

Aus dem Institut für Pathologie
(Prof. Dr. med. P. Ströbel)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Quantifizierung von Entzündungszellen
(„Immuno-Score“) im Knochenmark von
Patienten mit myelodysplastischem
Syndrom (MDS)**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Roya Piria

aus

Teheran

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Prof. Dr. med. P. Ströbel

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. J. Schanze

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. med. P. Ströbel

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. J. Schanze

Drittreferent/in: Prof. Dr. hum. biol. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 09.11.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Quantifizierung von Entzündungszellen („Immuno-Score“) im Knochenmark von Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS)" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Architektur vom Knochenmark und Microenvironment	1
1.2 Hämatopoese.....	3
1.3 Myelodysplastisches Syndrom	5
1.3.1 Epidemiologie	6
1.3.2 Ätiologie	6
1.3.3 Pathogenese und Pathophysiologie	7
1.3.4 Klassifikation	10
1.3.4.1 Klassifikationssysteme zur Diagnosebestimmung	10
1.3.4.2 Klassifikationssysteme zur Prognosebestimmung	11
1.3.5 Klinik	13
1.3.6 Diagnostik	13
1.3.7 Therapie	14
1.4 Immuno-Score Klassifikation für maligne Tumoren.....	15
1.5 Fragestellung.....	20
2 Material und Methode	21
2.1 Patientendaten.....	21
2.2 Ein- und Ausschlusskriterien.....	21
2.3 Zytogenetischer Befund.....	21
2.4 Klinische Datenerfassung	22
2.5 Histologische Präparate.....	22
2.5.1 Materialgewinnung und Herstellung histologischer Präparate	22
2.5.2 Schnittvorbehandlung für Immunhistochemie.....	23
2.5.3 Immunhistochemische Färbungen	23
2.6 Digitalisierung und Morphometrie.....	25
2.6.1 Automatische Segmentierung der Daten zur Gewebedetektion.....	26
2.6.2 Automatische Segmentierung der Daten zur Zellerkennung	27
2.6.3 Manuelle Segmentierung von Daten für die Zellerkennung.....	28
2.6.4 Aufbereitung von Daten für die Optimierung der Boxplatzierung und Boxgröße	28
2.7 Software	29
2.7.1 MatConvNet.....	29

2.7.2 Berechnungen, Statistiken und Grafiken	29
2.8 CNN-Training	29
2.8.1 Gewebedetektion CNN.....	29
2.8.2 Zelldetektion CNN.....	30
2.8.3 Boxgröße und Shift-Optimierung CNN.....	30
2.8.4 Fleckenerkennung CNN.....	30
2.9 Vergleich und Validierung der Ergebnisse.....	31
3 Ergebnisse.....	32
3.1 Patientenkollektiv.....	32
3.2 Einteilung nach WHO-Klassifikation.....	32
3.3 Infiltrationsmuster	33
3.4 IPSS-R Klassifikation.....	34
3.5 Clusteranalyse in der WHO Klassifikation.....	37
4 Diskussion.....	39
4.1 Vergleich der Ergebnisse mit anderen Arbeiten.....	39
4.1.1 Immuno-Score	39
4.1.2 Diskussion der Methodik	43
4.2 Limitation der Arbeit.....	45
4.2.1 Patientenkollektiv.....	45
4.2.2 IPSS-R und WHO-Klassifikation	46
4.2.3 Molekulare Veränderungen	47
4.2.4 Alternative Methodik	47
4.2.5 Technische Limitation.....	48
5 Zusammenfassung.....	49
6 Literaturverzeichnis	50

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der HSZ-Nische im Microenvironment des Knochenmark.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hämatopoese	5
Abbildung 3: Potenzielle Knochenmarksuppression durch T-Zellen.....	9
Abbildung 4: Definition und Methodologie des Immuno-Scores	19
Abbildung 5: Darstellung des Arbeitstools im Omero-Webclient.....	26
Abbildung 6: Darstellung der ROIs auf der Omero-Webclient Site.....	27
Abbildung 7: Verteilung der MDS-Diagnosen nach WHO Klassifikation.....	33
Abbildung 8: Verteilung der Zelltypen in intratrabekulären, peritrabekulären und perivaskulären Bereich des Knochenmarks, die sogenannten ROIs.	34
Abbildung 9: IPSS-R Risikogruppen im Gesamtkollektiv	35
Abbildung 10: Zusammenhang zwischen IPSS-R Risikogruppen und MDS-Subtyp nach WHO- Klassifikation.....	35
Abbildung 11: Immunhistochemische Verteilung der Zelltypen in IPSS-R Risikogruppen.....	36
Abbildung 12: Clusteranalyse und Homogenität-Darstellung der einzelnen Zellen in der IPSS-R- Risikogruppen	37
Abbildung 13: Relation der einzelnen immunhistochemisch gefärbten Zellen innerhalb der WHO- Klassifikationen zur Gesamtheit der Zellarten	38
Abbildung 14: Clusteranalyse der einzelnen immunhistochemisch gefärbten Zellen innerhalb der WHO-Klassifikationen.....	38

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kriterien des IPSS-R.....	12
Tabelle 2: Definition von WPSS.....	13
Tabelle 3: Erstellung des Immuno-Score anhand der Immunzellinfiltration.....	18
Tabelle 4: Vereinfachte Darstellung des Immuno-Scores.....	18
Tabelle 5: Immunhistochemische Marker	25

Abkürzungsverzeichnis

AJCC / UICC	American Joint Committee on Cancer/Union Internationale Contre le Cancer
AML	akute myeloische Leukämie
ANGPT1	Angio-Protein 1
CAW	<i>compared to a manually drawn truth</i>
CLP	<i>common lymphoid Progenitorcells</i>
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
CMP	<i>common myeloid Progenitorcells</i>
CT	<i>core of the tumour</i>
CTLA4	<i>T lymphocyte-associated antigen 4</i>
FAB	<i>french-american-british</i>
FISH	Floureszenz-in-situ-Hybridisierung
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GMP	Granulozyten/Monozyten Progenitorzellen
Hi	<i>high</i>
HIER	Hitze induziertes Epitopretrivel
HSZ	hämatopoetische Stammzellen
ICD	International Classification of Diseases
IFN- γ	Interferon-gamma
IM	<i>invasive margin</i>
IPSS	<i>International Prognostic Scoring System</i>
IPSS-R	<i>International Prognostic Scoring Sytem (Revised)</i>
ITL	intratumorale Lymphozyten
LDH	<i>Lactat-Dehydrogenase</i>
Lo	<i>low</i>
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MDS/MPS	myeloproliferative/ myelodysplastische Neoplasien
MDS-EB	<i>MDS with excess of blasts</i>
MDS-MLD	<i>MDS with multilineage dysplasia</i>
MDS-SLD	<i>MDS with single lineage dysplasia</i>
MEP	Megakaryozyten/Erythrozyten Progenitorzellen
MSPZ	mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen
MSZ	mesenchymale Stammzelle

NA	keine Angabe
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NK	<i>natural killer cells</i>
OR	<i>odds ratio</i>
PD-L1	<i>programmed death ligand-1</i>
PF4	<i>Platelet factor 4</i>
PNH	paroxysmale nächtliche Hämaturie
RA	refraktäre Anämie
RAEB	refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss, refraktäre Anämie und Blastenexzess
RAEB-T	refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss in Transformation
RARS	refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
RCMD	<i>refractory cytopenia with multi lineage dysplasia</i>
RCUD	<i>refractory cytopenia with unilineage dysplasia</i>
ROI	<i>regions of interest</i>
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
SITC	Society of Immunotherapy of Cancer
SZF	Stammzellfaktor
TCR	T-Zell Rezeptor
TGF-1	<i>Transforming growth faktor beta-1</i>
t-MDS	therapie-assoziiertes MDS
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TPO	Thrombopoetin
WHO	World Health Organization
WPSS	<i>WHO Prognostic Scoring System</i>
WSI	<i>whole slide images</i>

1 Einleitung

Das myelodysplastische Syndrom (MDS) gilt als eine Erkrankung mit pathophysiologisch komplexen Vorgängen sowie einer umfangreichen und interdisziplinären Diagnostik, welche vor allem im höheren Alter auftritt. Das MDS ist eine heterogene klonale Erkrankung von hämatopoetischen Stammzellen (Janssen et al. 1989). Sowohl Hyperzellularität und Zelldysplasie im Knochenmark, als auch Mono-, Bi- oder Panzytopenien im peripheren Blut spiegeln die qualitativen und quantitativen Veränderungen der Hämatopoese wieder.

Es wird angenommen, dass eine hämatopoetische Stammzelle (HSZ) mit der Fähigkeit, sich in Blutplättchen, Erythrozyten, Monozyten und Granulozyten zu differenzieren ursächlich betroffen scheint, wobei die Verantwortung der ineffektiven Hämatopoese der vermehrten Apoptose reifer Knochenmarkzellen zugeschrieben wird (Pecci et al. 2003).

Im Rahmen dieser Dissertation werden die Strukturen (Microenvironment) bzw. die Immunzellen, die sich im Knochenmark von diesen Patienten befinden, unter die Lupe genommen, um die diagnostisch sowie prognostisch relevanten Faktoren für die Therapie der Patienten zu untersuchen. Im Folgeabschnitt werden sowohl die Hintergründe, als auch die Zielsetzung der Arbeit ausgeführt. In der Einleitung wird zunächst die funktionelle Anatomie des Knochenmarks beschrieben. Anschließend werden die Hintergründe über die Entstehung, Untersuchung und Behandlung des MDS erläutert.

1.1 Architektur vom Knochenmark und Microenvironment

Das adulte Knochenmark besteht aus den hämatopoetischen Zellreihen, verschiedenen Anteilen an Fettzellen, Osteoblasten, Knochentrabekeln sowie vaskulären Komponenten. Das Knochenmark befindet sich in den die Substantia spongiosa betreffenden Anteilen des Skeletts. Die sogenannten Trabekel (aus mineralisiertem Kollagen bestehende Bälkchen) bilden die schwammartige Grundstruktur spongiöser Knochen. Zwischen den Trabekeln befinden sich weitläufig die übrigen Knochenmarksbestandteile.

Das Parenchym ist sehr stark vaskulisiert. In ihm befinden sich in den zentralen Markräumen Strukturen aus weitlumigen Blutgefäße. Das System ist als Schnittstelle zwischen venösem und arteriellem Gefäßsystem ähnlich derer von Kapillaren in anderen Geweben. Besonders ist dabei jedoch, dass sich lumenseitig die Wand der Sinusoiden aus einem einreihigen, flachen Endothel, einer nicht durchgängigen Basalmembran und außen aus einer fragmentarischen Hülle von

Retikulum-Zellen zusammensetzt (Adventitia-Zellen). Die Sinusoide, als ein geschlossenes funktionales System, stellen die Blut-Knochenmark-Schranke dar (Porwit et al. 2011).

Eine Fehlfunktion in diesem geschlossenen System (bspw. durch das Austreten von unreifen Vorstufen in das periphere Blut) zählt dabei als ein gemeinsames Merkmal vieler hämatologischer Erkrankungen. Dieses Merkmal trifft unter anderem auch auf das MDS zu.

Das Konzept des Microenvironments wurde erstmalig in 1978 durch Schofield vorgestellt. Seine Theorie besagt, dass die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen für ihre Funktion und Bedeutung an eine anatomische und regulatorische Umgebung gebunden sind (Schofield 1978).

Das Knochenmark wird anhand des Microenvironments, das in Abbildung 1 dargestellt ist, in zelluläre und nicht-zelluläre Elemente unterteilt. Unter den zellulären Elementen werden die hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen verstanden. Die hämatopoetischen Zellen werden von den verschiedenen Reifungsstufen der weißen und roten Zellreihe und Megakaryozyten, sowie T- und B-Zellen repräsentiert. Unter die nicht-hämatopoetischen Zellen zählen die mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ), Osteoprogenitoren, Osteozyten, Endothelzellen, Adipozyten, sympathische Nervenfasern und nicht-myelinisierte Schwannzellen. Zu den nicht-zellulären Elementen gehören die extrazelluläre Matrix, Proteine wie Kollagen, Fibronectin, Laminin und Hyaluronsäure (Schroeder et al. 2016).

Die hämatopoetischen Stammzellen existieren innerhalb dieses komplexen und dynamischen Microenvironments. Durch multiple zelluläre und molekulare Interaktionen bzw. Regulationen findet die Hämatopoese unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen statt. Für die Aufrechterhaltung der Hämatopoese sind die Interaktionen zwischen HSZ, Progenitorzellen, Mesenchymalzellen, Stromalzellen und Cytokine im Microenvironment von großer Bedeutung (Rankin et al. 2015).

Die Kommunikation der HSZ und des Microenvironments erfolgt durch sekretorische Faktoren, wie Stammzellfaktor (SZF), *Transforming growth Factor beta-1* (TGF-1), *Platelet factor 4* (PF4 oder CXCL4), Angio-Protein 1 (ANGPT1) und Thrombopoetin (TPO). Chemokine, Cytokine, sympathische Nervenfasern und der Sauerstoffdruck spielen zusätzlich dazu eine wesentliche Rolle.

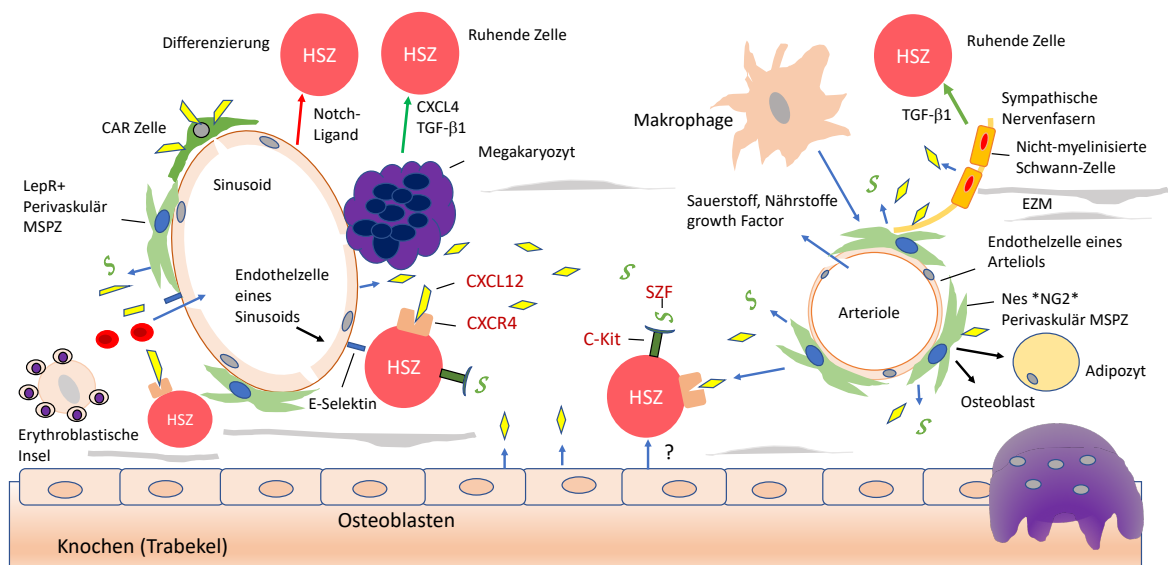


Abbildung 1: Darstellung der HSZ-Nische im Microenvironment des Knochenmarks. HSZ: hämatopoetische Stammzelle, MSPZ: mesenchymale Stamm- und Progenitorzelle, SZF: Stammzellfaktor, TGF- β 1: *Transforming growth Factor- beta-1*, CXCL4: *Platelet factor 4*, EZM: extrazellulär Matrix, Nes: Nestin, LepR+: Leptin-Rezeptor, CAR Zelle: CXCL12 abundant Retikularzelle, NG2: *Neuron/glia Antigen 2*, CXCR4: CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, CXCL12: CXC-Motiv-Chemokin 12, Quelle: Modifiziert nach Schroeder et al. (2016)

1.2 Hämatopoese

Die Hämatopoese, d.h. die Blutbildung, ist ein unentbehrlicher physiologischer Vorgang. Aus der von Natur aus begrenzten Lebensdauer der unterschiedlichen Blutzellen (Thrombozyten, Leukozyten, Erythrozyten) ergibt sich die Notwendigkeit der regelmäßigen Neubildung dieser, was zusätzlich zur Sicherstellung einer ausreichenden Menge der genannten Zellen im Blutkreislauf führt. Die Hämatopoese findet bei Erwachsenen im Knochenmark statt. Als Grundlage für die Einschätzung von Proben mit MDS-Verdacht bilden Physiologie-Kenntnisse und die der Anatomie eben jener gestörten Gewebeproben einen erheblichen Erfolgsfaktor. Diese Themenbereiche werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

Die reifen und unreifen Stufen der Hämatopoese befinden sich im Extravasalraum zwischen den Sinusoiden und der Spongiosa des Knochens. Bei der Hämatopoese und der Entwicklung der Blutzellen herrscht eine Hierarchie. Die pluripotenten HSZ mit Selbsterneuerungs- und Differenzierungsfähigkeit sind die Ausgangspunkte für die Hämatopoese. Zu Beginn bilden sich zwei große Gruppen von multipotenten Progenitorzellen: die *common myeloid progenitor* (CMP)-

Zellen und die *common lymphoid progenitor* (CLP)-Zellen, welche in der Abbildung 2 dargestellt sind (Porwit et al. 2011).

Im Verlauf entwickeln sich die CLP-Zellen zu T (Thymus)-, B (*Bursa fabricii*)- und NK (*natural killer*)-Zellen. Während die T-Zellen früh in den Thymus auswandern, verbleiben und differenzieren die B-Zellen im Knochenmark. Die finale immunologische Ausreifung von T-Zellen findet in lymphatischen peripheren Organen, wie Milz, Lymphknoten oder Mukosa-assoziiertem lymphatischen Gewebe (MALT) statt.

Der Großteil der myeloischen Ausreifung findet jedoch im Knochenmark statt. Nach dem CMP folgt die Granulozyten/Monozyten Progenitorzelle (GMP) und die Megakaryozyten/Erythrozyten Progenitorzelle (MEP). Aus der GMP entwickeln sich im Verlauf neutrophile, eosinophile, basophile, dendritische sowie monozytäre Vorläuferstufen, welche zu den entsprechenden peripheren Blutzellen heranreifen. Aus der MEP-Zelle folgt die Entstehung der erythrozytäre Blutreihe und der Megakaryozyten.

Die Sicherstellung der kontinuierlichen und an den Bedarf angepassten Versorgung mit Blutzellen wird folglich durch die Hämatopoese gewährleistet. Eine Über- oder Unterversorgung an Blutzellen hat indes umfangreiche Folgen, die den Sauerstofftransport und die Immunabwehr negativ beeinflussen. Die Anzahl der Zellen zeigt unter physiologischen Bedingungen eine konstante Menge. In Belastungssituationen, wie zum Beispiel während einer Infektion, steigt die Zellzahl in der Peripherie. Die Steuerung erfolgt abhängig vom Zelltyp durch eine Vielzahl von Mechanismen. Dafür spielen Hormone wie Erythropoetin und Thrombopoetin, die aus der Leber und Niere stammen, sowie Zyto- und Chemokine, die sich im Knochenmark-Microenvironment befinden, eine Rolle. Die Hauptregulatoren im Microenvironment sind *granulocyte-colony-stimulating factor* (G-CSF) oder Interleukine, die von Fibroblasten sowie Endothezellen gebildet werden (Porwit et al. 2011).

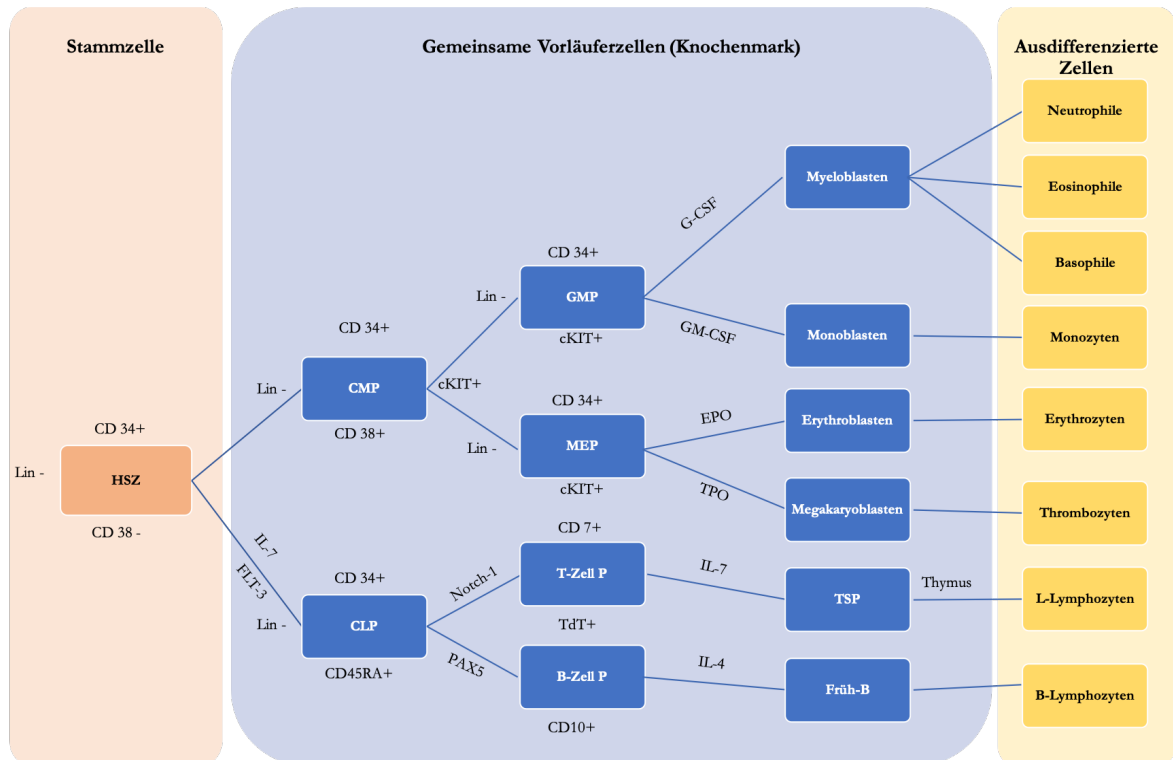


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hämatopoese

Dargestellt wird die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen zu ausgereiften Blutzellen. B-cell P, B-Precursorzelle; CLP, gemeinsame lymphatische Progenitorzelle; CMP, gemeinsame myelotische Progenitor; GMP, Granulozyten-Makrophagen Progenitorzelle; HSC, hämatopoetische Stammszelle; MEP, Megakaryozyten-Erythrozyten Progenitorzelle; T-cell P, T-Precursorzelle; TSP, Thymus-Progenitorzelle. Quelle: Modifiziert nach Porwit et al. (2011)

1.3 Myelodysplastisches Syndrom

Wie im Abschnitt 1.1 bereits erläutert, handelt es sich bei MDS um eine klonale Erkrankung der HSZ, die durch Dysplasien von Blut- und Knochenmarkzellen mit hämatopoetischer Insuffizienz und erhöhtem Risiko der Entwicklung einer akuten myeloischen Leukämie (AML) gekennzeichnet ist (Glenthøj et al. 2016). Therapieassoziiertes MDS kann nach vorangegangener Chemo- und/oder Strahlentherapie auftreten. In ca. 90 % der Fälle lässt sich eine Noxe nicht sicher nachweisen. Für die Diagnostik von MDS sind Zytopenien eine “conditio sine qua non” (Arber et al. 2016). In den meisten Fällen handelt es sich dabei um eine Anämie, in manchen Fällen zudem auch eine Bi- oder Panzytopenie. Oftmals zeigt sich das Knochenmark normo- oder hyperzellulär, in etwa 10 % der Fälle zeigt es sich hypozellulär. Dysplasiezeichen von einer oder von mehreren Zellreihen sind dabei für die Diagnose wegweisend. Für eine MDS-Diagnose ist es unerlässlich, dass eindeutige Zeichen einer Dysplasie bei mindestens 10 % der Zellen einer Reihe vorhanden sind (Arber et al. 2016).

1.3.1 Epidemiologie

MDS zählen mit einer Inzidenz von ca. 4-5/100.000 Einwohnern pro Jahr zu den häufigsten malignen hämatologischen Erkrankungen. Im Alter von über 70 Jahren steigt die Inzidenz auf >30/100.000 an. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei ungefähr 75 Jahren. Insgesamt sind Frauen nicht so oft betroffen wie Männer (Neukirchen et al. 2011).

Die letzten Ergebnisse der *National Cancer Institute Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) von 2007 bis 2011 haben gezeigt, dass die altersabhängige Inzidenz bei 4.9/100.000 Einwohner pro Jahr liegt. Die Rate bei den Patienten zwischen 65 bis 69 Jahren beträgt 13.5/100.000, und bei Patienten über 85 Jahren liegt die Rate bei 63.6/100.000 (Cogle 2015).

Trotz dieser Daten ist die altersabhängige Inzidenz von MDS unterdiagnostiziert und genaue Kennzahlen sind schwer zu erfassen. Viele Fälle von MDS sind auf Grund der falschen Einschätzung der Malignität nicht im Krebsregister aufgenommen worden. Seit der 10. Version der *international Classification of Diseases* (ICD-10) ist das MDS als eine Neoplasie eingestuft, was die Aufklärung erleichterte (Cogle 2015).

1.3.2 Ätiologie

Mehrere Einzelfaktoren, die allein oder in Kombination die Entwicklung eines MDS begünstigen sollen, sind bekannt. Unterschiedliche Faktoren wurden erkannt, welche eine Assoziation mit der Erkrankung aufweisen, bzw. mit einem erhöhten Auftreten der Erkrankung verbunden werden. Diese werden im Folgenden kurz beschrieben. Ätiologisch werden primäre Formen der MDS von den sekundären Formen unterschieden.

In der Mehrheit der Fälle (90 %) treten MDS primär auf. Molekular finden sich häufig numerische und strukturelle chromosomale wie Verluste der Chromosomen 5 und 7, und Punktmutationen in Genen des Splicingapparats, epigenetischen Regulatoren und Transkriptionsfaktoren. In 90 % der Fälle von MDS lässt sich mindestens eine der bekannten Mutationen nachweisen (Haferlach et al. 2014). Diese sind allerdings nicht pathognomonisch und beweisen nicht allein die Diagnose von MDS. Sie unterstreichen jedoch dessen klonalen Charakter. Andererseits sind Veränderungen im Microenvironment ebenfalls eine Ursache für die Entstehung von primären MDS. Immundysregulationen im Knochenmark und Stresssignale wie TNF und Fas, die zu einer Apoptose im Knochenmark von Patienten mit MDS führen, können auch eine Rolle in der Entstehung spielen (Glenthøj et al. 2016).

Erworbene Risikofaktoren wie mutagene Faktoren (Radiochemotherapie, Zigarettenrauch, Arbeits- und Umweltgifte) oder Folgeerscheinungen bestehender Erkrankungen (rheumatischer Formenkreis, aplastische Anämie, Adipositas) begünstigen die Entstehung eines MDS. Im Anschluss an Radio-, Chemo-, oder kombinierter Radiochemo- und Hochdosis-Chemotherapie mit Stammzelltransplantation tritt MDS häufiger auf (Sekeres 2010).

Außerdem ist bei bestimmten Stammzellerkrankungen eine erhöhte Rate für MDS zu beobachten. So ist z.B. im Zuge einer aplastischen Anämie eine erhöhte Rate festzustellen. In unterschiedlichen Studien lag die Progress-Rate bei 1,7 % bis 57 % (Afable et al. 2011). Ähnliches wurde auch bei paroxysmaler nächtlicher Hämaturie (PNH) und MDS festgestellt. Dabei war bei ungefähr 20 % der Patienten mit MDS mit niedrigem Risiko das für PNH typische defekte GPI-Ankerprotein nachgewiesen worden (Sugimori et al. 2009). Neben den assoziierten hämatologischen Erkrankungen wird durch umfangreiche epidemiologische Arbeiten eine Assoziation für das Vorkommen von MDS bei festgestellten Autoimmunerkrankungen (rheumatoide Arthritis, Polymyalgia Rheumatica sowie perniziöse Anämie) beobachtet. Die Studien ergaben eine odds ratio (OR) von 1.5 bis 3.5 (Glenthøj et al. 2016; Anderson et al. 2009).

Ein weiterer nennenswerter Faktor ist das therapie-assoziierte MDS (*therapy-related MDS*). Dazu gehören Immunsuppressiva wie Methotrexat, Azathioprin, oder Cyclophosphamid. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum MDS gehäuft bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen, die sich unter immunsuppressiver Therapie befinden, auftritt (Anderson et al. 2009).

1.3.3 Pathogenese und Pathophysiologie

Wie es genau zu der Genese des myelodysplastischen Syndroms kommt, ist bislang nicht vollumfänglich ergründet worden. In der jüngeren Vergangenheit konnten dennoch verschiedene Mechanismen aufgedeckt werden, die bei der Pathogenese beteiligt sind. So werden im Folgenden als Bestandteile der Genese von MDS die ineffektive Hämatopoese, somatische Genmutationen, Haploinsuffizienz, das Immunsystem, Immunsystemmanipulationen durch Immunsuppressiva und das Microenvironment des Knochenmarks betrachtet. Bedeutend hierfür sind die Immunregulationen und die Immunzellen im Knochenmark, auf die nachstehend eingegangen wird.

Die ineffektive Hämatopoese gilt schon seit längerem als zentraler Aspekt beim MDS. Die Theorie besagt, dass die HSZ die Fähigkeit zur Ausdifferenzierung verlieren. Die HSZ zeigen eine Veränderung im Nukleus und Zytoplasma. Aus diesen abnormalen Zellen entstehen keine Tochterzellen und die HSZ sterben vermehrt ab (Apoptose) (Corey et al. 2007). Die

mesenchymalen Stammzellen (MSZ), die normalerweise die CD34⁺ HSZ funktionell und zytogenetisch bei der Hämatopoese unterstützen, zeigen bei MDS auch eine gestörte Funktion (Flores-Figueroa et al. 2012). Flores-Figueroa et al. konnten darstellen, dass die perivaskulären MSZ im Knochenmark von MDS Patienten vermehrt expandiert sind und zusätzlich Mediatoren wie CXCL12 ausschütten. Dies führt dazu, dass der physiologische Kontakt zwischen den MSZ und den HSZ gestört ist.

Unter Haploinsuffizienz versteht man den Verlust eines Allels eines Gens, welcher zu einer verminderten Gen-Expression führt (Adès et al. 2014). Bei MDS wird dabei zwischen verschiedenen Formen wie del(5q), del(7q) oder del(20q) unterschieden. Die Relevanz von Haploinsuffizienz bei MDS kann am Beispiel der del(5q) genauer erläutert werden. Eine Deletion von Chromosom 5q wird in 15 % bei *de novo* und in 40 % bei *therapy-related MDS* gesehen (Thirman and Larson 1996). Bei MDS sind zwei Hauptregionen an Chromosom 5q betroffen (5q33 oder 5q31). Eine isolierte Deletion von 5q bei MDS Patienten wird als 5q-Syndrom bezeichnet, welches durch ein niedriges Risiko für einen AML-Übergang gekennzeichnet ist. Dabei besteht ein Verlust der Region 5q33. Diese Form zeigt eine bessere Prognose im Verlauf der Erkrankung und ein hohes Ansprechen bei einer Therapie mit Lenalinomid. Dagegen sind größere Verluste auf Chromosom 5q, die sowohl 5q33 als auch 5q31 betreffen, mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Li et al. 2017).

Somatische Genmutationen wie numerische, strukturelle und chromosomale Aberrationen lassen sich bei 50 % der MDS Patienten nachweisen (Corey et al. 2007). Durch molekulargenetische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es sich um Punktmutationen in Genen des RNA-Splicingapparats (*SF3B1*, *SRSF2*, *ZRSR2*, *U2AF1*), epigenetische Regulatoren (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *IDH1/2*, *EZH2*) und Transkriptionsfaktoren (*RUNX1*, *TP53*, *ETV6*, *NPM1*, *CEBP-alpha*, *GATA2*) handelt. Punktmutationen im Splicingapparat und in epigenetischen Regulatoren machen den Großteil von Mutationen dieser Art aus (Kim et al. 2015; Treppendahl et al. 2014). In 90 % der Fälle von MDS lässt sich mindestens eine der bekannten Mutationen nachweisen (Haferlach et al. 2014). Mutationen im Gen *SF3B1* sind stark mit MDS mit Ringsideroblasten assoziiert und zeigen eine gute Prognose. Dagegen sind Mutationen in *SRSF2* und *U2AF1* mit *MDS with multi lineage dysplasia (MDS-MLD)* und MDS mit Blastenexzess (MDS-EB) assoziiert und werden gehäuft bei Hoch-Risiko MDS beobachtet (Aslan et al. 2016).

Das Immunsystem und die Immundysregulation für die Erklärung der MDS-Pathogenese wurden in den letzten Jahren intensiv diskutiert und untersucht. Apoptose ist das Markenzeichen bei Niedrig-Risiko MDS und kann auf eine gestörte T-Zell-Reaktion und eine angeborene Immunaktivierung zurückgeführt werden (Gañán-Gómez et al. 2015). Die naiven CD3⁺ T-Zellen

zeigen bei MDS ein deutlich geringeres Proliferationspotential. Regulatorische $CD4^+$ T-Zellen nehmen eine zentrale Rolle ein. Ihnen obliegt physiologisch die Verhinderung einer überschießenden immunologischen Reaktion (Autoimmunität). Es wurde beobachtet, dass für das myelodysplastische Syndrom mehrere negative Prognosefaktoren bei einer erhöhten Anzahl von $CD4^+$ T-Zellen verbunden sind (Kordasti et al. 2007). Über 90 % der MDS-Patienten besitzen oligoklonale T-Zellen, die meistens aus dem malignen MDS-Klon stammen (Vercauteren et al. 2012). *In-vitro* Studien haben gezeigt, dass autologe T-Zellen sowohl die maligne als auch die nicht-maligne Hämatopoese hemmen. Dies kann durch $CD8^+$ T-Zellen vermittelt werden, die an MHC-Klasse-I Moleküle der HSZ binden (Abbildung 3).

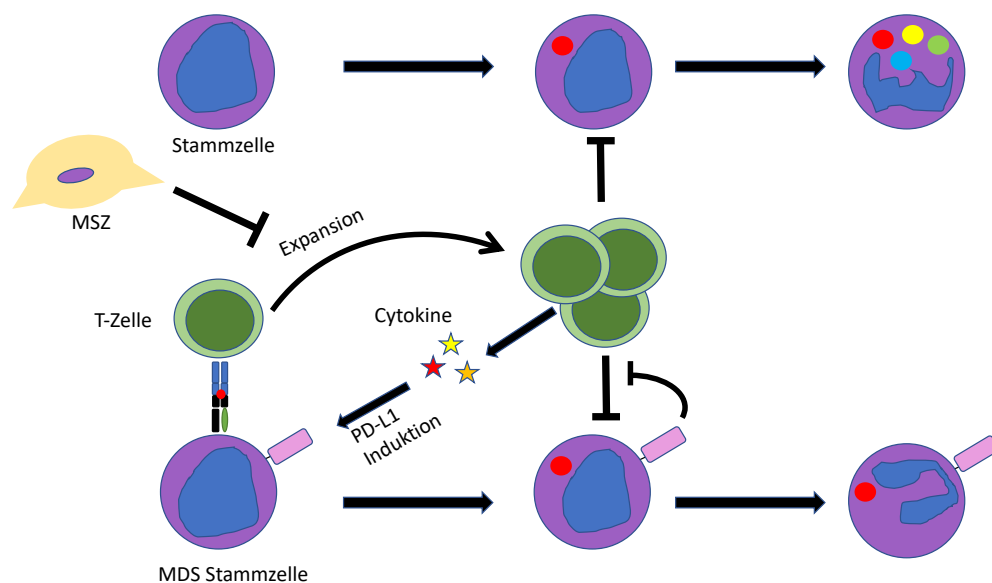


Abbildung 3: Potenzielle Knochenmarksuppression durch T-Zellen. MSZ: mesenchymale Stammzelle, PD-L1: *programmed death ligand-1* Quelle: modifizierte Darstellung nach Glenthøj et al. (2016)

$CD8^+$ T-Zellen schütten proinflammatorische Faktoren wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Interferon-gamma (IFN)- γ in das Knochenmark aus. Diese Zytokine können im Microenvironment des Knochenmarks sowohl die Hämatopoese verhindern, als auch *programmed death ligand 1* (PD-L1) auf Tumorzellen induzieren, wodurch die Tumor-Surveillance gehemmt wird. Normalerweise unterdrücken MSZ durch parakrine und zelluläre Interaktion die Aktivierung von T-Zellen im Knochenmark. Diese Mechanismen können jedoch beim MDS ausfallen (Yang et al. 2014; Medyouf et al. 2014). In letzter Zeit haben T-Zell-Suppressoren wie PD-L1 und *T lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA4) in der Onkologie eine große Aufmerksamkeit auf sich gezogen

(Postow et al. 2015). Bei MDS scheinen diese allerdings eine aktive Rolle bei der Flucht vor der Tumor-Surveillance und bei der Therapieresistenz zu spielen (Ørskov et al. 2015).

Wie der voranstehende Abschnitt zu den unterschiedlichen Faktoren der Pathogenese von MDS beweist, sind diese Einflussfaktoren vielfältig und schwierig einzuordnen, wenn die Prognose oder die Therapie eines MDS-Patienten bestimmt werden sollen.

1.3.4 Klassifikation

Für die Diagnostik und Prognose von MDS werden verschiedene Klassifikationen und Scores verwendet. Um die Erkrankung einerseits richtig zu diagnostizieren und andererseits entsprechend der Subtypen des MDS mit effektiver Therapie zu behandeln, sind die aktuellen Klassifikationen und Scores eine große Hilfe. Nur so können die Patienten eine entsprechend vielversprechende Therapie bekommen.

Zu den verschiedenen Klassifikationen für die Diagnosestellung gehören die WHO- oder die FAB-Klassifikation. Diese verwenden morphologische Faktoren. Für die Prognoseschätzung und zur Therapiestratifizierung werden IPSS oder WPSS angewandt.

1.3.4.1 Klassifikationssysteme zur Diagnosebestimmung

Bereits in den 1980er Jahren haben verschiedene französische, amerikanische und britische Ärzte und Wissenschaftler gemeinsam die sogenannte FAB-Klassifikation (*french-american-british*) entwickelt. Die Einteilung basiert vor allem auf dem Anteil unreifer Zellen (Blasten) im Knochenmark. Bei gesunden Menschen liegt dieser bei unter 2 %, bei MDS zwischen 2 % und 19 %. Ab einem Blastenanteil von 20 % spricht man per Definition von einer akuten Leukämie (Bennett et al. 1976). Die überarbeitete FAB-Klassifikation von 1982 unterscheidet fünf MDS-Subtypen: Refraktäre Anämie (RA), Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS), Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss (RAEB), Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss in Transformation (RAEB-T) sowie Chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) (Bennett et al. 1982).

Im Jahr 2001 wurden mit Einführung der WHO-Klassifikation myeloider Neoplasien und akuter Leukämie und ihren Überarbeitungen von 2008 und 2016 verschiedene Änderungen umgesetzt (Swerdlow et al. 2008; Arber et al. 2016). Die Zytopenie ist eine „unabdingbare Voraussetzung“ für jede MDS-Diagnose. In vergangenen WHO-Klassifikationen (2001 und 2008) enthielt die MDS-Nomenklatur Verweise auf „Zytopenien“ oder auf bestimmte Zytopenie-Arten (z.B. „refraktäre Anämie“). Die CMML ist der Gruppe myeloproliferativer/myelodysplastischer

Neoplasien (MDS/MPS) zugeteilt worden. Die RAEB-T zugehörigen Patienten mit Blasten > 20 % werden heutzutage als AML eingestuft und die RAEB-Gruppe wird in zwei Subtypen unterteilt (RAEB-1 und RAEB-2). Ebenso eingeführt wurde die Gruppe der *refractory cytopenia with multilineage dysplasia* (RCMD) für Betroffene mit dysplastischen Veränderung in zwei oder mehr Reihen. Die Gruppe der Patienten mit dysplastischen Veränderungen in nur einer Zellreihe werden in die RCUD-Kategorie (*refractory cytopenia with unilineage dysplasia*) eingeordnet (Swerdlow et al. 2008).

Die WHO-Klassifizierung aus dem Jahr 2016 stützt sich jedoch hauptsächlich auf den Grad der Dysplasie und der Blasten für die Klassifizierung von Krankheiten. Spezifische Zytopenien haben nur einen geringen Einfluss auf die MDS-Klassifizierung. Darüber hinaus korrelieren die Zellreihen, die eine signifikante morphologische Dysplasie aufweisen, häufig nicht mit der spezifischen Zytopenie in den einzelnen MDS-Fällen. Aus diesen Gründen hat sich die Terminologie für MDS bei Erwachsenen geändert. Begriffe wie „refraktäre Anämie“ und „refraktäre Zytopenie“ wurden entfernt und durch „MDS mit ...“, gefolgt von den entsprechenden Modifizierungsmitteln ersetzt: Dysplasie mit einer oder mehreren Zellreihen, Ringsideroblasten, übermäßigen Blasten oder der del (5q) zytogenetischen Anomalie. Aus *refractory cytopenia with unilineage dysplasia* (RCUD) wurde so *MDS with single lineage dysplasia* (MDS-SLD), aus RCMD wurde *MDS with multilineage dysplasia* (MDS-MLD) und aus RAEB wurde *MDS with excess of blasts* (MDS-EB), das in Typ 1 und Typ 2 unterteilt wird. Es gibt keine Änderungen an MDS in der Kindheit; die refraktäre Zytopenie der Kindheit bleibt als vorläufige Entität in dieser Kategorie (Arber et al. 2016).

1.3.4.2 Klassifikationssysteme zur Prognosebestimmung

Der natürliche Krankheitsverlauf und die Prognose von Patienten mit MDS hängt im Wesentlichen von krankheitsassoziierten Parametern wie der Anzahl der Knochenmarkblasten, der chromosomalen Aberrationen und des Ausmaßes der hämatopoetischen Insuffizienz sowie der Zellumsatzrate (LDH) ab. Diese Parameter sind mit der Überlebenswahrscheinlichkeit und dem Risiko des Krankheitsprogresses zur akuten Leukämie assoziiert. Prognose-Scores, wie das *WHO Prognostic Scoring System* (WPSS) und das *International Prognostic Scoring System* (IPSS), welche am gebräuchlichsten sind, kombinieren Prognoseparameter mit dem Ziel, Niedrigrisiko-Patienten, bei denen ein abwartendes Verhalten empfohlen ist, und Hochrisiko-Patienten, die soweit möglich einer intensiveren Therapie einschließlich einer Blutstammzelltransplantation unterzogen werden sollten, möglichst sicher zu identifizieren. Beim IPSS wurden bezüglich der Prognose folgende Kriterien miteinbezogen: die Karyotypanomalien, die hämatopoetische

Insuffizienz anhand der Anzahl an Zytopenien sowie der medulläre Blastenanteil (Greenberg et al. 1997). Aus diesen Ergebnissen wurden vier Risikogruppen (*low*, *intermediate-1*, *intermediate-2* und *high*) abgeleitet. Greenberg et al. haben das IPSS im Jahr 2012 überarbeitet. Zu dem überarbeiteten IPSS-R wurden keine neuen Kriterien hinzugefügt. Vielmehr wurden die schon bestehende Kriterien in detaillierten Subtypen beschrieben (Tabelle 1). Dabei wurden die chromosomalen Aberrationen in fünf statt drei Risikokategorien eingeteilt, die Risikogruppen in Abhängigkeit vom Blastenanteil (< 2 %, 3 bis 4 %, 5 bis 9 % und 10 bis 19 %) sowie anhand des Ausmaßes an Thrombozytopenie, Anämie und Granulozytopenie beschrieben (Greenberg et al. 2012).

Tabelle 1: Kriterien des IPSS-R

Score	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Zytogenetisches Risiko	Sehr günstig	–	günstig	–	Intermed.	ungünstig	Sehr ungünstig
Blastenanteil (%)	< 2	–	>2-<5	–	5–10	>10	–
Hämoglobin [g/dl]	>10	–	8-<10	<8	–	–	–
Plättchen (*10 ⁹ /l)	>100	50-<100	<50	–	–	–	–
Neutrophile (*10 ⁹ /l)	>0,8	<0.8	–	–	–	–	–

Quelle: Modifizierte Tabelle nach Greenberg et al. (2012)

Darüber hinaus hat das WPSS neue Erkenntnisse zu den Prognosevariablen geliefert, indem die Abhängigkeit von roten Blutzellen und der zytogenetischen IPSS-Klassifikation sowie die dysplastischen Kategorien der WHO hinzugefügt wurden. Im Vergleich zu den vier vom IPSS definierten Gruppen konnte WPSS fünf Risikogruppen (Tabelle 2) von MDS-Patienten mit unterschiedlichen Überlebenschancen und AML-Risiko identifizieren. Die relevanteste Verbesserung der Prognosefähigkeit wurde bei MDS ohne Blastenvermehrung beobachtet und war hauptsächlich auf die starke Auswirkung der Beteiligung der Zellreihen und der Transfusionsabhängigkeit zurückzuführen (Malcovati et al. 2007). WPSS konnte auch eine Gruppe von Patienten mit einem extrem schlechten Ergebnis identifizieren, obwohl der WHO-Grenzwert für die Definition der AML niedriger war.

Tabelle 2: Definition von WPSS

Score	0	1	2	3
WHO-Subtyp	RA/RARS/del(5q)	RCMD/RCMD-RS	RAEB I	RAEB II
Karyotyp Risk	niedrig	Intermed.	hoch	–
Transfusionsbedarf	keine	regelmäßig	–	–

Quelle: Modifiziert nach Malcovati et al. (2007)

RA: Refraktäre Anämie, RARS: Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten, 5q: MDS mit isolierter Deletion des (5q), RCMD: Refraktäre Cytopenie mit multipler Dysplasie, RCMD-RS: Refraktäre Cytopenie mit multipler Dysplasie und Ringsideroblasten RAEB I: Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss Typ I, RAEB II: Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss Typ II

1.3.5 Klinik

Patienten mit MDS zeigen, je nachdem wie viele Zellreihen (Mono-, Bi- oder Panzytopenie) befallen sind, unspezifische Symptome. Eine Anämie verursacht Müdigkeit, geringere Belastbarkeit und Mangel an Konzentration. Eine Neutropenie führt zu Infektionen, während eine Thrombozytopenie vermehrte Neigung zur Blutung bedingt. Faktoren wie das Alter und externe Einflüsse können anamnestisch erfasst werden und den Verdacht auf MDS verstärken. Ein Niedrig-Risiko MDS wird meistens zufällig während einer Routineuntersuchung erkannt.

1.3.6 Diagnostik

Für die eindeutige Diagnose von MDS sind umfangreiche Untersuchungen von Blut und Knochenmark notwendig, um Dysplasiezeichen zu identifizieren und den Anteil monozytärer Zellen und der Ringsideroblasten zu ermitteln. Zytomorphologisch sollte zudem eine möglichst exakte Bestimmung des Blastengehalts im Knochenmark und im peripheren Blut erfolgen. Unter Berücksichtigung der Vorgaben des IPSS-R (Greenberg et al. 2012) ist eine exakte Angabe des Blastenanteils im Knochenmark unter prognostischen Gesichtspunkten nötig. Eine Feststellung von Mono-, Bi- oder Panzytopenie im peripheren Blut in Verbindung mit dem Blastengehalt im Knochenmark geben Hinweise auf ein myelodysplastisches Syndrom. Insbesondere zytogenetische Veränderungen bestätigen oftmals die MDS-Diagnose, da diese bei mehr als der Hälfte der MDS-Patienten festgestellt werden können (Corey et al. 2007). Daneben können bei Patienten mit Verdacht auf MDS und normalem Karyotyp zusätzliche molekulare

Analysen mit dem sogenannten *Next Generation Sequencing* (NGS) hilfreich sein, um einerseits den klonalen Charakter der Erkrankung zu zeigen und andererseits eine therapeutische Konsequenz aus den gewonnenen Erkenntnissen zu ziehen (Arber et al. 2016). Die Bestimmung von LDH, Ferritin und endogenem Erythropoetinspiegel komplettiert die Basisdiagnostik.

Da sich die verschiedenen Formen von MDS deutlich in ihrem Krankheitsverlauf, der Prognose und dem Ansprechen auf verschiedene Therapien unterscheiden, sind sichere Diagnostikmethoden entscheidend, um einen geeigneten Plan für die Behandlung zu entwickeln.

1.3.7 Therapie

Die Behandlung von MDS basiert auf Erwartungen hinsichtlich der Verträglichkeit der Therapie, der Lebensqualität sowie der Risiken, die durch die Krankheit selbst auferlegt werden (List et al. 2004). MDS bietet eine Reihe von Behandlungsoptionen, um Symptome zu lindern, die Lebensqualität zu verbessern und das Überleben zu sichern. Die Palette an Therapiemöglichkeiten gewährleistet eine eigenständige Anpassung der Behandlung an die individuellen Ziele. Die Therapieziele sind auf die von den IPSS definierte Risikokategorie, die MDS-Subtypen, das Alter und den Leistungsstatus abgestimmt. Die Therapie sollte anhand dieser Ziele optimiert werden. Denn dies bestimmt die Wahrscheinlichkeit, ob eine Behandlung vom Patienten toleriert wird. Die Lebensqualität spielt bei jeder Behandlungsentscheidung eine wichtige Rolle und sollte bei der Diskussion von Optionen mit dem Patienten stark gewichtet werden. Bei MDS mit geringerem Risiko, bei dem das Ziel darin besteht, die Transfusionsabhängigkeit zu reduzieren, die Lebensqualität zu verbessern und das Fortschreiten der Krankheit zu verzögern, umfassen mögliche Behandlungen Wachstumsfaktorunterstützung, immunsuppressive Therapie und Hypomethylierungsmittel. Neuere Substanzen wie Luspatercept können der ineffektiven Erythropoese und dem zugrundeliegenden Erythrozyten-Reifungs-Defekt entgegenwirken und dadurch die Ausreifung funktionsfähiger Erythrozyten fördern. Luspatercept wirkt als TGF- β -Ligandenfalle und Erythrozyten-Reifungs-Aktivator in der späten Phase der Erythropoese (Suragani et al. 2014).

In der Untergruppe der Patienten mit symptomatischer Anämie und del(5q)-Anomalie mit oder ohne andere zytogenetische Auffälligkeiten ist Lenalidomid jedoch die erste Therapie der Wahl. Bei MDS mit höherem Risiko, bei dem es darum geht, das Überleben sicherzustellen bzw. zu verlängern, bleibt die HSCT die einzige potenziell kurative Therapie. Für die Mehrheit der Patienten, bei denen die HSCT nicht möglich ist, ist Azacitidin die einzige Behandlung, die das Überleben im Vergleich zur symptomatischen Behandlung sicherstellen und verlängern kann (Lyons 2012).

1.4 Immuno-Score Klassifikation für maligne Tumoren

Krebserkrankungen sind komplexe und dynamische Krankheiten, die für klinische Zwecke durch formale Begriffe beschrieben und eingeordnet werden können. Das gängigste System zur Klassifizierung des Ausmaßes der Ausbreitung von Krebserkrankungen ist die TNM-Klassifikation des *American Joint Committee on Cancer/Union Internationale Contre le Cancer* (AJCC / UICC). Die TNM-Klassifikation wird seit über 80 Jahren verwendet und ist für die Abschätzung der Prognose bei verschiedenen Krebsarten von Nutzen (Weitz et al. 2005). Das System wird in klinischen Studien für die Einordnung von Patientendaten und in Krebsregistern für verschiedene Vergleiche auf internationaler Ebene verwendet. Dieses TNM-Staging-System hat sich zwar bewährt, bietet jedoch oft unvollständige Prognoseinformationen. Die klinischen Ergebnisse können bei Patienten im gleichen histologischen Tumorstadium signifikant variieren (Nagtegaal et al. 2011). Die Vorhersagegenauigkeit des herkömmlichen Staging-Systems beruht auf der Annahme, dass das Fortschreiten der Erkrankung ein tumorzellautonomer Prozess ist. Der Fokus dieser Klassifikation liegt ausschließlich auf den Tumorzellen und kann die Auswirkungen der Immunantwort des Wirts nicht berücksichtigen (Bindea et al. 2010).

Die TNM-Klassifikation wurde in der multivariaten Analyse niemals durch alternative Methoden wie Immunhistochemie für Tumormarker, Durchflusszytometrie zur Bestimmung des DNA-Gehalts, molekulare Signaturen oder genetische Merkmale ersetzt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Analyse einer bestimmten Art intratumoraler Immunreaktion die Genauigkeit der TNM-Klassifizierung in multivariaten Analysen übertraf (Galon et al. 2006; Mlecnik et al. 2011). Daher muss die Tumorprogression als Ergebnis einer Kooperation zwischen dem invasiven Tumorprozess und einem Abwehrsystem betrachtet werden, dessen Hauptkomponente durch die Immunantwort des Wirts gebildet wird.

Die moderne Klassifikation von Tumoren basiert auf der Erkennung von Krankheitsentitäten, die durch morphologische, phänotypische und genetische Marker gekennzeichnet sind. Jedes gewählte Klassifizierungssystem muss zuverlässig, reproduzierbar, klinisch relevant und biologisch sinnvoll sein. Viele möglicherweise hinderliche Themen und Risiken müssen dabei berücksichtigt werden.

Erstens ist festzustellen, dass in „Tumorgebieten“ das unvermeidliche Vorhandensein von nicht-neoplastischen Zellen (einschließlich Immunzellen) dazu führt, dass es sich bei der DNA (oder RNA) aus dem Tumorgebiet nicht um „reine“ DNA (oder RNA) aus neoplastischen Zellen handelt. Diese "Verunreinigungen", die oft mehr als 50 % der Nicht-Tumorzellen ausmachen, können tatsächlich eine tiefgreifende biologische Bedeutung haben. Der Grad der

Infiltration von Immunzellen kann die Ergebnisse eines molekularen Tumorassays beeinflussen. Wichtiger aber ist die Erkenntnis, dass das Immuninfiltrat den Tumor auch (z.B. epigenetisch) modifizieren und somit sein klinisches Verhalten verändern kann.

Eine genaue Charakterisierung spezifischer tumorinfiltrierender Zellen erfordert die Verwendung moderner immunhistochemischer oder durchflusszytometrischer Multiplex-Techniken, um die Anwesenheit und Lokalisierung von spezifischen Antigenen, die durch Teilmengen von Immunzellen exprimiert werden, im Gewebe nachzuweisen. Zum Beispiel sind Lymphozyten mit gegensätzlichen Aufgaben oder Funktionen, wie $CD4^+$ T-Zellen mit Th1-Orientierung gegen Th2-Orientierung gegen Immunzellen mit regulatorischen Funktionen, ohne einen geeigneten Marker nicht unterscheidbar und erfordern Antikörper-Markierung durch Immunhistochemie.

Drittens ist bekannt, dass Immunzellen im Zentrum des Tumors (CT) und an der Invasionsfront (IM) unterschiedlich verteilt sind und sich funktionell unterscheiden. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Immunzellendichte in jeder Tumorregion (CT und IM) und dem Patientenergebnis konnte bei Darmkrebs gezeigt werden (Galon et al. 2006).

Viertens müssen objektive Methoden zur Quantifizierung von Immunzellen entwickelt werden, um die Subjektivität der Feldauswahl und die ungenaue Bewertung zu beseitigen. Fünftens gilt die Heterogenität eines Tumors für Tumorzellen, aber auch für das Microenvironment. Sechstens müssen geeignete Marker ausgewählt werden. Sie sollten robust und gut etabliert sein und einen hohen Vorhersagewert haben. Ein Großteil der zeitgenössischen Literatur zu der Thematik (Mlecnik et al. 2011; Galon et al. 2006) stützt die Hypothese, dass die Krebsentwicklung durch das Immunsystem des Wirts beeinflusst wird. Dies kann aussagekräftige Prognoseinformationen bieten und die klinische Entscheidungsfindung hinsichtlich der Notwendigkeit einer systemischen Therapie erleichtern (Bindea et al. 2010). Zahlreiche Daten legen nahe, dass $CD3^+/CD8^+$ und $CD45RO^+$ Zellen eine Rolle bei der Immunreaktion gegen Tumore spielen (Galon et al. 2014).

Eine durchgeführte Meta-Analyse konnte die Auswirkungen von Immunzellen, darunter B-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen und alle Subtypen von T-Zellen, als Ergebnis aus mehr als 120 veröffentlichten Artikeln zusammenfassen. Der Einfluss des Immuninfiltrats mit dem zytotoxischen und Gedächtnis-T-Zell-Phänotyp wurde bei Krebserkrankungen an verschiedenen anatomischen Stellen nachgewiesen. Dazu gehören kolorektale Karzinome, aber auch maligne Melanome, Bronchial-, Magen-, Ösophagus-, Kopf und Hals-, Mamma-, Blasen-, Urothel-, Ovarial-, Endometrium-, Prostata-, Pankreas-, Merkelzell-, Hepatozelluläre Karzinome sowie

Medulloblastome. An dieser Stelle ist es wichtig festzuhalten, dass die Implikationen dieses Immunphänotyps für viele verschiedene Malignome gelten, zum Beispiel Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome, großzellige Karzinome und Melanome (Fridman et al. 2012). Insgesamt zeigen die Publikationen, dass eine genaue Analyse der Immunkomponente der Tumormikromilieus durch computergestützte Analysen zu verbesserten Aussagen zum Tumorverlauf und damit zu Veränderungen im Patientenmanagement führen können. Daher kann eine genaue Analyse der Tumormikroumgebung durch Pathologen für die zukünftige klinische Implementierung und ein besseres Patientenmanagement unerlässlich sein. Ein Fachwissen auf diesem neuen aufstrebenden Gebiet ist nun erforderlich, um es in die klinische Praxis umzusetzen.

Der Immuno-Score reicht von Immuno-Score 0 (I0) bis zu Immuno-Score 4 (I4) (Abbildung 4). Wie in den Tabellen 3 und 4 dargestellt, ist der Immuno-Score abhängig von der Immunzellinfiltration und der Dichte an T-Zell-Populationen (CD3⁺ und CD8⁺) im Tumorzentrum, *core of the tumour (CT)*, sowie in der Invasionsfront, *invasive margin (IM)*. Während Regionen mit niedriger Dichte an den beiden T-Zell-Populationen in CT und IM (in der Tabelle als „Lo“ bezeichnet) ein geringer Immuno-Score 0 (I0) zugeschrieben wird, resultieren dagegen höhere Dichten an T-Zellen (s. Tabelle „Hi“) in beiden Regionen in einem Immuno-Score 4 (I4). Weiterhin wurden die Immuno-Scores 1, 2, 3 (I1, I2, I4) in eine heterogene Gruppe (s. Tabelle „Htg“) unterteilt, die eine Region mit einer höheren Dichte an CD3⁺ oder CD8⁺ (I1), 2 Regionen (I2) oder 3 Regionen (3I) beschreibt (Kirilovsky et al. 2016).

Tabelle 3: Erstellung des Immuno-Score anhand der Immunzellinfiltration

Lokalisation	Immunzellinfiltration		Score
	CD3 ⁺	CD8 ⁺	
CT	Hi oder Lo	Hi oder Lo	0, 1 oder 2
IM	Hi oder Lo	Hi oder Lo	0, 1 oder 2
Immuno-Score			0, 1, 2, 3 oder 4

Quelle: Modifiziert nach Galon et al. (2014)

CT: „*core of the tumour*“ (dt. Tumorzentrum), IM: „*invasive margin*“ (dt. Invasionsfront), Hi: „*High*“ (dt. hohe Zelldichte), Lo: „*Low*“ (dt. geringe Zelldichte).

Tabelle 4: Vereinfachte Darstellung des Immuno-Scores

Einteilung	Scores	Immuno-Score	Beschreibung
HiHi	2 + 2	I4	Hohe Dichte an T-Lymphozyten in CT und IM
Htg	0 + 1	I1, I2 oder I3	Hohe Dichte an T-Lymphozyten in einer der beiden Regionen
	0 + 2		
	1 + 1		
	1 + 2		
LoLo	0 + 0	I0	Geringe Dichte an T-Lymphozyten in CT und IM

Quelle: eigene Darstellung nach Kirilovsky et al. (2016)

CT: „*core of the tumour*“ (dt. Tumorzentrum), IM: „*invasive margin*“ (dt. Invasionsfront), HiHi: „*High-High*“ (dt. hohe Zelldichte an CD3⁺ und CD8⁺), LoLo: „*Low-Low*“ (dt. geringe Zelldichte an CD3⁺ und CD8⁺), Htg: „*heterogeneous*“ (dt. heterogene Verteilung).

In einer Arbeit von Pages et al. (2009) erwies sich der Immuno-Score bei Kolorektalkarzinom-Patienten mit nodal-negativem lokalisiertem Darmkrebs als sehr effektiv. Die Behandlung dieser Patienten besteht in der Regel nur aus einer operativen Entfernung des Tumors. Etwa 25 % dieser Patienten haben jedoch ein Fernrezidiv ihrer Erkrankung, was darauf hinweist, dass zum Zeitpunkt der kurativen Operation bereits okkulte Metastasen vorhanden waren. Diese Subgruppe wurde durch etablierte Parameter (Staging etc.) bislang nicht erfasst. Der Immuno-Score (I)-Ansatz (mit einer Aufzählung von CD8⁺ - und CD45RO⁺ -Zellen im CT und IM) wurde auf zwei große unabhängige Kohorten (n = 602) angewendet. Nur 4,8 % der Patienten mit hohem I4 erlitten nach 5 Jahren einen Rückfall und 86,2 % lebten zu diesem Zeitpunkt noch. Im Gegensatz dazu hatten 72 % der Patienten mit einer niedrigen Punktzahl (I0 und I1) ein

Tumorrezidiv und nur 27,5 % waren nach fünf Jahren noch am Leben. Diese I0- und I1-Patienten hätten möglicherweise von einer adjuvanten Therapie profitieren können, wenn der Immuno-Score in das Tumor-Staging integriert worden wäre.

Gegenwärtige immunhistochemische Technologien ermöglichen die Anwendung solcher Analysen in der routinemäßigen diagnostischen Pathologie. Angesichts des wahrscheinlich universellen Charakters der Immunkontrolle von Tumoren ist es daher für Patienten unerlässlich, den Immunparameter als prognostischen Faktor zu berücksichtigen und den Immuno-Score als Bestandteil der Krebsklassifizierung einzuführen (Galon et al. 2014).

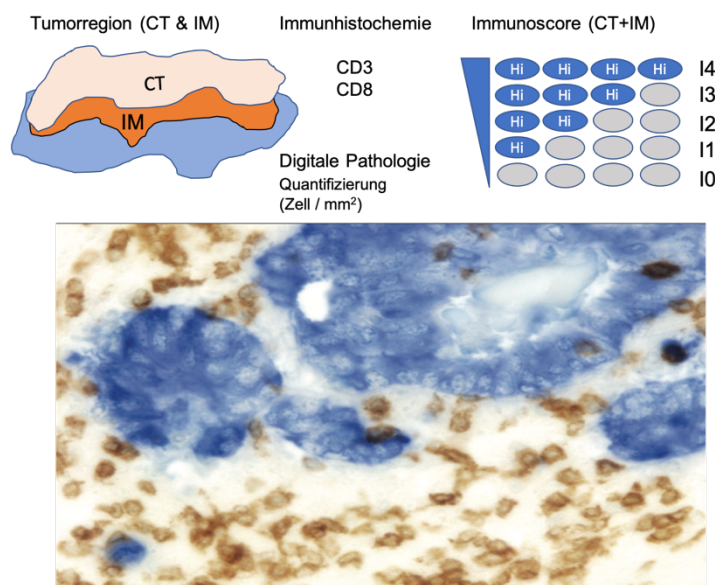


Abbildung 4: Definition und Methodologie des Immuno-Scores

Definition (oben), braun gefärbte CD3⁺ T-Zellen bei kolorektalen Karzinomen (unten). CT: „*core of the tumour*“ (dt. Tumorzentrum), IM: „*invasive margin*“ (dt. Invasionsfront), Hi: „*High*“ (dt. hohe Zelldichte) Quelle: Eigene Darstellung nach Galon et al. (2014)

1.5 Fragestellung

Bei myelodysplastischen Syndromen (MDS) handelt es sich um eine klinisch vielfältige Gruppe neoplastischer Erkrankungen des Knochenmarks, die durch eine Proliferation von dysplastischen und dysfunktionellen Knochenmarkszellen gekennzeichnet sind, was zu einer beeinträchtigten Produktion myeloischer Zellen führt (Swerdlow et al. 2008). Neben den neoplastischen Vorläufern der myeloischen, erythroiden und megakaryozytären Zellreihen gibt es viele andere Zelltypen im Knochenmark, die eine Assoziation mit dem MDS zeigen. Zum Beispiel infiltrieren Lymphozyten das Knochenmark (intratumorale Lymphozyten (ITL)). Es ist bekannt, dass ITLs bei MDS heterogene "Infiltrationsmuster" in Bezug auf ihre räumliche Verteilung und Menge aufweisen, was ein Hinweis auf unterschiedliche Reaktionen der immunmodulatorischen Therapie verschiedener MDS-Subtypen sein könnte (Fozza und Longinotti 2012). Allerdings fehlen Instrumente, um ITL-Infiltrationsmuster im Knochenmark zu klassifizieren und quantifizieren, so dass diese nicht als Biomarker mit klinischer Anwendbarkeit bei MDS-Patienten getestet werden können, die für eine immunmodulatorische Behandlung in Betracht gezogen werden. Darüber hinaus stellen Diagnostik, Prognosebestimmung und Therapieplanung in vielen Fällen eine Herausforderung dar. Die histopathologische Beurteilung einer Biopsie des Knochenmarks ist in der interdisziplinären diagnostischen und prognostischen Analyse ein Teilaspekt. Der von der französischen Arbeitsgruppe Galon et al. (2014) etablierte Immuno-Score stellt bereits jetzt eine sichere Alternative zu üblichen Methoden bei der Klassifikation kolorektaler Karzinome dar.

In dieser Dissertation sollten daher die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Kann der ursprünglich für kolorektale Karzinome entwickelte Score auch auf Knochenmarksbiopsien angewendet werden?
2. Kann die Anwendung des Immuno-Score bei MDS Vorhersagen zur Prognose ermöglichen?
3. Inwiefern beeinflussen die Ergebnisse des Immuno-Score die Therapie?
4. Lassen sich durch die Ergebnisse des Immuno-Score genauere Aussagen zur Pathogenese treffen?

2 Material und Methode

2.1 Patientendaten

Anhand der in der Klinikdatenbank (iXserv, ixmid Software Technologie GmbH, Köln) hinterlegten Befunde (Pathologie, Laborbefunde, Zytogenetik, Arztbriefe) wurden die Patientendaten gefiltert, erhoben und zusätzlich in manchen Fällen kategorisiert. Die Methodik der Datenerhebung wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen genehmigt (DOK_129_2013). Zur Anonymisierung der sensiblen persönlichen Informationen der einzelnen ausgewählten Patienten, wie Vor- und Nachname sowie Geburtsdatum, wurden Identifikationsnummern (GöMa) vergeben. Erhaltene Proben sowie Präparate wurden den fortlaufenden Identifikationsnummern zugeordnet. Alter und Geschlecht der Patienten wurde anhand der Befund- bzw. Entnahmedaten errechnet und registriert.

2.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Auswahl der Patienten erfolgte aus der internen Befund-Datenbank des Instituts für Pathologie (Universitätsmedizin Göttingen). Dabei wurden solche ausgewählt, bei denen in Folge einer Routinediagnostik eine MDS-Diagnose gestellt wurde. Einschlusskriterium war die Voraussetzung, dass bei den ausgewählten Patienten im Rahmen der histologischen Untersuchung in der Klinik für Hämatologie und Onkologie neben einer Knochenmarkentnahme durch Beckenkammstanze auch eine Laboranalyse von Blutproben inkl. genetischer Untersuchung mittels Karyogramm und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) durchgeführt wurde. Fehlende oder unvollständige Befunde und Analysen galten dabei als Ausschlusskriterium und wurden in Folge dessen nicht berücksichtigt. Die zu den Patienten gehörenden Präparate wurden aus dem Archiv der Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen gesammelt. Die finale Auswahl erstreckt sich über 83 Präparate aus dem Zeitraum zwischen 2008 und 2016.

2.3 Zytogenetischer Befund

Die Erhebung der zytogenetischen Daten erfolgte anhand der vom Labor für Zytogenetik der Klinik für Hämatologie und Onkologie (INDIGHO, Prof. Haase, Universitätsmedizin Göttingen) festgestellten Befunde. Im Rahmen der klinischen Routine wurden die Untersuchungen in üblicher Weise durchgeführt. Vorwiegend wurde eine Bänderungsanalyse im Karyogramm erstellt. Zusätzlich ist in Ausnahmefällen eine FISH-Sondenmarkierung an CD34⁺-Zellen erfolgt.

2.4 Klinische Datenerfassung

Die einzelnen erhaltenen Knochenmarksstanzen waren mit klinischen Basisdaten (Alter, Geschlecht, hämatologische Laborparameter) annotiert, um den Gesamtprozess der Diagnosestellung einordnen und den aktuellen Stellenwert der pathologischen Untersuchung feststellen zu können. Diese stellte den Ausgangspunkt für die weitere Diagnostik dar.

Der Gruppe „V.a. MDS“ wurden sämtliche Fälle zugeordnet, bei denen laut Einsendeschein noch keine etablierte MDS Diagnose bestand. Unklare Zytopenien waren in dieser Kategorie häufig ausschlaggebend für die Knochenmarksbiopsie. Patienten mit bereits diagnostiziertem MDS und einer anschließenden Verlaufskontrolle wurden einer weiteren Gruppe zugeteilt, da zur Abklärung des Krankheitsverlaufs (Remission, Progress) erneute Probenentnahmen angeordnet wurden. Die Gruppen „Verlaufskontrolle ohne Therapie“ (Patienten mit *watch-and-wait*-Ansatz oder rein supportiver Therapie) und „Verlaufskontrolle unter Therapie“ (Patienten mit aktueller oder stattgehabter Chemotherapie bzw. Stammzelltransplantation) wurden gebildet, um den bewiesenen Einfluss der Chemotherapie auf die Morphologie des Knochenmarks abzugrenzen und gesondert zu klassifizieren. Trotz möglicher Einflussnahme auf die Knochenmarkshistologie wurden supportive Therapien, wie Eisenchelatoren oder Wachstumsfaktoren, nicht separat erfasst und ausgegliedert.

In manchen Fällen enthielt der Einsendeschein oder die Krankenakte vereinzelte Hinweise auf die Ätiologie des MDS. Bei vorheriger Radio-Chemotherapie in der Anamnese eines Patienten für eine andere maligne Erkrankung wurde dies bspw. als therapie-assoziiertes, sekundäres MDS (t-MDS) gewertet.

2.5 Histologische Präparate

2.5.1 Materialgewinnung und Herstellung histologischer Präparate

Die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten histologischen Schnitte stammen aus den Archiven des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen. Bei den Gewebeproben handelt es sich um standardmäßig am Beckenkamm gewonnene, direkt nach der Entnahme formalinfixierte Knochenmarksstanzzyylinder (Bain 2001), die vor der histologischen Aufarbeitung in Ameisensäure entkalkt und nach Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe in Paraffin eingebettet werden. Nach dem Schneiden an einem Mikrotom wurden 2 µm dicke Schnitte standardmäßig mit Hämatoxylin&Eosin (HE), perjoidic Schiff's acid (PAS), Gomörri

(Versilberung), Berliner Blau Reaktion (Eisenfärbung) und enzymhistochemisch auf Chloracetat-Esterase (CAE) gefärbt.

2.5.2 Schnittvorbehandlung für Immunhistochemie

Bei mit Formalin fixiertem Gewebe kommt es durch Einwirkung des Formalins zu einer Vernetzung der Proteine (Crosslinking). Dieses Crosslinking kann durch verschiedene Verfahren rückgängig gemacht werden, damit eine weitere Bearbeitung der Schnitte ermöglicht wird. Die am meisten verbreitete Methode ist das sogenannte Hitze induzierte Epitopretrieval (HIER), bei dem die Schnitte für eine variable Zeit thermisch vorbehandelt werden. Ein wichtiger Faktor für den Erfolg von HIER ist die Zusammensetzung, insbesondere aber auch der pH-Wert der Flüssigkeit, die das Gewebe umspült. Als Alternative zur HIER wird bei einigen wenigen Antikörpern die Behandlung mit Proteinase durchgeführt.

Abhängig von der geplanten Visualisierung der Antikörper-Antigen-Bindung muss die Antikörperinkubation von verschiedenen „Blockierschritten“ begleitet werden. Dabei werden entweder die endogene Peroxidase oder endogenes Biotin blockiert. Außerdem können andere unspezifische Proteininteraktionen reduziert werden (Sprich 2006).

2.5.3 Immunhistochemische Färbungen

Die Grundlagen für die immunhistochemischen Färbungen beruhen auf der Affinität von Antikörpern zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft (Epitop) als Antigen-Antikörper-Reaktion. Im Idealfall kommt es dabei zu einer spezifischen und starken Bindung zwischen dem sog. Primärantikörper und dem gewünschten Epitop. Im nächsten Schritt wird der Schnitt mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper inkubiert. Ein an den Sekundärantikörper gekoppeltes Detektionssystem (in der Regel ein Enzym wie z.B. Peroxidase) weist nach Inkubation mit einem farbigen Substrat die Bindung des Antikörpers im Präparat nach. Vorbereitend wurde im Rahmen dieser Arbeit der Immun-Färbeautomat Dako „Omnis“ (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) samt korrespondierender Reagenzien, die auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten verwendet werden, verwendet. Das Nachweissystem Dako EnVision™ FLEX identifiziert primäre Maus- und Kaninchen-Antikörper und ist in der Lage mithilfe von EnVision™ FLEX DAB+ die Reaktion mittels Chromogen darzustellen. So ist es für immunhistochemische Verfahren unter Verwendung von Dako Autostainer (Autostainer Plus) Systemen geeignet. Nach Anwendung der HIER-Methode wurde zusätzlich in einer Citratlösung mit pH 6 für 20 Minuten eine Inkubation durchgeführt. Die Proteine

CD34⁺ und CD3⁺ wurden darüber hinaus für zehn Minuten zur Verstärkung der Sichtbarkeit mit einem der oben genannten Mausverstärker („M“, EnVision™ FLEX+, Mouse (LINKER)) samt Proteinen zur Stabilisierung behandelt, sodass die Ausprägungen der Signale der primären Maus- und Kaninchenantikörper verdeutlicht werden. Um eine Bindung an das zu analysierende Zielantigen zu ermöglichen, wurde ein spezifischer Klon des jeweiligen primären Antikörpers in der festgelegten Konzentration aufgetragen.

Der primäre Antikörper wurde als spezifischer Klon aufgetragen, damit eine Bindung mit dem zu untersuchenden Zielantigen stattfinden konnte. Bei manchen Antikörpern erfolgte die Applikation unverdünnt, wohingegen in manchen Fällen mit in konzentrierter Form vorliegender Reagenz eine Verdünnung vorgenommen wurde.

Das EnVision™ System wurde als sekundärer Antikörper verwendet (Sabattini et al. 1998). Dem Dextran-Polymer als Grundgerüst waren verschiedene sekundäre Antikörper (von Maus und Kaninchen) angelagert (Dako, EnVision™ FLEX/HRP Detection Reagent, Bestell-Nr. SM802). Dadurch wurde die Sensitivität für die im Präparat befindlichen Epitope gesteigert. Daneben waren zudem mehrere HRP-Enzyme (*horseradish peroxidase*) an das Polymer gebunden. Die lichtmikroskopische Detektion war möglich, nachdem das Polymer durch Oxidation nach Zugabe des HRP-Substrates DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) braun eingefärbt wurde. Die Nutzung des Systems bot den Vorteil, dass sich einerseits eine erhöhte Reaktivität durch die Vielzahl gebundener Enzyme und Antikörper am Polymer ergab und andererseits für den Ablauf mit dem Aufbringen des primären Antikörpers und des Polymer nur zwei Arbeitsschritte nötig waren. Mögliche Nachteile können jedoch aufgrund der Größe bei der Durchlässigkeit bestimmter Gewebe gesehen werden.

Tabelle 5: Immunhistochemische Marker

Marker	Zelltyp	Funktion des Proteins	Klon
CD3 ⁺	T-Lymphozyten (alle)	Signaltransduktion, T-Zell-Rezeptor (TCR)	Polyclonal
CD4 ⁺	Helfer-/ „Inducer“- T-Lymphozyt	Bindung an MHD-II	
CD5 ⁺	T-Lymphozyten, B-Lymphozyten-subpopulation	Bindung an CD72	CLA229
CD8 ⁺	Zytotoxische/Suppressor- T-Lymphozyten	Bindung an MHC-I	144B
CD20 ⁺	B-Lymphozyten	B-Zell-Aktivierung	L26
CD34 ⁺	Hämatopoetische Progenitorzellen, Endothelzellen	Zelladhäsion Zellmigrationsaktivität	QBEnd10

2.6 Digitalisierung und Morphometrie

Die morphometrische Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Cleo-Aron Weis vom pathologischen Institut der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg unter Verwendung eigens entwickelter Software durchgeführt.

Die durch die Immunhistochemie gefärbten Blöcke wurden über einen Slide Scanner der Firma Digitalmikroskop und Scanner M8 (PreciPoint GmbH, Freising) in einer Vergrößerung analog x20er bis x60er Objektiv digitalisiert und auf einem gemeinsamen Server der Universitätsmedizin Göttingen und Universitätsmedizin Mannheim hochgeladen. Für jeden Block wurden die sechs angefertigten Färbungen (CD3⁺, CD4⁺, CD5⁺, CD8⁺, CD20⁺, CD34⁺) unter dem Namen GöMa und zugewiesener fortlaufender Nummer gespeichert und bearbeitet. Sie bildeten die Grundlage für die weitere Bearbeitung.

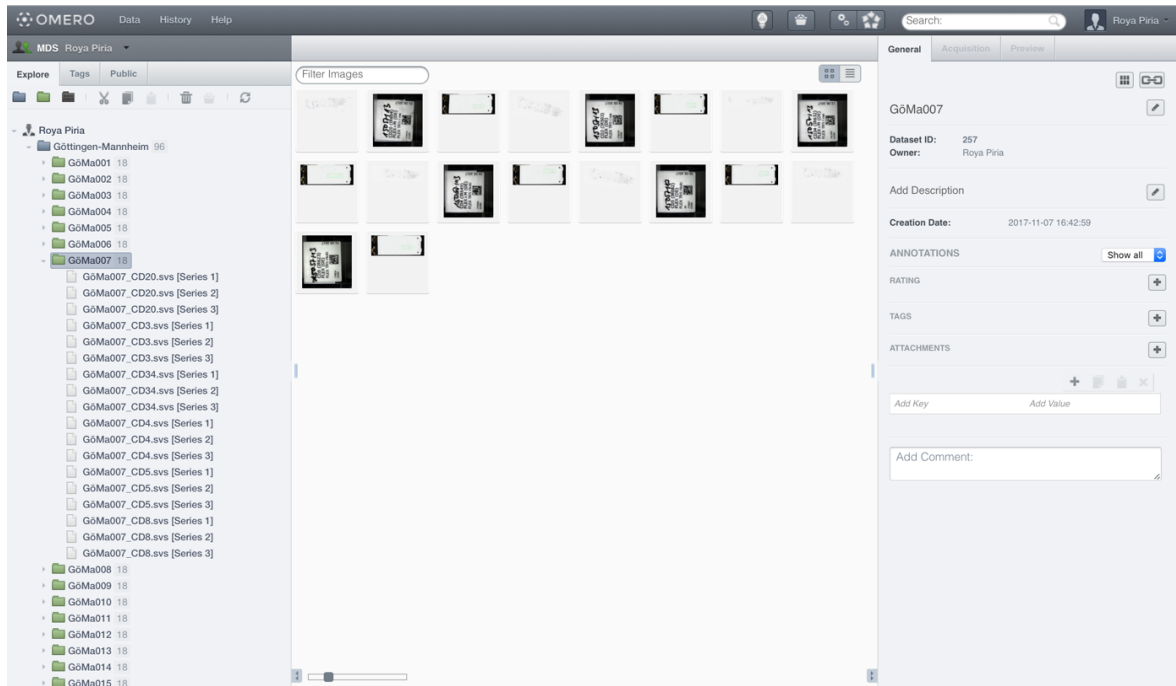


Abbildung 5: Darstellung des Arbeitstools im Omero-Webclient.

2.6.1 Automatische Segmentierung der Daten zur Gewebedetektion

Auf Basis der MATLAB-Omero-Toolbox (“The Open Microscopy Environment,” n.d.) wurden Miniaturbilder von ganzen Folienbildern, *whole slide images* (WSI), in den Arbeitsbereich von MATLAB geladen. In diesen Miniaturbildern wurden bestimmte Regionen (*regions of interest*: ROIs), die Bereiche mit relevanten Strukturen (z.B. Knochen trabekeln) enthalten, manuell gezeichnet. Ein benutzerdefinierter Algorithmus berechnete die Position und Form der ROI innerhalb des ursprünglichen WSI und zerlegte die ROIs anschließend in Kacheln mit einer Pixelgröße von 100 x 100 x 3. Alle resultierenden Kacheln (in Summe $n = 7.243$) wurden in einem Strukturelement gesammelt, das die Kacheln (Bilddaten) und die Klassifizierung ("Knochenmark", "Knochen trabekel", "leerer Raum") enthält.

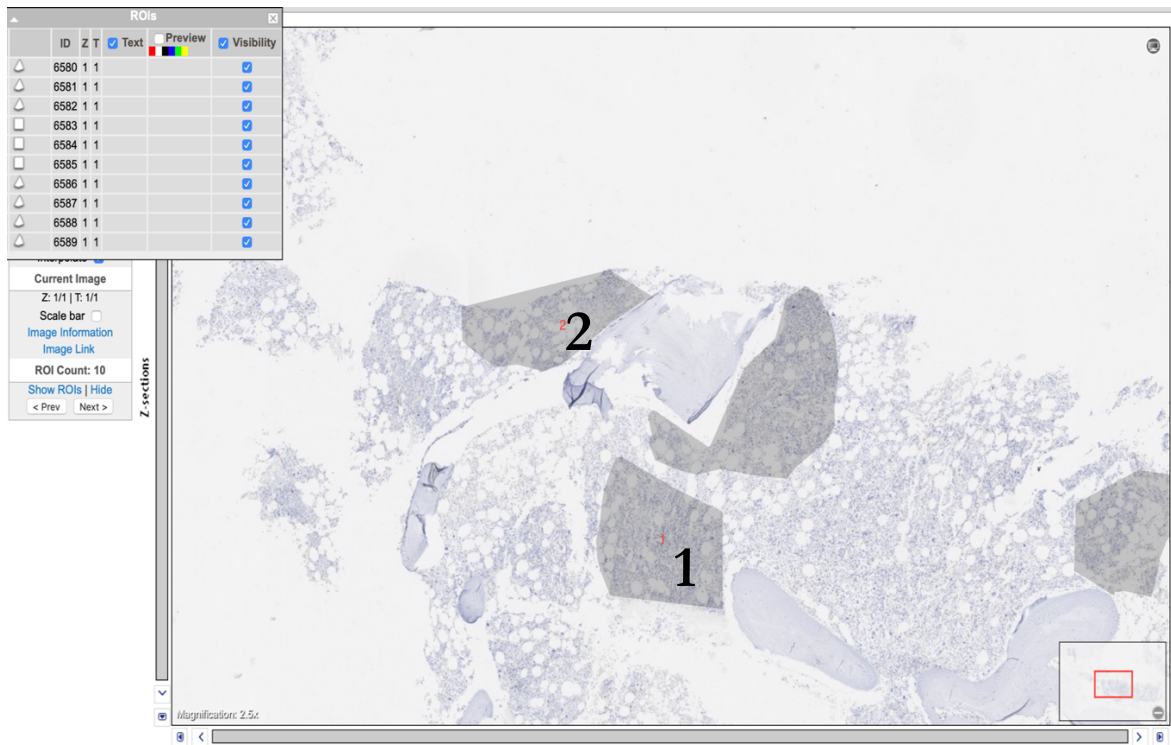


Abbildung 6: Darstellung der ROIs auf der Omero-Webclient Site.

CD 34+ Präparat vom Knochenmark eines MDS-Patienten. 1: Intratrabekuläres Areal. 2: Peritrabekuläres Areal.

2.6.2 Automatische Segmentierung der Daten zur Zellerkennung

Mit einem bislang nicht veröffentlichten, von Herrn PD Dr. Cleo-Aron Weis (Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mannheim) entwickelten, benutzerdefinierten Segmentierungswerkzeug für die Detektion von Zellkernen im Knochenmark in der Programmiersprache MATLAB (mit MatConvNet als CNN-toolbox und C++ im Hintergrund) wurden einzelne Kerne, mehrere Kerne und Bereiche zwischen Kernen automatisch segmentiert: Zuerst wurden die Bilder mit Farbfaltung versehen, um die blauen Kerne zu segmentieren. Zweitens wurden zwei verschiedene Ansätze verwendet, um Zellkerne automatisch zu erkennen: Der erste verwendete eine Kreuzkorrelation mit einer kreisförmigen Schablone der Größe eines Kerns, um die Kerne hervorzuheben. Der zweite verwendete die von MATLAB erstellte kreisförmige Hough-Transformation, um kreisförmige Objekte zu erkennen. Drittens wurden die Ergebnisse beider Ansätze auf Basis der Zentroidentfernung zusammengeführt, um doppelte Erkennungen zu verwerfen. Viertens wurden auf der Grundlage der resultierenden Zentroide pro detektierter Kerne Kacheln mit "einzelnen Kernen", "mehreren Kernen" und - durch Hinzufügen von Punkten zwischen den Zentroiden - "Bereiche zwischen Kernen" definiert. Die resultierenden Kacheln hatten jeweils eine Größe von 41 x 41 x 3 Pixeln. Schließlich wurde ein Strukturelement

mit den Kacheln ($n = 9.000$) und Klassenbeschriftungen ("einzelne Zelle", "viele Zellen", "nicht fokussiert") erstellt. Die resultierende Datenbank wurde einer Sichtprüfung unterzogen, die eine gute Übereinstimmung der Klassenbezeichnungen und des Flieseninhalts ergab.

2.6.3 Manuelle Segmentierung von Daten für die Zellerkennung

Die digitalisierten vollständigen Folienbilder (WSI) wurden auf einen lokalen Omero-Server hochgeladen. Mit der MATLAB-Omero-Toolbox wurden Teile der Bilder abgerufen und lokal als .tiff gespeichert. Diese Teile wurden in Fiji (11) (11) (11) (11) (11) (11) [14] [14] [13] [12] [11] [11] und den entsprechenden Strukturen (z.B. Einzelzellkerne) manuell in eine Bounding-Box eingebaut. Die Größe dieser Boxen war nicht festgelegt, da die betrachteten Strukturen unterschiedliche Größen hatten. Im nächsten Schritt wurden alle ROI-Werte, die von den Begrenzungsrahmen in den Bildern definiert wurden, durch die zusätzliche Read-mageJROI-Datei ("ReadImageJROI - File Exchange - MATLAB Central," n.d.) m-file in den Arbeitsbereich von MATLAB geladen. Für das Zellenerkennungsnetz wurden anschließend alle Kacheln auf $41 \times 41 \times 3$ Pixel gleich groß. Schließlich wurde ein Strukturelement erstellt, das Kacheln ($n = 5.330$) und Klassenbeschriftungen ("einzelne Zelle", "viele Zellen", "nicht fokussiert" und "Hintergrund") enthält.

2.6.4 Aufbereitung von Daten für die Optimierung der Boxplatzierung und Boxgröße

Für die Platzierung von Boxen und die Optimierung der Größe wurde eine Kombination aus manueller und automatischer Datengenerierung angewendet. Bei der Platzierung von Boxen wurden in Fiji für Zellkerne gezeichnete Begrenzungsboxen automatisch in neun Richtungen verschoben. Die Kachel jedes resultierenden Begrenzungsrahmens wurde zugeschnitten und zusammen mit der bekannten Verschiebung als Klassenetikett gespeichert, was zu $n = 8.496$ Datenabastungen führte. Im Fall der Schachtelgröße erfuhren die in Fiji für 208 Zellkerne gezeichneten Umrandungskästen eine automatische Größenänderung in 22 Variationen. Die Kacheln werden wieder zugeschnitten und zusammen mit der Größenänderung als Beschriftung gespeichert, was zu $n = 4.576$ Datenabastungen führt.

2.7 Software

2.7.1 MatConvNet

MatConvNet ist eine frei verfügbare CNN-Toolbox für MATLAB von A. Vedaldi, K. Lenc und A. Gupta (*MatConvNet* 2019). Die Toolbox umfasst nicht nur die Funktionen zum Erstellen eines CNNs, sondern auch Schulungs- und Lernfunktionen.

Funktionen wurden hinzugefügt, um zufälliges Rauschen zu implementieren (in diesem Zusammenhang als Jitter bekannt) und um eine Verwirrungsmatrix zu zeichnen.

2.7.2 Berechnungen, Statistiken und Grafiken

Berechnungen wurden in MATLAB (R2016a) und / oder R (R-Version 3.3.1, RStudio-Version 1.0.136) durchgeführt. Statistiken, die statistische Daten zur Leistung darstellen, werden mit dem ggplot2-Paket in R erstellt. Die MATLAB-Codierung wurde gemäß den von Johnson (2014) vorgeschlagenen Gestaltungsvorgaben zur Erhöhung der Lesbarkeit durchgeführt (Johnson 2014). Darüber hinaus wurde die objektorientierte Programmierung angewendet ("Einführung in die Objekt-Orientierte Programmierung mit MATLAB", 2015) und die Richtlinien für die Beschleunigung durch Altman wurden befolgt (Altman 2015).

Die Clusteranalyse in R bei dieser Arbeit war vom besonderen Interesse, da das Ziel ist, eine Gruppe von Objekten zu homogenen Gruppen zusammenzufassen, welche zum Erhebungszeitpunkt noch nicht vorlagen. In diesem Fall wurde Clark-Value als Clusterparameter, zur Abschätzung der Clusterbildung, beachtet.

2.8 CNN-Training

Die aktuelle Analyse basierte auf vier CNN für unterschiedliche Aufgaben: Gewebedetektion (Abschnitt 2.8.1), Zellerkennung (Abschnitt 2.8.2) und zwei Begrenzungsrahmenoptimierungen für Größe und Lokalisierung (Abschnitt 2.8.3). Die ersten beiden Netzwerke wurden mit den für die jeweilige Aufgabe aufbereiteten Daten von Grund auf geschult und validiert. Die letzten beiden Netzwerke sind neu trainierte Zellerkennungs-CNNs.

2.8.1 Gewebedetektion CNN

Für die Klassifizierung des Bildinhalts der 100 x 100 x 3-Pixel-Kacheln in "Knochenmark", "Knochentrabekel" und "leerer Raum" wurde ein CNN entworfen, das aus einer Reihe von Faltungs- und Pooling-Schichten besteht. Es wurde in 800 Epochen mit den oben

beschriebenen Gewebetrainings- und Validierungsdaten trainiert (vergleiche Abschnitt 2.6.1). 25 % der Daten wurden nur zur Validierung reserviert. Der Prozess wurde mit einer Genauigkeit von 0,92 für die Validierungskohorte gestoppt, da dies für den beabsichtigten Gewebedetektionsschritt ausreichend war.

2.8.2 Zelldetektion CNN

Für die Klassifizierung des Inhalts von 41 x 41 x 3-Pixel-Kacheln in „Einzelzelle“, „Viele Zellen“, „Unfokussiert“ und „Hintergrund“ wurde ein CNN entworfen, das aus einer Reihe von Faltungs-, Rektifikations- und Pooling-Schichten besteht. Zuerst wurde es in 1.000 Epochen mit einem Datensatz von geringer Qualität für die ersten drei Klassen trainiert (vergleiche Abschnitt 2.6.2). Zweitens wurde es mit einem manuell segmentierten, hochwertigen Datensatz für alle fünf Klassen in ~ 6.000 Epochen trainiert. In jedem der beiden Durchläufe waren 25 % der Daten nur für Validierungszwecke reserviert. Der Prozess wurde mit einer Genauigkeit von 0,95 für die Validierungskohorte gestoppt, da die Lernkurven mit Anpassung der Lernrate für 500 Epochen keine Verbesserungen mehr zeigten.

2.8.3 Boxgröße und Shift-Optimierung CNN

Das oben beschriebene Zellennachweis-CNN wurde zweimal neu trainiert: Erstens, um die relative Verschiebung einer Begrenzungsbox zum entsprechenden Zellkern (Zellversatz-CNN) zu erfassen, und zweitens, um die Boxgröße an die Kerngröße (Zellgröße CNN) anzupassen. Für die erste Aufgabe wurden neun Schichtklassen definiert, während für die zweite Aufgabe 22 Größenklassen definiert wurden. Schulung und Validierung wurden für ~ 8.000 Epochen mit den oben beschriebenen Daten (Abschnitt 2.6.4) und mit 25 % der Daten für Validierungszwecke durchgeführt. Das Training und die Validierung wurden bei Genauigkeiten von 0,90 bzw. 0,94 abgebrochen. Auch für 500 Epochen gab es keine Verbesserung der Lernkurven mehr.

2.8.4 Fleckenerkennung CNN

Zum Nachweis der Färbung wurde ein CNN für die lineare Regression trainiert, um eine positive Färbung (brauner Bereich) in immunohistochemisch gefärbten Objektträgern nachzuweisen. Die Netzwerkarchitektur wurde von einer Arbeit von Cohen et al. inspiriert. Die Größe des Empfangsfelds beträgt 110 x 110 Pixel. Die Ausgabe ist ein einzelner Wert im Bereich von 0 bis 1 für die Anfärbeintensität.

2.9 Vergleich und Validierung der Ergebnisse

Die Ergebnisse des hier verwendeten Zellkerndetektionswerkzeugs und des von Phoulady et al. publizierten Tools wurden mit einer *compared to a manually drawn ground truth* (CAW) verglichen. Zum Vergleich der Erkennungen wurde die Überlappung des Begrenzungsrahmens als Metrik für die Erkennungsgenauigkeit berechnet. Um die Auswirkungen von Pixelwertschwankungen und Bildverzerrungen auf die Erkennungsqualität zu testen, wurde der Abstand der Begrenzungsrahmenswerpunkte als Metrik für die Erkennungsgenauigkeit gemessen. Zuvor erfahren die Positionen der Zentroide der Bodenwahrheit dieselbe räumliche Verzerrung wie das Bild. Um anschließend die Erkennungsqualität durch die Überlappung des Begrenzungsrahmens oder den Zentroidenabstand der Begrenzungsrahmen zu bewerten, werden die Genauigkeit ($\text{true positive} / (\text{true positive} + \text{false positive})$) und der Rückruf ($\text{true positive} / (\text{true positive} + \text{false negative})$) berechnet. Darüber hinaus wird die doppelte Erkennungsrate als Anzahl der doppelten Erkennungen berechnet, die auf die Anzahl der erkannten Zellen normiert sind ($n \text{ double detection} / n \text{ detected}$).

3 Ergebnisse

Im Rahmen der folgenden Beschreibung erfolgt die Erläuterung der Ergebnisse der Clusteranalyse in R.

3.1 Patientenkollektiv

In dieser Arbeit wurden initial 96 Patienten eingeschlossen. Im Verlauf der Analyse ergab sich bei 6 Patientinnen und Patienten ein Mangel an klinischen Daten (wie z. B. Angaben zum Alter, zum Geschlecht, o. ä.), sodass diese in der abschließenden Bewertung nicht berücksichtigt wurden. Aus Transparenzgründen sind diese in der nachfolgenden Beschreibung der Ergebnisse trotzdem enthalten. Die verbleibende Grundgesamtheit der Patienten mit verwertbaren klinischen Daten setzt sich aus 54 männlichen (60 %) und 36 weiblichen (40 %) Patienten zusammen. Das durchschnittliche Alter betrug 68,24 Jahre (Mdn = 71; Min = 29; Max = 85; SD = 10,52).

3.2 Einteilung nach WHO-Klassifikation

Die 96 ausgewählten Knochenmarkproben zeigten die folgende Einteilung in der WHO-Klassifikation: bei 39 Proben wurde MDS-EB-2 (41 %), bei 24 Proben MDS-MLD (25 %), bei 18 Proben MDS-EB-1 (19 %), bei 3 Proben MDS-SLD (3 %) und bei einem Patienten ein nicht näher bezeichnetes MDS (1 %) festgestellt. Bei elf Proben konnten aufgrund fehlender klinischer Diagnose keine Angaben getätigt werden (NA) (11 %).

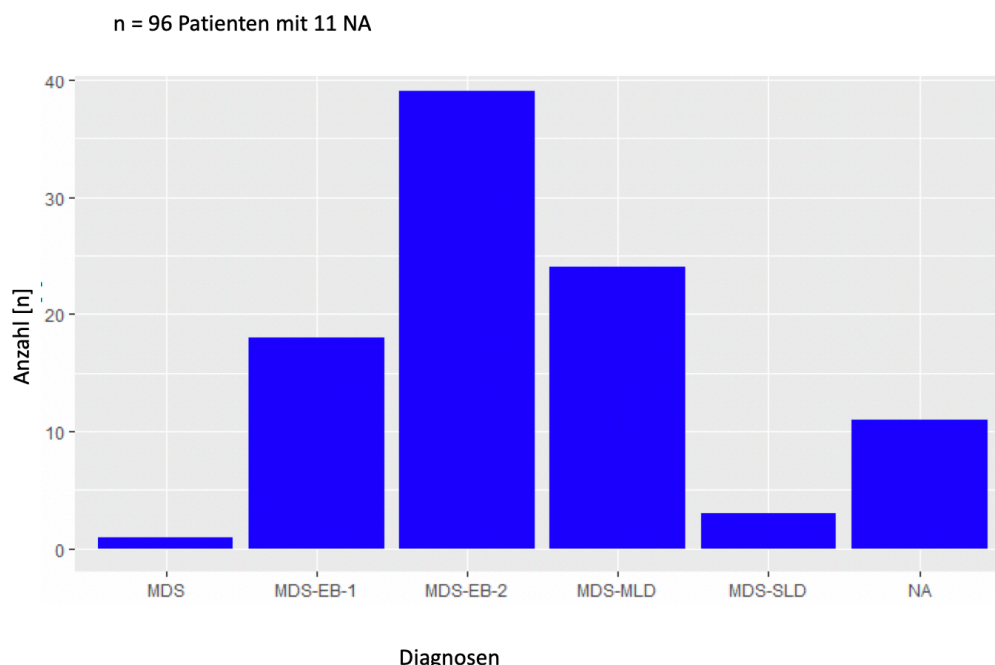


Abbildung 7: Verteilung der MDS-Diagnosen nach WHO Klassifikation

MDS: myelodysplastisches Syndrom, MDS-EB-1: *MDS with excess of blasts Typ 1* MDS-EB-2: *MDS with excess of blasts Typ 2*, MDS-MLD: *MDS with multilineage dysplasia* MDS-SLD: *MDS with single lineage dysplasia* NA: keine Angaben

3.3 Infiltrationsmuster

In der Abbildung 8 wird die Verteilung von fünf verschiedenen Zelltypen im gekennzeichneten Bereich des Knochenmarks (ROIs) ersichtlich. Im Folgenden wird die Relation der einzelnen CD-positiven Zellen zu den nicht immunhistochemisch verfärbten Zellen dargestellt. Wie der Darstellung zu entnehmen ist, weist die Verteilung keine eindeutige Homogenität der Zellen auf. Das Infiltrationsmuster zeigt insgesamt ein sehr heterogenes Bild. Die CD5⁺ Zellen im intratrabekulären und peritrabekulären Bereich zeigen eine marginal höhere Dichte. Im perivaskulären Bereich bilden die CD 34⁺ Zellen den großen Anteil.

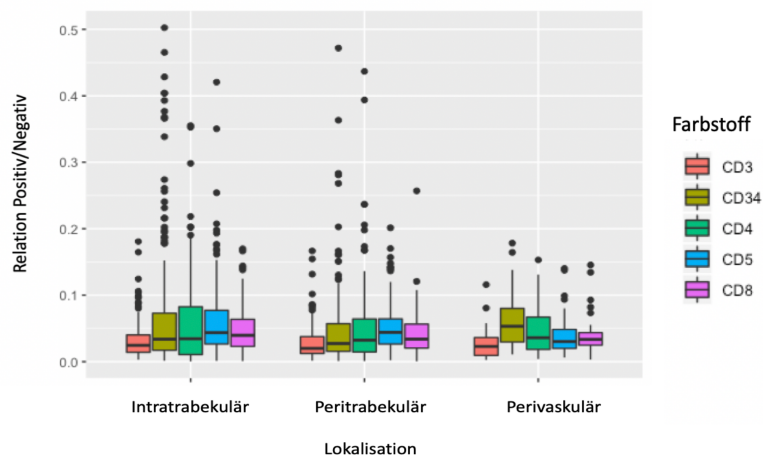


Abbildung 8: Verteilung der Zelltypen in intratrabekulären, peritrabekulären und perivaskulären Bereich des Knochenmarks, die sogenannten ROIs.

3.4 IPSS-R Klassifikation

Im Rahmen der Analyse wurde zunächst die durch die bereits bekannten histopathologischen und klinischen Daten die IPSS-R Klassifikation für die Prognosebestimmung bei allen Patienten berechnet. Die folgenden Abbildungen stellen die Anzahl der Patienten mit IPSS-R-Risikogruppe 0-4 sowie die Verteilung der IPSS-R-Risikogruppen innerhalb der WHO-Klassifikation dar. Der Großteil der Patienten wurde der IPSS-R-Risikogruppe von 1 zugeordnet ($n = 52$). Unter Nichtberücksichtigung der zehn nicht verwertbaren IPSS-R-Klassifizierungen ergab sich bei den verbleibenden 34 Patienten eine ungefähre Gleichverteilung bei den IPSS-R-Scores 2 bis 4. Innerhalb der WHO-Klassifikation sind in der IPSS-R-Risikogruppe 1 insbesondere MDS-EB-1, MDS-EB-2 und MDS-MLD vertreten. Der IPSS-R-Risikogruppe 1 sind zusätzlich drei Patienten mit der Subdiagnose MDS-SLD und ein geringer Anteil von zwei Patienten ohne Diagnosebestimmung zugeordnet. Die MDS-EB-2 sind mit Ausnahme der Gruppe 0 in allen Kategorien vertreten.

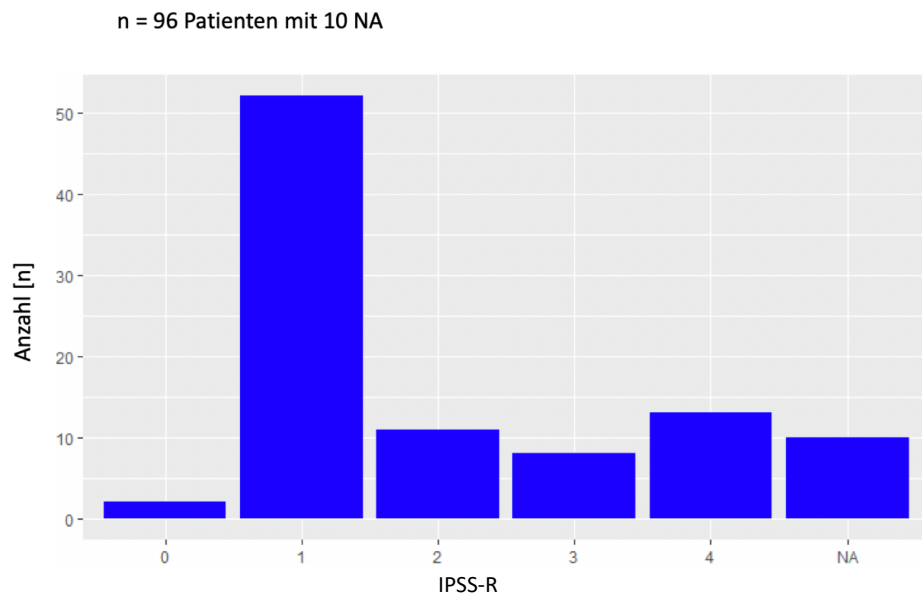


Abbildung 9: IPSS-R Risikogruppen im Gesamtkollektiv

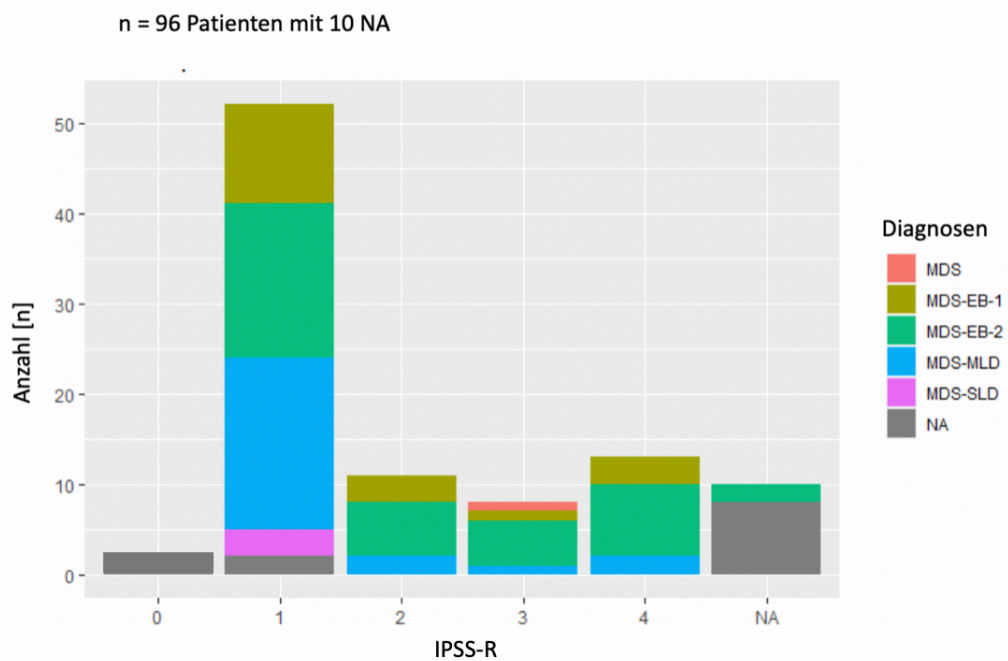


Abbildung 10: Zusammenhang zwischen IPSS-R Risikogruppen und MDS-Subtyp nach WHO-Klassifikation. MDS: myelodysplastisches Syndrom, MDS-EB-1: *MDS with excess of blasts Typ 1* MDS-EB-2: *MDS with excess of blasts Typ 2*, MDS-MLD: *MDS with multilineage dysplasia* MDS-SLD: *MDS with single lineage dysplasia* NA: keine Angaben

Des Weiteren wurde die Verteilung der verschiedenen Zelltypen in der IPSS-R Klassifikation berechnet. Wie der Darstellung in Abbildung 11 zu entnehmen ist, sind die $CD4^+$ T-Zellen hauptsächlich in der IPSS-R 3 repräsentiert. Ein großer Anteil an $CD5^+$ Zellen ist insbesondere IPSS-R 0 und 2 zugeordnet. Die hämatopoetischen Progenitorzellen und Endothelzellen ($CD34^+$) sind vor allem bei IPSS-R 4 vertreten. Die Verteilung von $CD8^+$ Zellen ergab kein eindeutiges Muster.

In der Abbildung 12 wurde die Clusteranalyse der verschiedenen Zelltypen anhand des Clark-Value vorgenommen. Je höher der sog. Clark-Value, desto höher die Wahrscheinlichkeit für Clusterbildung, was ein Zeichen für homogene Verteilungsmuster der einzelnen Zelltypen innerhalb der IPSS-R Risikogruppen ist. Hier konnte kein eindeutiges und signifikantes Verteilungsmuster innerhalb der einzelnen Zelltypen festgestellt werden.

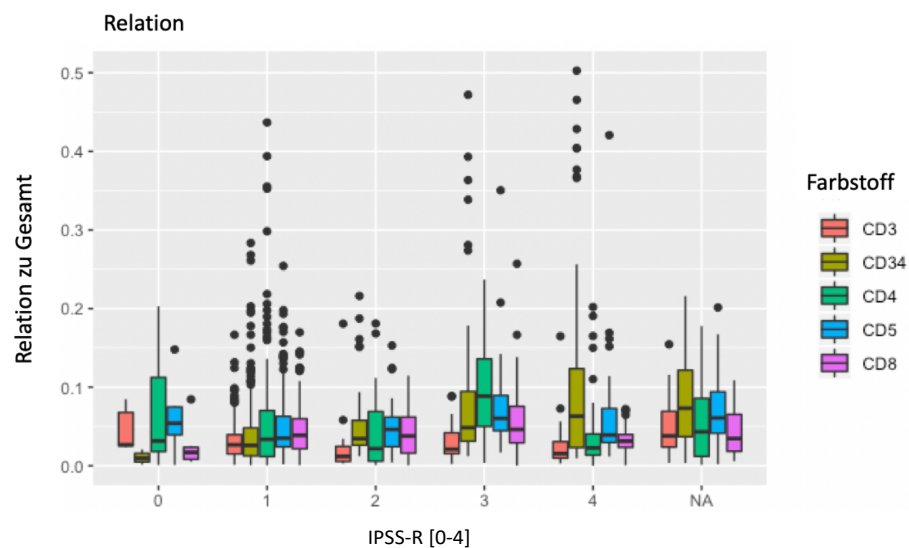


Abbildung 11: Immunhistochemische Verteilung der Zelltypen in IPSS-R Risikogruppen

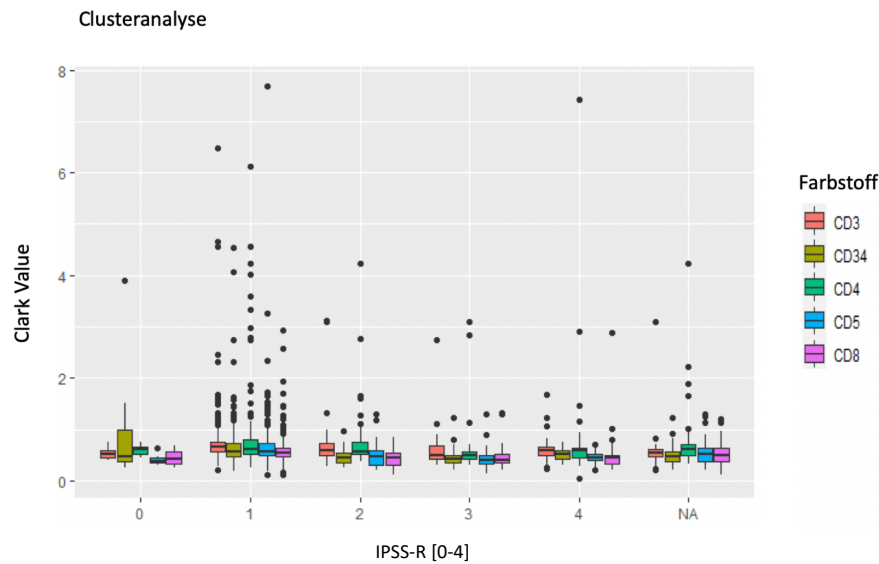


Abbildung 12: Clusteranalyse und Homogenität-Darstellung der einzelnen Zellen in der IPSS-R-Risikogruppen

3.5 Clusteranalyse in der WHO Klassifikation

Zunächst wurde innerhalb der WHO-Klassifikation die Relation der einzelnen positiven CD Zellpopulation zu der gesamten Zellpopulation dargestellt. In der Abbildung 13 sind keine signifikanten Unterschiede der Zellverteilungsmuster innerhalb der einzelnen Diagnosegruppen sichtbar. Zu beobachten ist, dass eine marginal höhere Anzahl an CD 34⁺ Zellen bei MDS-EB-2 vorhanden ist. Auch in Bezug auf die Diagnosestellung kann kein eindeutiger Anhaltspunkt für gesteigerte Clusterbildung anhand der Analyse mithilfe des Clark-Value festgestellt werden, da dieser im Median einen Wert von unter 1 unter allen Diagnosen annimmt (siehe Abbildung 14). Insgesamt unterstreicht diese Beobachtung die Heterogenität der Ergebnisse.

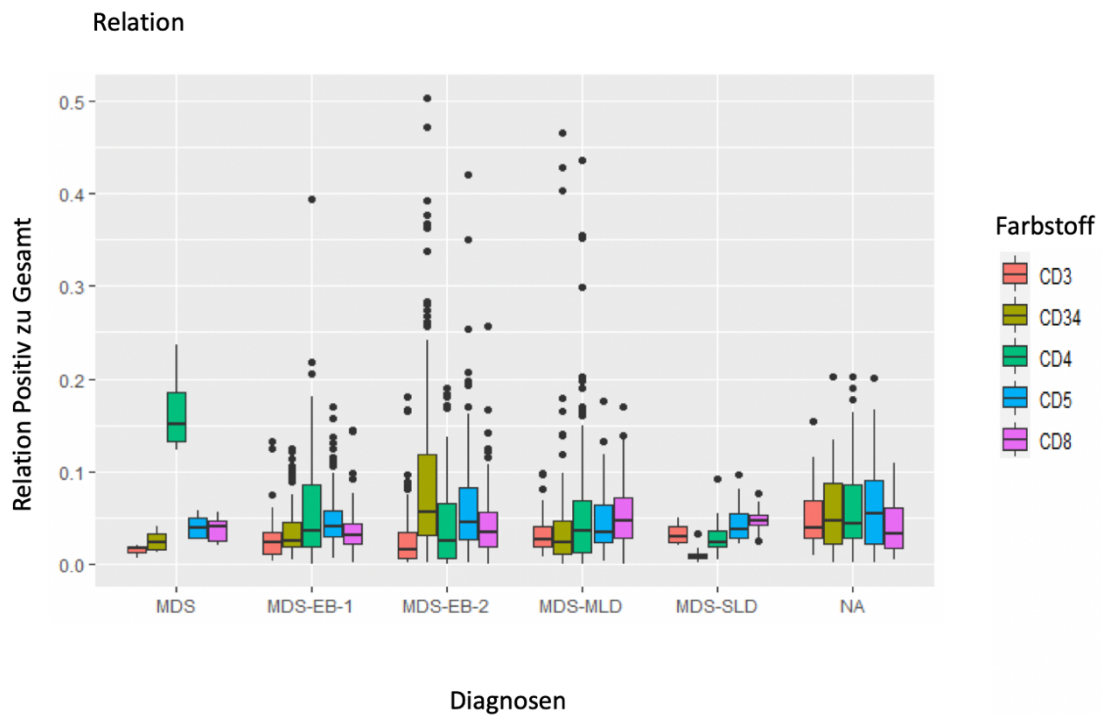


Abbildung 13: Relation der einzelnen immunhistochemisch gefärbten Zellen innerhalb der WHO-Klassifikationen zur Gesamtheit der Zellarten. MDS: myelodysplastisches Syndrom, MDS-EB-1: *MDS with excess of blasts Typ 1* MDS-EB-2: *MDS with excess of blasts Typ 2*, MDS-MLD: *MDS with multilineage dysplasia* MDS-SLD: *MDS with single lineage dysplasia* NA: keine Angaben

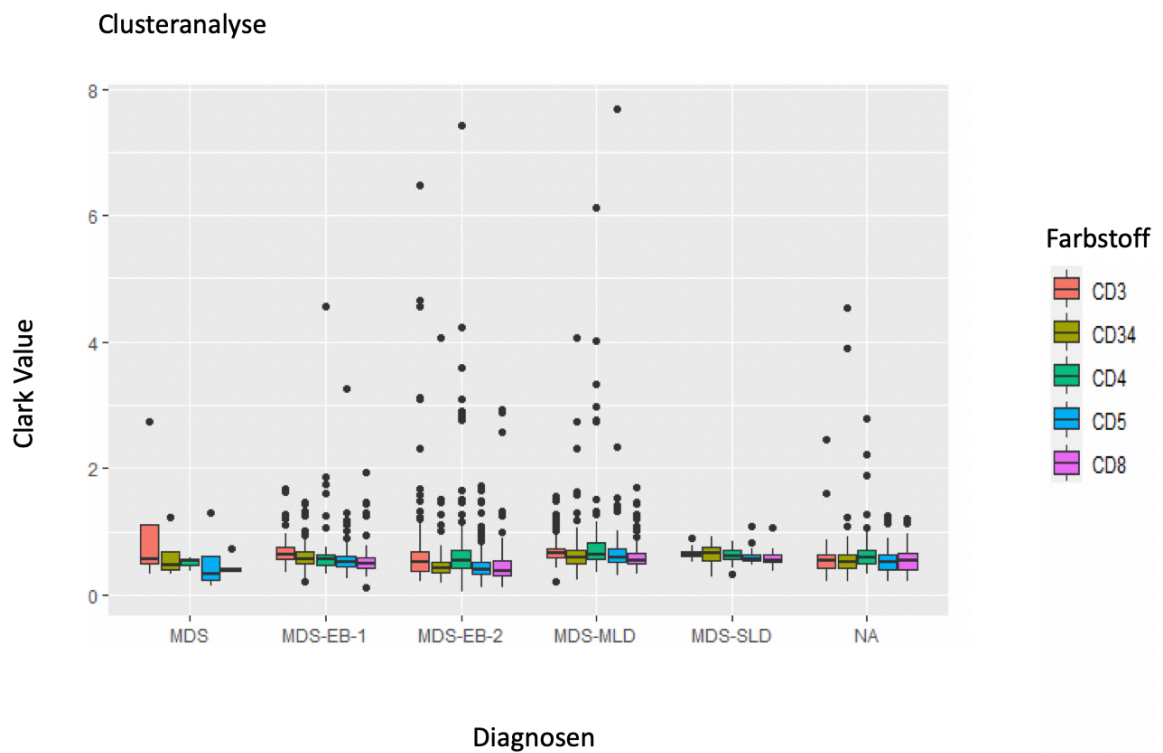


Abbildung 14: Clusteranalyse der einzelnen immunhistochemisch gefärbten Zellen innerhalb der WHO-Klassifikationen. MDS: myelodysplastisches Syndrom, MDS-EB-1: *MDS with excess of blasts Typ 1* MDS-EB-2: *MDS with excess of blasts Typ 2*, MDS-MLD: *MDS with multilineage dysplasia* MDS-SLD: *MDS with single lineage dysplasia* NA: keine Angaben

4 Diskussion

In dieser Dissertation erzielte Ergebnisse zu der bereits vorgestellten Hypothese und der Fragestellungen werden in diesem Abschnitt mit Arbeiten anderer Publikationen sowie anderen Methoden verglichen. Zum Schluss werden in einer kritischen Gegenüberstellung mögliche Fehlerquellen, Schwachpunkte und Potenziale dieser Arbeit sowie die Limitation der ausgewählten Methode bei Untersuchung des myelodysplastischen Syndroms diskutiert.

4.1 Vergleich der Ergebnisse mit anderen Arbeiten

4.1.1 Immuno-Score

Die Fragestellung dieser Arbeit beruht auf der Charakterisierung des immunologischen Tumor-Microenvironments bei myelodysplastischem Syndrom sowie der Möglichkeit einer vereinfachten Prognoseeinschätzung.

Obwohl sich die treibenden Elemente innerhalb des Microenvironments einzelner Primärorgane unterscheiden, bleiben viele der hervorstechenden Merkmale gleich. Das Vorhandensein eines robusten Antitumor-Milieus, das durch die hohe Dichte an CD 8⁺ – zytotoxischen T-Zellen, Th1-Helferzellen und assoziierten Zytokinen gekennzeichnet ist, weist häufig auf eine anti-tumorale Aktivierung des Immunsystems hin und kann sogar zur Tumorelimination führen. Die regulatorischen CD 4⁺ T-Zellen, Typ-2-Helfer-T-Zellen, und spezifische Makrophagen zeigen eine unterstützende Wirkung bei der Tumorentwicklung. Bei vielen Tumorarten tritt die Wechselwirkung des Tumors mit dem Immunsystem des Wirts im Bereich der Invasionsfront, *invasive margin* (IM) oder der umgebenden intratumoralen Blutgefäße auf. Das Gleichgewicht zwischen pro-tumorigenen und antitumorigenen Faktoren beeinflusst die Tumorentwicklung und letztlich die Überlebenschance des Patienten. Einige dieser Merkmale wurden zu einem Immuno-Score kombiniert, der nachweislich die Prognosefähigkeit des aktuellen TNM-Staging für kolorektale Karzinome im Frühstadium ergänzt (Taubke et al. 2018).

Der Immuno-Score ist ein Beispiel dafür, wie Elemente der Immunmikroumgebung auf standardisierte Weise quantifiziert und in einen Prognoseindex integriert werden können, der Informationen liefert, die robuster sind als das Standard-AJCC / UICC-TNM-Staging-System. Der standardisierte Immuno-Score basiert auf der Quantifizierung (Zellen / mm²) von zwei Lymphozytenpopulationen (CD3⁺ und CD8⁺) innerhalb der zentralen Region und dem invasiven Rand von kolorektalen Karzinomtumoren und bietet ein Bewertungssystem von Immuno-Score 0 (I0) bis Immunoscore 4 (I4) (Abbildung 4) (Galon et al. 2014). Es wurde gezeigt, dass

die Klassifizierung durch den Immuno-Score eine prognostische Bedeutung hat, die der des klassischen TNM-Systems für das Überleben bei Patienten mit kolorektalem Karzinom überlegen ist (Galon et al. 2006). Mehrere Follow-up-Studien bestätigten den starken prognostischen Wert bei Patienten mit kolorektalem Karzinom in allen Stadien der Erkrankung (Mlecnik et al. 2011; Pagès et al. 2009; Galon et al. 2016). Weitere Studien zeigten auch, dass der Immuno-Score ein stärkerer Prädiktor für das Überleben des Patienten als die Mikrosatelliteninstabilität ist (Mlecnik et al. 2016) und dass der Immuno-Score auch als prognostischer Wert bei Hirnmetastasen angewendet werden kann.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde 2012 ein internationales Konsortium von Pathologen und Immunologen gebildet (Galon et al. 2012a; 2012b). Die Hauptziele waren die Bewertung der Durchführbarkeit, Reproduzierbarkeit, Bedeutung und Robustheit des Immuno-Scores. Das Konsortium bestand ursprünglich aus 23 Zentren aus 17 Ländern und wurde von der *Society for Immunotherapy of Cancer* (SITC) unterstützt. Der statistische Analyseplan wurde vordefiniert und alle statistischen Analysen wurden dabei von externen Statistikern durchgeführt. Das primäre Ziel der Studie war es, die Zeit bis zum Wiederauftreten der Erkrankung herauszufinden, abhängig von der jeweiligen Klassifizierung nach Immuno-Score (hoch bis niedrig). Die mediane Dauer bis zum Wiederauftreten über alle beteiligten Zentren betrug 5,9 Jahre. Damit wurde der primäre Endpunkt der weltweit durchgeführten Immuno-Score Studie erreicht. Die Dauer bis zum Wiederauftreten war in den Stadien I / II / III des kolorektalen Karzinoms mit hohem Immuno-Score signifikant länger. Der niedrige Immuno-Score zeigte sich insbesondere in einer Untergruppe von Patienten im Stadium II mit hohem Risiko. Die Analysen wurden mit Cox-Modellen durchgeführt, die nach Registrierungszentren geschichtet waren. Die endgültigen Ergebnisse stützten den signifikanten prognostischen Wert des Immuno-Scores bei 3.855 Patienten mit kolorektalen Karzinom in den AJCC / UICC-TNM I / II / III. Der Immuno-Score wird derzeit bei verschiedenen Tumortypen als Ergänzung zum aktuellen TNM-Staging-System untersucht.

Der vornehmlich für die Einstufung kolorektaler Karzinome im Rahmen einer Risikostratifizierung eingesetzte Immuno-Score findet bei MDS-Patienten noch nicht routinemäßig Anwendung. In der Literatur ist dieses Vorgehen noch nicht weit verbreitet. Die Idee dahinter, die Lymphozyteninfiltration und die treibende Wirkung von bestimmten T-Lymphozyten-Subgruppen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit versucht umzusetzen. Es gibt Studien, die sich dieser Fragestellung angenommen haben und die Wirkung von Lymphozyteninfiltration als Prognosefaktor bzw. zur Therapieentscheidung bei MDS untersucht haben (so z.B. Sallmann et al. (2020) und Pescia et al. (2021)). Im Vergleich zu den bislang veröffentlichten Studien zu

dem Themenbereich lässt sich sagen, dass wie bei kolorektalen Karzinomen der Immuno-Score eine mögliche Prognosemethode bei MDS sein kann.

So wurde die Bedeutung des Immun-Microenvironments des Knochenmarks bei MDS hervorgehoben. Dies weist in einigen Fällen auf eine mögliche vermittelte „autoimmune“ ätiopathogenetische Rolle hin oder eine Korrelation zwischen bestimmten T-Zell-Subtypen und der Aggressivität der Krankheit, wie z. B. CD4⁺-T-reg-Zellen, die die Krankheitsprogression durch eine Verringerung der antineoplastischen Reaktion beeinflussen (Sallman et al. 2020).

MDS mit hohem Risiko stellen therapeutische Herausforderungen dar und werden normalerweise mit hypomethylierenden Wirkstoffen wie Azacitidin behandelt. Die Studie von Sallman et al. (2020) bestätigte die große Bedeutung des Microenvironments bei MDS. Sie stellt fest, dass höhere lymphozytäre Infiltrate vor und nach der Behandlung mit einem besseren Ansprechen auf Azacitidin korrelieren und dass höhere lymphozytäre Infiltrate vor der Behandlung mit einem geringeren Risiko einer AML-Progression verbunden sind. So wurde bspw. nach einer Behandlung mit Azacitidin nur ein geringer, nicht signifikanter Anstieg des lymphozytären Infiltrats beobachtet.

In einer Arbeit von Pescia et al. (2021) wurden retrospektiv 57 Hochrisiko-MDS-Fälle analysiert, um durch die Azacitidin-Therapie induzierte Veränderungen oder relevante Korrelationen zwischen Therapieansprechen und Vor- oder Nachbehandlungsmerkmalen zu identifizieren (Pescia et al. 2021).

Im Rahmen der Studie konnte gezeigt werden, dass, ähnlich wie bei Knochenmarkbiopsien vor der Behandlung, höhere lymphozytäre Infiltrate mit einem besseren Ansprechen auf die Behandlung ($p = 0,004$), mit Mittelwerten des lymphozytären Infiltrats von 8,96 % bei Respondern und von 6,10 % bei Non-Respondern, korrelierten (Pescia et al. 2021).

Es wurde ebenso die Rolle von lymphozytärem Infiltrat und p53⁺-Elementen als prädiktive Marker bei mit Azacitidin behandeltem MDS diskutiert. Diese eröffnen neue Kapitel im Verständnis der MDS-Entwicklung und -Behandlung (Pescia et al. 2021).

Obwohl statistisch nicht signifikant, wurde beobachtet, dass nach der Behandlung eine leichte Abnahme der CD34⁺- und CD117⁺-Blasten und der p53⁺-Vorläufer vorliegen.

Darüber hinaus korrelierten der zytogenetische IPSS-R-Score vor der Behandlung ($p = 0,004$), das lymphozytäre Infiltrat ($p = 0,017$) und die p53⁺-Elemente ($p = 0,001$) mit der AML-Progression; Lymphozyteninfiltrat war vor der Behandlung auch mit einem besseren Ansprechen auf die Therapie verbunden ($p = 0,004$), was auf eine antitumorale Rolle des Microenvironments

des Knochenmarks schließen lässt. Die Blastenzahl nach der Behandlung wirkte sich negativ auf die Überlebenschance ($p = 0,035$) und das Risiko einer leukämischen Progression ($p = 0,04$) aus, während sowohl das lymphozytäre Infiltrat nach der Behandlung als auch die p53+-Elemente eine signifikante Korrelation mit dem Ansprechen auf die Behandlung zeigten ($p = 0,004$ und $p = 0,003$) (Pescia et al. 2021).

Das Vorhandensein einer funktionellen T-Lymphozyten-Subgruppe ist entscheidend für die erfolgreiche Anwendung von Immun-Checkpoint-basierten Therapien zur Behandlung von Malignomen. Es wurde gezeigt, dass T-Zellpopulationen im Rahmen dieser Therapieform erhalten bleiben und darüber hinaus sogar mit CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowohl im peripheren Blut als auch im Knochenmark bei Patienten mit AML erhöht werden können (Daver et al. 2016). Wendelbo et al. zeigten, dass selbst bei AML-Patienten mit Chemotherapie-induzierter Leukopenie die meisten zirkulierenden Leukozyten bei den AML-Patienten T-Lymphozyten waren, während B-Lymphozyten und Monozyten normalerweise < 10 % ausmachten (Wendelbo et al. 2004). T-Zellen bei AML-Patienten weisen Unterschiede zu T-Zellen gesunder Menschen auf, wobei Genexpressionsprofilstudien an T-Zellen von Patienten mit AML eine abweichende T-Zell-Aktivierung zeigen. In ähnlicher Weise legte die durchflusszytometrische Immunphänotypisierung peripherer Blutlymphozyten im Vergleich zu gesunden Personen bei Patienten mit AML eine Expansion des aktivierten T-Zell-Kompartiments dar, deren pathophysiologische Bedeutung jedoch unklar bleibt (Boddu et al. 2018).

Eine niedrige Lymphozytenzahl ist ein prognostischer Faktor bei soliden Tumoren und lymphatischen Malignomen (Ray-Coquard et al. 2009). Die Prävalenz und die prognostischen Auswirkungen der Lymphopenie bei MDS-Patienten wurden weniger systematisch untersucht. In einer Studie von Silzle et al. (2019) wurde bei 1.023 Patienten mit MDS die absolute Lymphozytenzahl im Knochenmark mit Fokus auf MDS-Subtypen gemäß der Klassifikation der WHO 2016, dem IPSS-R und dem Vorhandensein von Komorbiditäten untersucht (Silzle et al. 2019). In dieser Arbeit wurde erläutert, dass eine direkte Beziehung zwischen der MDS-Pathophysiologie und niedrigen Lymphozytenzahlen besteht. Es wurden signifikante Unterschiede in Bezug auf die absolute Lymphozytenzahl zwischen verschiedenen MDS-Subtypen festgestellt. Bemerkenswerterweise waren absolute Lymphozytenzahlen niedriger in Subtypen mit schlechterer Prognose, wie MDS mit höherem Risiko gemäß IPSS-R, Fällen von therapieassoziierten MDS und bei Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose transfusionsabhängig waren. Darüber hinaus war Lymphopenie mit niedrigeren peripheren Blutwerten als Charakteristikum für die Schwere der Erkrankung verbunden (Silzle et al. 2019).

Inwiefern durch den Immuno-Score genaue Aussagen zur Pathogenese getroffen werden können, lässt sich durch das Immunsystem und die Immundysregulation erklären. Seit vielen Jahren wird über eine entzündliche Komponente von MDS diskutiert, die eine direktere Rolle der chronischen Signalübertragung des angeborenen Immunsystems bei der Pathogenese von MDS unterstützen (Barreyro et al. 2018). In einer Arbeit von Gañán-Gómez et al. (2015) wurde ausgeführt, dass die Dysregulation der HSZ bei MDS zu abnormaler Hämatopoese, unausgeglichener Apoptose und Proliferation im Knochenmark der Patienten führt und eine wichtige Rolle bei der Entstehung von MDS spielt (Gañán-Gómez et al. 2015). Schließlich sind Immunanomalien bekannt, bei denen regulatorische $CD4^+$ -T-reg-Zellen eine Autoimmunantwort auf normale HSZ auslösen können, welche zur malignen Hämatopoese führt. Obwohl MDS-Patienten im Allgemeinen an Lymphopenie leiden, ist die zelluläre Immunität bei MDS mit niedrigerem Risiko generell hochreguliert. Diese Patienten weisen eine höhere Anzahl $CD8^+$ T-Zellen und eine niedrigere Anzahl regulatorischer $CD4^+$ T Zellen auf (Fozza et al. 2012).

Unsere Ergebnisse weisen ebenfalls darauf hin, dass eine erhöhte Anzahl an $CD4^+$ -T-regulatorischen Zellen vor allem bei MDS mit schlechter Prognose vorkommt.

In der vorliegenden Arbeit zeigen die Ergebnisse, wie bereits den im dritten Kapitel dargestellten Diagrammen zu entnehmen ist, dass unsere Patienten ein heterogenes Immun-Microenvironment aufweisen. So sind in unserem Fall bei den MDS-Typen mit vielen $CD3^+$ T-Zellen vor allem $CD4^+$ T-Zellen gegenüber $CD8^+$ vertreten. Innerhalb des IPSS-R als Prognose-Score wurde die Dichte der Lymphozyten Subgruppen untersucht. Unsere Daten ergeben eine höhere Dichte an $CD8^+$ bei IPSS-R 1 und 2. Durch die anti-tumorale Aktivierung des Immunsystems mittels $CD8^+$ wird eine bessere Prognose der Erkrankung erwartet. Wiederum zeigt sich innerhalb IPSS-R 3 eine höhere Dichte an $CD4^+$. Höhere Anteile an $CD34^+$ Blasten kamen im IPSS-R 4 vor. Dadurch lässt sich sagen, dass höhere Anteile an Blasten erwartungsgemäß eine schlechtere Prognose vermitteln.

Während bei dem herkömmlichen IPSS-R-Score weitere Parameter zur Therapieentscheidung herangezogen werden, könnte das inflammatorische Mikromilieu (hier stark vereinfacht zusammengefasst als Immuno-Score) einen weiteren Faktor bei der Entstehung, Progression und ggf. auch die Therapie von MDS darstellen.

4.1.2 Diskussion der Methodik

Die automatische Zell- bzw. Zellkernerkennung in histologischen Bildern stellt eines der Hauptziele der digitalen Pathologie dar. Dabei liegt der Fokus normalerweise auf der groben

Lokalisierung von Objekten in einem Bild und nicht in der präzisen Erkennung seiner jeweiligen Grenzen (Xing und Yang 2016).

Die Vielfalt der verfügbaren Software-Tools in diesem Bereich spiegelt das große Interesse an der Lösungsfindung des geschilderten Problems wider. Bisherige Veröffentlichungen zu diesem Thema wenden im Wesentlichen entweder "klassische" Segmentierungsmethoden oder Methoden an, die hauptsächlich auf maschinellem Lernen basieren.

Die Gruppe der klassischen Segmentierungsmethoden umfasst eine Vielzahl unterschiedlicher Ansätze und kann grob in drei verschiedene Hierarchieebenen unterteilt werden: erstens gibt es Merkmale auf Pixelebene, die weiter in Pixel unterteilt werden können (z.B. Intensität) und texturbasierte (z. B. Frequenz-)Merkmale (Tscherepanow et al. 2008; Kothari et al. 2013; Raman et al. 2007). So würden beispielsweise Lymphozyten durch ihre blaue Farbe definiert werden. Zweitens gibt es Merkmale auf Objektebene, die sich aus mehreren Ableitungen der oben genannten pixelbasierten Merkmale zusammensetzen. Auf dieser Ebene ist wiederum eine weitere Unterteilung in kontur- (z.B. Kantenerkennung) und regionsbasierte Merkmale (z.B. Homogenität) möglich (Kothari et al. 2013). Im Ergebnis dessen würden die Lymphozyten als scharf abgegrenzte Objekte mit homogener blauer Farbe definiert. Drittens gibt es Merkmale auf semantischer Ebene, die sich aus den beiden zuvor genannten Ebenen ableiten. Nach dieser dritten Strategie würden die genannten Lymphozyten als scharf abgegrenzte Objekte mit homogener Farbe definiert, die die Kriterien anderer Zellen wie Epithelzellen nicht erfüllen (Kothari et al. 2013). Diese Klassifizierungen könnten entweder auf expliziten (z. B. geometrischen) Einschränkungen (Raman et al. 2007) oder auf Techniken des maschinellen Lernens (z. B. Unterstützung von Vektormaschinen oder neuronalen Netzen) beruhen, die explizit oder implizit die Definitionen der jeweiligen Klasse enthalten (Kothari et al. 2013).

So verwendeten viele Studien, die sich anfänglich hauptsächlich mit „klassischen“ Segmentierungsansätzen befassten, schließlich auch maschinelles Lernen, um die automatische Zellerkennung zu verbessern (Kothari et al. 2013; Raman et al. 2007). Unter den Ansätzen, die hauptsächlich auf maschinellem Lernen beruhen und typischerweise mit mehr oder weniger Rohbilddaten begannen, wurden einige Variationen von CNNs angewendet. Diese Studien führen zu unterschiedlichen Produktionsformen. Dies erschwert die Vergleiche zwischen verschiedenen Algorithmen und unserem angewandten CNN-Kaskaden-basierten Ansatz: Zum Beispiel trainierten Xu et al. (2016) ein CNN, um zu entscheiden, ob ein Tumor eine Region eines Bildes einnimmt oder nicht (Xu et al. 2016). Dieses Klassifizierungswerkzeug führt zu markierten Bildern, jedoch nicht zu segmentierten, zählbaren Zellkernen wie in unserem Ansatz. Dennoch reicht unser Ansatz derzeit nicht aus, um eine eingehende Analyse der zellulären

Zusammensetzung von komplexen Bildern zu ermöglichen, da unsere CNN-Kaskade noch nicht darauf trainiert wurde, segmentierte Zellen in verschiedene Subtypen (z.B. durchschnittliche und dysplastische Zellen) zu klassifizieren. Im Rahmen der Zellsegmentierung implementierte Kavassery ein "Regressions-CNN", das ausgehend von einem einzelnen Bild eine Karte erzeugte, die die Zentroide der Zellkerne beinhaltet (Kavassery Rajalingam 2016). Xing et al. (2016) kombinierten eine CNN basierte Wahrscheinlichkeitskarte mit einem nachfolgenden Segmentierungsalgorithmus und Akram et al. wendeten einen auf Zellerkennungsvorschlägen basierenden Ansatz an, der zu Begrenzungsrahmen um Zellkerne führte (Carneiro et al. 2016; Akram et al. 2016). Im Gegensatz dazu ist unser Ansatz eine Kaskade von CNNs, bei der jedes CNN eine andere Aufgabe erfüllt, nämlich die Gewebedetektion und die Überlappungserkennung. Li et al. beschrieben in ihrer Arbeit eine CNN-Kaskade zur Gesichtserkennung (Li et al. 2015). Obwohl sich diese Methoden grundlegend unterscheiden, ist unsere Vorgehensweise in Bezug auf Leistungsmetriken (wie z. B. Präzision) vergleichbar mit den beschriebenen, veröffentlichten Methoden (Xing et al. 2016).

4.2 Limitation der Arbeit

Eine grundsätzliche Limitation dieser Arbeit ist die Gefahr einer Untersucherabhängigkeit der Daten. Die möglichen Schwachpunkte dabei sind: die Erhebung der Daten, die Aufarbeitung der Knochenmarkbiopsien, die immunhistochemische Färbung der jeweiligen Proben und die Anwendung des IPSS-R anhand der klinischen Daten. Zu den technischen Aspekten lässt sich festhalten, dass die Digitalisierung der Proben, die gewählte Zellerkennungsmethode und die manuelle Kennzeichnung der Slides weitere Schwachstellen im Rahmen von untersucherabhängigen Fehlerquellen darstellen können.

4.2.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv war in Bezug auf die Alters- und Geschlechtsverteilung mit demographischen Daten ähnlicher Studien vergleichbar. Das erhöhte Risiko von Männern im Vergleich zu Frauen (59 % zu 41 %) findet sich auch in zahlenmäßig größeren Grundgesamtheiten ((Della Porta et al. 2015): 318 Patienten mit 58 % zu 42 %; (Schanz et al. 2012): 2.902 Patienten mit 58,4 % zu 41,6 %). Auch der Median war mit 71 Jahren annäherungsweise identisch mit den Vergleichsarbeiten (Schanz et al. 2012): 70 Jahre). Ebenso wurden in einer Studie von Greenberg et al. (2012) Daten von 7.012 Patienten untersucht: ihr medianes Alter betrug 71 Jahre; 77 % waren > 60 Jahre, das Verhältnis Männer zu Frauen lag bei 1,5:1 (Greenberg et al. 2012).

4.2.2 IPSS-R und WHO-Klassifikation

Während die Aufteilung von insgesamt 2.902 Patienten in der von Schanz et al. (2012) durchgeführten Studie zum IPSS-R zum genetischen Risiko in Prognosegruppen wie folgt verteilt waren: sehr günstig (2,9 %), günstig (65,7 %), intermediär (19,2 %), ungünstig (5,4 %) und sehr ungünstig (6,8 %) (Schanz et al. 2012), ist das Patientenkollektiv in dieser Dissertation hinsichtlich der Prognose von sehr günstig bis sehr ungünstig folgendermaßen aufgeteilt: 2,1 %, 54,2 %, 11,5 %, 8,3 % und 13,5 %. Bei zehn Patienten lagen keine Informationen zum IPSS-R vor. Die Verteilung ist im direkten Vergleich, vermutlich aufgrund des Einschlusses von Patienten mit sekundärem MDS begründet, unterschiedlich und die Hochrisiko-Genetik (ungünstiger und sehr ungünstiger Prognosen) im Verhältnis etwas stärker vertreten.

Es zeigten sich im Rahmen dieser Arbeit keine Korrelationen zwischen IPSS-R und WHO-Klassifikation. Dies gilt für das Gesamt- wie auch das Score-Kollektiv. Unter der Annahme, dass ein erhöhtes zytogenetisches Risiko mit einem höheren Stadium laut WHO einhergeht, ist dies zunächst überraschend, jedoch werden diese Erkenntnis mit denen vergleichbarer publizierter Ergebnisse belegt.

In einer Studie von Germing et al. (2006) mit 1.095 Patienten wurden alle WHO-Subtypen im Hinblick auf ihren Prognoseeinfluss bei MDS analysiert. Es zeigte sich eine unterschiedliche Beschreibung der zytogenetischen Zusammensetzung bei der Grundgesamtheit zwischen den WHO-Gruppen in Bezug auf den Anteil des Kollektivs mit nachweisbar abnormem Karyotyp (RCMD [MDS-MLD – Anm. d. Verf.]: 49 % vs. RAEB-1 [MDS-EB1 – Anm. d. Verf.]: 61 %, RAEB-2 [MDS-EB2 – Anm. d. Verf.]: 62 %). Leichte Unterschiede zeigten sich ebenfalls zwischen RCMD, RAEB1 und RAEB-2 in Bezug auf die zytogenetische Risikoverteilung nach IPSS-R (0 Punkte: 70 % vs. 62 % vs. 60 %; 0,5 Punkte: 14 % vs. 16 % vs. 15 %; 1 Punkt: 16 % vs. 25 % und 26 %). Eine statistische Testung dieser Daten auf Signifikanz wurde nicht durchgeführt. Für die Einteilung der morphologischen Kategorien wurde die zytologische Untersuchung gewählt (Germing et al. 2006).

Der anfängliche Verdacht, dass es (mit Ausnahme des günstigsten WHO-Subtyps MDS-SLD) offensichtlich keinen Zusammenhang zwischen dem genetischen Risiko und den WHO-Subtypen MDS-MLD, MDS-EB-1 und MDS-EB-2 gibt, bestätigte sich im Vergleich mit der bestehenden Literatur. Dieser Subtyp ist in der Diagnostik jedoch durch die histologische Morphologie nur schwer zugänglich.

4.2.3 Molekulare Veränderungen

In der vorliegenden Arbeit wurden keinerlei zytogenetischen Merkmale zur Analyse herangezogen.

Allerdings werden Rezidivierende zytogenetische Anomalien als starke Prädiktoren für die Prognose bei MDS angesehen und werden in mehrere prognostische Bewertungssysteme aufgenommen, die in der klinischen Praxis verwendet werden (Bejar 2014). Einzelne, isolierte Anomalien können eine Vielzahl von prognostischen Assoziationen innehaben. So ist bspw. die Deletion von Chromosom 5q günstig, während der Verlust von Chromosom 7 ungünstig ist (Schanz et al. 2012). Unabhängig von der Art der Läsionen wird im Gegensatz dazu das Vorliegen von drei oder mehr Chromosomenanomalien immer als ungünstig angesehen. Die Zuweisung eines erheblichen Risikos erfolgt in Prognosemodellen wie dem IPSS-R für die 10 % der MDS-Patienten mit einem komplexen Karyotyp, gekennzeichnet durch drei oder mehr somatische Chromosomenanomalien in einem einzigen Klon. Das IPSS-R weist Patienten mit genau drei Anomalien ein „ungünstiges“ zytogenetisches Risiko zu, während Patienten mit vier oder mehr Anomalien ein „sehr ungünstiges“ zytogenetisches Risiko zugeschrieben bekommen – die höchstmögliche Risikokategorie, mit einem Score, der den für Knochenmarksblasten zugeschriebenen Wert von >10 % übersteigt (Schanz et al. 2012). Tatsächlich schließt der Befund vom komplexen Karyotyp die meisten MDS-Patienten davon aus, ein MDS mit „geringem Risiko“ laut IPSS-R zu haben, auch wenn nur ein zusätzlicher Risikofaktor vorhanden ist (Haase et al. 2019).

4.2.4 Alternative Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurde als Methodik ausschließlich die immunhistochemische Färbung der Entzündungszellen und ein benutzerdefiniertes Segmentierungswerkzeug für die Detektion von Zellkernen genutzt.

Eine alternative Methode zur Zellerkennung stellt die Durchflusszytometrie dar.

Die Immunphänotypisierung durch die Durchflusszytometrie ist eine gängige Methode zur Verbesserung der Bewertung von Knochenmarksdysplasie. Der Grund für die Anwendung der Durchflusszytometrie bei der diagnostischen Aufarbeitung von MDS ist, dass die Immunphänotypisierung eine genaue Methode zur quantitativen und qualitativen Bewertung von hämatopoetischen Zellen ist und dass festgestellt wurde, dass MDS eine abnormale Expression mehrerer zellulärer Antigene aufweist. Um klinisch anwendbar zu werden, sollte die Durchflusszytometrie-Analyse auf Parametern mit ausreichender Spezifität und Sensitivität basieren. Die

Daten sollten zwischen verschiedenen Anwendern reproduzierbar und die Ergebnisse sollten für Kliniker leicht verständlich sein (Della Porta et al. 2011).

In einer Arbeit von Xu et al. (2014) wurde bei 528 MDS-Patienten die Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass niedriggradiges MDS eine signifikante Abnormalität der CD15-, CD11b-, CD4- und CD56-Expression auf CD34⁺-Blasten kennzeichnet, während hochgradiges MDS eine bemerkenswerte Abnormalität der CD19-, CD38- und CD7-Expression auf CD34⁺-Blasten aufweist. Daneben wurde ein höherer Gesamtanteil an CD34⁺-Blasten beobachtet (Xu et al. 2014).

Schwierig bleibt jedoch die Auswahl geeigneter Antikörper. Daher ist es unbedingt erforderlich, ein wirtschaftliches und leicht standardisierbares Diagnosesystem zu etablieren, das auf der Auswahl von Immunphänotypen mit spezifischen biologischen Bedeutungen basiert, die klonale Zellen bei MDS widerspiegeln könnten. Selbst einzelne Immunzell-Typen können unterschiedliche Oberflächen-Antigene erhalten, die für die Prognosebestimmung eine große Rolle spielen könnten.

4.2.5 Technische Limitation

Eine Einschränkung unseres Tools ist die Rechenzeit pro Bildkachel, die etwa 0,1 bis 0,5 Minuten pro 1000 x 1000 Pixel-Bild beträgt. Zur Analyse ganzer WSI kann einerseits eine Parallelisierung angewendet werden, um die Gesamtberechnungszeit zu verkürzen: Betrachtet man beispielsweise ein WSI einer Knochenmarkbiopsie (durchschnittlich 15.000 x 30.000 Pixel), impliziert dies die Notwendigkeit, etwa 450 Kacheln mit 1000 x 1000 Pixel zu berechnen. Die Verwendung der parallelen MATLAB-Toolbox, die auf 12 Kerne beschränkt ist, würde zu einer Berechnungszeit von ca. 0,5 bis 1 Stunde pro WSI führen.

Auf der anderen Seite führt das Verschieben der Berechnungen über CUDA (das bereits in MatConvNet verfügbar ist) auf die GPU (was bereits in MatConvNet verfügbar ist) zu den niedrigsten Berechnungszeiten: Auf diese Weise erhält unser Tool eine Beschleunigung von mindestens Faktor 2 (mit einer NVidia GeForce).

Wenn alternativ nur die Anzahl der Zellen von Interesse ist, kann ein neues CNN trainiert werden, um den Zellgehalt pro Kachel zu schätzen, wie es Seguí et al. (2015) für die Zählung von Personen beschrieben haben (Seguí et al. 2015). Daher könnten Trainingsdaten durch den hier vorgestellten CNN-Kaskaden-basierten Ansatz in einer Langzeitberechnung erzeugt werden.

Zudem ist ergänzend zu erwähnen, dass die durch den Untersucher manuell markierten ROIs auch eine Limitation darstellen können.

5 Zusammenfassung

Das MDS ist eine komplexe Erkrankung mit seiner herausfordernder Diagnose- und Prognosebestimmung. Die Prognose von Patienten mit MDS ist sehr heterogen und daher müssen Prognosesysteme entwickelt werden, die eine Risikostratifizierung ermöglichen und bei der zeitlichen Abstimmung und Auswahl der Therapie helfen. Neben dem prognostischen Wert morphologischer Klassifikationen werden derzeit eine Reihe prognostischer Scores bei MDS verwendet. In dieser vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Lymphozyteninfiltraten im Knochenmark-Microenvironment als Prognosefaktor untersucht.

Zunächst wurden die histologischen Daten von 96 Patienten mit Diagnose MDS immunhistochemisch für bestimmte Zellen (CD 3⁺, CD 4⁺, CD 5⁺, CD 8⁺, CD 34⁺) bearbeitet und mit einem nicht veröffentlichten, von Herrn PD Dr. Cleo-Aron Weis (Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mannheim) entwickelten, benutzerdefinierten Segmentierungswerkzeug für die Detektion von Zellkernen im Knochenmark in der Programmiersprache MATLAB (mit MatConvNet als CNN-toolbox und C++ im Hintergrund) untersucht.

Die Ergebnisse zeigten allerdings keine homogene Verteilung bzw. Clusterbildung. Im Vergleich zu vielen anderen veröffentlichten Arbeiten konnte bewiesen werden, dass Lymphozyteninfiltrate ein sehr häufiger und konstanter Befund bei MDS sind und dass eine erhöhte Dichte an Lymphozyten vor und nach der Therapie mit niedrigerem Risiko und besserer Prognose (IPSS-R) korreliert. Innerhalb der Lymphozyten-Untergruppen scheinen vor allem CD8⁺-Zellen durch ihre mutmaßlich antitumorale Wirkung für die verbesserte Prognose nach IPSS-R verantwortlich zu sein, während ein hoher Gehalt an CD4⁺-Zellen bei high-risk MDS möglicherweise auf eine erhöhte Zahl an immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen hinweist und einen prognostisch eher ungünstigen Faktor darstellte. Der Einfluss spezifischer zytogenetischer oder molekularpathologischer Veränderungen (z.B. der Verlust von Chr. 5q) auf das Ausmaß und die Zusammensetzung des Immuninfiltrates wurden in dieser Arbeit nicht untersucht und wären eine interessante Fragestellung für weitere Analysen an einem größeren Kollektiv. Ebenfalls können die hier erarbeiteten Kriterien für prognostische oder (differential-)diagnostische Fragestellungen genutzt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Adès L, Itzykson R, Fenaux P (2014): Myelodysplastic syndromes. *Lancet* 383, 2239–2252
- Afable MG, Tiu RV, Maciejewski JP (2011): Clonal Evolution in Aplastic Anemia. *ASH Educ. Program Book 2011*, 90–95
- Altman Y, (2015): Accelerating MATLAB Performance: 1001 tips to speed up MATLAB programs. <https://www.crcpress.com/Accelerating-MATLAB-Performance-1001-tips-to-speed-up-MATLAB-programs/Altman/p/book/9781482211290>; abgerufen am 26.02.2019
- Anderson LA, Pfeiffer RM, Landgren O, Gadalla S, Berndt SI, Engels EA (2009): Risks of myeloid malignancies in patients with autoimmune conditions. *Br. J. Cancer* 100, 822–828
- Arber D., Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW (2016): The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127, 2391–2405
- Aslan D, Garde C, Nygaard MK, Helbo AS, Dimopoulos K, Hansen JW, Severinsen MT, Treppe Dahl MB, Sjø LD, Grøn bæk K, Kristensen LS (2016): Tumor suppressor microRNAs are downregulated in myelodysplastic syndrome with spliceosome mutations. *Oncotarget* 7, 9951–9963
- Bain B (2001): Bone marrow trephine biopsy. *J. Clin. Pathol.* 54, 737–742
- Barreyro L, Chlon TM, Starczynowski DT (2018): Chronic immune response dysregulation in MDS pathogenesis. *Blood* 132, 1553–1560
- Bejar R (2014): Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 99, 956–964
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1982): Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 51, 189–199
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1976): Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol.* 33, 451–458
- Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH, Pagès F, Galon J (2010): Natural immunity to cancer in humans. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 215–222
- Boddu P, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Allison J, Sharma P, Daver N (2018): The emerging role of immune checkpoint based approaches in AML and MDS. *Leuk. Lymphoma* 59, 790–

802

Cogle CR (2015): Incidence and Burden of the Myelodysplastic Syndromes. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 10, 272–281

Corey SJ, Minden MD, Barber DL, Kantarjian H, Wang JCY, Schimmer AD (2007): Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat. Rev. Cancer* 7, 118–129

Daver N, Basu S, Garcia-Manero G, Cortes JE, Ravandi F, Ning J, Xiao L, Juliana L, Kornblau SM, Konopleva M et al. (2016): Defining the Immune Checkpoint Landscape in Patients (pts) with Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood* 128, 2900

Della Porta MG, Lanza F, Del Vecchio L (2011): Flow cytometry immunophenotyping for the evaluation of bone marrow dysplasia. *Cytometry B Clin. Cytom.* 80B, 201–211

Della Porta MG, Travaglino E, Boveri E, Ponzoni M, Malcovati L, Papaemmanuil E, Rigolin GM, Pascutto C, Croci G, Gianelli U et al. (2015): Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 29, 66–75

Einführung in die Objekt-Orientierte Programmierung mit MATLAB 2015. <https://de.mathworks.com/company/newsletters/articles/introduction-to-object-oriented-programming-in-matlab.html>; abgerufen am 26.02.2019

Flores-Figueroa E, Varma S, Montgomery K, Greenberg PL, Gratzinger D (2012): Distinctive contact between CD34+ hematopoietic progenitors and CXCL12+ CD271+ mesenchymal stromal cells in benign and myelodysplastic bone marrow. *Lab. Invest.* 92, 1330–41

Fozza C, Contini S, Viridis P, Galleu A, Massa A, Bonfigli S, Longinotti M (2012): Patients with myelodysplastic syndromes show reduced frequencies of CD4+ CD8+ double-positive T cells. *Eur. J. Haematol.* 88, 89–90

Fozza C, Longinotti M (2012): Are T-cell dysfunctions the other side of the moon in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes? *Eur. J. Haematol.* 88, 380–387

Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J (2012): The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 12, 298–306

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* 313, 1960–1964

- Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bifulco C et al. (2014): Towards the introduction of the ‘Immunoscore’ in the classification of malignant tumours. *J. Pathol.* 232, 199–209
- Galon J, Mlecnik B, Marliot F, Ou F-S, Bifulco CB, Lugli A, Zlobec I, Rau TT, Hartmann A, Masucci GV et al. (2016): Validation of the Immunoscore (IM) as a prognostic marker in stage I/II/III colon cancer: Results of a worldwide consortium-based analysis of 1,336 patients. *J. Clin. Oncol.* 34, 3500–3500
- Galon J, Pagès F, Marincola FM, Angell HK, Thuri M, Lugli A, Zlobec I, Berger A, Bifulco C, Botti G et al. (2012a): Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J. Transl. Med.* 10, 205
- Galon J, Pagès F, Marincola FM, Thurin M, Trinchieri G, Fox BA, Gajewski TF, Ascierto PA (2012b): The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J. Transl. Med.* 10, 1
- Gañán-Gómez I, Wei Y, Starczynowski D, Colla S, Yang H, Cabrero-Calvo M, Bohannan Z, Verma A, Steidl U, Garcia-Manero G (2015): Deregulation of innate immune and inflammatory signaling in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 29, 1458–1469
- Germing U, Strupp C, Kuendgen A, Isa S, Hildebrandt B, Giagounidis A, Aul C, Gattermann N, Haas R (2006): Prospective validation of the WHO proposals for the classification of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 91, 1596–1604.
- Glenthøj A, Ørskov AD, Hansen JW, Hadrup SR, O’Connell C, Grønbaek K (2016): Immune Mechanisms in Myelodysplastic Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* 17
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenau P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D et al. (1997): International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. *Blood* 89, 2079–2088.
- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, Bennett JM, Bowen D, Fenau P, Dreyfus F et al. (2012): Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood* 120, 2454–2465
- Haase D, Stevenson KE, Neuberg D, Maciejewski JP, Nazha A, Sekeres MA, Ebert BL, Garcia-Manero G, Haferlach C, Haferlach T et al. (2019): TP53 mutation status divides myelodysplastic syndromes with complex karyotypes into distinct prognostic subgroups. *Leukemia* 33, 1747–1758

- Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, Schnittger S, Sanada M, Kon A, Alpermann T et al. (2014): Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 28, 241–247
- Janssen JW, Buschle M, Layton M, Drexler HG, Lyons J, van den Berghe H, Heimpel H, Kubanek B, Kleihauer E, Mufti GJ (1989): Clonal analysis of myelodysplastic syndromes: evidence of multipotent stem cell origin. *Blood* 73, 248–254
- Johnson R (2014): MATLAB Style Guidelines 2.0 - File Exchange. <https://de.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/46056>; abgerufen am 26.02.2019
- Kavassery Rajalingam V: Cell segmentation in cancer histopathology images using convolutional neural networks. Informatik-Master-Arb. Texas 2016
- Kim E, Ilagan JO, Liang Y, Daubner GM, Lee SC-W, Ramakrishnan A, Li Y, Chung YR, Micol J-B, Murphy M, Cho H et al. (2015): SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia Through Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell* 27, 617–630
- Kirilovsky A, Marliot F, El Sissy C, Haicheur N, Galon J, Pagès F (2016): Rational bases for the use of the Immunoscore in routine clinical settings as a prognostic and predictive biomarker in cancer patients. *Int. Immunol.* 28, 373–382
- Kordasti SY, Ingram W, Hayden J, Darling D, Barber L, Afzali B, Lombardi G, Wlodarski MW, Maciejewski JP, Farzaneh F, Mufti GJ (2007): CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood* 110, 847–850
- Kothari S, Phan JH, Stokes TH, Wang MD (2013): Pathology imaging informatics for quantitative analysis of whole-slide images. *J. Am. Med. Inform. Assoc. JAMIA* 20, 1099–1108
- Li H, Lin Z, Shen X, Brandt J, Hua G (2015): A Convolutional Neural Network Cascade for Face Detection. *IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*. pp. 5325–5334
- Li L, Sheng Y, Li W, Hu C, Mittal N, Tohyama K, Seba A, Zhao Y-Y, Ozer H, Zhu T, Qian Z (2017): β -Catenin is a candidate therapeutic target for myeloid neoplasms with del(5q). *Cancer Res.* 77, 4116–4126
- List AF, Vardiman J, Issa J-PJ, DeWitte TM (2004): Myelodysplastic Syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 297–317
- Lyons RM (2012): Myelodysplastic Syndromes: Therapy and Outlook. *Am. J. Med.* 125, S18–S23

Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Giagounidis A, Hildebrandt B, Bernasconi P, Knipp S et al. (2007): Time-Dependent Prognostic Scoring System for Predicting Survival and Leukemic Evolution in Myelodysplastic Syndromes. *J. Clin. Oncol.* 25, 3503–3510

MatConvNet: CNNs for MATLAB. Contribute to vlfeat/matconvnet development by creating an account on GitHub, 2019. . VLFeat.org.

Medyouf H, Mossner M, Jann J-C, Nolte F, Raffel S, Herrmann C, Lier A, Eisen C, Nowak V, Zens B et al. (2014): Myelodysplastic Cells in Patients Reprogram Mesenchymal Stromal Cells to Establish a Transplantable Stem Cell Niche Disease Unit. *Cell Stem Cell* 14, 824–837

Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Maby P, Angelova M, Tougeron D, Church SE, Lafontaine L, Fischer M, Fredriksen T et al. (2016): Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity* 44, 698–711

Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman W-H, Pagès F, Galon J (2011): Histopathologic-Based Prognostic Factors of Colorectal Cancers Are Associated With the State of the Local Immune Reaction. *J. Clin. Oncol.* 29, 610–618

Nagtegaal ID, Quirke P, Schmol H-J (2011): Has the new TNM classification for colorectal cancer improved care? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9, 119–123

Neukirchen J, Schoonen WM, Strupp C, Gattermann N, Aul C, Haas R, Germing U (2011): Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Düsseldorf MDS-registry. *Leuk. Res.* 35, 1591–1596

Ørskov AD, Treppendahl MB, Skovbo A, Holm MS, Friis LS, Hokland M, Grønbaek K (2015): Hypomethylation and up-regulation of PD-1 in T cells by azacytidine in MDS/AML patients: A rationale for combined targeting of PD-1 and DNA methylation. *Oncotarget* 6, 9612–9626

Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K et al. (2009): In Situ Cytotoxic and Memory T Cells Predict Outcome in Patients With Early-Stage Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* 27, 5944–5951

Pecci A, Travaglino E, Klersy C, Invernizzi R (2003): Apoptosis in Relation to CD34 Antigen Expression in Normal and Myelodysplastic Bone Marrow. *Acta Haematol.* 109, 29–34

Pescia C, Boggio F, Croci GA, Cassin R, Barella M, Pettine L, Reda G, Sabbatini E, Finelli C,

- Gianelli U (2021): Lymphocytic Infiltrate and p53 Protein Expression as Predictive Markers of Response and Outcome in Myelodysplastic Syndromes Treated with Azacitidine. *J. Clin. Med.* **10**, 4809
- Porwit A, McCullough J, Erber WN: *Blood and Bone Marrow Pathology E-Book: Expert Consult*, 2nd ed; Churchill Livingstone, S.I. 2011
- Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, Linette GP, Meyer N, Giguere JK, Agarwala SS et al. (2015): Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2006–2017
- Raman S, Maxwell CA, Barcellos-Hoff MH, Parvin B (2007): Geometric approach to segmentation and protein localization in cell culture assays. *J. Microsc.* **225**, 22–30
- Rankin EB, Narla A, Park JK, Lin S, Sakamoto KM (2015): Biology of the bone marrow micro-environment and myelodysplastic syndromes. *Mol. Genet. Metab., SI: Therapy* **116**, 24–28
- Ray-Coquard I, Cropet C, Glabbeke MV, Sebban C, Cesne AL, Judson I, Tredan O, Verweij J, Biron P, Labidi I, Guastalla J-P et al. (2009): Lymphopenia as a Prognostic Factor for Overall Survival in Advanced Carcinomas, Sarcomas, and Lymphomas. *Cancer Res.* **69**, 5383–5391
- ReadImageROI - File Exchange - MATLAB Central. <https://de.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/32479>; abgerufen am 26.02.2019
- Sallman DA, McLemore AF, Aldrich AL, Komrokji RS, McGraw KL, Dhawan A, Geyer S, Hou H-A, Eksioglu EA, Sullivan A et al. (2020): TP53 mutations in myelodysplastic syndromes and secondary AML confer an immunosuppressive phenotype. *Blood* **136**, 2812–2823
- Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, Granada I, Hildebrandt B, Slovak ML, Ohyashiki K et al. (2012): New Comprehensive Cytogenetic Scoring System for Primary Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Oligoblastic Acute Myeloid Leukemia After MDS Derived From an International Database Merge. *J. Clin. Oncol.* **30**, 820–829
- Schofield R (1978): The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7–25
- Schroeder T, Geyh S, Germing U, Haas R (2016): Mesenchymal stromal cells in myeloid malignancies. *Blood Res.* **51**, 225–232
- Seguí S, Pujol O, Vitrià J (2015): Learning to count with deep object features. *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition Workshop* 90-96

- Sekeres MA (2010): The epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 24, 287–294
- Silzle T, Blum S, Schuler E, Kaivers J, Rudelius M, Hildebrandt B, Gattermann N, Haas R, Germing U (2019): Lymphopenia at diagnosis is highly prevalent in myelodysplastic syndromes and has an independent negative prognostic value in IPSS-R-low-risk patients. *Blood Cancer J.* 9, 1–9
- Sprich C: Optimierung von Immunhistochemie-Protokollen an Tissue Microarrays Erfahrungen mit 70 verschiedenen Antikörpern. *Med. Diss. Freiburg im Breisgau* 2006
- Sugimori C, Mochizuki K, Qi Z, Sugimori N, Ishiyama K, Kondo Y, Yamazaki H, Takami A, Okumura H, Nakao S (2009): Origin and fate of blood cells deficient in glycosylphosphatidylinositol-anchored protein among patients with bone marrow failure. *Br. J. Haematol.* 147, 102–112
- Suragani RNVS., Cadena SM, Cawley SM, Sako D, Mitchell D, Li R, Davies MV, Alexander MJ, Devine M, Loveday KS, Underwood KW, Grinberg AV, Quisel JD, Chopra R, Pearsall RS, Seehra J, Kumar R (2014): Transforming growth factor- β superfamily ligand trap ACE-536 corrects anemia by promoting late-stage erythropoiesis. *Nat. Med.* 20, 408–414
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Hrg.): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Band 2. 4. Auflage; Interlational Agency for Research on Cancer, Genf 2008
- Taube JM, Galon J, Sholl LM, Rodig SJ, Cottrell TR, Giraldo NA, Baras AS, Patel SS, Anders RA, Rimm DL, Cimino-Mathews A (2018): Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics. *Mod. Pathol.* 31, 214–234
- The Open Microscopy Environment. <https://www.openmicroscopy.org/omero/>; abgerufen am 25.02.2019
- Thirman MJ, Larson RA (1996): Therapy-related myeloid leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 10, 293–320.
- Treppendahl MB, Kristensen LS, Grønbaek K (2014): Predicting response to epigenetic therapy. *J. Clin. Invest.* 124, 47–55
- Tscherepanow M, Zöllner F, Hillebrand M, Kummert F: Automatic Segmentation of Unstained Living Cells in Bright-Field Microscope Images. In: Perner, P., Salvetti, O. (Hrgs.): *Advances in Mass Data Analysis of Images and Signals in Medicine, Biotechnology, Chemistry and Food*

Industry, Lecture Notes in Computer Science. Springer, Berlin 2008, 158–172

Vercauteren SM, Starczynowski DT, Sung S, McNeil K, Salski C, Jensen C-L, Bruyere H, Lam WL, Karsan A (2012): T cells of patients with myelodysplastic syndrome are frequently derived from the malignant clone. *Br. J. Haematol.* 156, 409–412.

Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW (2005): Colorectal cancer. *Lancet* 365, 153–165

Wendelbo Ø, Nesthus I, Sjø M, Paulsen K, Ernst P, Bruserud Ø (2004): Functional characterization of T lymphocytes derived from patients with acute myelogenous leukemia and chemotherapy-induced leukopenia. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 740–747

Xing F, Xie Y, Yang L (2016): An Automatic Learning-Based Framework for Robust Nucleus Segmentation. *IEEE Trans. Med. Imaging* 35, 550–566

Xing F, Yang L (2016): Robust Nucleus/Cell Detection and Segmentation in Digital Pathology and Microscopy Images: A Comprehensive Review. *IEEE Rev. Biomed. Eng.* 2, 234–263

Xu F, Li X, Chang C-K, Guo J, Wu L-Y, He Q, Zhang Z, Zhu Y, Gu S-C, Shi W-H et al. (2014): Establishment and Validation of an Updated Diagnostic FCM Scoring System Based on Pooled Immunophenotyping in CD34+ Blasts and Its Clinical Significance for Myelodysplastic Syndromes. *PLOS ONE* 9, e88706

Xu J, Luo X, Wang G, Gilmore H, Madabhushi A (2016): A Deep Convolutional Neural Network for segmenting and classifying epithelial and stromal regions in histopathological images. *Neurocomputing* 191, 214–223

Yang H, Bueso-Ramos C, DiNardo C, Estecio MR, Davanlou M, Geng Q-R, Fang Z, Nguyen M, Pierce S, Wei Y et al. (2014): Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia* 28, 1280–1288