L., Ribas, A., . . . Chan, T. A. (2014). Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 371(23), 2189-2199. 10.1056/NEJMoa1406498

- Steffens, S., Roos, F. C., Janssen, M., Becker, F., Steinestel, J., Abbas, M., Steinestel, K., Wegener, G., Siemer, S., Thüroff, J. W., Hofmann, R., Stöckle, M., Schrader, M., Hartmann, A., Junker, K., Kuczyk, M. A., Schrader, A. J., & For the German Renal Cell Cancer Network. (2014). Clinical behavior of chromophobe renal cell carcinoma is less aggressive than that of clear cell renal cell carcinoma, independent of Fuhrman grade or tumor size. *Virchows Archiv*, 465(4), 439-444. 10.1007/s00428-014-1648-9
- Stenzel, P. J., Schindeldecker, M., Tagscherer, K. E., Foersch, S., Herpel, E., Hohenfellner, M., Hatiboglu, G., Alt, J., Thomas, C., Haferkamp, A., Roth, W., & Macher-Goeppinger, S. (2020). Prognostic and Predictive Value of Tumor-infiltrating Leukocytes and of Immune Checkpoint Molecules PD1 and PDL1 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Translational Oncology*, 13(2), 336-345. 10.1016/j.tranon.2019.11.002
- Su, C. Y., Fu, X. L., Duan, W., Yu, P. W., & Zhao, Y. L. (2018). High density of CD68+ tumor-associated macrophages predicts a poor prognosis in gastric cancer mediated by IL-6 expression. *Oncology Letters*, 15(5), 6217-6224. 10.3892/ol.2018.8119 [doi]
- Tabibu, S., Vinod, P. K., & Jawahar, C. V. (2019). Pan-Renal Cell Carcinoma classification and survival prediction from histopathology images using deep learning. *Scientific Reports*, 9(1), 10509. 10.1038/s41598-019-46718-3
- Tamma, R., Rutigliano, M., Lucarelli, G., Annese, T., Ruggieri, S., Cascardi, E., Napoli, A., Battaglia, M., & Ribatti, D. (2019). Microvascular density, macrophages, and mast cells in human clear cell renal carcinoma with and without bevacizumab treatment. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 37(6), 355.e11-355.e19.
- Tatli Dogan, H., Kiran, M., Bilgin, B., Kiliçarslan, A., Sendur, M. A. N., Yalçın, B., Ardiçoğlu, A., Atmaca, A. F., & Gumuskaya, B. (2018). Prognostic significance of the programmed death ligand 1 expression in clear cell renal cell carcinoma and correlation with the tumor microenvironment and hypoxia-inducible factor expression. *Diagnostic Pathology*, 13(1), 60-8. 10.1186/s13000-018-0742-8 [doi]
- Thompson, R. H., Dong, H., Lohse, C. M., Leibovich, B. C., Blute, M. L., Cheville, J. C., & Kwon, E. D. (2007). PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(6), 1757-1761. 13/6/1757 [pii]
- Thompson, R. H., Kuntz, S. M., Leibovich, B. C., Dong, H., Lohse, C. M., Webster, W. S., Sengupta, S., Frank, I., Parker, A. S., Zincke, H., Blute, M. L., Sebo, T. J., Cheville, J. C., & Kwon, E. D. (2006). Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Research*, 66(7), 3381-3385. 66/7/3381 [pii]
- Ting Sim, J. Z., Fong, Q. W., Huang, W., & Tan, C. H. (2023). Machine learning in medicine: what clinicians should know. *Singapore Medical Journal*, 64(2), 91-97. 10.11622/smedj.2021054
- Toge, H., Inagaki, T., Kojimoto, Y., Shinka, T., & Hara, I. (2009). Angiogenesis in renal cell carcinoma: The role of tumor-associated macrophages. *International Journal of Urology*, 16(10), 801-807.

- Tran, K. A., Kondrashova, O., Bradley, A., Williams, E. D., Pearson, J. V., & Waddell, N. (2021). Deep learning in cancer diagnosis, prognosis and treatment selection. *Genome Medicine*, 13(1), 152. 10.1186/s13073-021-00968-x
- Trüb, M., & Zippelius, A. (2021). Tertiary Lymphoid Structures as a Predictive Biomarker of Response to Cancer Immunotherapies. *Frontiers in Immunology*, 12, 674565. 10.3389/fimmu.2021.674565
- Tsou, P., Katayama, H., Ostrin, E. J., & Hanash, S. M. (2016). The Emerging Role of B Cells in Tumor Immunity. *Cancer Research*, 76(19), 5597-5601. 10.1158/0008-5472.CAN-16-0431
- Ueda, K., Suekane, S., Kurose, H., Chikui, K., Nakiri, M., Nishihara, K., Matsuo, M., Kawahara, A., Yano, H., & Igawa, T. (2018). Prognostic value of PD-1 and PD-L1 expression in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Urologic Oncology*, 36(11), 499.e9-499.e16. S1078-1439(18)30251-5 [pii]
- Wang, L., Zhang, S., Wu, H., Rong, X., & Guo, J. (2019). M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, 106(2), 345-358.
- Wang, X., & Li, B. B. (2021). Deep Learning in Head and Neck Tumor Multiomics Diagnosis and Analysis: Review of the Literature. *Frontiers in Genetics*, 12, 624820. 10.3389/fgene.2021.624820 [doi]
- Wang, X., Lopez, R., Luchtel, R. A., Hafizi, S., Gartrell, B., & Shenoy, N. (2021). Immune evasion in renal cell carcinoma: biology, clinical translation, future directions. *Kidney International*, 99(1), 75-85. S0085-2538(20)31078-4 [pii]
- Warren, A. Y., & Harrison, D. (2018). WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. *World Journal of Urology*, 36(12), 1913-1926. 10.1007/s00345-018-2447-8 [doi]
- Webster, W. S., Lohse, C. M., Thompson, R. H., Dong, H., Frigola, X., Dicks, D. L., Sengupta, S., Frank, I., Leibovich, B. C., Blute, M. L., Cheville, J. C., & Kwon, E. D. (2006). Mononuclear cell infiltration in clear-cell renal cell carcinoma independently predicts patient survival. *Cancer*, 107(1), 46-53. 10.1002/cncr.21951 [doi]
- Wennhold, K., Thelen, M., Lehmann, J., Schran, S., Preugszat, E., Garcia-Marquez, M., Lechner, A., Shimabukuro-Vornhagen, A., Ercanoglu, M. S., Klein, F., Thangarajah, F., Eidt, S., Löser, H., Bruns, C., Quaas, A., von Bergwelt-Baildon, M., & Schlößer, H. A. (2021). CD86(+) Antigen-Presenting B Cells Are Increased in Cancer, Localize in Tertiary Lymphoid Structures, and Induce Specific T-cell Responses. *Cancer Immunology Research*, 9(9), 1098-1108. 10.1158/2326-6066.CIR-20-0949
- Woo, S. R., Turnis, M. E., Goldberg, M. V., Bankoti, J., Selby, M., Nirschl, C. J., Bettini, M. L., Gravano, D. M., Vogel, P., Liu, C. L., Tansombatvisit, S., Grosso, J. F., Netto, G., Smeltzer, M. P., Chaux, A., Utz, P. J., Workman, C. J., Pardoll, D. M., Korman, A. J., . . . Vignali, D. A. (2012). Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Research*, 72(4), 917-927. 10.1158/0008-5472.CAN-11-1620 [doi]

- Wouters, M. C. A., & Nelson, B. H. (2018). Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating B Cells and Plasma Cells in Human Cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(24), 6125-6135. 10.1158/1078-0432.CCR-18-1481
- Wu, K., Lin, K., Li, X., Yuan, X., Xu, P., Ni, P., & Xu, D. (2020). Redefining Tumor-Associated Macrophage Subpopulations and Functions in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 11, 1731. 10.3389/fimmu.2020.01731 [doi]
- Wu, T., & Dai, Y. (2017). Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Letters*, 387, 61-68. S0304-3835(16)30015-5 [pii]
- Wu, Z., Zhou, J., Xiao, Y., Ming, J., Zhou, J., Dong, F., Zhou, X., Xu, Z., Zhao, X., Lei, P., & Huang, T. (2022). CD20(+)CD22(+)ADAM28(+) B Cells in Tertiary Lymphoid Structures Promote Immunotherapy Response. *Frontiers in Immunology*, 13, 865596. 10.3389/fimmu.2022.865596
- Xia, Q., Jia, J., Hu, C., Lu, J., Li, J., Xu, H., Fang, J., Feng, D., Wang, L., & Chen, Y. (2022). Tumor-associated macrophages promote PD-L1 expression in tumor cells by regulating PKM2 nuclear translocation in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, 41(6), 865-877. 10.1038/s41388-021-02133-5
- Xiang, X., Wang, J., Lu, D., & Xu, X. (2021). Targeting tumor-associated macrophages to synergize tumor immunotherapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 75. 10.1038/s41392-021-00484-9
- Xiao, W. J., Xu, F. J., Zhang, X., Zhou, S. X., Zhang, H. L., Dai, B., Zhu, Y., Shi, G. H., Shen, Y. J., Zhu, Y. P., Qu, Y. Y., Zhao, J. Y., & Ye, D. W. (2019). The Prognostic Value of Programmed Death-Ligand 1 in a Chinese Cohort with Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 9, 879. 10.3389/fonc.2019.00879 [doi]
- Xie, Q., Ding, J., & Chen, Y. (2021). Role of CD8+ T lymphocyte cells: Interplay with stromal cells in tumor microenvironment. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(6), 1365-1378.
- Xu, L., Zhu, Y., Chen, L., An, H., Zhang, W., Wang, G., Lin, Z., & Xu, J. (2014). Prognostic value of diametrically polarized tumor-associated macrophages in renal cell carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 21(9), 3142-3150. 10.1245/s10434-014-3601-1 [doi]
- Xu, W., Jiang, X., Guan, C., & Gu, M. (2020). The prognostic and predictive value of tumor infiltrating Macrophage and Neutrophil in patient with clear cell renal cell carcinoma: Tumor infiltrating lymphocytes in renal cell carcinoma. *Medicine*, 99(46), e23181. 10.1097/MD.00000000000023181
- Yagi, T., Baba, Y., Ishimoto, T., Iwatsuki, M., Miyamoto, Y., Yoshida, N., Watanabe, M., & Baba, H. (2019). PD-L1 Expression, Tumor-infiltrating Lymphocytes, and Clinical Outcome in Patients with Surgically Resected Esophageal Cancer. *Annals of Surgery*, 269(3), 471-478. 10.1097/SLA.0000000000002616 [doi]

- Yagi, T., Baba, Y., Okadome, K., Kiyozumi, Y., Hiyoshi, Y., Ishimoto, T., Iwatsuki, M., Miyamoto, Y., Yoshida, N., Watanabe, M., Komohara, Y., & Baba, H. (2019). Tumour-associated macrophages are associated with poor prognosis and programmed death ligand 1 expression in oesophageal cancer. *European Journal of Cancer*, 111, 38-49. 10.1016/j.ejca.2019.01.018
- Yakirevich, E., & Patel, N. R. (2020). Tumor mutational burden and immune signatures interplay in renal cell carcinoma. *Annals of Translational Medicine*, 8(6), 269. 10.21037/atm.2020.02.81
- Yang, J., Li, X., Liu, X., & Liu, Y. (2015). The role of tumor-associated macrophages in breast carcinoma invasion and metastasis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(6), 6656-6664.
- Zaretsky, J. M., Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Escuin-Ordinas, H., Hugo, W., Hu-Lieskovan, S., Torrejon, D. Y., Abril-Rodriguez, G., Sandoval, S., Barthly, L., Saco, J., Homet Moreno, B., Mezzadra, R., Chmielowski, B., Ruchalski, K., Shintaku, I. P., Sanchez, P. J., Puig-Saus, C., Cherry, G., . . . Ribas, A. (2016). Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 375(9), 819-829. 10.1056/nejmoa1604958
- Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M. N., Rubin, S. C., & Coukos, G. (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348(3), 203-213. 348/3/203 [pii]
- Zhang, N., & Bevan, M. J. (2011). CD8⁺ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity*, 35(2), 161-168.
- Zhang, R., Liu, Q., Peng, J., Wang, M., Gao, X., Liao, Q., & Zhao, Y. (2019). Pancreatic cancer-educated macrophages protect cancer cells from complement-dependent cytotoxicity by up-regulation of CD59. *Cell Death & Disease*, 10(11), 836-4. 10.1038/s41419-019-2065-4 [doi]
- Zhu, M., Ren, B., Richards, R., Suriawinata, M., Tomita, N., & Hassanpour, S. (2021). Development and evaluation of a deep neural network for histologic classification of renal cell carcinoma on biopsy and surgical resection slides. *Scientific Reports*, 11(1), 7080. 10.1038/s41598-021-86540-4
- Zhu, Q., Cai, M., Weng, D., Zhao, J., Pan, Q., Wang, Q., Tang, Y., He, J., Li, M., & Xia, J. (2019). PD-L1 expression patterns in tumour cells and their association with CD8(+) tumour infiltrating lymphocytes in clear cell renal cell carcinoma. *Journal of Cancer*, 10(5), 1154-1161. 10.7150/jca.29052
- Znaor, A., Lortet-Tieulent, J., Laversanne, M., Jemal, A., & Bray, F. (2015). International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *European Urology*, 67(3), 519-530. S0302-2838(14)01010-0 [pii]

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jan Hinrich Bräsen für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sein Vertrauen, seine Hinweise und die Kooperation. Die wissenschaftlichen Dialoge mit Ihm haben dazu beigetragen, ein besseres kritisches Denken zu entwickeln und mein Wissen in die Immunonkologie zu vertiefen.

Bei Frau Prof. Dr. Doris Steinemann, als zweite Betreuerin dieser Arbeit, bedanke ich mich herzlich für die wertvollen Hinweise und Ihre Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt an Frau Jessica Schmitz, wissenschaftliche Leiterin der Arbeitsgruppe Nephropathologie. Sie unterstützte mich in allen Phasen dieser Arbeit schon vom ersten Tag an und hat mir die notwendigen Kenntnisse und Fähigkeiten vermittelt, die für die Durchführung dieses Projekts erforderlich waren.

Ich bedanke mich besonders bei Herrn David Christensen für seine Unterstützung im Bereich der künstlichen Intelligenz.

Ein großer Dank gilt an meinen Kommilitoninnen und Kommilitonen für die sehr gute Kooperation. Ein besonderer Dank gilt an Frau Melanie Maulhardt, die bereits mit dem Projekt begonnen hatte und mir mit einem reibungslosen Übergang ermöglichte.

Frau Edda Christians und Frau Jennifer Jost danke ich für die sehr gute und problemlose Kooperation im Labor. Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Mahtab Taleb-Naghsh und dem Team des Immunlabors des Instituts für Pathologie für die Durchführung der zahlreichen und notwendigen Färbungen dieser Arbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt der Sander Stiftung, die das Projekt gefördert und meine akademische Stelle finanziert hat.

Von ganzem Herzen möchte ich bei meinen Eltern Periklis Vasileiadis und Maria Aggou und meiner Schwester Anastasia Vasileiadou dafür bedanken, dass sie in allen Situationen und Phasen meiner Doktorarbeit stets meine größte Unterstützung waren!

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus der Wirkung von Immuncheckpoint-Inhibitoren.....	20
Abbildung 2: HE-El gefärbter Nieren-Tumor Schnitt mit entsprechenden Annotationen	28
Abbildung 3: HE-El gefärbter Nieren-Tumor Schnitt mit entsprechenden Annotationen	29
Abbildung 4: HE-El gefärbter Nieren-Tumor.....	29
Abbildung 5: Training eines Pixel-basierten Makrophagen Classifiers	31
Abbildung 6: Verfahren der Makrophagen-Quantifizierung in den vom HE-El Präparat auf Immunfärbungen übertragenen Annotationen.....	32
Abbildung 7: Bland-Altman-Plot zum Vergleich des Pixel-basierten mit dem CNN-basierten Classifier.....	41
Abbildung 8: Vergleich des Pixel-basierten mit dem CNN-basierten Classifier auf dem identischen digitalisierten Schnittpräparat	41
Abbildung 9: Repräsentative Darstellung der Dichten von Makrophagen (CD68) in verschiedenen Regionen.....	42
Abbildung 10: Repräsentative Darstellung der Dichten von alternativ aktivierten Makrophagen (CD204) in verschiedenen Regionen	43
Abbildung 11: Repräsentative Darstellung von unterschiedlichen CD8-Dichten in verschiedenen Regionen.....	44
Abbildung 12: Repräsentative Darstellung von unterschiedlichen CD20-Dichten in verschiedenen Regionen.....	45
Abbildung 13: PD-L1-Expression im ccRCC.....	46
Abbildung 14: CD68-Dichten in verschiedenen Regionen im Bezug zu den Tumor-Charakteristika	48
Abbildung 15: CD204-Dichten in verschiedenen Regionen im Bezug zu den Tumor-Charakteristika	49
Abbildung 16: Intratumorale CD8- und CD20-Dichten im Bezug zu den Tumor-Charakteristika	50
Abbildung 17: PD-L1-Expression im Bezug zu den Tumor-Charakteristika.....	51
Abbildung 18: Intratumorale Leukozyten-Dichten im Bezug zur PD-L1-Expression der Tumorzellen	52
Abbildung 19: Zusammenhang des Gesamtüberlebens von ccRCC-Patienten mit der CD68-Dichte	53
Abbildung 20: Zusammenhang des Gesamtüberlebens von ccRCC-Patienten mit der CD20-Dichte	54
Abbildung 21: Zusammenhang des Gesamtüberlebens von ccRCC-Patienten mit der PD-L1-Expression in Abhängigkeit von verschiedenen cut-off-Werten	55

Abbildung 22: Niedrige CD68-Dichte und negative PD-L1-Expression im vitalen Tumor (Gruppe 4) gingen mit längerem Gesamtüberleben einher	57
Abbildung 23: Niedrige CD204-Dichte und negative PD-L1-Expression im vitalen Tumor (Gruppe 4) gingen mit längerem Gesamtüberleben einher	58
Abbildung 24: Hohe CD8-Dichte und negative PD-L1-Expression im vitalen Tumor (Gruppe 2) gingen mit längerem Gesamtüberleben einher	59
Abbildung 25: Hohe CD20-Dichte und negative PD-L1-Expression im vitalen Tumor (Gruppe 2) gingen mit längerem Gesamtüberleben einher	60
Abbildung 26: Zusammenhang des progressionsfreien Überlebens von ccRCC-Patienten mit der CD20-Dichte	62
Abbildung 27: Clusterbildung von B-Lymphozyten im vitalen Tumor eines guten Responders	64
Abbildung 28: Strukturerkennung der Klasse „Tumor vital“	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie.....	24
Tabelle 2: Übersicht von durchgeführten immunhistochemischen Färbungen im Ventana System.	25
Tabelle 3: Scoring-Systeme der PD-L1-Expression	35
Tabelle 4: Immunhistochemische Marker bei der Klassifikation der Nierenzellkarzinome ...	36
Tabelle 5: Übersicht klinischer und histologischer Charakteristika.....	40
Tabelle 6: PD-L1-Expression von Tumor- und Immunzellen.....	46
Tabelle 7: Häufigkeit der PD-L1-Expression in Abhängigkeit zum cut-off-Wert.....	47
Tabelle 8: Multivariate Cox-Regressionsanalyse im Bezug zum Gesamtüberleben (OS).....	56
Tabelle 9: Kombinierte Untersuchung der CD68-positiven Makrophagen mit der Expression des PD-L1-Markers im Hinblick auf das Gesamtüberleben (OS).....	57
Tabelle 10: Kombinierte Untersuchung der CD204-positiven TAMs mit der Expression des PD-L1-Markers im Hinblick auf das Gesamtüberleben (OS).....	58
Tabelle 11: Kombinierte Untersuchung der CD8-positiven T-Lymphozyten mit der Expression des PD-L1-Markers im Hinblick auf das Gesamtüberleben (OS).....	59
Tabelle 12: Kombinierte Untersuchung der CD20-positiven B-Lymphozyten mit der Expression des PD-L1-Markers im Hinblick auf das Gesamtüberleben (OS).....	60
Tabelle 13: Multivariate Cox-Regressionsanalyse im Bezug zum progressionsfreien Überleben (PFS).....	62
Tabelle 14: Zusammenhang von IO-Therapieansprechen mit CD20-Dichte.....	63
Tabelle 15: Abundanz der Klassen im gesamten Datensatz.....	65
Tabelle 16: IoU-Wert der Klassen im Testdatensatz.....	66
Tabelle 17: IoU-Wert der Klassen im Evaluierungsdatensatz	66

Anhang

Protokolle

Protokoll 1: Protokoll für die HE-El Färbung

- 1 Schnittpräparate für 12 Minuten bei 60°C in einem Wärmeschränk heizen
- 2 Entparaffinieren im Xylol zweimal für 02:30 Minuten und Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (zweimal 100 %, 90 %, 70 %) für jeweils 01:30 Minuten
- 3 Behandlung im Resorcin-Fuchsin für 10 Minuten für die Färbung der elastischen Fasern
- 4 Zweimal in 100 % Ethanol für jeweils 30 und 15 Sekunden
- 5 Spülung unter Leitungswasser für 15 Sekunden
- 6 Behandlung im Hämalan für die Kern-Färbung für 4 Minuten
- 7 Spülen unter Leitungswasser für 30 Sekunden (Bläuen)
- 8 Behandlung im HCl-Ethanol für 20 Sekunden, um unspezifische Hintergrundfärbung zu minimieren
- 9 Spülen unter Leitungswasser für 5 Minuten
- 10 Behandlung im Eosin für 5 Minuten, um Zytoplasma und Bindegewebe zu färben
- 11 Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 90 %, zweimal 100%) für jeweils 15, 15, 30 und 60 Sekunden und zweimal Xylol für jeweils 30 und 90 Sekunden
- 12 Eindecken mit Eukitt bzw. Eindeckautomaten

Protokoll 2: Protokoll für die CD204 Immunfärbung

Schritte 1-3 wurden manuell durchgeführt.

- 1 Schnittpräparate für 20 Minuten bei 60°C in einem Wärmeschrank heizen
- 2 Entparaffinieren im RotiClear zweimal für 15 Minuten und Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (zweimal 100 %, 90 %, 70 %) für jeweils 2 Minuten
- 3 Antigen-Demaskierung: Erhitzen im Tris-EDTA-Puffer (pH 9) + 5 % Urea im Wasserbad für 30 Minuten bei 98°C und anschließend Schnitte in Waschpuffer gewaschen

Schritte 4-14 wurden automatisiert (InsituPro VSI) bei Raumtemperatur durchgeführt.

- 4 Waschschrift mit Waschpuffer für 3 Minuten
- 5 Blockierung der Aktivität der endogenen Peroxidase mit 3 % Wasserstoffperoxid für 10 Minuten
- 6 Waschschrift mit Waschpuffer für 6 Minuten
- 7 Blockierung unspezifischer Proteinbindungen für 5 Minuten
- 8 Waschschrift mit Waschpuffer für 6 Minuten
- 9 Primär-Antikörper Inkubation für 90 Minuten
- 10 Waschschrift mit Waschpuffer für 6 Minuten
- 11 Inkubation mit Post Block Reagenz 2 für 20 Minuten
- 12 Waschschrift mit Waschpuffer für 6 Minuten
- 13 Inkubation mit HRP-Polymer Reagenz 3 für 30 Minuten
- 14 Waschschrift mit Waschpuffer für 6 Minuten

Schritte 15-20 wurden manuell durchgeführt.

- 15 Entwicklung der Färbung durch Zugabe vom Chromogen DAB für 10 Minuten
- 16 Spülen mit destilliertem Wasser für 5 Minuten
- 17 Zellkernfärbung mit Hämalaun für 5 Sekunden
- 18 Spülen unter Leitungswasser für 10 Minuten (Bläuen)
- 19 Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 90 %, 100%) und RotiClear für jeweils 2 Minuten
- 20 Eindecken mit Eukitt bzw. Eindeckautomaten

Skript: Makrophagen-Detektion und Quantifizierung mit dem Pixel-Classifier

```
anns_ROI = getAnnotationObjects().findAll {
    it.getPathClass()==getPathClass("Tumor_necrosis") ||
    it.getPathClass()==getPathClass("capsule") ||
    it.getPathClass()==getPathClass("extrarenal") ||
    it.getPathClass()==getPathClass("Tumor_vital") ||
    it.getPathClass()==getPathClass("cortex_atrophy") ||
    it.getPathClass()==getPathClass("mark") ||
    it.getPathClass()==getPathClass("Tumor_regression") ||
    it.getPathClass()==getPathClass("Tumor_bleeding") ||
    it.getPathClass()==getPathClass("cortex") ||
    it.getPathClass()==getPathClass("Cyst") ||
    it.getPathClass()==getPathClass("Angioinvasion")
}
print(anns_ROI)
//anns_ROIs_loop =getSelectedObjects()
//print(anns_ROIs_loop.size())
//print(anns_ROIs_loop)
for (ann in anns_ROI){
    class_ROI = ann.getPathClass().toString()
    print(class_ROI)
    Thread.sleep(100)
    selectObjects{return it.isAnnotation() && it.getPathClass()==getPathClass(class_ROI)}
    Thread.sleep(200)
runPlugin('qupath.lib.algorithms.TilerPlugin', '{"tileSizeMicrons": 1000.0, "trimToROI": true, "makeAnnotations": true,
"removeParentAnnotation": false}');
    anns = selectObjects{it.getPathClass()==null}
    anns = getSelectedObjects()
    print(anns)
    total_count = anns.size()
    counter = 1
    while(counter <= total_count){
        def name = ("Tile " + counter).toString()
        selectObjects{it.getName()==name}
        Thread.sleep(200)
        //createDetectionsFromPixelClassifier("210121_RT_RES_0.69_Ch3-RGB_4f_1238_N_Macrophage EX Ferrum", 2.0, 8.0, "SPLIT")
        createDetectionsFromPixelClassifier("Macrophage_detector_RT_0.52_RGBDAB_0.5_1_4_GAU_11022021_neu", 0.5, 8.0, "SPLIT")
        //createAnnotationsFromPixelClassifier("210119_RT_RES0.69µm_5Ch-RGB-HDAB_Scale_0.5-1-2_f3_NORM", 2.5, 8.0, "SPLIT")
        //selectObjects{it.getPathClass()==getPathClass("Other")}
        //clearSelectedObjects()
        //selectObjects{it.isDetection() && it.getPathClass()==getPathClass("Ferrum")}
        //clearSelectedObjects()
        print(name)
        //Thread.sleep(500)
        counter = counter +1
        print(counter)
    }
    selectObjects{it.getPathClass()==null}
    clearSelectedObjects()
}
```

```

Thread.sleep(1000)
resolveHierarchy()
Thread.sleep(1000)
selectDetections();
addShapeMeasurements("AREA")
//now apply object classifier to detections to filter into macrophages and other:
selectDetections();
resetDetectionClassifications();
selectDetections();
addShapeMeasurements("AREA", "LENGTH", "CIRCULARITY", "MAX_DIAMETER", "MIN_DIAMETER")
runPlugin('qupath.lib.algorithms.IntensityFeaturesPlugin', '{"pixelSizeMicrons": 0.1729, "region": "ROI", "tileSizeMicrons": 25.0,
"colorOD": false, "colorStain1": true, "colorStain2": true, "colorStain3": false, "colorRed": true, "colorGreen": true, "colorBlue": true,
"colorHue": false, "colorSaturation": false, "colorBrightness": false, "doMean": true, "doStdDev": true, "doMinMax": true, "doMedian":
true, "doHaralick": false, "haralickDistance": 1, "haralickBins": 32}');
runPlugin('qupath.lib.algorithms.IntensityFeaturesPlugin', '{"pixelSizeMicrons": 0.1729, "region": "Circular tiles", "tileSizeMicrons": 10.0,
"colorOD": false, "colorStain1": true, "colorStain2": true, "colorStain3": false, "colorRed": true, "colorGreen": true, "colorBlue": true,
"colorHue": false, "colorSaturation": false, "colorBrightness": false, "doMean": false, "doStdDev": true, "doMinMax": true, "doMedian":
true, "doHaralick": true, "haralickDistance": 1, "haralickBins": 32}');
selectDetections();
runObjectClassifier("05_Macrophage OtherClassifier_115f_20467tObj");
selectObjectsByClassification("Other");
//now comput area percentage of macrophages
def server = getCurrentServer()
def cal_2 = server.getPixelCalibration()
hierarchy = getCurrentHierarchy()
anns = getAnnotationObjects()
for (ann in anns){
    //resolveHierarchy()
    children = ann.getChildObjects().findAll{it.isDetection() && it.getPathClass() == getPathClass("Makrophage")}
    Thread.sleep(1000)
    print(children.size())
    name = ann.getPathClass().toString()
    //macrophages = getSelectedObjects()
    sum_size_all_macrophages = 0
    for (single_macrophage_detection in children) {
        macrophage_size = single_macrophage_detection.getROI().getArea()*cal_2.getPixelWidthMicrons()*cal_2.getPixelHeightMicrons()
        sum_size_all_macrophages = sum_size_all_macrophages + macrophage_size
    }
    ann.getMeasurementList().putMeasurement("Area of macrophages  $\mu\text{m}^2$ ", sum_size_all_macrophages)
    annotation_size = ann.getROI().getArea()*cal_2.getPixelWidthMicrons()*cal_2.getPixelHeightMicrons()
    relative_macrophage_area_in_annotation = ((sum_size_all_macrophages/annotation_size)*100).round(2)
    print("Prozentanteil Markophagen in der Annotation " + name.toString() +" ist: " + relative_macrophage_area_in_annotation)
    print("Gesamte Makrophagenflaeche: " + sum_size_all_macrophages + " $\mu\text{m}^2$ ")
    ann.getMeasurementList().putMeasurement("Makrophage Area percentage %", relative_macrophage_area_in_annotation)
}

```

Weitere Ergebnisse

Tabellen

Tabelle S1: Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
Waschpuffer (20X)	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
Antikörper Verdünnungsmittel	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
DAB-Substratpuffer	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
DAB Chromogen	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
HIER T-EDTA Puffer pH 9 (10X)	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
HIER Citratpuffer pH 6 (10X)	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
Hämalaun	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Eukitt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Protein Blockierungslösung	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
Wasserstoffperoxid (30 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
RotiClear	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle S2: Geräte und Verbrauchsmaterial.

Geräte und Verbrauchsmaterial	Hersteller
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Modell: 1012), Burgwedel, Deutschland
Färbeautomat	CEM GmbH (Modell: InsituPro VSI), Kamp-Lintfort, Deutschland
Färbeautomat	Hoffmann-La Roche (Modell: Ventana Benchmark Ultra), Basel, Schweiz
Vortexer	neoLab Migge GmbH (Modell: Sunlab SU 1900), Heidelberg, Deutschland
Scanner	MetaSystems Hard & Software GmbH (Modell: Metafer), Altlußheim, Deutschland
Rotationsmikrotom	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Pipetten 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf SE (Modell: Reference 2), Hamburg, Deutschland
Pipetten-Spitzen 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Falcon Röhrchen 50 ml	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle S3: Räumliche Verteilung von Makrophagen (CD68) in verschiedenen Regionen.

Makrophagen/ROI %	n	Mittelwert % $\pm$ SEM (min. - max.)
CD68/Tumor %	155	1,97 $\pm$ 0,08 (0,16 - 5,77)
CD68/vitaler Tumor %	155	2,20 $\pm$ 0,09 (0,37 - 6,60)
CD68/Regression %	145	1,57 $\pm$ 0,09 (0,06 - 6,81)
CD68/Nekrose %	58	2,44 $\pm$ 0,28 (0,32 - 12,00)
CD68/Blutung %	71	1,18 $\pm$ 0,12 (0,01 - 5,00)
CD68/Kapsel %	132	0,96 $\pm$ 0,07 (0,06 - 4,61)
CD68/Angioinvasion %	10	1,72 $\pm$ 0,42 (0,20 - 4,31)
CD68/Zystenbildung %	27	0,58 $\pm$ 0,22 (0,01 - 5,89)
CD68/Nierenparenchym %	113	0,85 $\pm$ 0,06 (0,02 - 2,64)
CD68/Cortex %	53	0,47 $\pm$ 0,05 (0,02 - 2,04)
CD68/atrophierter Cortex %	89	1,08 $\pm$ 0,07 (0,03 - 2,85)
CD68/Mark %	67	0,77 $\pm$ 0,07 (0,07 - 2,37)
CD68/Extrarenal %	132	0,47 $\pm$ 0,03 (0,02 - 1,91)

Tabelle S4: Räumliche Verteilung von Tumor-assoziierten Makrophagen (CD204) in verschiedenen Regionen.

TAM/ROI %	n	Mittelwert % $\pm$ SEM (min. - max.)
CD204/Tumor %	155	0,66 $\pm$ 0,06 (0 - 5,36)
CD204/vitaler Tumor %	155	0,77 $\pm$ 0,07 (0 - 6,19)
CD204/Regression %	145	0,42 $\pm$ 0,05 (0 - 5,80)
CD204/Nekrose %	58	1,51 $\pm$ 0,38 (0 - 18,30)
CD204/Blutung %	71	0,35 $\pm$ 0,07 (0 - 3,08)
CD204/Kapsel %	132	0,20 $\pm$ 0,02 (0 - 1,37)
CD204/Angioinvasion %	10	0,62 $\pm$ 0,26 (0,05 - 2,36)
CD204/Zystenbildung %	27	0,21 $\pm$ 0,09 (0 - 2,33)
CD204/Nierenparenchym %	113	0,07 $\pm$ 0,01 (0 - 0,52)
CD204/Cortex %	54	0,04 $\pm$ 0,01 (0 - 0,44)
CD204/atrophierter Cortex %	89	0,08 $\pm$ 0,01 (0 - 0,56)
CD204/Mark %	67	0,10 $\pm$ 0,02 (0 - 0,89)
CD204/Extrarenal %	133	0,10 $\pm$ 0,01 (0 - 0,75)

Tabelle S5: Räumliche Verteilung von zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8) in verschiedenen Regionen.

T-Lymphozyten /ROI mm²	n	Mittelwert Zellen/mm² ± SEM (min. - max.)
CD8/Tumor mm ²	155	268,18 ± 23,94 (7,55 - 1431,48)
CD8/vitaler Tumor mm ²	155	286,84 ± 28,51 (4,58 - 2119,24)
CD8/Regression mm ²	145	252,39 ± 21,34 (4,91 - 1243,52)
CD8/Nekrose mm ²	58	17,80 ± 3,93 (0 - 181,37)
CD8/Blutung mm ²	71	71,35 ± 12,98 (0 - 651,34)
CD8/Kapsel mm ²	132	338,78 ± 26,46 (5,33 - 1792,47)
CD8/Angioinvasion mm ²	10	339,69 ± 191,38 (6,55 - 2022,32)
CD8/Zystenbildung mm ²	27	21,75 ± 7,23 (0 - 168,29)
CD8/Nierenparenchym mm ²	114	308,84 ± 20,99 (16,22 - 1035,28)
CD8/Cortex mm ²	54	144,99 ± 17,76 (0 - 495,99)
CD8/atrophierter Cortex mm ²	89	424,08 ± 28,64 (20,16 - 1083,72)
CD8/Mark mm ²	67	281,98 ± 30,42 (15,38 - 1005,92)
CD8/Extrarenal mm ²	133	79,13 ± 6,93 (3,00 - 426,17)

Tabelle S6: Räumliche Verteilung von B-Lymphozyten (CD20) in verschiedenen Regionen.

B-Lymphozyten/ROI mm²	n	Mittelwert Zellen/mm² ± SEM (min. - max.)
CD20/Tumor mm ²	155	35,28 ± 4,62 (0,06 - 329,59)
CD20/vitaler Tumor mm ²	155	18,47 ± 2,93 (0,04 - 274,36)
CD20/Regression mm ²	145	82,60 ± 13,74 (0 - 1068,10)
CD20/Nekrose mm ²	58	0,59 ± 0,12 (0 - 4,49)
CD20/Blutung mm ²	71	8,90 ± 2,13 (0 - 100,58)
CD20/Kapsel mm ²	132	110,24 ± 22,99 (0 - 2714,76)
CD20/Angioinvasion mm ²	10	67,23 ± 41,43 (0 - 419,73)
CD20/Zystenbildung mm ²	27	0,88 ± 0,48 (0 - 11,81)
CD20/Nierenparenchym mm ²	114	223,70 ± 26,37 (1,63 - 1692,31)
CD20/Cortex mm ²	54	83,12 ± 16,88 (0 - 802,80)
CD20/atrophierter Cortex mm ²	89	332,35 ± 38,16 (1,63 - 1692,31)
CD20/Mark mm ²	67	101,87 ± 15,96 (0,63 - 837,90)
CD20/Extrarenal mm ²	133	71,84 ± 11,34 (0,19 - 799,89)

Tabelle S7: Odds-Ratio für die Assoziation vom Differenzierungsgrad (ISUP) und Leukozyten-Dichten mit der PD-L1-Expression in Tumorzellen (TPS 1 %) (univariate logistische Regression, negative PD-L1-Expression diente als Referenz).

	n	Odds-Ratio	95 % KI	p-Wert
Differenzierungsgrad (ISUP)	153			
G2	67	1 (Referenz)		
G3	62	2,92	1,24 - 6,85	0,014
G4	24	6,74	2,36 - 19,19	<0,001
CD68/Tumor vital	155			
niedrig	77	1 (Referenz)		
hoch	78	1,73	0,86 - 3,51	0,12
CD204/Tumor vital	155			
niedrig	74	1 (Referenz)		
hoch	81	2,31	1,12 - 4,77	0,023
CD8/Tumor vital	155			
niedrig	75	1 (Referenz)		
hoch	80	2,40	1,16 - 4,95	0,018
CD20/Tumor vital	155			
niedrig	78	1 (Referenz)		
hoch	77	2,34	1,14 - 4,80	0,02

Tabelle S8: Zusammenhang des Gesamtüberlebens von ccRCC-Patienten mit den Charakteristika (OS, univariate Cox-Regressionsanalyse).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
Geschlecht	153			
W	42	1 (Referenz)		
M	111	0,57	0,38 - 0,86	0,007
Alter	153			
<60	72	1 (Referenz)		
≥60	81	1,12	0,76 - 1,65	0,56
Differenzierungsgrad (ISUP)	151			
G2	67	1 (Referenz)		
G3	60	1,95	1,28 - 2,98	0,002
G4	24	2,45	1,32 - 4,56	0,005
T Status	152			
T1	35	1 (Referenz)		
T2	17	1,51	0,73 - 3,11	0,26
T3	96	1,62	1,00 - 2,61	0,47
T4	4	14,27	4,48 - 45,51	<0,001
N Status	63			
N neg	39	1 (Referenz)		
N pos	24	3,44	1,84 - 6,44	<0,001
Nekrose	153			
nein	95	1 (Referenz)		
ja	58	2,40	1,59 - 3,60	<0,001
Tumorgroße	145			
<7 cm	64	1 (Referenz)		
≥7 cm	81	2,17	1,40 - 3,35	<0,001

Tabelle S9: Zusammenhang des Gesamtüberlebens von ccRCC-Patienten mit der CD68-Dichte in verschiedenen Regionen (OS, univariate Cox-Regressionsanalyse, CNN-Classifer).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
CD68/Tumor	153			
niedrig	75	1 (Referenz)		
hoch	78	1,71	1,16 - 2,53	0,007
CD68/Tumor vital	153			
niedrig	75	1 (Referenz)		
hoch	78	1,78	1,20 - 2,63	0,004
CD68/Regression	143			
niedrig	70	1 (Referenz)		
hoch	73	2,12	1,39 - 3,24	<0,001
CD68/Nekrose	58			
niedrig	30	1 (Referenz)		
hoch	28	1,04	0,56 - 1,93	0,89
CD68/Kapsel	130			
niedrig	63	1 (Referenz)		
hoch	67	1,49	0,97 - 2,29	0,07
CD68/Blutung	69			
niedrig	32	1 (Referenz)		
hoch	37	1,97	1,08 - 3,58	0,027
CD68/Nierenparenchym	111			
niedrig	55	1 (Referenz)		
hoch	56	1,50	0,95 - 2,36	0,08
CD68/Cortex	52			
niedrig	26	1 (Referenz)		
hoch	26	1,19	0,59 - 2,39	0,63
CD68/Cortex-Atrophie	87			
niedrig	43	1 (Referenz)		
hoch	44	1,50	0,90 - 2,51	0,12
CD68/Mark	65			
niedrig	32	1 (Referenz)		
hoch	33	1,82	1,01 - 3,30	0,046
CD68/Extrarenal	131			
niedrig	61	1 (Referenz)		
hoch	70	1,78	1,15 - 2,75	0,009

Tabelle S10: Zusammenhang des Gesamtüberlebens von ccRCC-Patienten mit der CD204-Dichte in verschiedenen Regionen (OS, univariate Cox-Regressionsanalyse, CNN-Classifizier).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
CD204/Tumor	153			
niedrig	73	1 (Referenz)		
hoch	80	1,12	0,76 - 1,65	0,56
CD204/Tumor vital	153			
niedrig	73	1 (Referenz)		
hoch	80	1,22	0,83 - 1,79	0,32
CD204/Regression	143			
niedrig	69	1 (Referenz)		
hoch	74	0,84	0,56 - 1,25	0,39
CD204/Nekrose	58			
niedrig	27	1 (Referenz)		
hoch	31	1,07	0,58 - 1,98	0,83
CD204/Kapsel	130			
niedrig	64	1 (Referenz)		
hoch	66	0,96	0,62 - 1,48	0,84
CD204/Blutung	69			
niedrig	32	1 (Referenz)		
hoch	37	1,61	0,90 - 2,89	0,11
CD204/Nierenparenchym	111			
niedrig	55	1 (Referenz)		
hoch	56	0,95	0,61 - 1,50	0,84
CD204/Cortex	53			
niedrig	27	1 (Referenz)		
hoch	26	1,22	0,60 - 2,47	0,58
CD204/Cortex-Atrophie	87			
niedrig	43	1 (Referenz)		
hoch	44	0,70	0,43 - 1,17	0,17
CD204/Mark	65			
niedrig	31	1 (Referenz)		
hoch	34	1,09	0,61 - 1,96	0,77
CD204/Extrarenal	132			
niedrig	65	1 (Referenz)		
hoch	67	0,86	0,56 - 1,32	0,50

Tabelle S11: Zusammenhang des Gesamtüberlebens von ccRCC-Patienten mit der CD8-Dichte in verschiedenen Regionen (OS, univariate Cox-Regressionsanalyse).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
CD8/Tumor	153			
niedrig	75	1 (Referenz)		
hoch	78	0,71	0,48 - 1,05	0,09
CD8/Tumor vital	153			
niedrig	74	1 (Referenz)		
hoch	79	0,78	0,53 - 1,14	0,20
CD8/Regression	143			
niedrig	70	1 (Referenz)		
hoch	73	1,39	0,93 - 2,07	0,11
CD8/Nekrose	58			
niedrig	28	1 (Referenz)		
hoch	30	0,64	0,34 - 1,21	0,17
CD8/Kapsel	130			
niedrig	64	1 (Referenz)		
hoch	66	1,37	0,89 - 2,11	0,15
CD8/Blutung	69			
niedrig	33	1 (Referenz)		
hoch	36	0,82	0,46 - 1,45	0,49
CD8/Nierenparenchym	112			
niedrig	56	1 (Referenz)		
hoch	56	1,34	0,85 - 2,11	0,21
CD8/Cortex	53			
niedrig	25	1 (Referenz)		
hoch	28	1,34	0,67 - 2,70	0,41
CD8/Cortex-Atrophie	87			
niedrig	44	1 (Referenz)		
hoch	43	0,82	0,49 - 1,36	0,44
CD8/Mark	65			
niedrig	32	1 (Referenz)		
hoch	33	1,37	0,76 - 2,49	0,29
CD8/Extrarenal	132			
niedrig	62	1 (Referenz)		
hoch	70	1,24	0,81 - 1,90	0,31

Tabelle S12: Zusammenhang des Gesamtüberlebens von ccRCC-Patienten mit der CD20-Dichte in verschiedenen Regionen (OS, univariate Cox-Regressionsanalyse).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
CD20/Tumor	153			
niedrig	77	1 (Referenz)		
hoch	76	0,92	0,63 - 1,35	0,68
CD20/Tumor vital	153			
niedrig	77	1 (Referenz)		
hoch	76	0,68	0,46 - 1,01	0,05
CD20/Regression	143			
niedrig	71	1 (Referenz)		
hoch	72	1,01	0,68 - 1,51	0,95
CD20/Nekrose	58			
niedrig	31	1 (Referenz)		
hoch	27	0,94	0,51 - 1,73	0,83
CD20/Kapsel	130			
niedrig	65	1 (Referenz)		
hoch	65	1,11	0,73 - 1,71	0,62
CD20/Blutung	69			
niedrig	34	1 (Referenz)		
hoch	35	0,92	0,52 - 1,62	0,76
CD20/Nierenparenchym	112			
niedrig	56	1 (Referenz)		
hoch	56	0,91	0,58 - 1,43	0,67
CD20/Cortex	53			
niedrig	26	1 (Referenz)		
hoch	27	1,26	0,62 - 2,57	0,52
CD20/Cortex-Atrophie	87			
niedrig	43	1 (Referenz)		
hoch	44	0,83	0,50 - 1,38	0,48
CD20/Mark	65			
niedrig	31	1 (Referenz)		
hoch	34	1,49	0,82 - 2,72	0,19
CD20/Extrarenal	132			
niedrig	64	1 (Referenz)		
hoch	68	1,34	0,88 - 2,04	0,18

Tabelle S13: Zusammenhang des Gesamtüberlebens von ccRCC-Patienten mit der PD-L1-Expression (OS, univariate Cox-Regressionsanalyse).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
TPS cut-off 1 %	153			
<1 %	109	1 (Referenz)		
≥1 %	44	2,54	1,68 - 3,85	<0,001
TPS cut-off 5 %	153			
<5 %	133	1 (Referenz)		
≥5 %	20	2,89	1,67 - 5,00	<0,001
TPS cut-off 10 %	153			
<10 %	142	1 (Referenz)		
≥10 %	11	2,37	1,14 - 4,93	0,02
IC-Scoring cut-off 1 %	153			
<1 %	90	1 (Referenz)		
≥1 %	63	1,21	0,82 - 1,79	0,33
IC-Scoring cut-off 5 %	153			
<5 %	119	1 (Referenz)		
≥5 %	34	1,57	1,01 - 2,45	0,047
IC-Scoring cut-off 10 %	153			
<10 %	136	1 (Referenz)		
≥10 %	17	2,71	1,49 - 4,93	0,001
CPS cut-off 10	153			
<10	129	1 (Referenz)		
≥10	24	2,33	1,42 - 3,82	<0,001

Tabelle S14: Multivariate Cox-Regressionsanalyse im Bezug zum Gesamtüberleben (OS).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
Differenzierungsgrad (ISUP)	134			
G2	58	1 (Referenz)		
G3	53	2,16	1,24 - 3,77	0,006
G4	23	1,63	0,59 - 4,47	0,34
T Status	134			
T1	31	1 (Referenz)		
T2	15	1,04	0,39 - 2,77	0,93
T3	85	0,87	0,44 - 1,72	0,69
T4	3	5,02	1,08 - 23,24	0,039
Nekrose	134			
nein	83	1 (Referenz)		
ja	51	1,44	0,84 - 2,46	0,19
Tumorgroße	134			
<7 cm	61	1 (Referenz)		
≥7 cm	73	1,81	0,98 - 3,34	0,06
TPS cut-off 1 %	134			
<1 %	97	1 (Referenz)		
≥1 %	37	2,61	1,34 - 5,07	0,005
TPS cut-off 5 %	134			
<5 %	117	1 (Referenz)		
≥5 %	17	2,02	0,72 - 5,69	0,18
TPS cut-off 10 %	134			
<10 %	124	1 (Referenz)		
≥10 %	10	0,74	0,20 - 2,77	0,66
CD68/Tumor vital	134			
niedrig	66	1 (Referenz)		
hoch	68	0,73	0,41 - 1,31	0,30
CD68/Regression	134			
niedrig	65	1 (Referenz)		
hoch	69	2,14	1,23 - 3,72	0,007

Fortsetzung der Tabelle S14	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
CD204/Tumor vital	134			
niedrig	65	1 (Referenz)		
hoch	69	0,88	0,42 - 1,84	0,74
CD204/Regression	134			
niedrig	68	1 (Referenz)		
hoch	66	0,64	0,34 - 1,21	0,17
CD8/Tumor vital	134			
niedrig	66	1 (Referenz)		
hoch	68	1,01	0,58 - 1,74	0,98
CD8/Regression	134			
niedrig	65	1 (Referenz)		
hoch	69	2,33	1,24 - 4,39	0,009
CD20/Tumor vital	134			
niedrig	67	1 (Referenz)		
hoch	67	0,44	0,25 - 0,75	0,003
CD20/Regression	134			
niedrig	67	1 (Referenz)		
hoch	67	0,45	0,24 - 0,85	0,014

Tabelle S15: Zusammenhang des progressionsfreien Überlebens von ccRCC-Patienten mit den Charakteristika (PFS einer IO-Therapie, univariate Cox-Regressionsanalyse).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
Alter	40			
<60	21	1 (Referenz)		
≥60	19	1,26	0,63 - 2,53	0,51
Differenzierungsgrad (ISUP)	40			
G2	13	1 (Referenz)		
G3	15	1,44	0,62 - 3,34	0,40
G4	12	1,19	0,47 - 3,00	0,71
Nekrose	40			
nein	22	1 (Referenz)		
ja	18	1,45	0,72 - 2,92	0,30
Tumorgröße	39			
<7 cm	11	1 (Referenz)		
≥7 cm	28	1,45	0,65 - 3,26	0,36

Tabelle S16: Zusammenhang des progressionsfreien Überlebens von ccRCC-Patienten mit der CD68-Dichte (PFS einer IO-Therapie, univariate Cox-Regressionsanalyse, CNN-Classifer).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
CD68/Tumor	40			
niedrig	21	1 (Referenz)		
hoch	19	0,90	0,45 - 1,82	0,78
CD68/Tumor vital	40			
niedrig	22	1 (Referenz)		
hoch	18	1,17	0,58 - 2,35	0,66
CD68/Regression	38			
niedrig	18	1 (Referenz)		
hoch	20	0,76	0,38 - 1,54	0,45

Tabelle S17: Zusammenhang des progressionsfreien Überlebens von ccRCC-Patienten mit der CD204-Dichte (PFS einer IO-Therapie, univariate Cox-Regressionsanalyse, CNN-Classifer).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
CD204/Tumor	40			
niedrig	12	1 (Referenz)		
hoch	28	0,52	0,24 - 1,13	0,10
CD204/Tumor vital	40			
niedrig	13	1 (Referenz)		
hoch	27	0,74	0,35 - 1,56	0,43
CD204/Regression	38			
niedrig	11	1 (Referenz)		
hoch	27	0,96	0,44 - 2,11	0,92

Tabelle S18: Zusammenhang des progressionsfreien Überlebens von ccRCC-Patienten mit der CD8-Dichte (PFS einer IO-Therapie, univariate Cox-Regressionsanalyse).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
CD8/Tumor	40			
niedrig	20	1 (Referenz)		
hoch	20	0,72	0,36 - 1,45	0,36
CD8/Tumor vital	40			
niedrig	21	1 (Referenz)		
hoch	19	0,69	0,34 - 1,40	0,30
CD8/Regression	38			
niedrig	24	1 (Referenz)		
hoch	14	1,22	0,59 - 2,54	0,59

Tabelle S19: Zusammenhang des progressionsfreien Überlebens von ccRCC-Patienten mit der CD20-Dichte (PFS einer IO-Therapie, univariate Cox-Regressionsanalyse).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
CD20/Tumor	40			
niedrig	20	1 (Referenz)		
hoch	20	0,83	0,41 - 1,67	0,60
CD20/Tumor vital	40			
niedrig	18	1 (Referenz)		
hoch	22	0,37	0,18 - 0,75	0,006
CD20/Regression	38			
niedrig	17	1 (Referenz)		
hoch	21	0,76	0,37 - 1,54	0,44

Tabelle S20: Zusammenhang des progressionsfreien Überlebens von ccRCC-Patienten mit der PD-L1-Expression (PFS einer IO-Therapie, univariate Cox-Regressionsanalyse).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
TPS cut-off 1 %	40			
<1 %	30	1 (Referenz)		
≥1 %	10	0,71	0,30 - 1,64	0,42
TPS cut-off 5 %	40			
<5 %	33	1 (Referenz)		
≥5 %	7	0,39	0,14 - 1,13	0,08

Tabelle S21: Multivariate Cox-Regressionsanalyse im Bezug zum progressionsfreien Überleben (PFS).

	n	Hazard Ratio	95 % KI	p-Wert
Differenzierungsgrad (ISUP)	38			
G2	12	1 (Referenz)		
G3	14	3,58	0,98 - 13,06	0,053
G4	12	5,16	1,12 - 23,68	0,035
TPS cut-off 1 %	38			
<1 %	28	1 (Referenz)		
≥1 %	10	5,61	0,84 - 37,48	0,07
TPS cut-off 5 %	38			
<5 %	31	1 (Referenz)		
≥5 %	7	0,06	0,01 - 0,56	0,014
CD68/Tumor vital	38			
niedrig	20	1 (Referenz)		
hoch	18	0,87	0,27 - 2,84	0,82
CD68/Regression	38			
niedrig	18	1 (Referenz)		
hoch	20	2,17	0,64 - 7,32	0,21
CD204/Tumor vital	38			
niedrig	12	1 (Referenz)		
hoch	26	0,47	0,10 - 2,13	0,33
CD204/Regression	38			
niedrig	11	1 (Referenz)		
hoch	27	0,65	0,19 - 2,27	0,50
CD8/Tumor vital	38			
niedrig	20	1 (Referenz)		
hoch	18	1,68	0,65 - 4,34	0,29
CD8/Regression	38			
niedrig	24	1 (Referenz)		
hoch	14	1,36	0,41 - 4,44	0,61
CD20/Tumor vital	38			
niedrig	17	1 (Referenz)		
hoch	21	0,22	0,07 - 0,67	0,008
CD20/Regression	38			
niedrig	17	1 (Referenz)		
hoch	21	0,83	0,20 - 3,46	0,79

Tabelle S22: Odds-Ratio für die Assoziation von Charakteristika mit dem IO-Therapieansprechen (univariate logistische Regression, schlechte Responder dienten als Referenz).

	n	Odds-Ratio	95 % KI	p-Wert
Alter	24			
<60	12	1 (Referenz)		
≥60	12	0,70	0,13 - 3,68	0,67
Differenzierungsgrad (ISUP)	24			
G2	7	1 (Referenz)		
G3	9	0,67	0,09 - 5,13	0,70
G4	8	0,80	0,10 - 6,35	0,83
Nekrose	24			
nein	12	1 (Referenz)		
ja	12	0,33	0,06 - 1,88	0,21

Tabelle S23: Odds-Ratio für die Assoziation von CD68-Dichte mit dem IO-Therapieansprechen (univariate logistische Regression, schlechte Responder dienten als Referenz).

	n	Odds-Ratio	95 % KI	p-Wert
CD68/Tumor	24			
niedrig	10	1 (Referenz)		
hoch	14	1,75	0,31 - 9,75	0,52
CD68/Tumor vital	24			
niedrig	12	1 (Referenz)		
hoch	12	0,70	0,13 - 3,68	0,67
CD68/Regression	24			
niedrig	12	1 (Referenz)		
hoch	12	1,43	0,27 - 7,52	0,67

Tabelle S24: Odds-Ratio für die Assoziation von CD204-Dichten mit dem IO-Therapieansprechen (univariate logistische Regression, schlechte Responder dienten als Referenz).

	n	Odds-Ratio	95 % KI	p-Wert
CD204/Tumor	24			
niedrig	4	1 (Referenz)		
hoch	20	0	0	0,99
CD204/Tumor vital	24			
niedrig	5	1 (Referenz)		
hoch	19	2,91	0,27 - 31,21	0,38
CD204/Regression	24			
niedrig	5	1 (Referenz)		
hoch	19	0,87	0,12 - 6,58	0,90

Tabelle S25: Odds-Ratio für die Assoziation von CD8-Dichten mit dem IO-Therapieansprechen (univariate logistische Regression, schlechte Responder dienten als Referenz).

	n	Odds-Ratio	95 % KI	p-Wert
CD8/Tumor	24			
niedrig	11	1 (Referenz)		
hoch	13	2,29	0,41 - 12,73	0,34
CD8/Tumor vital	24			
niedrig	13	1 (Referenz)		
hoch	11	1,87	0,35 - 9,98	0,46
CD8/Regression	24			
niedrig	14	1 (Referenz)		
hoch	10	1,20	0,22 - 6,39	0,83

Tabelle S26: Odds-Ratio für die Assoziation von CD20-Dichten mit dem IO-Therapieansprechen (univariate logistische Regression, schlechte Responder dienten als Referenz).

	n	Odds-Ratio	95 % KI	p-Wert
CD20/Tumor	24			
niedrig	13	1 (Referenz)		
hoch	11	1,87	0,35 - 9,98	0,46
CD20/Tumor vital	24			
niedrig	14	1 (Referenz)		
hoch	10	14,00	1,86 - 105,27	0,01
CD20/Regression	24			
niedrig	11	1 (Referenz)		
hoch	13	2,29	0,41 - 12,73	0,34

Tabelle S27: Odds-Ratio für die Assoziation von PD-L1-Expression mit dem IO-Therapieansprechen (univariate logistische Regression, schlechte Responder dienten als Referenz).

	n	Odds-Ratio	95 % KI	p-Wert
TPS cut-off 1 %	24			
<1 %	17	1 (Referenz)		
≥1 %	7	3,20	0,52 - 19,84	0,21
IC-Scoring cut-off 1 %	24			
<1 %	14	1 (Referenz)		
≥1 %	10	1,20	0,22 - 6,39	0,83
IC-Scoring cut-off 5 %	24			
<5 %	17	1 (Referenz)		
≥5 %	7	3,20	0,52 - 19,84	0,21

Tabelle S28: Zusammenhang von IO-Therapieansprechen der ccRCC-Patienten mit den Charakteristika (exakter Test nach Fisher*).

	n	guter Responder	schlechter Responder	p-Wert
Alter	24			1,0 *
<60	12	5 (41,7 %)	7 (58,3 %)	
≥60	12	4 (33,3 %)	8 (66,7 %)	
Differenzierungsgrad (ISUP)	24			1,0 *
G2	7	3 (42,9 %)	4 (57,1 %)	
G3	9	3 (33,3 %)	6 (66,7 %)	
G4	8	3 (37,5 %)	5 (62,5 %)	
Nekrose	24			0,40 *
Nein	12	6 (50 %)	6 (50 %)	
Ja	12	3 (25 %)	9 (75 %)	

Tabelle S29: Zusammenhang von IO-Therapieansprechen mit CD68-Dichte (exakter Test nach Fisher*).

	n	guter Responder	schlechter Responder	p-Wert
CD68/Tumor	24			0,68 *
niedrig	10	3 (30 %)	7 (70 %)	
hoch	14	6 (42,9 %)	8 (57,1 %)	
CD68/Tumor vital	24			1,0 *
niedrig	12	5 (41,7 %)	7 (58,3 %)	
hoch	12	4 (33,3 %)	8 (66,7 %)	
CD68/Regression	24			1,0 *
niedrig	12	4 (33,3 %)	8 (66,7 %)	
hoch	12	5 (41,7 %)	7 (58,3 %)	

Tabelle S30: Zusammenhang von IO-Therapieansprechen mit CD204-Dichte (exakter Test nach Fisher*).

	n	guter Responder	schlechter Responder	p-Wert
CD204/Tumor	24			0,26 *
niedrig	4	0 (0 %)	4 (100 %)	
hoch	20	9 (45 %)	11 (55 %)	
CD204/Tumor vital	24			0,61 *
niedrig	5	1 (20 %)	4 (80 %)	
hoch	19	8 (42,1 %)	11 (57,9 %)	
CD204/Regression	24			1,0 *
niedrig	5	2 (40 %)	3 (60 %)	
hoch	19	7 (36,8 %)	12 (63,2 %)	

Tabelle S31: Zusammenhang von IO-Therapieansprechen mit CD8-Dichte (exakter Test nach Fisher*).

	n	guter Responder	schlechter Responder	p-Wert
CD8/Tumor	24			0,42 *
niedrig	11	3 (27,3 %)	8 (72,7 %)	
hoch	13	6 (46,2 %)	7 (53,8 %)	
CD8/Tumor vital	24			0,67 *
niedrig	13	4 (30,8 %)	9 (69,2 %)	
hoch	11	5 (45,5 %)	6 (54,5 %)	
CD8/Regression	24			1,0 *
niedrig	14	5 (35,7 %)	9 (64,3 %)	
hoch	10	4 (40 %)	6 (60 %)	

Tabelle S32: Zusammenhang von IO-Therapieansprechen mit PD-L1-Expression (exakter Test nach Fisher*).

	n	guter Responder	schlechter Responder	p-Wert
TPS cut-off 1 %	24			0,36 *
<1 %	17	5 (29,4 %)	12 (70,6 %)	
≥1 %	7	4 (57,1 %)	3 (42,9 %)	
IC-Scoring cut-off 1 %	24			1,0 *
<1 %	14	5 (35,7 %)	9 (64,3 %)	
≥1 %	10	4 (40 %)	6 (60 %)	
IC-Scoring cut-off 5 %	24			0,36 *
<5 %	17	5 (29,4 %)	12 (70,6 %)	
≥5 %	7	4 (57,1 %)	3 (42,9 %)	

Tabelle S33: Abundanz der Klassen im Trainingsdatensatz (n=Anzahl der Schnitte, die die Klasse enthalten).

Klasse	n	Fläche (in mm²)	% Fläche im Datensatz
Tumor vital	138	14613,65	43,92 %
Tumor regression	126	3715,77	11,17 %
Tumor necrosis	56	1137,58	3,42 %
Tumor bleeding	62	443,79	1,33 %
Capsule	118	879,14	2,64 %
Angioinvasion	9	12,78	0,04 %
Cyst formation	28	87,41	0,26 %
Cortex	50	2169,61	6,52 %
Cortex atrophy	81	2191,23	6,59 %
Medulla	57	1871,45	5,62 %
Extrarenal	120	5938,21	17,85 %
Diffuse tumor growth in soft tissue	1	161,78	0,49 %
Medullary spindle cell nodule	1	4,32	0,01 %
Papillom	0	0	0 %
Gesamtgewebefläche		33272,93	100 %

Weitere Ergebnisse

Abbildungen

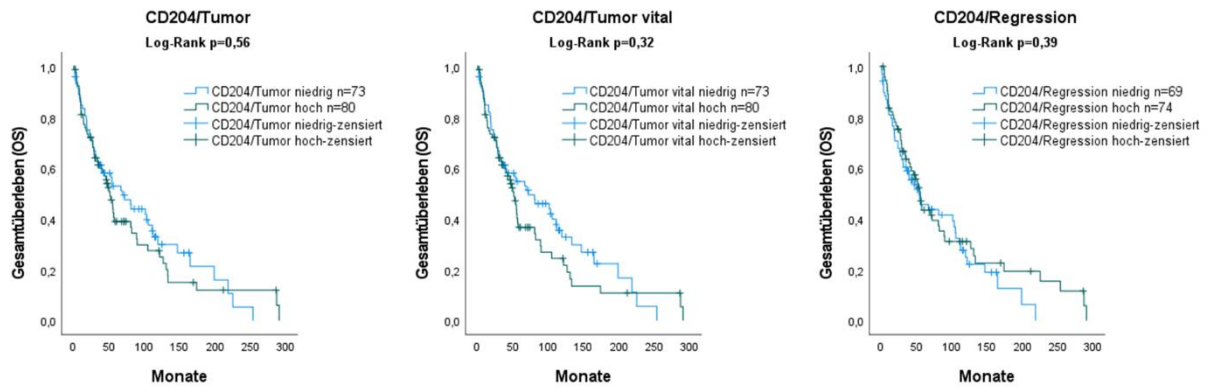


Abbildung S1: Zusammenhang des Gesamtüberlebens von ccRCC-Patienten mit der CD204-Dichte (OS, Kaplan-Meier Überlebenskurven, CNN-Classifer).

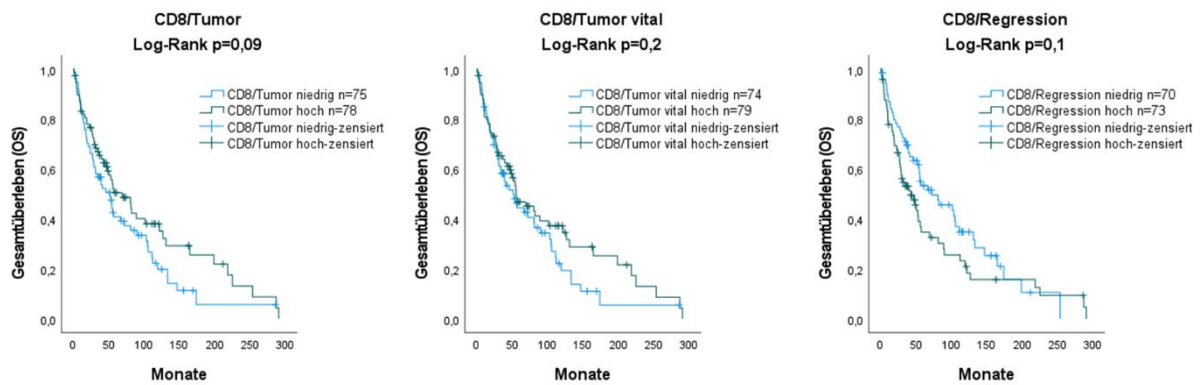


Abbildung S2: Zusammenhang des Gesamtüberlebens von ccRCC-Patienten mit der CD8-Dichte (OS, Kaplan-Meier Überlebenskurven).

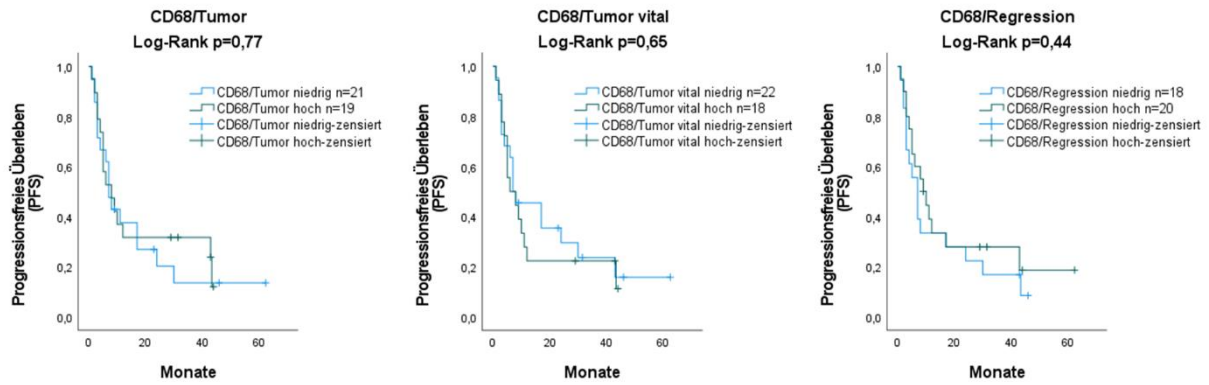


Abbildung S3: Zusammenhang des progressionsfreien Überlebens von ccRCC-Patienten mit der CD68-Dichte (PFS einer IO-Therapie, Kaplan-Meier Überlebenskurven, CNN-Classifer).

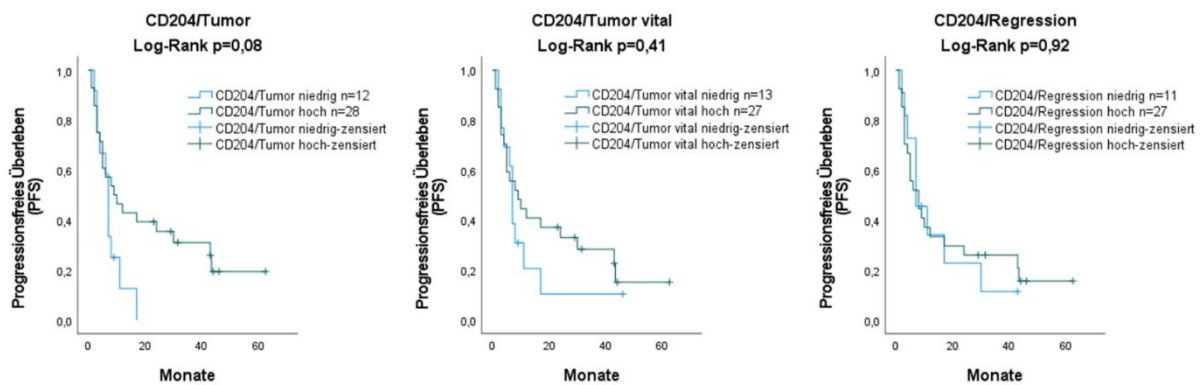


Abbildung S4: Zusammenhang des progressionsfreien Überlebens von ccRCC-Patienten mit der CD204-Dichte (PFS einer IO-Therapie, Kaplan-Meier Überlebenskurven, CNN-Classifer).

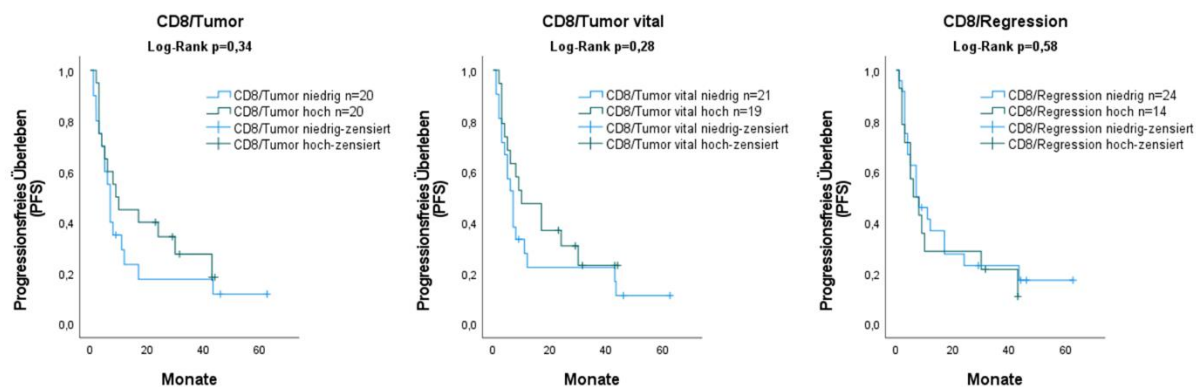


Abbildung S5: Zusammenhang des progressionsfreien Überlebens von ccRCC-Patienten mit der CD8-Dichte (PFS einer IO-Therapie, Kaplan-Meier Überlebenskurven).

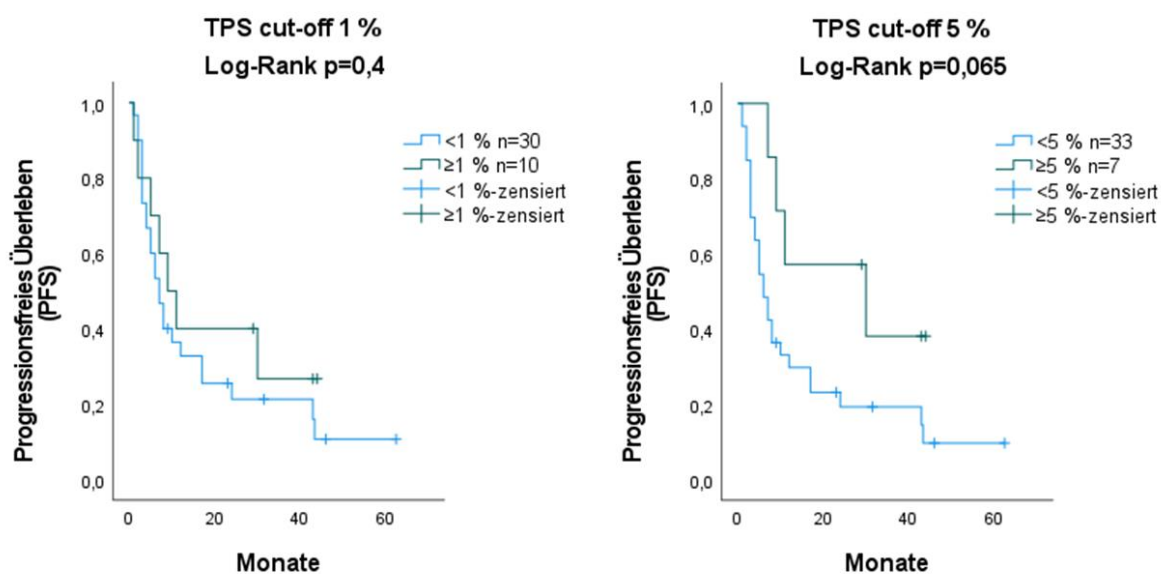


Abbildung S6: Zusammenhang des progressionsfreien Überlebens von ccRCC-Patienten mit der PD-L1-Expression (PFS einer IO-Therapie, Kaplan-Meier Überlebenskurven).

Lebenslauf

Name: Nikolaos Vasileiadis

E-Mail: nikolaos.vasileiadis@hotmail.com

Geburtsdatum: 20.06.1986

Geburtsort: Thessaloniki, Griechenland

Nationalität: griechisch

Berufliche Laufbahn

12.2022 – bisher	Biologe/Wissenschaftlicher Mitarbeiter Durchflusszytometrie/Hämatologie und Onkologie amedes Medizinische Dienstleistungen GmbH Halle (Saale), Deutschland
02.2020 – 01.2022	Biologe/Wissenschaftlicher Mitarbeiter Institut für Pathologie, Bereich Nephropathologie Medizinische Hochschule Hannover Hannover, Deutschland
04.2018 – 01.2020	Biologe/Wissenschaftlicher Mitarbeiter Cytop GmbH Hannover, Deutschland
05.2011 – 09.2011	Praktikum im Bereich Zytogenetik (Karyotyp-Analyse) Praktikum als Biologe im Bereich Zytogenetik Universitätskrankenhaus AHEPA, Thessaloniki, Griechenland

Promotionsstudium

04.2020–07.2024	Abschluss: Doctor rerum naturalium Institut für Pathologie, Bereich Nephropathologie Medizinische Hochschule Hannover Hannover, Deutschland
04.2020–07.2024	Dissertation im Bereich Nephropathologie Thema: „ <i>Präzisierte Diagnostik von Nierentumoren: Einfluss von Immunzellinfiltraten auf Therapieansprechen und Langzeitprognose</i> “.

Masterstudium

04.2015–11.2017	Abschluss: Master of Science in Plant Biotechnology 120 ECTS (Note 1,6) Bestanden am 16.11.2017 Leibniz Universität Hannover Fakultät für Naturwissenschaften Institut für Pflanzengenetik, Abteilung V: Pflanzenproteomik Hannover, Deutschland
01.2017–11.2017	Abschlussarbeit im Bereich Proteinbiochemie - Proteomik Thema: „ <i>In vitro</i> Aktivitäten von elektrophoretisch getrennten Proteinkomplexen und Superkomplexen aus Pflanzen-Mitochondrien“.
10.2016–03.2017	Niedersachsenstipendium
10.2015–09.2016	Deutschlandstipendium

Bachelorstudium

10.2004–03.2011	Abschluss: Bachelor of Science in Biology 240 ECTS (Note 2,9) Bestanden am 21.03.2011 Aristoteles Universität Thessaloniki Fakultät für Naturwissenschaften Abteilung für Biologie Thessaloniki, Griechenland Schwerpunktrichtung: Molekularbiologie, Genetik und Biotechnologie
-----------------	---

Schulbildung

09.2001–06.2004	Abschluss des Allgemeinbildenden Lyzeums (äquivalent zu Abitur) Naturwissenschaftliche Fachrichtung (Note 1,7) Datum der Hochschulzugangsberechtigung: 30.06.2004 18. Allgemeinbildendes Lyzeum, Thessaloniki, Griechenland
-----------------	--

Publikationen

Ester, Oliver & Hörst, Fabian & Seibold, Constantin & Keyl, Julius & Ting, Saskia & **Vasileiadis, Nikolaos** & Schmitz, Jessica & Ivanyi, Philipp & Grünwald, Viktor & Bräsen, Jan & Egger, Jan & Kleesiek, Jens. (2023). *Valuing Vicinity: Memory attention framework for context-based semantic segmentation in histopathology*.

Präsentationen

Nikolaos Vasileiadis, Jessica Schmitz, Melanie Maulhardt, David Christensen, Yvonne Mondorf, Markus A. Kuczyk, Hossein Tezval, Viktor Grünwald, Philipp Ivanyi, Jan Hinrich Bräsen: *Prävalenz von Tumor assoziierten-Makrophagen und Checkpoint-Markern in metastasierten klarzelligen Nierenzellkarzinomen (ccRCC)*.

Virtuelle Pathologietage der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e. V. (08 - 12.06.2021)

Jessica Schmitz, David Christensen, Lena Müller, Lina Neugeboren, Tim Zachrau, **Nikolaos Vasileiadis**, Tilman Johannes, Andreas Plesch, Thomas Lörch, Wilfried Gwinner, Jan Hinrich Bräsen: *Automated renal structure recognition: Multi-class segmentation of differently stained kidney tissues using convolutional neuronal networks (CNNs)*.

33rd European Congress of Pathology (29 - 31.08.2021)

Lars Drüke, Jessica Schmitz, **Nikolaos Vasileiadis**, David Christensen, Melanie Maulhardt, Markus A. Kuczyk, Hossein Tezval, Christopher Darr, Viktor Grünwald, Philipp Ivanyi, Jan Hinrich Bräsen: *CD20 (B cells) and CD47 are predictive biomarkers for response to checkpoint inhibitor therapy in renal cell carcinoma*.

Digital Oncology Conference 2023 (15 - 16.03.2023)

Ort, Datum: _____

Unterschrift: _____

Erklärung gem. § 6 Abs. 2 Nr. 8 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation mit dem Titel *„Präzisierte Diagnostik von Nierentumoren: Einfluss von Immunzellinfiltraten auf Therapieansprechen und Langzeitprognose„*, selbstständig verfasst habe. Bei der Anfertigung wurde folgende Hilfe in Anspruch genommen: Zusammenarbeit mit Herrn David Christensen im Bereich der künstlichen Intelligenz.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation am Institut für Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt.

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Ort, Datum: _____

Unterschrift: _____