



Multidimensionale Charakterisierung reaktiver und
neoplastischer menschlicher Lymphknoten unter
Anwendung von Methoden aus dem Bereich
Bioinformatik, digitale Pathologie, Datenanalyse und
Graphentheorie

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 12
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Patrick Wurzel
aus Darmstadt

Frankfurt (2023)
(D30)

Vom Fachbereich 12 der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Martin Möller

Gutachter: Prof. Dr. Ina Koch

Prof. Dr. Dr. h.c. Martin-Leo Hansmann

Datum der Disputation: **20.12.2023**

Zusammenfassung

Das adaptive Immunsystem schützt den Menschen vor extra- wie auch intrakorporal auftretenden Pathogenen und Krebszellen. Die Funktionalität dieses Prozesses geht hierbei auf die Interaktion und Kooperation einer Vielzahl verschiedener Zelltypen des Körpers zurück und ist vorwiegend innerhalb der Lymphknoten lokalisiert. Ist auch nur ein Bestandteil dieses sensiblen Prozesses gestört, kann dies zu einem teilweisen oder vollständigen Verlust der immunologischen Fitness des Menschen führen. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, solche Aberrationen des humanen Lymphknotengewebes umfassend digital-pathologisch zu detektieren und zu definieren.

Hierfür wurde zunächst eine digitale Gewebedatenbank etabliert. Diese basiert auf dem im Rahmen dieser Arbeit implementierten Content-Management-System *Digital Tissue Management Suite*. Weiterhin wurde die Software *Feature analysis in tissue histomorphometry* entwickelt, welche die Analyse von zweidimensionalen *whole slide images* ermöglicht. Hierbei werden Methoden aus dem Bereich Computer Vision und Graphentheorie eingesetzt, um morphologische und distributionale Eigenschaften der Zelltypen des Lymphknotens zu charakterisieren. Darüber hinaus enthält diese Software Plug-ins zur Visualisierung und statistischen Analyse der Daten.

Aufbauend auf der eigens implementierten, digitalen Infrastruktur, in Kombination mit der Software Imaris wurden zweidimensional und dreidimensional gescannte, reaktive und neoplastische Gewebeproben digital phänotypisiert. Hierbei konnten neue mechanische Barrieren zur Kompartimentalisierung der Keimzentren aufgeklärt werden. Weiterhin konnte der Erhalt des quantitativen Verhältnisses einzelner Zellpopulationen innerhalb der Keimzentren beschrieben werden. Ausgehend von den reaktiven Phänotypen des Lymphknotens, wurden pathophysiologische Aberrationen in verschiedenen lymphatischen Neoplasien untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass speziell die strukturelle Destruktion häufig mit einer morphologischen Veränderung der fibroblastischen Retikulumzellen einhergeht.

Neben strukturellen Veränderungen sind auch zytologische Veränderungen der Tumormikroumgebung zu verzeichnen. Eine besondere Rolle spielen hierbei sogenannte Tumor-assoziierte Makrophagen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass speziell Makrophagen in der Tumormikroumgebung des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms und der chronisch lymphatischen Leukämie spezifische pathophysiologische Veränderungen aufzeigen. Auch konnte gezeigt werden, dass genetische Änderungen neoplastischer B-Zellen mit einer generellen Reduktion der CD20-Antigendichte einhergehen.

Zusammenfassend ermöglichten die Ergebnisse die Generierung eines umfassenden digital-pathologischen Profils des klassischen Hodgkin-Lymphoms. Hierbei konnten morphologische Veränderungen neoplastischer, CD30-positiver Hodgkin-

Reed-Sternberg-Zellen validiert und beschrieben werden. Auch konnten pathologische Veränderungen des Konnektoms und der Tumormikroumgebung dieser Zellen parametrisiert und quantifiziert werden. Abschließend wurde unter Anwendung eines *Random forest*-Klassifikators die diagnostische Potenz digitalpathologischer Profile evaluiert und validiert.

Abstract

The adaptive immune system defends humans' from extra- and intracorporeally occurring pathogens and cancer cells. This process is based on the interaction and cooperation of diverse cell populations within lymph nodes. If even one component of this sensitive process is disturbed, a partial or complete loss of immunological fitness in humans can be found.

To recognize and understand such disturbances at an early stage, this work aimed to detect and define new digital biomarkers for benign and malignant aberrations of human lymph nodes. For this purpose, a digital biobank was established. For the management of this biobank a new content management system named *Digital Tissue Management Suite* was developed. In addition, the digital pathology software *Feature analysis in tissue histomorphometry* was implemented to analyze whole slide images. *Feature analysis in tissue histomorphometry* comprised methods from Computer vision to detect and analyze cell objects and methods from data science to visualize and statistically analyze the data. To analyze three-dimensional images the software IMARIS was used.

Based on the IT infrastructure, it was possible, to digitally phenotype reactive and neoplastic tissue samples. Here, wall-like structures supporting compartmentalization by enclosing the germinal centers could be described for the first time. In addition, the conservation of quantitative ratios of individual cell populations within germinal centers could be shown. The ongoing process of phenotyping intact, reactive tissue enabled the detection and description of neoplastic lymphoid aberrations. Here, it could be shown that structural aberrations like the decompartmentalization process are mostly correlated with morphological alterations of fibroblastic reticulum cells. Cells that are also associated with these structural changes are called tumor-associated macrophages. Analyzing the distribution and morphology of macrophages in the tumor microenvironment revealed specific patterns, especially for tissue samples showing diffuse large B-cell lymphoma and chronic lymphocyte leukemia. Besides alterations in the tumor microenvironment, it could be proven that neoplastic cells show less dense CD20-antigen expressions on the cell surface.

Finally, all the findings were utilized for a holistic and detailed characterization of tissue samples with a diagnosed Hodgkin lymphoma. Here, known morphological alterations could be validated. Pathological changes in the connectomes and the tumor microenvironment of tumor cells could be revealed. Conclusively, the diagnostic potential of such digital pathology profiles could be demonstrated.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Motivation | 1 |
| 1.2 | Ziel der Arbeit | 2 |
| 1.3 | Stand der Technik | 3 |
| 1.4 | Aufbau der Arbeit | 3 |
| 2 | Biologisch-medizinische Grundlagen | 5 |
| 2.1 | Lymphknoten | 5 |
| 2.1.1 | Struktur | 5 |
| 2.1.2 | Zytologie | 7 |
| 2.2 | Das adaptive Immunsystem | 11 |
| 2.3 | Reaktive und neoplastische Lymphadenopathien | 13 |
| 2.3.1 | Lymphadenitis | 13 |
| 2.3.2 | Hodgkin-Lymphom | 15 |
| 2.3.3 | Folikuläres Lymphom | 17 |
| 2.3.4 | Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom | 18 |
| 2.3.5 | Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom | 19 |
| 2.3.6 | Chronisch lymphatische Leukämie | 20 |
| 2.3.7 | Marginalzonenlymphom | 21 |
| 2.3.8 | Mantelzellymphom | 22 |
| 3 | Material und Methoden | 24 |
| 3.1 | Bilddaten | 24 |
| 3.1.1 | 2D-Bilddaten | 24 |
| 3.1.2 | 3D-Bilddaten | 25 |
| 3.1.3 | 4D-Bilddaten | 25 |
| 3.2 | Computer Vision | 25 |
| 3.2.1 | Präprozessierung | 26 |
| 3.2.2 | Objekterkennung | 27 |
| 3.3 | Graphentheorie | 27 |
| 3.3.1 | Zellgraphen | 28 |
| 3.4 | Data engineering und Data science | 28 |
| 3.4.1 | Präprozessierung | 28 |
| 3.4.2 | Statistik | 29 |
| 3.4.3 | Unüberwachtes Lernen | 31 |
| 3.4.4 | Überwachtes Lernen | 32 |
| 3.5 | Hardware | 33 |
| 3.6 | Software | 34 |
| 3.6.1 | Fiji | 34 |
| 3.6.2 | VGG Image Annotator | 34 |
| 3.6.3 | Imaris | 34 |
| 3.6.4 | Verwendete Softwarepakete für die Python-Programmierung | 35 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4 | Ergebnisse: Entwickelte Software | 36 |
| 4.1 | <i>Digital tissue management suite</i> | 36 |
| 4.2 | <i>Digital tissue management suite – Labelprinter</i> | 39 |
| 4.3 | <i>Feature analysis in tissue histomorphometry</i> | 41 |
| 4.3.1 | Hauptprogramm | 42 |
| 4.3.2 | Plug-ins | 46 |
| 5 | Ergebnisse: Die digital-pathologische Charakterisierung reaktiver und neoplastischer Lymphknoten | 51 |
| 5.1 | Projektdesign | 51 |
| 5.2 | Digital-pathologische Charakterisierung reaktiver Lymphknoten | 53 |
| 5.2.1 | Digital-pathologische Charakterisierung des Keimzentrums | 53 |
| 5.2.2 | Die strukturelle Integrität des Keimzentrums | 56 |
| 5.3 | Digital-pathologische Charakterisierung Tumorgenese-induzierter struktureller Destruktion des Lymphknotengewebes | 57 |
| 5.3.1 | Verlust der strukturellen Integrität des Lymphknotens durch die Tumorgenese-induzierte Modulation fibroblastischer Retikulumzellen | 58 |
| 5.3.2 | Verlust der strukturellen Integrität des Keimzentrums in einem angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphom | 59 |
| 5.4 | Digital-pathologische Charakterisierung Tumorgenese-induzierter zytologischer Veränderungen | 59 |
| 5.4.1 | Veränderung der CD20-Expression in neoplastischen B-Zellen | 59 |
| 5.4.2 | Pathologische Veränderungen tumorassoziierter Makrophagen durch die Tumorgenese | 62 |
| 5.5 | Digital-pathologisches Profil des Hodgkin-Lymphoms | 63 |
| 5.5.1 | Die Morphologie der Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle | 65 |
| 5.5.2 | Das Konnektom der Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle | 66 |
| 5.5.3 | Die Tumormikroumgebung der Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle | 68 |
| 5.5.4 | Die diagnostische Potenz digital-pathologischer Eigenschaften | 69 |
| 6 | Diskussion | 70 |
| 6.1 | Bildqualität | 70 |
| 6.2 | Datensatz | 73 |
| 6.3 | Korrelation von Funktion, Morphologie und Verteilung | 73 |
| 6.4 | 2D-, 3D- und 4D-Bildgebung im Vergleich | 78 |
| 6.5 | Etablierung und Möglichkeiten der computerassistierten Detektion in der klinischen Routine | 80 |
| 7 | Zusammenfassung, Schlussfolgerung und Ausblick | 82 |
| 8 | Danksagung | 95 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----|--|----|
| 1 | Aufbau eines Lymphknotens | 6 |
| 2 | Zelltypen des Lymphknotens | 7 |
| 3 | Das adaptive Immunsystem | 11 |
| 4 | Lymphadenitis mit folliculärer Hyperplasie | 14 |
| 5 | Nodulär sklerosierendes Hodgkin-Lymphom | 16 |
| 6 | Follikuläres Lymphom Grad 1–2 | 17 |
| 7 | Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom | 18 |
| 8 | Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom | 19 |
| 9 | Chronisch lymphatische Leukämie | 20 |
| 10 | Marginalzonenlymphom | 21 |
| 11 | Mantelzelllymphom | 22 |
| 12 | Schematische Darstellung der Gewinnung der Bilddaten immun- histologisch präprozessierter Gewebeprobe | 24 |
| 13 | Oberfläche der Software <i>Digital Tissue Management Suite</i> (DTMS) | 38 |
| 14 | Oberfläche der Software <i>Digital tissue management suite - Label- printer</i> (DTMS-LP) | 41 |
| 15 | <i>Feature analysis in tissue histomorphometry</i> (FAITH) | 42 |
| 16 | Projektdesign | 51 |
| 17 | Digital-pathologische Charakterisierung des Keimzentrums | 54 |
| 18 | Die strukturelle Integrität des Keimzentrums | 56 |
| 19 | Verlust der strukturellen Integrität des Lymphknotens durch die Tumorgenese | 58 |
| 20 | Veränderung der CD20-Expression in neoplastischen B-Zellen | 60 |
| 21 | Pathologische Veränderung tumorassoziierter Makrophagen durch die Tumorgenese | 62 |
| 22 | Die Morphologie der Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle | 65 |
| 23 | Das Konnektom der Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle | 67 |
| 24 | Die Tumormikroumgebung der Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle | 68 |
| 25 | Die digital-pathologischen Eigenschaften CD30-positiver Zellen | 71 |
| 26 | Die diagnostische Potenz des digital-pathologischen Profils des Hodgkin-Lymphom (HL) | 71 |
| 27 | Definition des Qualitätsbegriffs | 72 |
| 28 | 2D-3D-4D-Histologie im Vergleich | 78 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|----|---|----|
| 1 | Verwendete Python-Programmbibliotheken | 35 |
| 2 | Metadaten der Software DTMS | 37 |
| 3 | Allgemeine Funktionen des DTMS-Frontends | 39 |
| 4 | Metadaten der Software DTMS-LP. | 40 |
| 5 | <i>FAITH</i> -spezifische Konfigurationsdatei des Hauptprogramms . . | 44 |
| 6 | <i>FAITH</i> -spezifische Konfigurationsdatei zur Registrierung von Plug- ins | 45 |
| 7 | Morphologische Parameter | 47 |
| 8 | Parameter zur Charakterisierung der Zellverteilung | 49 |
| 9 | Projektverantwortlichkeiten | 52 |
| 10 | Die zelluläre Zusammensetzung des Keimzentrums | 55 |
| 11 | Die CD20-Expression reaktiver und neoplastischer B-Zellen . . . | 61 |
| 12 | Digital-pathologische Parameter zur Charakterisierung tumoras- soziierter Makrophagen | 64 |
| 13 | Parameter des digital-pathologischen Profils reaktiver und neo- plastischer Gewebeproben | 70 |

Abkürzungsverzeichnis

- AAM** Alternativ aktivierte Makrophage
- AD** Adenoid
- AITL** Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom
- API** *Application Programming Interface*
- Bcl-2** *B-cell lymphoma 2*
- CAD** Computerassistierte Detektion
- CAM** Klassisch aktivierte Makrophage
- CAR** Chimärer Antigenrezeptor
- CD** *Cluster of Differentiation*
- cHL** Klassisches Hodgkin-Lymphom
- CLL** Chronisch lymphatische Leukämie
- CMS** *Content-Management-System*
- CSV** *Comma-separated values*
- HTML** *Hypertext Markup Language*
- DAPI** 4',6-Diamidino-2-phenylindol
- DBSCAN** *Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise*
- DLBCL** Diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom
- DTMS** *Digital Tissue Management Suite*
- DTMS-LP** *Digital tissue management suite - Labelprinter*
- EBV** Eppstein-Barr-Virus
- EZM** Extrazelluläre Matrix
- FAITH** *Feature analysis in tissue histomorphometry*
- FDC** Follikuläre dendritische Retikulumzellen
- FDR** *False discovery rate*
- FL** Follikuläres Lymphom
- FRC** Fibroblastische Retikulumzellen
- HE** Hämatoxilin-Eosin

HEV Hochendotheliale Venole
HIV *Human Immunodeficiency Virus*
HL Hodgkin-Lymphom
HRS-Zellen Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen
IDZ Interdigitierende dendritische Retikulumzelle
IgG Immunglobulin G
IT Informationstechnologie
LA Lymphadenitis
LDcHL Lymphozytenarmes klassisches Hodgkin-Lymphom
LP-Zellen Lymphozyten-prädominante Zellen
LRcHL Lymphozytenreiches klassisches Hodgkin-Lymphom
MALT Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe
MC Mantelzelllymphom
MCcHL Gemischtzelliges klassisches Hodgkin-Lymphom
MDI *Mean decrease in impurity*
MHC *Major histocompatibility complex*
MPS Mononukleär-phagozytäres System
MWU-Test Mann-Whitney-U-Test
MZ Marginalzonenlymphom
NLPHL Nodulär Lymphozyten-prädominantes Hodgkin-Lymphom
NScHL Nodulär-sklerosierendes klassisches Hodgkin-Lymphom
PD-1 *Programmed cell death protein 1*
PTGC *Progressive Transformation of Germinal Centers*
ROI *Region of interest*
TAF Tumor-assoziiertes Fibroblast
TAM Tumor-assoziierte Makrophage
TFH-Zellen Follikuläre T-Helfer Zellen
TIFF *Tagged Image File Format*

TME Tumormikroumgebung

TPR *True positive rate*

USB *Universal Serial Bus*

VGG *Visual Geometry Group*

VIA *VGG Image Annotator*

WSI *Whole slide image*

1 Einleitung

1.1 Motivation

Ohne ein funktionierendes Immunsystem wäre ein Mensch auf Dauer nicht lebensfähig. Tag für Tag wird der menschliche Körper mit extra- wie auch intrakorporalen Pathogenen und Krebszellen konfrontiert. Diese zu eliminieren, obliegt dem Immunsystem [1]. Ist das Immunsystem selbst gestört, so kann dies das Überleben des Menschen massiv gefährden. Diese Störungen zu detektieren und zu phänotypisieren ist Ziel dieser Arbeit.

Eine solche Störung kann durch verschiedenste Pathogene und Krebszellen bedingt sein. Hierzu zählen unter anderem Bakterien, Viren und entartete, körpereigene Krebszellen. Krebs-Erkrankungen stellen die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland dar (Statistisches Bundesamt, Deutschland). Zusätzlich zeigte die Coronapandemie, dass ebenso virale Erkrankungen eine mögliche Gefahr für Leib und Leben darstellen können. Der Schutz vor solchen Pathogenen und Krebszellen basiert auf der Funktionalität des adaptiven Immunsystems [1]. Das adaptive Immunsystem dient der Identifikation körperfremder Pathogene und aberranter Zellen und der darauffolgenden Neutralisation mittels einer Kaskade zytologischer Prozesse [1, 2]. Ein Großteil dieser Prozesse ist innerhalb des Lymphknotens lokalisiert [1, 3]. Liegt nun eine immunologische Indisposition des Menschen vor, so resultiert dies oftmals in einer pathophysiologischen Veränderungen des Lymphknotens [4, 5]. Hieraus folgt, dass speziell die Charakterisierung von Lymphknotenbiopsien im Fokus dieser Arbeit stehen.

Eine solche histopathologische Untersuchung von Lymphknotenbiopsien wird seit vielen Jahrzehnten vorgenommen [4]. Hierbei werden immunhistologisch präprozessierte Gewebeproben mikroskopiert und hinsichtlich potenziell aberranter Regionen untersucht. Doch innerhalb eines Gewebeschnitts sind mehrere Millionen Zellen lokalisiert, wodurch eine vollständige, lichtmikroskopische Untersuchung aller sichtbaren Zellen in der klinischen Routine schwer durchführbar ist. Auch unterliegt die lichtmikroskopische Untersuchung der Subjektivität des Pathologen. Um diese Untersuchung zukünftig umfassender und objektiver zu gestalten, sollen im Rahmen dieser Arbeit unterstützende Methoden der Computergestützte Detektion (CAD) entwickelt, evaluiert und implementiert werden.

Die histopathologische Untersuchung einer Gewebeprobe basiert auf der Untersuchung der Zell- und Zellkernmorphologie, wie auch der Untersuchung der Verteilung und Vorkommen verschiedener Zellpopulationen [4]. Speziell die morphologische Untersuchung dreidimensionaler Zellen in zweidimensionalen Darstellungen ist jedoch limitiert. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit der Nutzen dreidimensionaler Visualisierungsmethoden evaluiert werden. Schließlich sollen diese Methoden in Kombination mit der klassischen Dünnschnittmikroskopie genutzt werden, um neue diagnostische Eigenschaften zu detektieren, zu defi-

nieren und hinsichtlich bekannter, funktioneller Aberrationen des menschlichen Immunsystems zu korrelieren.

1.2 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Dissertation besteht in der digital-pathologischen Phänotypisierung reaktiver und neoplastischer Gewebeproben.

Dies erfordert zunächst den Aufbau einer digitalen Gewebedatenbank und der Entwicklung einer individuellen *Content-Management-System* (CMS)-Lösung. Darauf aufbauend ist die Implementierung einer Software vonnöten, die das individuelle Etikettieren einzelner Objektträger ermöglicht und so eine effiziente Digitalisierung der Gewebeproben gewährleistet. Die Anpassung der Software an das CMS soll hierbei die automatisierte Integration der neu etikettierten und gescannten Bilddaten in die bestehende Datenbank ermöglichen. Um anschließend eine effektive Analyse der katalogisierten Bilddaten zu gewährleisten, gilt es ebenso eine adäquate Informationstechnologie (IT)-Infrastruktur zu schaffen. Diese IT-Infrastruktur umfasst die Installation ausreichender Hardwareressourcen, wie auch die fortlaufende Entwicklung individueller Softwarelösungen, basierend auf modernen CAD-Methoden.

Mithilfe dieser IT-Infrastruktur sollen bekannte pathophysiologische Veränderungen quantifiziert und neue digital Biomarker identifiziert und definiert werden. Im Rahmen der Tumorgenese werden einzelne Populationen eines Zelltyps funktionell aberrant. Im Zuge der pathologischen Begutachtung liegt das Hauptaugenmerk auf der Identifikation einer Neoplasie. Betrachtet man jedoch das zelluläre System innerhalb des Lymphknotens, so ist festzustellen, dass bereits singuläre, zytologische Veränderungen einen Einfluss auf das gesamte zelluläre Gleichgewicht haben können. Daher ist es im Besonderen das Ziel dieser Arbeit, das lymphatische System als Ganzes zu analysieren. Welche Zellpopulationen sind korreliert? Welche Zellpopulationen erfahren welche pathophysiologische Veränderung im Rahmen der Initiation unterschiedlicher Tumore? Welche strukturellen Veränderungen des Lymphknotens gehen mit der Tumorgenese einher? Neben der qualitativen Beantwortung dieser Fragestellungen liegt das Hauptaugenmerk dieser Arbeit in der digital-pathologischen Parametrisierung pathophysiologischer Aberrationen.

Darüber hinaus ist es das Ziel dieser Arbeit, pathophysiologische Veränderungen hinsichtlich bekannter möglicher funktionaler Aberrationen zu evaluieren. Hierbei soll diskutiert werden, inwiefern mögliche Ursachen einzelner morphologischer oder distributionaler Änderungen identifiziert und aufgezeigt werden können. Abschließend sollen ganzheitliche, digital-pathologische Profile einzelner Tumorentitäten auf Basis der Ergebnisse der quantitativen Bildanalyse erstellt und hinsichtlich ihres diagnostischen Potenzials untersucht werden.

1.3 Stand der Technik

Moderne Mikroskope und *slide scanner* ermöglichen die effiziente und hochauflösende Digitalisierung medizinischer Gewebeproben. Im Besonderen findet im Rahmen der Etablierung der digitalen Pathologie die Digitalisierung immunhistologisch gefärbter Dünnschnitte in der Routine mehr und mehr Einzug [6].

Dies ermöglicht neben der Etablierung der Telepathologie, der Digitalisierung der Archive auch den Einsatz der CAD [6]. Methoden der CAD finden hierbei in vielerlei Hinsicht Anwendung. Sie dienen der Automatisierung wiederkehrender Aufgaben, ermöglichen aber auch die Etablierung und Nutzung digitaler Biomarker im Rahmen der Diagnostik [7]. Speziell in der Histopathologie basieren diese Methoden auf der Analyse von *whole slide images* (WSI).

Aufbauend auf Methoden aus dem Bereich Computer Vision, finden hier mehr und mehr Methoden des maschinellen Lernens Anwendung [8]. Die so generierten Pipelines umfassen zunächst Methoden zur Präprozessierung der WSIs. Hierbei gilt es Intensitätsschwankungen immunhistologischer Färbungen zu normalisieren, mögliche Artefakte zu identifizieren, oder aber auch einzelne Farbkkanäle des Bildes zu separieren. Präprozessierte WSI ermöglichen darauf folgend die Quantifizierung digital-pathologischer Eigenschaften. Dies kann die Detektion einzelner Zell(-kern)-Objekte oder aber auch ganzer Tumorareale umfassen [8].

Abschließend beinhalten solche Pipelines Methoden aus dem Bereich der Datenanalyse zur Visualisierung und statistischen Beurteilung der Bildinformationen. Neben der Anwendung dieser Pipelines in der klinischen Routine, dienen die so generierten Daten auch der Grundlagen-orientierten, funktionellen Forschung. Hier können mehr und mehr biologische Prozesse und Funktionen des Lymphknotens und des adaptiven Immunsystems aufgedeckt werden [9].

Über methodische Neuerungen bezüglich der Bildanalyse hinaus werden auch bestehende Methoden zur Visualisierung der Gewebeproben weiterentwickelt. Ein Beispiel hierfür ist die multidimensionale Visualisierung humaner, extrakorporaler Gewebeproben, welche die Untersuchung zellulärer Morphologie, Bewegung, Kommunikation und Netzwerkbildung in Raum und Zeit ermöglichen [10, 11, 12].

1.4 Aufbau der Arbeit

Die Arbeit ist in sieben Kapitel untergliedert: „Einleitung“, „Biologisch-medizinische Grundlagen“, „Material und Methoden“, „Ergebnisse: Software“, „Ergebnisse: Die digital-pathologische Charakterisierung reaktiver und neoplastischer Lymphknoten“, „Diskussion“ und „Schlussfolgerung und Ausblick“.

Kapitel zwei, „Biologisch-medizinische Grundlagen“, umfasst hierbei die Auf-

arbeitung Projekt-relevanter biologisch-medizinischer Grundlagen. Hierbei wird die Funktion des Lymphknotens, wie auch dessen Aufbau und Zytologie beschrieben. Weiterhin erfolgt im Rahmen dieses Kapitels eine Erläuterung der immunologischen Grundprozesse des adaptiven Immunsystems. Abschließend werden bekannte reaktive und neoplastische Lymphadenopathien vorgestellt.

Im darauffolgenden Kapitel „Material und Methoden“ werden zunächst die im Rahmen dieser Arbeit behandelten Bilddaten vorgestellt. Darüber hinaus erfolgt eine Einführung mathematischer Grundlagen, der im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden. Ebenfalls wird die für diese Arbeit benötigte, installierte Hardware beschrieben. Abschließend werden verwendete, proprietäre, wie auch Open-Source-Programme vorgestellt.

In Kapitel vier „Ergebnisse: Entwickelte Software“ werden daran anschließend, die im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelten Programme und damit die technischen Ergebnisse vorgestellt. Hierbei wird ein Einblick in die Softwarestruktur, wie auch die generelle Funktionalität der einzelnen Programme gegeben.

Kapitel fünf „Ergebnisse: Die digital-pathologische Charakterisierung reaktiver und neoplastischer Lymphknoten“ umfasst die digital-pathologischen Ergebnisse dieser Arbeit. Hierbei wird zunächst das grundsätzliche Design der einzelnen Teilprojekte erläutert. Darauf folgend werden gewonnene digital-pathologische Erkenntnisse bezüglich des Aufbaus und der Struktur reaktiver Lymphknoten herausgestellt. Hierauf aufbauend, werden zelluläre und strukturelle Veränderungen innerhalb neoplastischer Lymphknoten beschrieben. Im Speziellen wird auch auf die Möglichkeit der Parametrisierung solcher Veränderungen eingegangen. Das Kapitel schließt mit der diagnostischen Evaluation der digital-pathologischen Profile einzelner Gewebeprobe.

In Kapitel sechs, „Diskussion“, werden die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich ihrer Validität beurteilt. Weiterhin erfolgt eine Evaluation digital-pathologischer Veränderungen hinsichtlich bekannter funktioneller Alterationen. Darüber hinaus werden Möglichkeiten und Limitationen der einzelnen Bildgebungsverfahren diskutiert. Abschließend werden die Methoden und Erkenntnisse in einem klinischen Kontext evaluiert.

Die Arbeit schließt mit Kapitel sieben „Schlussfolgerung und Ausblick“, welches die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse beleuchtet, offene Fragen thematisiert und mögliche Lösungsvorschläge und Erweiterungen aufzeigt.

2 Biologisch-medizinische Grundlagen

Ziel der Arbeit ist die digital-pathologische Beschreibung reaktiver und neoplastischer Lymphadenopathien. Hierfür werden Gewebeproben aus humanen Lymphknoten, aber auch aus Adenoiden und Tonsillen analysiert. Im Folgenden wird exemplarisch der Aufbau und die Funktion eines Lymphknotens skizziert. Adenoide und Tonsillen ähneln in ihrem funktionellen Aufbau dem Lymphknoten. Darüber hinaus werden Zelltypen des Lymphsystems definiert. Abschließend werden einzelne Lymphadenopathien aufgegriffen und histopathologisch eingeordnet.

2.1 Lymphknoten

Lymphknoten sind sekundäre lymphatische Organe und Teil des menschlichen Lymphsystems. Der menschliche Körper enthält ca. 600 Lymphknoten [13]. Sie weisen eine bohnenförmige Morphologie auf und haben einen Durchmesser von 5mm – 10mm . Im Bereich des Halses und der Leiste können reaktive Lymphknoten bis zu 25mm groß werden [3]. Sie sind vorwiegend im Bereich des Kopfes, des Halses, in der Achselhöhle, der Brust, des Bauches und der unteren Extremitäten lokalisiert. Lymphknoten befinden sich vorwiegend an logistisch günstigen Bereichen, meist im Abflussgebiet weiterer Organe. Innerhalb des Körpers sind Lymphknoten einzeln, aber auch als Gruppe lokalisiert und dienen in den jeweiligen Arealen als Filter- und Abwehreinheiten für Pathogene und aberrante Zellen.

2.1.1 Struktur

Histologisch sind Lymphknoten, wie in Abbildung 1 dargestellt, kompartmentalisiert [5]. Äußerlich ist der Lymphknoten von einer Kapsel aus Bindegewebe umgeben [3, 5]. Direkt unterhalb der Kapsel befindet sich ein System aus Sinusstrukturen, dem Randsinus [5]. Dieser ist mit den afferenten und efferenten Lymphgefäßen verbunden und ragt mit intermediären Sinusstrukturen, auch Trabekel genannt, in das Kernsystem des Lymphknotens hinein [3].

Das Kernsystem des Lymphknotens kann wiederum in einzelne Funktionseinheiten, Lobuli genannt, untergliedert werden [3]. Ein solcher Lobulus besteht vorwiegend aus drei Hauptkompartimenten. Apikal gelegen, befindet sich der Cortex, auch B-Zone genannt. Dieser Cortex enthält einzelne Lymphfollikel. Lymphfollikel selbst weisen hierbei vorwiegend zwei Differenzierungsstadien auf. Primärfollikel zeichnen sich durch eine dichte Ansammlung vorwiegend naiver B-Zellen aus [5]. Aus einem Primärfollikel entwickelt sich im Rahmen der Keimzentrumsreaktion durch diverse Differenzierungs-, Proliferations- und Reorganisationsprozesse ein Sekundärfollikel. Der Sekundärfollikel weist im Gegensatz zu Primärfollikeln eine Polarisierung und Kompartimentalisierung auf. Hierbei wäre zunächst die Mantelzone zu nennen. Die Mantelzone ist apikal des Lymphfollikels lokalisiert und besteht aus einer dichten Ansammlung von B-Zellen. Das

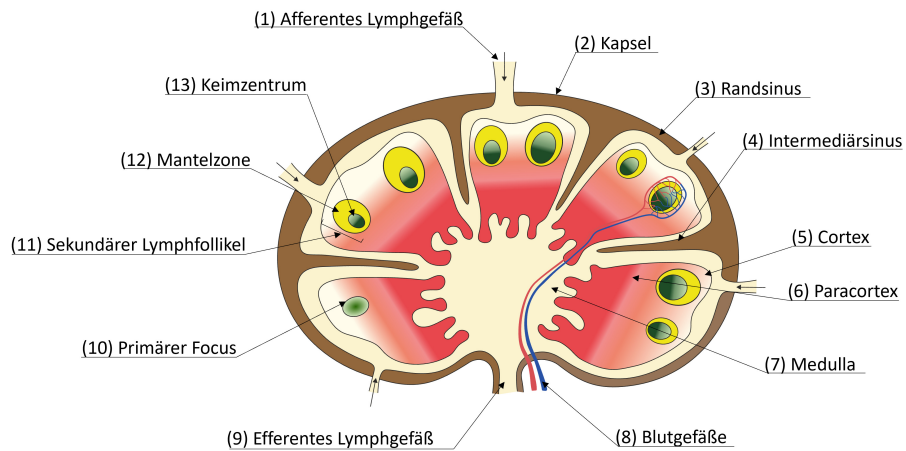


Abbildung 1: Aufbau eines Lymphknotens. Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines Lymphknotens im Längsschnitt. Der Lymphknoten umfasst die charakteristische Kompartimentalisierung in Paracortex, Cortex und Medulla. Umgeben und durchzogen ist der Lymphknoten von Sinusstrukturen, die mit afferenten und efferenten Lymphgefäßen verbunden sind. Die Abbildung wurde adaptiert nach Kaufmann et al. (2020) [14].

Keimzentrum hingegen zeigt eine heterogene Zellpopulation. Das Grundgerüst des Keimzentrums bilden Netzwerke aus follikulären dendritischen Retikulumzellen (FDC) [5]. Neben diesen Stützstrukturen sind innerhalb des Keimzentrums vorwiegend Zentrozyten und Zentroblasten lokalisiert. Diese Zellpopulationen werden durch T-Zellen und Makrophagen ergänzt [3, 5, 2].

Basal des Cortex befindet sich der Paracortex, auch T-Zone genannt. Der Paracortex ist von einem lymphoretikulären Netzwerk aus fibroblastischen Retikulumzellen (FRC) durchdrungen [3]. Dieses Netzwerk dient als Leitstruktur für die hier einwandernden und patrouillierenden Lymphozyten. Der Paracortex ist auch durch hochendotheliale Venolen (HEV) mit dem Blutsystem des Körpers verbunden und dient somit, neben den Lymphgefäßen, als Ein- und Austrittsstelle für Zellen [5]. Neben den Lymphozyten sind innerhalb der T-Zone auch interdigitierende dendritische Retikulumzellen (IDZ) lokalisiert. IDZ dienen der *Major histocompatibility complex* (MHC)-II-gekoppelten Antigenpräsentation, speziell auch für naive T-Zellen.

Basal abgeschlossen wird ein Lobulus durch die Medulla [3]. Die Medulla, auch Mark genannt, geht fließend aus dem Paracortex hervor und ist durch ein linear angeordnetes Netzwerk aus FRC charakterisiert. Nahe dem Hilus gelegen, laufen innerhalb der Medulla die Intermediärsini zu einem Marksinus zusammen. Die

Medulla zeichnet sich zellulär durch ein hohes Vorkommen von Gedächtniszellen und kurzlebigen Plasmazellen aus [3].

2.1.2 Zytologie

| | | | | | | |
|-----------------|--------------------------------|---|---|---|------------------------------|-----------------|
| B-Zellen | Prä-B-Zelle | Naive B-Zelle | Zentroblast | Zentrozyt | Plasmazelle | Gedächtniszelle |
| T-Zellen | Prä-T-Zelle | Naive T-Zelle | T-Helfer-Zelle | Zytotoxische T-Zelle | Gedächtniszelle | |
| Makrophagen | Monozyt | M1-Makrophage | Sternhimmel-makrophage | M2-Makrophage | Tumor-assoziierte Makrophage | |
| Retikulumzellen | Fibroblastische Retikulumzelle | Interdigitierende dendritische Retikulumzelle | Follikuläre dendritische Retikulumzelle | Plasmazytoide dendritische Retikulumzelle | Histiozytäre Retikulumzelle | |

Abbildung 2: Zelltypen des Lymphknotens. Die Abbildung zeigt schematisch die vier häufigsten Zelltypen und ihre Untergruppen innerhalb des Lymphknotens. Diese umfassen B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen und Retikulumzellen. Weiterhin sind zeilenweise die Untergruppen und Differenzierungsstadien der einzelnen Zelltypen innerhalb des Lymphknotens aufgeführt.

Die Funktionalität des Lymphknotens basiert neben der Kompartimentalisierung auf dem komplexen Zusammenspiel diverser Zelltypen. Im Folgenden werden die wichtigsten Zelltypen innerhalb menschlicher Lymphknoten charakterisiert. Diese Zelltypen sind in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

B-Zelle

Unterformen und Differenzierungsstadien: Prä-B-Zelle, naive B-Zelle, Zentrozyt, Zentroblast, Plasmazelle, Gedächtniszelle.

Histologie: B-Zellen sind rundliche Zellen mit einem großen Zellkern und einem schmalen Zytoplasma. Sie sind im Durchschnitt ca. $8 \mu\text{m}$ groß, können durch Aktivierungs- und Differenzierungsprozesse aber auch auf bis zu $12 \mu\text{m}$ anwachsen. In dieser Arbeit werden B-Zellen mithilfe der Antikörper gegen *Cluster of Differentiation* (CD)19 und CD20 visualisiert. Auch wird Pax5 eingesetzt, um Zellkerne der B-Zellen aufzuzeigen. Plasmazellen werden durch eine immunhistologische Färbung gegen CD138 visualisiert.

Ursprung: Naive B-Zellen entstehen als Prä-B-Zellen im Knochenmark. Durch eine VDJ-Rekombination der Gensegmente für den B-Zell-Rezeptor und an-

schließender Selektionsprozesse findet eine Differenzierung zu naiven B-Zellen, also B-Zellen ohne vorherigen Antigenkontakt statt. Im Weiteren bilden sich durch Aktivierungs-, Proliferations- und Differenzierungsprozesse aus den naiven B-Zellen zunächst Zentroblasten, anschließend Zentrozyten und abschließend Plasmazellen und Gedächtniszellen.

Lokalisation im Lymphknoten: Naive B-Zellen sind innerhalb des Lymphknotens vorwiegend in Primärfollikeln und der T-Zone lokalisiert. Zentrozyten befinden sich in der hellen Zone des Lymphfollikels, wohingegen Zentroblasten innerhalb der dunklen Zone der sekundären Lymphfollikel lokalisiert sind. Plasmazellen und Gedächtniszellen wandern nach ihrer Entstehung aus den sekundären Lymphfollikeln aus. Kurzlebige Plasmazellen verlassen anschließend den Lymphknoten, während langlebige Plasmazellen und Gedächtniszellen in die Medulla einwandern.

Physiologie: B-Zellen bilden die Grundlage der MHC-II-vermittelten, adaptiven Immunreaktion. Hierbei werden B-Zellen durch einen Antigenkontakt, im Rahmen der T-Zell-unabhängigen Aktivierung, oder aber einen kostimulatorischen Kontakt zu spezifischen T-Helfer-Zellen, im Zuge der T-Zell-abhängigen Aktivierung, angeregt. Eine anschließende Ausdifferenzierung zu Plasmazellen ermöglicht die Elimination von Pathogenen und aberranten Zellen im Körper durch sezernierte Antikörper. Durch die Bildung von B-Gedächtniszellen wird innerhalb des Lymphknotens ein Immungedächtnis erzeugt. Dies ist möglich, da Antigen-geprimte B-Gedächtniszellen durch das erneute Auftreten des Antigens direkt zu Plasmazellen differenzieren können, um so das Antigen zu eliminieren, noch bevor es zu einer Infektion kommt. Neben der Ausbildung von Plasmazellen und Gedächtniszellen, sind B-Zellen auch in der Lage selbst Antigene mittels Endozytose MHC-II-gebunden zu präsentieren.

Literatur: *Janeway Immunologie (2018) [5], Willard-Mack (2006) [3], Grundwissen Immunologie (2011) [2], Young et al. (2021) [15], Hamel et al. (2012) [16]*

T-Zelle

Unterformen und Differenzierungsstadien: naive T-Zelle, T-Helfer-Zelle, zytotoxische T-Zelle, T-Gedächtniszelle.

Histologie: T-Zellen sind runde Zellen mit einem Durchmesser von durchschnittlich $7,5 \mu\text{m}$. Sie weisen einen großen Zellkern mit einem schmalen Zytoplasmasaum auf. T-Zellen sind positiv für CD3. T-Helfer-Zellen sind zusätzlich CD4-positiv und im Speziellen folliculäre T-Helfer Zellen (TFH-Zellen) positiv für das *Programmed cell death protein 1* (PD-1). Zytotoxische T-Zellen sind positiv für CD8.

Ursprung: T-Zellen entstehen zunächst im Knochenmark. Anschließend wandern diese in den Thymus, wo sie MHC-I und MHC-II-Komplexe ausbilden. Durch anschließende positive und negative Selektionsprozesse entstehen naive T-Zellen. Diese differenzieren sich abschließend, basierend auf ihrer Bindungsaffinität, zu T-Helfer-Zellen oder aber zytotoxischen T-Zellen aus.

Lokalisation im Lymphknoten: T-Zellen sind innerhalb des Lymphknotens vorwiegend in der T-Zone lokalisiert. Hierin enthalten sind T-Helfer-Zellen, zytoto-

xische T-Zellen und T-Gedächtniszellen. Innerhalb der sekundären Lymphfollikel sind auch TFH-Zellen lokalisiert.

Physiologie: T-Zellen sind direkt am Prozess der adaptiven Immunantwort beteiligt. Zunächst können zytotoxische T-Effektor-Zellen eine virale Infektion mittels MHC-I-gekoppelter Immunreaktion durch die in direkt eliminieren. Dies gelingt durch die Extraktion der in Granula gebundenen Perforine und Granzyme. Im Rahmen der MHC-II-gekoppelten Immunreaktion sind T-Helfer-Zellen für die Zytokin-vermittelte Aktivierung der B-Zellen im B-Zell-Pathogen-Komplex essenziell. Follikuläre T-Helfer-Zellen sind Bestandteil der Selektionsprozesse der B-Zell-Differenzierung im Zuge der Keimzentrumsreaktion. T-Gedächtniszellen bilden ein Immungedächtnis, indem diese durch langlebige Zellen als Katalysator fungieren.

Literatur: Janeway Immunologie (2018) [5], Willard-Mack (2006) [3], Grundwissen Immunologie (2011) [2]

Makrophage

Unterformen und Differenzierungsstadien: M1-Makrophage (Klassisch aktivierte Makrophage (CAM)), M2-Makrophage (Alternativ aktivierte Makrophage (AAM)), Sternhimmelmakrophage, Tumor-assoziierte Makrophage (TAM).

Histologie: Makrophagen sind ca. 21 μm große Zellen mit variabler Morphologie, abhängig von ihrer Funktion und Lokalisation. Sternhimmelmakrophagen sind große, runde Makrophagen mit einem breiten Zytoplasma. M1- und M2-Makrophagen weisen oftmals eine hohe Anzahl von Zellfortsätzen auf. M1-Makrophagen sind positiv für CD68 und M2-Makrophagen sind positiv für CD163.

Ursprung: Die Vorläuferzelle der Makrophagen, Monozyten genannt, bilden sich im Knochenmark. Diese differenzieren sich anschließend, basierend auf der Mikroumgebung, zu M1- oder M2-Makrophagen aus.

Lokalisation im Lymphknoten: Sternhimmelmakrophagen sind innerhalb der dunklen Zone der sekundären Lymphfollikel lokalisiert. Sonstige M1- und M2-Makrophagen sind vorwiegend in der T-Zone lokalisiert. Speziell M2-Makrophagen sind nicht innerhalb der sekundären Lymphfollikel vorzufinden. Neben der Lokalisation in der T-Zone befindet sich im Randsinus nahe dem afferenten Lymphgefäß eine dichte Ansammlung von M2-Makrophagen („Makrophagen-Cap“).

Physiologie: Makrophagen sind innerhalb des Lymphknotens vorwiegend in die zelluläre Homöostase eingebunden. Hierbei kann die Funktion in vier grundlegende Eigenschaften untergliedert werden: Gewebereparatur, Phagozytose, Attraktion und Stimulation. Durch die Anregung von Stammzellen und die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren können Makrophagen proregenerativ auf das umliegende Gewebe wirken. Weiterhin kann bestehender Zelldebris mittels Phagozytose abgebaut werden. Auch können sie weitere Zellen als Attraktant durch die Ausschüttung von Zytokinen anlocken. Abschließend können sie umliegende Zellen in der Mikroumgebung stimulieren und Antigene präsentieren. Bezüglich der Funktion der Makrophagen sind M1- und M2-Makrophagen als Antagonisten zu betrachten. Während M1-Makrophagen proinflammatorisch auf das um-

liegende Gewebe wirken und so Entzündungsreaktionen einleiten können, wirken M2-Makrophagen antiinflammatorisch und proregenerativ auf die Mikroumgebung. In neoplastischen Lymphknoten sind TAM, speziell M2-Makrophagen, oftmals vermehrt in der Tumormikroumgebung (TME) zu finden. Hierbei werden die zuvor beschriebenen Eigenschaften der Makrophagen zugunsten der Neoplasie verändert, um so die Angiogenese, die Tumorgenese und die Immunflucht der Tumorzellen zu begünstigen.

Literatur: Janeway Immunologie (2018) [5], Willard-Mack (2006) [3], Grundwissen Immunologie (2011) [2], Ruffel et al. (2012) [17], Verschoor et al. (2012) [18]

Retikulumzelle

Unterformen und Differenzierungsstadien: fibroblastische Retikulumzelle, interdigitierende dendritische Retikulumzelle, folliculäre dendritische Retikulumzelle, plasmazytoide dendritische Zelle, histiozytäre Retikulumzelle.

Histologie: Retikulumzellen stellen eine heterogene Zellgruppe dar, deren Eigenschaften in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation und ihres Ursprungs different sind. Gemein weisen Retikulumzellen „bäumchenartige“ Zellfortsätze auf, die der Retikulumzelle ihre charakteristische sternförmige Morphologie verleihen. Unterschieden wird vorwiegend in fibroblastische Retikulumzellen, histiozytäre Retikulumzellen und dendritische Retikulumzellen. Fibroblastische Retikulumzellen sind stationäre Zellen mit einem großen ovalen Kern. Sie bilden durch die Synthese von retikulären Fasern Kontakte zu benachbarten Zellen aus und bilden so ein großes, dreidimensionales Netzwerk. Dieses Netzwerk wird im Rahmen dieser Arbeit durch eine Färbung des α -Aktins visualisiert. Histiozytäre Retikulumzellen sind hingegen motil und haben kürzere Zellfortsätze, auch Pseudopodien genannt. Dendritische Retikulumzellen bilden wie auch fibroblastische Retikulumzellen über Desmosome dreidimensionale Netzwerke aus. Im Rahmen dieser Arbeit werden interdigitierende dendritische Retikulumzellen mithilfe von CD11c gefärbt. Folliculäre dendritische Retikulumzellen sind in Teilen je positiv für CD21, CD23 und CD35.

Ursprung: Retikulumzellen sind mesenchymalen Ursprungs und werden im Knochenmark gebildet. Die Progenitorzelle der Retikulumzellen ist die gemeinsame myeloische Vorläuferzelle.

Lokalisation im Lymphknoten: Fibroblastische Retikulumzellen bilden das retikuläre Bindegewebe innerhalb des Paracortex und der Medulla. Auch interdigitierende dendritische Retikulumzellen und plasmazytoide Retikulumzellen sind vorwiegend innerhalb des Paracortex lokalisiert. Dementgegen stehen folliculäre dendritische Retikulumzellen, die innerhalb der primären und sekundären Lymphfollikel lokalisiert sind.

Physiologie: Die Hauptaufgabe der Retikulumzellen verteilt sich auf die Assoziation zum adaptiven Immunsystem und die Toleranzentwicklung der Autoimmunreaktion. Im Speziellen sind hier die dendritischen Retikulumzellen zu nennen. Interdigitierende dendritische Retikulumzellen sind essenziell für die Aktivierung der T-Zellen. Hierbei werden mittels Phagozytose aufgenommene Antigene MHC-I oder aber MHC-II-vermittelt präsentiert. Eine MHC-I-vermittelte

Präsentation von Antigenen aktiviert zytotoxische T-Zellen und leitet so eine adaptive Immunantwort ein. Die MHC-II-vermittelte Präsentation von Antigenen aktiviert T-Helfer-Zellen, die so zu der Induktion einer Keimzentrumsreaktion beitragen können. FDC sind von der Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen entkoppelt. FDC sind im Rahmen der Keimzentrumsreaktion am Selektionsprozess der mutierenden B-Zellen in Kooperation mit follikulären T-Helfer-Zellen beteiligt. Auch sind Retikulumzellen, im Speziellen histiozytäre Retikulumzellen, Teil des mononukleär-phagozytären Systems (MPS). Dies impliziert, dass Retikulumzellen mittels Phagozytose Zelldebris und Pathogene, wie auch ganze Mikroorganismen eliminieren können. Abschließend bildet das retikuläre Netzwerk innerhalb des Lymphknotens ein Stütz- und Leitsystem. So können andere Zellen sich an der Oberfläche des retikulären Netzwerks fortbewegen. Auch können Retikulumzellen mittels Sekretion von Zytokinen Zellpopulationen innerhalb des Lymphknotens gezielt leiten, sodass eine effektive und gerichtete Fortbewegung innerhalb des Lymphknotens möglich wird.

Literatur: Janeway Immunologie (2018) [5], Willard-Mack (2006) [3], Grundwissen Immunologie (2011) [2]

2.2 Das adaptive Immunsystem

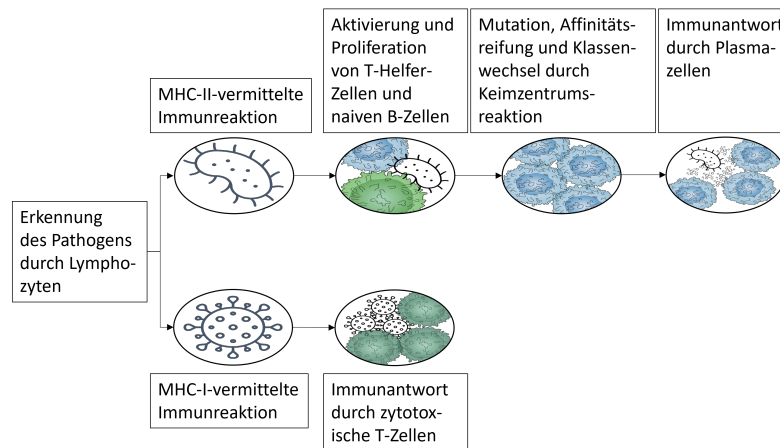


Abbildung 3: Das adaptive Immunsystem. Die Abbildung zeigt schematisch den Prozess der zellulären und humoralen Immunantwort. Hierbei werden einzelne Stadien, die zugrundeliegenden Prozesse und beteiligten Zellen aufgezeigt und beschrieben.

Das adaptive Immunsystem, auch spezifisches Immunsystem genannt, umfasst die erworbene Immunkompetenz des Menschen. Hierbei wird zwischen der

zellulären und humoralen Immunabwehr unterschieden [5]. Welche Immunabwehr zum Tragen kommt, ist abhängig vom Pathogen. Es wird zwischen der MHC-I und MHC-II-vermittelten Immunreaktion unterschieden, dargestellt in Abbildung 3 [5].

Die MHC-I-vermittelte, zelluläre Immunreaktion dient der Eliminierung intrazellulärer Pathogene, welche trotz der Erkennung durch Makrophagen persistieren. Hierbei werden intrazelluläre Pathogene durch interdigitierende dendritische Retikulumzellen phagozytiert und das spezifische Antigen MHC-I vermittelt präsentiert [2, 5]. Diese Präsentation des Antigens induziert eine Aktivierung zytotoxischer T-Zellen. Diese aktivierten, zytotoxische T-Zellen sind anschließend in der Lage Perforin- und Granzym-enhaltende Granula zu exozytieren. Hierbei bewirkt das enthaltene Perforin eine Aufspaltung der Membran der mit einem Pathogen befallenen oder entarteten Zellen [5]. Die im Anschluss eindringenden Granzyme bewirken die Einleitung der Apoptose der Zellen. Auch ist eine direkte Lyse der Zellen möglich.

Die MHC-II-vermittelte, humorale Immunreaktion dient der Eliminierung extrazellulärer Pathogene [5]. Hierbei findet zunächst eine Aktivierung naiver B-Zellen und T-Helfer-Zellen statt [5]. Im Zuge dessen werden T-Helfer-Zellen MHC-II-vermittelt aktiviert. Dies geschieht durch die Präsentation des Antigens durch interdigitierende dendritische Retikulumzellen. Gleichzeitig findet eine Aktivierung der naiven B-Zellen durch einen Pathogenkontakt oder einen Kontakt mit Antigen-präsentierenden Zellen statt [5]. Dies bewirkt eine Präsentation des prozessierten Antigens mittels MHC-II an der Oberfläche der aktivierten B-Zelle und einer Migration der selbigen an den Rand des Primärfollikels. Treffen aktivierte B-Zellen auf entsprechende T-Helfer-Zellen, so erfolgt eine Kostimulation der B-Zelle [5]. Ein Teil der nun stimulierten B-Zellen und T-Helfer-Zellen proliferieren und bilden einen Primärfokus. Innerhalb des Primärfokus werden anschließend kurzlebige, IgM-produzierende Plasmablasten gebildet. Ein weiterer Teil aktivierter B-Zellen und T-Helfer-Zellen wandern in den Kern des Primärfollikels ein.

Durch Proliferations- und Restrukturierungsprozesse erfolgt eine Kompartimentalisierung und Polarisierung des Primärfollikels, sodass ein sekundärer Lymphfollikel entsteht. Die nun in der dunklen Zone befindlichen B-Zellen, auch Zentroblasten genannt, erfahren im Rahmen der somatischen Hypermutation eine Veränderung der Gene der variablen Bereiche der Antikörper. Hieraus resultieren neue B-Zell-Klone [5, 15, 16, 19, 20, 21, 22]. Diese wandern anschließend in die helle Zone des Keimzentrums ein [5]. Innerhalb der hellen Zone werden die neuen B-Zell-Klone, auch Zentrozyten genannt, hinsichtlich ihrer Affinität zum Antigen durch die FDC selektiert. Diesen Vorgang nennt man Affinitätsreifung. Zentrozyten mit einer ausreichend hohen Affinität werden anschließend einem, durch TFH-Zellen induzierten, Klassenwechsel unterzogen. Dies hat eine Veränderung der schweren Kette der Antikörper zur Folge, sodass ein Klassenwechsel des B-Zell-eigenen Antikörpers von IgM zu beispiels-

weise Immunglobulin G (IgG) stattfindet [20, 5]. Abschließend differenzieren sich die gereiften Zentrozyten zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen aus. Diese können nun aus dem Keimzentrum emigrieren und extrazelluläre Pathogene mittels Antikörper eliminieren oder aber in die Medulla einwandern und so ein immunologisches Gedächtnis bilden [3, 5].

2.3 Reaktive und neoplastische Lymphadenopathien

Durch das Auftreten eines Pathogens kann die reguläre Lymphknotenstruktur und die zytologische Zusammensetzung verändert werden. Dies zeichnet sich in der Regel durch eine unspezifische Lymphknotenschwellung ab und wird im Krankheitsverlauf von weiteren B-Symptomen begleitet. Hält diese Raumforderung an und ist morphologisch, sowie ätiologisch ungeklärt, so muss mittels Lymphadenektomie oder Stanzbiopsie lymphatisches Gewebe entnommen und histopathologisch untersucht werden. Hierbei werden anschließend histopathologische Veränderungen charakterisiert, eingeordnet und, wenn nötig, durch molekularpathologische Untersuchungen ergänzt. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten und charakterisierten, benignen und malignen Lymphknotenveränderungen werden im Folgenden beschrieben. Weiterhin wird jeweils ein Hämatoxylin-Eosin (HE)-Schnitt als Übersicht angegeben.

2.3.1 Lymphadenitis

Wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, erfährt ein Lymphknoten im Rahmen der spezifischen Immunantwort bereits weitreichende Veränderungen. Dies bezieht sich im Speziellen auf begrenzte mikroskopische Veränderungen der zellulären Homöostase, aber auch auf makroskopische Veränderungen, wie die Ausdifferenzierung primärer zu sekundären Follikeln oder dem temporären Anschwellen eines Lymphknotens. Durch den Einfluss bestimmter Viren und Bakterien, aber auch in Kombination mit einer Störung einzelner Körperfunktionen, können diese Veränderungen von den essenziellen Veränderungen der spezifischen Immunantwort abweichen. Die Lymphadenitis (LA), welche in der klinischen Terminologie oft mit einer generellen Lymphadenopathie gleichgesetzt wird, beschreibt eine benigne Entzündungsreaktion innerhalb des Lymphknotens unter Erhalt der strukturellen Integrität [13]. Dies geht oftmals mit einer Verschiebung des zellulären Gleichgewichts einher. So können sekundäre Follikel über die Maße anwachsen, was als folliculäre Hyperplasie definiert ist, dargestellt in Abbildung 4 [13]. Diese weist jedoch im Vergleich zu den meisten neoplastischen Keimzentrumsveränderungen einen Erhalt der Polyklonalität der B-Zellen auf und auch die charakteristische Kompartimentalisierung des Follikels bleibt erhalten. Weiterhin sind B- und T-Zellen des Keimzentrums im Rahmen einer LA mit folliculärer Hyperplasie negativ für *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) [13]. Eine Hyperplasie der Follikel kann zusätzlich auch mit einer progressiven Transformation von ein bis drei Keimzentren vergesellschaftet sein (*Progressive Transformation of Germinal Centers* (PTGC)). Neben der folliculären Hyperplasie tritt häufig eine Hyperplasie der T-Zone auf. Ein Beispiel hierfür ist die dermatopathische

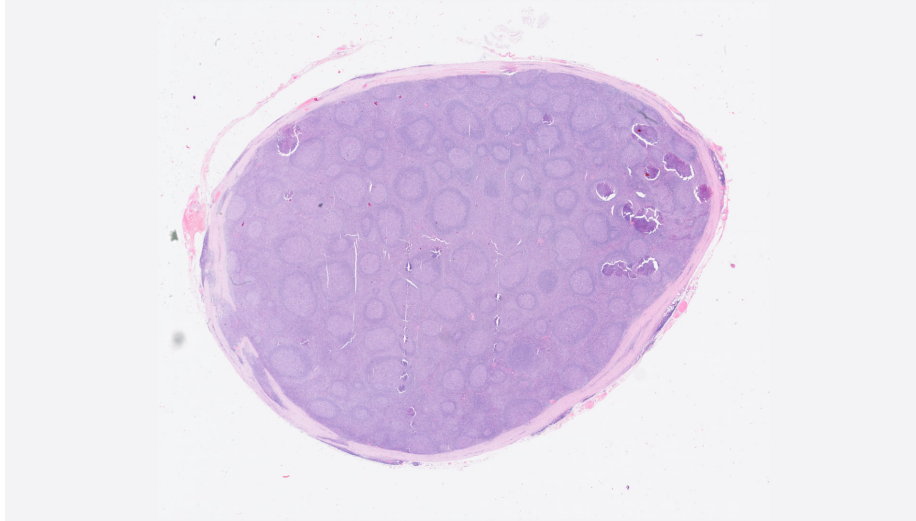


Abbildung 4: Lymphadenitis mit folliculärer Hyperplasie. Dargestellt ist ein Dünnschnitt eines Lymphknotens eines Patienten mit diagnostizierter Lymphadenitis, mit vorliegender folliculärer Hyperplasie in der Übersicht. Der Dünnschnitt wurde immunhistologisch mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung präprozessiert.

LA [13].

Die dermatopathische LA ist über die strukturelle Veränderung hinaus zytologisch durch ein vermehrtes Aufkommen CD11c- und S-100-positiver IDZ charakterisiert [13]. Neben der Verbreiterung der B- und T-Zone ist auch die Sinushistiozytose ein bekanntes histopathologisches Erscheinungsbild. Hierbei treten innerhalb der Sinusstrukturen, im Speziellen in verbreiterten, medullären Sinusstrukturen, vermehrte Ansammlungen von ortsständigen Makrophagen (Histiozyten) auf [13].

Neben der Erweiterung und zellulären Verdichtung der Sinus kann es im Rahmen einer LA zu einem partiellen oder vollständigen Infarkt und damit zu einem Verschluss der Gefäße kommen. Dieser Infarkt ist meist bedingt durch Vasculitiden, welche eine Ansammlung von T-Zell-Infiltraten und Thromben darstellen. Zusätzlich zu Gefäß- und Kompartimentveränderungen, können auch zelluläre Veränderungen im Rahmen einer LA auftreten. Hierbei ist beispielsweise das Vorkommen von aktivierten, CD30-positiven B-Zellen charakteristisch.

Auch können diverse Lymphadenitiden mit einer Expression von IgG4 einhergehen. Diese Expression bedingt das vermehrte Vorkommen von IgG4-positiven Plasmazellen [13]. Abgeschlossen wird das heterogene Bild der LA durch spezielle Veränderungen, wie die Pinner-Lymphadenitis, den Morbus Castleman, die

Kikuchi-Fujimoto-Erkrankung und die charakteristischen Veränderungen durch das *Human Immunodeficiency Virus* (HIV).

Die Piringer-Lymphadenitis ist histopathologisch gekennzeichnet durch eine Perilymphadenitis, eine folliculäre Hyperplasie, eine monozytoide B-Zell-Reaktion, sowie kleinherdige Epitheloidzellreaktionen [13].

Der Morbus Castleman ist hingegen histopathologisch durch zwiebelschalenartig gelagerte, folliculäre dendritische Zellen gekennzeichnet, welche mit einer Lymphozytendepletion im Keimzentrum einhergehen [13].

Die Kikuchi-Fujimoto-Erkrankung zeichnet sich histopathologisch durch vorwiegend hellzellige Follikel und rundliche, nekrotisierende Bereiche im Paracortex aus [13].

Die Infiltration durch HIV bedingt zunächst die Bildung großer, teils konfluierender Keimzentren. Diese bilden sich mit fortschreitender Erkrankung jedoch wieder zurück und das histopathologische Bild der Lymphknoten eines HIV-Patienten ist geprägt durch eine Lymphozytendepletion und die Ausbildung von Fibrosen [13].

Somit zeigt sich zusammenfassend die Heterogenität des histopathologischen Erscheinungsbildes der LA. Hieraus resultiert, dass reaktive und neoplastische Lymphadenopathien histopathologisch nicht immer klar abzugrenzen sind [13].

2.3.2 Hodgkin-Lymphom

Das HL ist ein malignes B-Zell-Lymphom und wurde erstmals 1832 durch Thomas Hodgkin beschrieben [23]. Das HL wird in zwei Hauptgruppen unterteilt: das klassische Hodgkin-Lymphom (cHL) und das nodulär Lymphozyten-prädominante Hodgkin-Lymphom (NLPHL). Das cHL hat eine Inzidenz von 3 pro 100.000 Patienten und macht 15% bis 25% aller Lymphome bei Kindern und jungen Erwachsenen in der westlichen Welt aus [24, 25]. Mit Heilungsraten von über 80% gilt es als gut behandelbar und doch gehen mit der aggressiven Behandlung viele Beeinträchtigungen einher. Charakteristisch für das cHL sind CD30-positive und teils CD15-positive, aber CD20-negative, mononukleäre Hodgkin-Zellen und multinukleäre Reed-Sternberg-Zellen [23, 26, 27, 28]. Die Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) nehmen meist weniger als 1% des Gewebes ein [29, 25]. HRS-Zellen können bis zu 50 μm im Durchmesser groß werden und das TME ist vorwiegend dominiert durch CD3-positive und CD4-positive Bystander-T-Zellen [29, 30, 25]. Der Ursprung des Tumors geht meist auf B-Zellen des Keimzentrums zurück [31, 32]. Histopathologisch wird das cHL in folgende Subtypen weiter unterklassifiziert: nodulär-sklerosierendes klassisches Hodgkin-Lymphom (NScHL), gemischtzelliges klassisches Hodgkin-Lymphom (MCCHL), lymphozytenreiches klassisches Hodgkin-Lymphom (LRCHL) und lymphozytenarmes klassisches Hodgkin-Lymphom

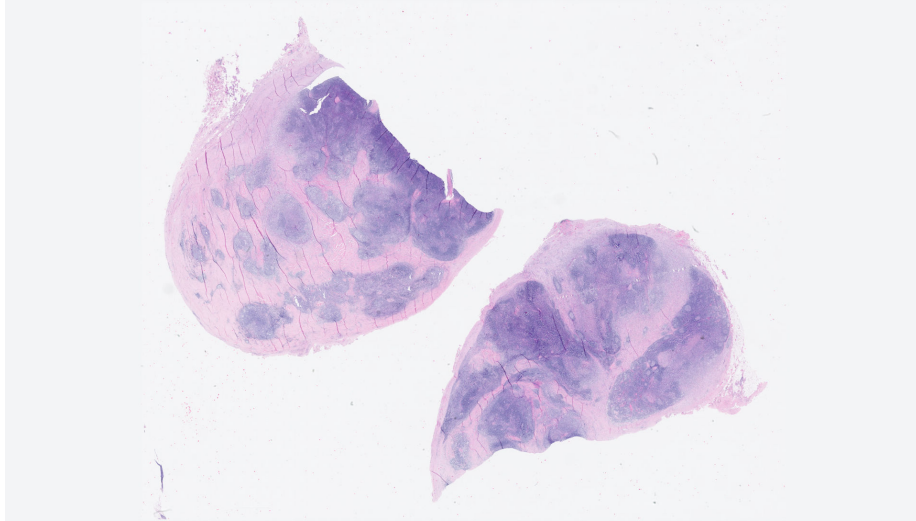


Abbildung 5: Nodulär sklerosierendes Hodgkin-Lymphom. Dargestellt ist ein mit Hämatoxylin-Eosin-gefärbter Dünnschnitt eines Lymphknotens eines Patienten mit einem diagnostizierten nodulär sklerosierendem Hodgkin-Lymphom in der Übersicht.

(LDcHL).

Das NScHL ist charakterisiert durch das Auftreten von Lakunar-Zellen und sklerotischen Bändern, welche Tumorknoten einzeln vollständig umschließen und so eine knotenartige Strukturierung des Lymphknotens erzeugen, dargestellt in Abbildung 5 [33, 34].

Bei dem MCcHL hingegen findet sich eine solche Sklerose nicht. Vielmehr ist ein diffuser Umbau zu erkennen. Das Infiltrat des MCcHL setzt sich aus CD4-positiven T-Zellen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten und teils gruppierten Epitheloidzellen zusammen [34]. Oftmals ist hierbei eine rosettenartige Anordnung der T-Zellen im TME der HRS-Zellen zu erkennen. Auch ist eine Erkrankung des MCcHL häufig mit einer Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion assoziiert [34].

Das LRcHL ist charakterisiert durch ein knotiges Wachstum in Korrelation mit einem Begleitinfiltrat aus reaktiven B-Zellen. Auch ist im LRcHL eine Formation von PD-1-positiven T-Zell-Rosetten im TME der HRS-Zellen zu finden [34].

Das LDcHL kann histopathologisch in zwei Subgruppen untergliedert werden, dem retikulären Subtyp und dem diffus fibrosierenden Subtyp. Hierbei liegen HRS-Zellen zwischen kollagenen Fasern und sind von nur wenigen Lymphozyten und Histozyten umgeben [34].

Neben dem cHL ist auch das NLPHL als Subtyp des HL bekannt. Spezifisch für das NLPHL ist hierbei das Auftreten von Lymphozyten-prädominanten Zellen (LP-Zellen), welche wie die HRS-Zellen in den cHL lediglich 1% des Tumordinfiltrats ausmachen [35, 34]. Ebenfalls charakteristisch für die NLPHL ist das Wachstum der Tumoreale in Form von großen Knoten und diffus wachsenden Tumorealen. Zytologisch unterscheiden sich diese beiden Areale durch das vermehrte Vorkommen von reaktiven B-Zellen in den großen Tumorknoten und dem vermehrten Vorkommen von T-Lymphozyten und Histiozyten in den diffusen Bereichen [34].

2.3.3 Follikuläres Lymphom

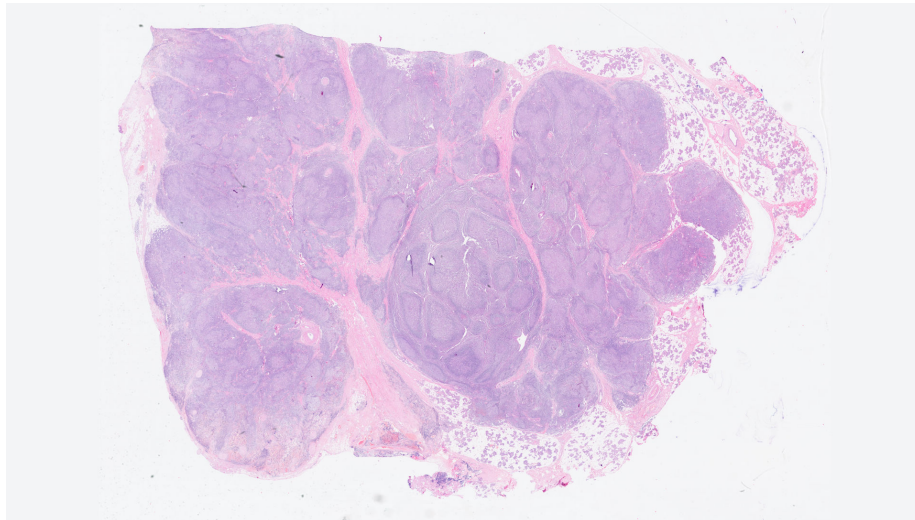


Abbildung 6: Follikuläres Lymphom Grad 1–2. Dargestellt ist ein Hämatoxylin-Eosin-gefärbter Dünnschnitt einer Lymphknotenbiopsie eines Patienten mit diagnostiziertem follikulärem Lymphom Grad 1–2 in der Übersicht.

Das Follikuläre Lymphom (FL) ist das am zweithäufigsten diagnostizierte Non-Hodgkin-Lymphom der westlichen Welt [36], dargestellt in Abbildung 6. Die Tumorzellen des FL sind neoplastische, CD10-, CD19- und CD20-positive B-Zellen in den Keimzentren der sekundären Lymphfollikel. Hier liegt auch der Ursprung des Tumors [37, 36]. Innerhalb eines neoplastischen Keimzentrums stellen Zentrozyten reaktive B-Zellen und Zentroblasten neoplastische B-Zellen dar.

Das FL wird auf Basis des Zentrozyten-Zentroblasten-Verhältnisses pro Gesichtsfeld graduiert. Diagnostisch wird das FL in die Maximalvarianten FL Grad 1 (0–5 Zentroblasten pro Gesichtsfeld) bis hin zu einem FL Grad 3b

(Durchgängiges Auftreten von Zentroblasten) subklassifiziert.

85% der FL gehen mit einer Translokation $t(14;18)$ und einer daraus resultierenden Überexpression des Bcl-2-Proteins einher. Das Bcl-2-Protein selbst ist an der Regulation der Apoptose beteiligt, sodass eine verminderte Apoptoseaktivität der Tumorzellen vorzufinden ist. Dies führt zu einer Homogenisierung der vergrößerten, sekundären Lymphfollikel bei gleichzeitiger, progressiver Verdrängung reaktiver Lymphozyten.

Dies impliziert das diverse, histopathologische Erscheinungsbild der Gewebeproben des FL bei unterschiedlichen Graden des Tumors. In den niedrig malignen Graden des FL sind vergrößerte, sekundäre Lymphfollikel, wie auch eine lokale Begrenzung des Tumors innerhalb der Keimzentren charakteristisch. Darüber hinaus erscheint der Lymphknoten strukturell intakt. Dieses Bild ändert sich bei höhergradigen Fällen des FL. Hierbei zeigt sich ein mehr und mehr diffuses histopathologisches Erscheinungsbild.

2.3.4 Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom

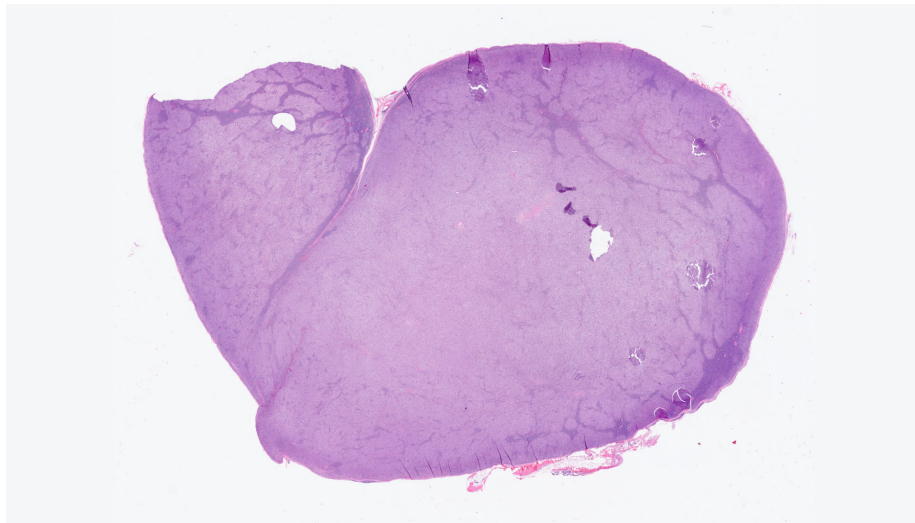


Abbildung 7: Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom. Dargestellt ist ein Hämatoxylin-Eosin-gefärbter Dünnschnitt einer Lymphknotenbiopsie eines Patienten mit diagnostiziertem diffus-großzelligem B-Zell-Lymphom in der Übersicht.

Das diffus-großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) ist mit einem Anteil von 30% – 40% das häufigste Non-Hodgkin-Lymphom der Welt, dargestellt in Abbildung 7 [38]. Histopathologisch zeichnet sich das DLBCL durch eine diffuse Proliferation von großen B-Zellen aus. Deren Zellkerne können auf eine Größe

vergleichbar zu histiozytären Zellkernen und mehr anwachsen.

Neben dieser Eigenschaft ist das pathologische Erscheinungsbild einzelner Fälle sehr divers, was in Teilen die Diversität des B-Zell-Systems widerspiegelt [38, 39]. Dies führt dazu, dass Fälle der DLBCL nur sehr bedingt in distinkte Subgruppen untergliedert werden können. Auch der Ursprung ist variabel. Fälle der DLBCL können hierbei ihren primären Ursprung in der neoplastischen Veränderung des reaktiven Gewebes haben, aber beispielsweise auch aus einer chronisch lymphatischen Leukämie (CLL), mittels Richter-Transformation, hervorgehen [39]. Strukturell und zytologisch findet eine Homogenisierung des Gewebes statt, was sich in einer Verdrängung reaktiver B-Zellen und der Auflösung der Kompartimentalisierung widerspiegelt.

2.3.5 Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom

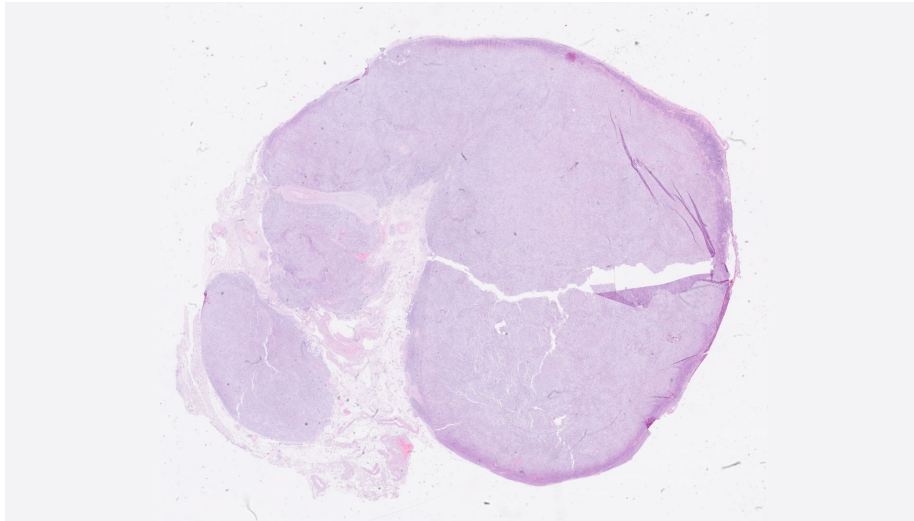


Abbildung 8: Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom. Dargestellt ist ein Hämatoxylin-Eosin-gefärbter Dünnschnitt einer Lymphknotenbiopsie eines Patienten mit diagnostiziertem angioimmunoblastischem T-Zell-Lymphom in der Übersicht.

Das angioimmunoblastische T-Zell-Lymphom (AITL) ist eine Neoplasie peripherer T-Zellen, dargestellt in Abbildung 8 [40]. Betroffen sind hiervon meist Menschen mittleren und höheren Alters [40]. Das AITL ähnelt zunächst oftmals einer hyperimmunen Reaktion des Lymphknotens. Zytologische und molekulare Untersuchungen bestätigten jedoch das Vorliegen einer T-Zell-Neoplasie [41].

Diese ist histopathologisch durch inflammatorische Infiltrate vorwiegend im Interfollikularbereich charakterisiert. Die Infiltrate beinhalten Lymphozyten, Plas-

mazellen und eosinophile Zellen. Auch findet man in den Tumorarealen eine vermehrte Proliferation von HEV und FDC. In seiner maximalen Ausprägung ist eine teilweise oder aber auch vollständige Aufhebung der strukturellen Integrität des Lymphknotens zu beobachten [41].

Innerhalb dieser generellen histopathologischen Charakteristika werden drei Muster unterschieden. Muster 1 zeigt einen Strukturerhalt des Lymphknotens. Hierbei sind hyperplastische B-Zell-Follikel mit unterentwickelten, unscharf abgegrenzten Mantelzonen zu beobachten [40]. Diese Follikel gehen in einen Paracortex über, der polymorphe Infiltrate von Lymphozyten, große, transformierte Lymphoblasten, Plasmazellen, Makrophagen, eosinophile Zellen und teilweise multinukleären Zellen enthält [40]. Muster 2 hingegen zeigt einen Verlust der strukturellen Integrität des Lymphknotens. Hierbei sind lediglich einzelne, verkümmerte Follikel zu beobachten, welche eine konzentrische Anordnung von teils proliferierenden FDC aufweisen [40]. Abschließend zeigt Muster 3 eine vollständige Auflösung der Lymphknotenstruktur. Hierbei ist eine ausgeprägte Proliferation der FDC zu beobachten [40]. Konsekutive Untersuchungen zeigten bei einigen Patienten eine Progression von Muster 1 zu Muster 3.

2.3.6 Chronisch lymphatische Leukämie

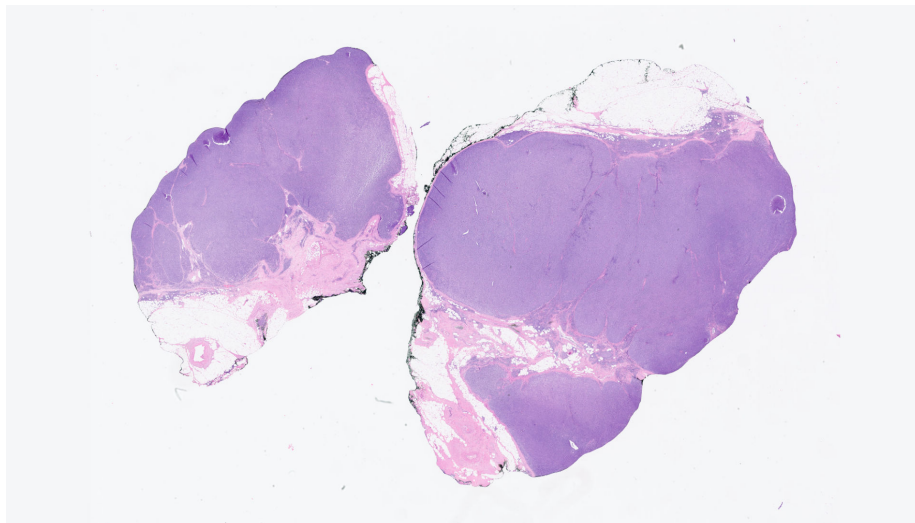


Abbildung 9: Chronisch lymphatische Leukämie. Dargestellt ist ein Hämatoxylin-Eosin-gefärbter Dünnschnitt einer Lymphknotenbiopsie eines Patienten mit diagnostizierter chronisch lymphatischer Leukämie in der Übersicht.

Die CLL ist ein B-Zell-Lymphom, dargestellt in Abbildung 9. Es ist charakterisiert durch eine diffuse Proliferation von neoplastischen und monomorphen

B-Lymphozyten. Morphologisch sind diese Zellen als vorwiegend klein und rund charakterisiert. Der Zellkern weist ein dichtes Chromatin und eine unauffällige Morphologie auf [42]. Neben den zuvor beschriebenen Zellen finden sich im Lymphknoten auch vereinzelte größere Zellen wieder, welche ein weitaus weniger dichtes Chromatin aufweisen. Auch der Phänotyp der neoplastischen Zellen ist charakteristisch. Neoplastische Zellen der CLL sind positiv für CD19, CD5, CD23 und, wenn auch abgeschwächt, für CD20 [42].

Makroskopisch ist das neoplastische Lymphknotengewebe durch das Auftreten von Proliferationszentren, auch Pseudofollikel genannt, charakterisiert. Diese stellen Aggregationen von Prolymphozyten und Paraimmunoblasten dar [43]. Die Größe der Pseudofollikel ist hierbei von Fall zu Fall variabel.

2.3.7 Marginalzonenlymphom

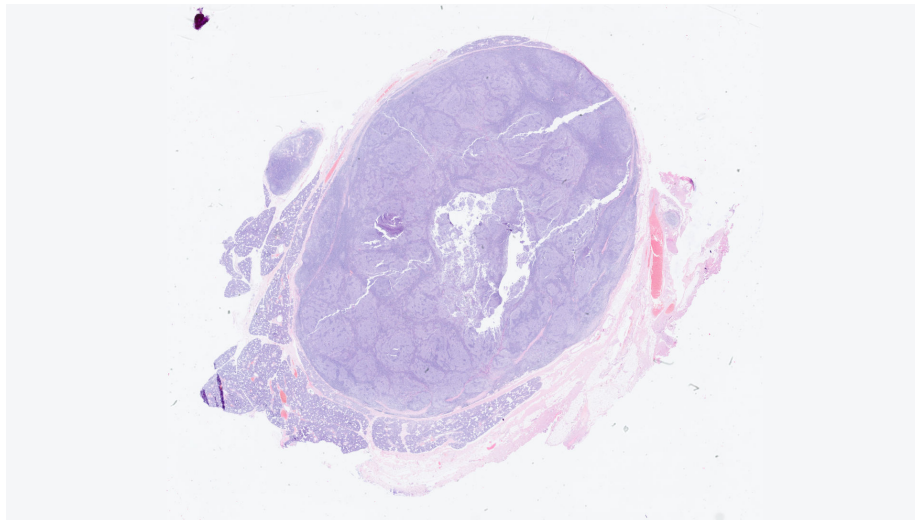


Abbildung 10: Marginalzonenlymphom. Dargestellt ist ein Hämatoxylin-Eosin gefärbter Dünnschnitt einer Lymphknotenbiopsie eines Patienten mit diagnostiziertem Marginalzonenlymphom in der Übersicht.

Das Marginalzonenlymphom (MZ) ist nach dem DLBCL und dem FL mit einem Anteil von 7% – 8% das dritthäufigste Lymphom und ist in Abbildung 10 dargestellt [44, 45]. Es ist ein B-Zell-Lymphom, welches in drei Subgruppen unterteilt wird: das extranodale MZ des mukosaassoziierten lymphatischen Gewebes (MALT), das nodale MZ und das primäre MZ der Milz [45]. Da einzig das nodale MZ seinen Ursprung und Manifestation im Lymphknoten hat, wird im Folgenden dieser Subtyp charakterisiert.

Das nodale MZ geht mit einer Proliferation monozytoider B-Zellen einher. Die

se Zellen weisen kleine bis mittelgroße, monozytenähnliche Kerne mit einem verbreiterten Zytoplasma auf [4]. Weiterhin ist das TME diffus mit Blasten durchsetzt. Im Rahmen der Tumorgenese findet eine vorwiegende Ausbreitung über lymphoide Sinusstrukturen statt, welche nach und nach zersetzt werden. Tumorzellen des MZ weisen keinen spezifischen Phänotyp auf [4].

2.3.8 Mantelzelllymphom

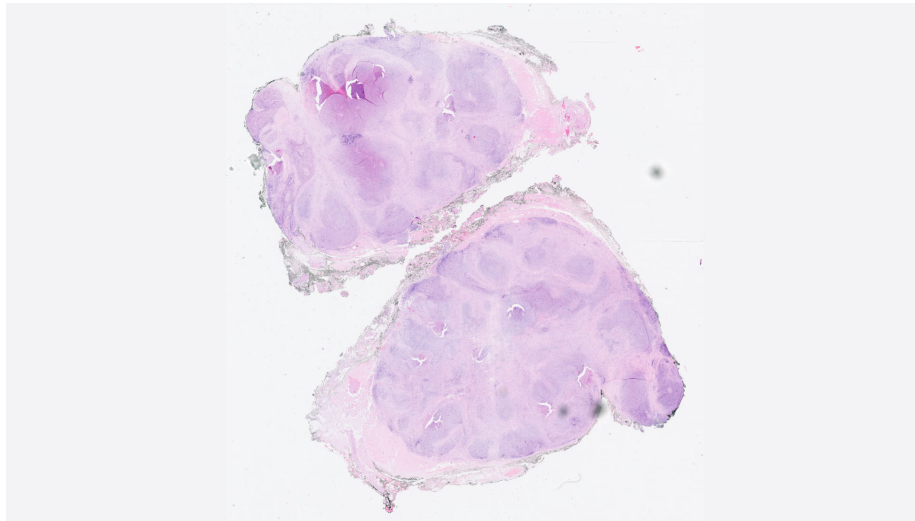


Abbildung 11: Mantelzelllymphom. Dargestellt ist ein Hämatoxylin-Eosin-gefärbter Dünnschnitt einer Lymphknotenbiopsie eines Patienten mit diagnostiziertem Mantelzelllymphom in der Übersicht.

Das Mantelzelllymphom (MC) ist ein B-Zell-Lymphom, welches erstmals 1882 durch Weisenburger et al. beschrieben wurde [46]. Histopathologisch zeichnet sich das MC durch ein knotiges Wachstum mit einer verbreiterten Mantelzone aus, dargestellt in Abbildung 11 [47]. In Abgrenzung zum FL und CLL findet sich in den Tumorknoten keine Ansammlung von Zentrozyten, Prolymphozyten, Paraimmunoblasten und Immunoblasten. Die Tumorknoten können von kleinen Gefäßen und Epitheloidzellen durchzogen sein [48].

Zytologisch zeichnet sich das MC durch kleine bis mittelgroße, neoplastische Lymphozyten aus. Diese weisen einen morphologisch irregulären Kern mit gelockertem Chromatin auf. Das Zytoplasma der neoplastischen Zellen ist schmal [48]. Phänotypisch zeigen sich Tumorzellen des MC positiv für CD5, jedoch nicht für CD10 und CD23 [4].

Genetisch ist für Tumorzellen des MC eine Translokation $t(11;14)$ und eine damit einhergehende Überexpression von CyclinD1 charakteristisch. Das MC

kann darüber hinaus in drei Subgruppen untergliedert werden: die kleinzellige Variante, die klassische Variante und die aggressive Variante, welche durch pleomorphe und teils blastoide Tumorzellen charakterisiert ist [4].

3 Material und Methoden

3.1 Bilddaten

Im Rahmen der Arbeit sollen reaktive und neoplastische lymphoide Gewebeveränderungen digital-pathologisch charakterisiert werden. Diese Charakterisierung basiert auf der manuellen und (semi-)automatischen Auswertung humaner, lymphoider Gewebeproben. Bevor diese bioinformatisch ausgewertet werden können, bedarf es, wie in Abbildung 12 dargestellt, der Extirpation, der immunhistologischen Vorverarbeitung und der Digitalisierung der Gewebeproben. Hierbei werden Patient*innen zunächst zu kurativen und/oder diagnostischen Zwecken Gewebeproben mittels Lymphknotenbiopsie, Adenotomie oder Tonsillektomie entnommen. Diese Gewebeproben werden anschließend immunhistologisch aufgearbeitet und gefärbt. Abschließend werden die Proben mithilfe von Hochleistungsscannern und/oder Mikroskopen digitalisiert und in der mit DTMS (Kapitel 4.1) verwalteten Datenbank abgelegt. Die Bilddaten gliedern sich in zweidimensionale Aufnahmen von ganzen Gewebeproben, sowie dreidimensionale und vierdimensionale Aufnahmen von Ausschnitten von Gewebeproben. Für jede Gewebeprobe liegen Informationen bezüglich der Fallnummer,

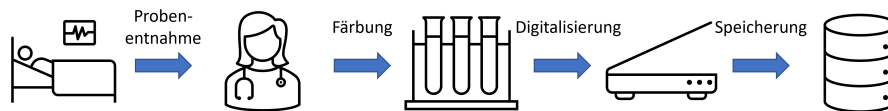


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Gewinnung der Bilddaten immunhistologisch präprozessierter Gewebeproben.

der angewendeten immunhistologischen Färbung und der Diagnose vor. Für die fortlaufende Untersuchung wurden die Fallnummern anonymisiert, sodass diese nicht auf Patienten zurückzuführen sind. Die Gewebeproben wurden durch das Referenz- und Konsultationszentrum für Lymphknotenpathologie des Dr. Senckenbergischen Instituts für Pathologie, Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt. Frischgewebeproben für die 4D-Mikroskopie und Adenoide wurden durch die Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt. Alle Gewebeproben stammen aus dem Zeitraum zwischen 1999 und 2022. Die Verwendung der Gewebeproben wurde im Hinblick auf institutionelle Richtlinien der Goethe-Universität Frankfurt am Main untersucht und stattgegeben.

3.1.1 2D-Bilddaten

Zweidimensionale Aufnahmen, im Folgenden *whole slide images* (WSIs) genannt, stellen in dieser Arbeit Aufnahmen von Lymphknotenbiopsien dar. Im Rahmen der Präprozessierung wurden $2\mu\text{m}$ dicke Dünnschnitte der in Paraffin eingebetteten Gewebeprobe angefertigt und immunhistologisch aufgearbeitet.

Hierbei wurden überwiegend Zellkerne in Kombination mit einem weiteren Marker visualisiert. Zur Digitalisierung der Gewebeproben wurde ein Hamamatsu NanoZoomer S360 und ein Aperio ScanScope XT eingesetzt. Diese digitalisieren Gewebeproben haben eine Auflösung von $0,25\mu m$ pro Pixel. Die WSIs liegen in einem pyramidal gestaltetem **tif!** (**tif!**)-Format vor und haben eine Größe von bis zu 80.000×80.000 Pixel, respektive bis zu 3 GB.

3.1.2 3D-Bilddaten

Dreidimensionale Aufnahmen stellen in dieser Arbeit Aufnahmen von Lymphknotenbiopsien und Gewebeproben aus einer Adenotomie dar. Im Rahmen der Präprozessierung wurden $20\mu m$ dicke Dickschnitte der in Paraffin eingebetteten Gewebeprobe angefertigt und mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt. Hierbei wurden eins bis drei Fluoreszenzfärbungen pro Schnitt durchgeführt. Ein Farbkanal enthält meist eine 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Färbung zur Visualisierung der Zellkerne. Die Gewebeproben wurden überwiegend mit dem konfokalen Lasermikroskop SP8 der Firma Leica digitalisiert. Diese Aufnahmen weisen eine durchschnittliche Auflösung von $0,13\mu m$ pro Voxel auf und haben eine durchschnittliche Größe von $5.000 \times 5.000 \times 150$ Voxel, respektive bis zu 20 GB.

3.1.3 4D-Bilddaten

Vierdimensionale Bilddaten repräsentieren in dieser Arbeit zeitaufgelöste Daten einzelner Lymphknotenbiopsien oder aber Gewebeproben aus einer Adenotomie. Zur Anfertigung der Bilddaten werden $350\mu m$ dicke Frischgewebsschnitte angefertigt und mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern direkt gefärbt. Hierbei liegen pro Schnitt eins bis vier Fluoreszenzfärbungen vor. Die Gewebeproben wurden mit dem konfokalen Lasermikroskop Leica SP8 digitalisiert und die hieraus resultierenden Aufnahmen weisen eine durchschnittliche Auflösung von $0,13\mu m$ pro Voxel in X- und Y-Richtung, beziehungsweise $2,7\mu m$ pro Voxel in Z-Richtung auf. Die Videos zeigen einen Zeitraum von ungefähr 20 Minuten und sind durchschnittlich $2.000 \times 2.000 \times 100$ Voxel, respektive bis zu 10 GB groß.

3.2 Computer Vision

Im Rahmen der Arbeit sollen reaktive und neoplastische sekundäre lymphatische Organe auf Basis von 2D- und 3D-Bilddaten von lymphoiden Gewebeproben digital-pathologisch charakterisiert werden. Hierzu wurden eigens entwickelte und proprietäre Softwarelösungen eingesetzt. Für die digital-pathologische Analyse der WSIs wurde die Software *FAITH*, beschrieben in Abschnitt 4.3, entwickelt. Die hierin enthaltenen Programmbausteine und Plug-ins zur Bildanalyse basieren auf Algorithmen aus dem Bereich Computer Vision. Im Folgenden werden die hierfür nötigen Grundlagen erläutert.

3.2.1 Präprozessierung

Die Funktionalitäten verschiedener Programmbausteine und Plug-ins der Software *FAITH* bedürfen diverser Algorithmen zur Präprozessierung der Bilddaten. Medizinische Bilddaten, speziell Daten aus der Routine der klinischen Arbeit, enthalten vielerlei Artefakte und Fehlinformationen, die die Ergebnisse einer digital-pathologischen Analyse negativ beeinflussen können. Diese approximativ zu eliminieren und die jeweiligen Bilddaten für die Anwendung von Algorithmen aus dem Gebiet der Bildanalyse aufzuarbeiten, ist die Aufgabe spezieller Präprozessierungsalgorithmen.

Multi-Level Schwellenwertverfahren

Die Intention hinter dem Einsatz von Schwellenwertverfahren ist hier die Diskriminierung von Hintergrund- und Objektpixeln. Schwellenwertverfahren können in Bi-Level und Multi-Level-Schwellenwertverfahren unterteilt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem *Multi-Otsu*-Schwellenwertverfahren ein Multi-Level-Schwellenwertverfahren angewandt. Das Bi-Level-Schwellenwertverfahren nach Otsu basiert auf der Maximierung der Inter-Klassenvarianz der Intensitätswerte zur Bestimmung eines Schwellenwertes. Das hier angewendete *Multi-Otsu*-Verfahren nach Liao (2001) basiert auf einer Adaption der Inter-Klassenvarianz als Diskriminationskriterium [49]. Die daraus resultierende Multi-Level-Lösung ermöglicht die Diskriminierung multipler Klassen innerhalb eines Intensitätsspektrums [50]. Diese multiple Definition von Intensitätsklassen bildet die fluide Präsenz der Intensitätsklassen (zum Beispiel Hintergrundpixel, unspezifische Färbung, Objektpixel) innerhalb immunhistologischer Bilddaten weitaus präziser ab, als herkömmliche Bi-Level-Verfahren.

Color deconvolution

Die in der diagnostischen Routine vorwiegend verwendeten immunhistologischen Protokolle basieren auf der dualen Färbung zweier zytologischer Marker. Die hieraus resultierenden WSIs weisen somit meist überlagerte Informationen der immunhistologischen Färbungen auf. Diese Informationen zu separieren und für die quantitative, digital-pathologische Analyse zu erschließen, ist die Intention hinter der Anwendung der *color deconvolution*. Um die Trennung der Farbkanäle nach Ruifrok (2001) zu bewerkstelligen, werden zunächst spezifische Farbvektoren der Primär- und Sekundärfärbung manuell bestimmt [51]. Auf Basis dieser Farbkanäle werden anschließend die Pixelinformationen im RGB-Format orthonormal transformiert.

Kontrastverstärkung

Im Rahmen der Bildoptimierung spielt die Kontrastverstärkung eine essenzielle Rolle. Das menschliche Auge führt im Bildkontext fortwährend eine Adaption des Bildes durch, um beispielsweise schwach abgegrenzte Objekte in dunklen Bildbereichen zu erkennen. Auch erkennt das menschliche Auge marginale Unterschiede in Bildbereichen, in denen zu detektierende Objekte fließend in die Umgebung übergehen. Dies hat zur Folge, dass viele medizinische

Gewebeproben für einen Pathologen evaluierbar bleiben, während sie für eine digital-pathologische Untersuchung unbrauchbar sind. Um diesen Effekt abzumildern, werden im Rahmen der Bildnormalisierung Kontrastverstärkungen vorgenommen. Hierbei gibt es verschiedene Ansätze. Ein Ansatz ist die logarithmische Transformation von Bilddaten. Hierbei werden speziell in dunklen Intensitätsspektren schwach gefärbte Objekte verstärkt. Dies geschieht nach folgender Formel:

$$S = c * \log(r + 1) \quad (1)$$

Hierbei repräsentiert S den resultierenden Intensitätswert, r den initialen Intensitätswert und c eine Änderungskonstante [52]. Dies hat jedoch ebenfalls zur Folge, dass sehr stark gefärbte Objekte an Kontrast verlieren, wenngleich dieser Effekt schwächer ausfällt. Dennoch resultiert die Anwendung der logarithmischen Transformation in einer unvollständigen Ausnutzung des zur Verfügung stehenden Intensitätsspektrums. Um dies zu umgehen, wird eine Spreizung des abgebildeten Intensitätsspektrums auf Basis der minimalen und maximalen Intensitätswerte durchgeführt. Dies geschieht nach folgender Formel:

$$I_{res} = \frac{(I - I_{min})}{(I_{min} - I_{max})} \quad (2)$$

Hierbei beschreibt I_{res} den adaptierten Intensitätswert. I repräsentiert den initialen Intensitätswert und I_{min} , respektive I_{max} , den minimalen und maximalen Intensitätswert innerhalb eines Bildes [52].

3.2.2 Objekterkennung

In der quantitativen, digitalen Pathologie nimmt die Objekterkennung eine zentrale Rolle ein. Hierbei sollen in medizinischen Bilddaten Objekte wie Zellkerne, Zellen, aber auch Zellverbände und funktionelle Kompartimente detektiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Computer Vision-basierte Algorithmen zur Detektion von Zellobjekten eingesetzt. Für die Detektion in dreidimensionalen Bilddaten wurde das Programm *create surfaces* der Software „Imaris Advanced Tracking“ der Firma Bitplane AG (Badenerstraße 682, CH-8048 Zürich, Schweiz) eingesetzt, welches auf dem *Marching Cubes*-Algorithmus basiert [53]. Das Plug-in *celldetection* der eigens implementierten Software *FAITH*, beschrieben in Abschnitt 4.3, basiert auf der Detektion von Zusammenhangskomponenten mithilfe der Open-Source-Software *scipy* unter Einsatz zentrosymmetrischer Matrizen [54, 55].

3.3 Graphentheorie

Im Rahmen der pathologischen Begutachtung von immunhistologisch gefärbten Gewebeproben, werden neoplastische Veränderungen im zellulären und strukturellen Kontext evaluiert. Hierbei spielen nicht nur morphologische Veränderungen der Tumorzelle selbst eine Rolle, sondern auch die zelluläre Zusammensetzung

der Tumormikroumgebung. Um dies in digital-pathologischen und CAD-basierten Workflows abzubilden, werden Zellgraphen eingesetzt [56, 57, 58].

3.3.1 Zellgraphen

Zellgraphen dienen der Beschreibung der räumlichen Distribution und Organisation von Zellen. Ein Zellgraph $Z(N, E)$ ist im Rahmen dieser Arbeit als geometrischer, unmarkierter und ungerichteter Graph definiert. Innerhalb eines Zellgraphen repräsentiert ein Knoten N eine Zelle oder einen Zellverbund und eine Kante E eine potenzielle Interaktion zweier Zellen oder Zellverbände. Eine potenzielle Interaktion E ist auf Basis der räumlichen Nähe zwischen zwei Zellen definiert. Für die Konstruktion des Zellgraphen wurde im Rahmen dieser Arbeit das Konzept des *Unit disk*-Graphen eingesetzt [59]. Hierbei wird eine Kante zwischen jedweder Knotenpaarung initiiert, welche eine euklidische Distanz kleiner einem gegebenen Schwellenwert aufweist. Dieses deterministische Verfahren kann für eine genauere Approximation einer potenziellen zellulären Interaktion durch ein probabilistisches Model ergänzt werden. Hierbei wird die Interaktionswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der euklidischen Distanz zweier Zellobjekte modelliert. Das Modell nach Waxmann (1988) gewichtet die Interaktionswahrscheinlichkeit wie folgt [60]:

$$P(u, v) = \alpha * e^{\frac{-d(u,v)}{(S*\beta)}} \quad (3)$$

Hierbei stellt $P(u, v)$ die Interaktionswahrscheinlichkeit zwischen den Knoten u und v dar. $d(u, v)$ repräsentiert die euklidische Distanz zwischen den Knoten u und v . S repräsentiert den Schwellenwert, ab welcher Distanz eine Interaktion potenziell möglich ist. Für die in Waxmann (1988) aufgeführten Modellparameter α und β wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Wert von 1 für α und 0,01 für β , wie in Gunduz et al. (2004) diskutiert, angenommen [61].

3.4 Data engineering und Data science

Im Rahmen dieser Arbeit sollen digital-pathologische Parameter einzelner Gewebeproben hinsichtlich potenzieller Differenzen und darauf aufbauend bezüglich ihrer diskriminativen Potenz untersucht werden. Diese Analysen sollen mögliche diagnostische Anwendungsfälle aufzeigen.

3.4.1 Präprozessierung

Um verschiedene Datensätze und Parameter vergleichbar und zugänglich zu machen, bedarf es einer Präprozessierung der Daten. Zur Beschreibung verschiedener Sachverhalte können verschiedene Datentypen Anwendung finden. Hierbei können kategorische Datentypen zur Klassifikation verschiedener Zustände, wie beispielsweise der Färbung einzelner Zellen, zum Einsatz kommen, aber auch numerische Datentypen zur Beschreibung verschiedener Eigenschaften, wie beispielsweise der Größe von Zellen. Die Vorverarbeitung der Daten bezieht sich

jedoch nicht nur auf die Definition und Anpassung der Datentypen einzelner Parameter, sondern auch beispielsweise auf die Normalisierung der zugrundeliegenden Zahlenräume.

Datennormalisierung

Verschiedene Parameter weisen verschiedene Zahlenräume auf. Während sich beispielsweise Parameter wie die Solidität eines Objekts im Intervall zwischen 0 und 1 bewegen, erstreckt sich beispielsweise das Intervall der Zellgröße in μm auf Werte zwischen $5\mu m$ und mehr. Für den regulären Einsatz einiger Algorithmen des maschinellen Lernens ist eine einheitliche Skalierung der Daten jedoch unabdingbar. Mithilfe des *StandardScaler* der Open-Source-Software *scikit-learn* wurden Daten unter Abzug des Datendurchschnitts hinsichtlich einer einheitlichen Varianz unter Anwendung folgender Formel skaliert [62]:

$$Z = \frac{(x - u)}{s} \quad (4)$$

Hierbei repräsentiert Z den skalierten Wert, x den initialen Wert, u den Durchschnitt der Daten und s die Standardabweichung der Daten.

3.4.2 Statistik

Um die Verteilung verschiedener Eigenschaften entitätspezifisch vergleichen zu können und im Speziellen die diskriminative Potenz einzelner Parameter beurteilen zu können, wurden zunächst Tests der deskriptiven Statistik angewendet, welche nachfolgend näher erläutert werden. Für die Beurteilung signifikanter Abweichungen zwischen unterschiedlichen Stichproben wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ angewendet. Die statistischen Tests wurden mithilfe der Open-Source-Softwarepakete *scipy*, *scikit-learn* und *scikit-posthocs* durchgeführt [55, 62, 63]. Im Folgenden werden die verwendeten statistischen Tests vorgestellt und beschrieben.

Kruskal-Wallis-Test

Der Kruskal-Wallis-Test ist ein nicht-parametrisches Verfahren, um zu beurteilen, ob unabhängige Stichproben einer einzigen Population entstammen [64]. Hierbei wird im Rahmen einer Varianz-Analyse ein Rangsummen-Test zwischen zwei oder mehr Stichproben durchgeführt. Als Voraussetzung gilt die Ordinalskalierung der zu untersuchenden Variable. Eine Normalverteilung der Daten muss nicht angenommen werden.

Mann-Whitney-U-Test

Der Mann-Whitney-U-Test (MWU-Test), auch Wilcoxon-Rangsummen-Test genannt, ist ein nicht-parametrisches Verfahren zur Beurteilung zentraler Tendenzen zwischen zwei unabhängigen Stichproben [65, 66, 67]. Für die Anwendung des MWU-Tests wird die Ordinalskalierung der unabhängigen Variable vorausgesetzt. Im Verfahren des MWU-Tests werden zwei Stichproben mithilfe der

Rangierung der Daten verglichen. Hierbei werden die Stichproben nicht nur hinsichtlich ihrer Verteilung, sondern auch hinsichtlich ihrer numerischen Lage verglichen. Eine Normalverteilung der Daten muss nicht angenommen werden.

Dunn's-Test

Der Dunn's-Test ist vergleichbar mit dem MWU-Test. Der Dunn's-Test ist ein nicht-parametrisches Verfahren zur Beurteilung einer Abweichung zweier unabhängiger Stichproben unter Berechnung von Rangsummen [68, 69]. Eine Normalverteilung der Daten muss nicht angenommen werden.

Kolmogorov-Smirnov-Test

Der hier verwendete Kolmogorov-Smirnov-Test ist ein nicht-parametrisches Verfahren, um zwei Stichprobenmengen hinsichtlich Ort und Form ihrer empirischen Verteilungsfunktion auf Unterschiedlichkeit zu testen [70]. Hierfür wird für jede aufsteigend sortierte Stichprobenmenge die relative Summenfunktion bestimmt und anschließend verglichen.

Benjamini-Hochberg-Korrektur

Die Benjamini-Hochberg-Korrektur ist ein Verfahren zum Kontrollieren der *False discovery rate* (FDR) und stellt eine abgeschwächte Form der Korrektur nach Bonferroni [71, 72] dar. Das Kontrollieren der FDR ist nötig, da multiples Testen das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen erwarten lässt. Im Rahmen der Benjamini-Hochberg-Korrektur werden errechnete p-Werte aufsteigend sortiert und hinsichtlich Signifikanzniveau und Testanzahl nach folgender Formel korrigiert:

$$P^* = \frac{k}{m} \alpha \quad (5)$$

Hierbei ist P^* der korrigierte p-Wert, k der Rang des p-Werts, m die Summe der statistischen Tests und α das Signifikanzniveau.

Korrelation nach Pearson

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson ermöglicht eine Aussage über den linearen Zusammenhang zweier metrisch skalierten Variablen [73]. Der Korrelationskoeffizient ist dimensionslos und hat einen Wert zwischen -1 und 1 . Negative Korrelationskoeffizienten beschreiben eine negative Korrelation, analog ist dies für positive Korrelationskoeffizienten definiert. In dieser Arbeit ist der lineare Zusammenhang auf Basis des Korrelationskoeffizienten nach Cohen (1988) definiert [74]. Der Korrelationskoeffizient beschreibt in einem Bereich von $0,0 \leq r \leq 0,1$ keinen linearen Zusammenhang. Im Bereich von $0,1 < r \leq 0,3$ wird von einer schwachen Korrelation gesprochen. Der Bereich $0,3 < r \leq 0,5$ wird als moderater linearer Zusammenhang interpretiert. Im Bereich von $0,5 < r \leq 1,0$ wird von einem starken linearen Zusammenhang gesprochen. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten basiert auf der Kova-

rianz, der Standardabweichung und dem Mittelwert der Stichprobe, sowie der Stichprobengröße.

Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse, auch Hauptachsentransformation oder Singulärwertzerlegung genannt, ist ein Verfahren der multivariaten Statistik zur Dimensionsreduktion mithilfe der Eigenvektoren der Kovarianzmatrix. Die Projektion der Daten mithilfe von Linearkombinationen verschiedener Parameter in einen niedrig-dimensionalen Raum diente im Rahmen dieser Arbeit der Vereinfachung der Datenbeurteilung. Es wurde eine Implementierung der Open-Source-Software *scikit-learn* der Adaption nach Halko (2009) eingesetzt [75, 76, 62].

3.4.3 Unüberwachtes Lernen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Clustering-Algorithmen aus dem Bereich des unüberwachten Lernens für eine automatische Strukturierung der Daten eingesetzt. Im Folgenden werden die verwendeten Clustering-Algorithmen vorgestellt und beschrieben. Die Implementierung entstammt dem Open-Source-Softwarepaket *scikit-learn* [62].

Hierarchisches Clustering

Das im Rahmen dieser Arbeit angewendete hierarchische Clustering ist ein binäres Clustering-Verfahren. Hierbei werden iterativ paarweise Distanzen zwischen zwei Clustern nach den Verfahren *single linkage*, *average linkage* und *complete linkage* berechnet. Ein Cluster kann aus einem oder mehreren Elementen bestehen. *Single linkage* beschreibt die Distanz zweier Cluster als die geringste Distanz zwischen zwei Elementen der bereits bestehenden Cluster. *Average linkage* definiert die Distanz zweier Cluster als die durchschnittliche Distanz aller Elemente der bestehenden Cluster. *Complete linkage* definiert die Distanz zwischen zwei Clustern als die maximale Distanz zweier Elemente der bestehenden Cluster. Es werden in jeder Iteration die zwei Cluster zusammengefasst, welche die geringste paarweise Distanz aufweisen. Darauf folgt stets eine Neuberechnung der paarweisen Distanzen. Dies geschieht iterativ, bis ein vollständiger Cluster-Baum initiiert wurde.

K-Means-Clustering

Der hier verwendete *K-Means-Clustering*-Algorithmus nach Lloyd (1957) ermittelt Cluster-Zentren durch die Minimierung der Intraklassen-Varianz [77]. Hierbei werden zunächst k zufällige Mittelwerte des Datensatzes als Zentrum des jeweiligen Clusters gewählt. Anschließend wird jedes Element einem Cluster zugeordnet, dessen Intraklassen-Varianz am wenigsten durch die Zuordnung ansteigt. Abschließend wird das Zentrum des Clusters neu berechnet. Dies wird iterativ wiederholt, bis durch eine Neuordnung der Elemente keine Änderung mehr eintritt. Die Anzahl k zu detektierender Cluster muss hierbei manuell de-

finiert werden.

DBSCAN

Der Clustering-Algorithmus *Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise* (DBSCAN) definiert Cluster auf Basis ihrer „Dichteverbundenheit“ [78, 79, 80]. Als „dichteverbunden“ wird ein Element bezeichnet, welches mindestens n Nachbarn mit einer Distanz D kleiner einem Schwellenwert S aufweist. Hierbei werden Elemente einem Cluster zugeordnet, sofern sie selbst als „dichteverbunden“ definiert werden oder aber eine Distanz $D < S$ zu einem „dichteverbundenen“ Element aufweisen. Elemente, die nach dieser Definition keinem Cluster zugeordnet werden können, werden als Rauschen bezeichnet. Für diesen Algorithmus muss die Anzahl vorhandener Cluster nicht im Vorhinein definiert werden.

3.4.4 Überwachtes Lernen

Im Rahmen dieser Arbeit werden überwachte Lernalgorithmen eingesetzt, um verschiedene Parametersets hinsichtlich ihrer diskriminativen Potenz zu untersuchen. Neben den zuvor beschriebenen Data engineering Verfahren ist hierfür die Zusammenstellung geeigneter Parametersets, wie auch die Wahl des richtigen Klassifikators essenziell. In den folgenden Abschnitten werden die hierfür verwendeten Methoden vorgestellt und erläutert. Die Methoden wurden mithilfe der Open-Source-Software *scikit-learn* angewendet [62].

Feature selection

Ein essenzieller Bestandteil in der Anwendung von Algorithmen des maschinellen Lernens ist die Wahl geeigneter Parameter. Hierzu gibt es verschiedene Ansätze, um die diskriminative Potenz einzelner Parameter zu bewerten. Ein bewährter Ansatz ist hierbei der Score *Mean decrease in impurity* (MDI) auf Basis eines *Random forest*-Klassifikators [81]. Dieser basiert auf der *Gini impurity*. Die *Gini impurity* beschreibt ein statistisches Maß der Ungleichverteilung und ist definiert als:

$$Gini = 1 - \sum_{i=1}^n (P_i)^2 \quad (6)$$

Hier ist n definiert als die Anzahl der Klassen und P_i als die Wahrscheinlichkeit eines Elements einer Klasse i anzugehören. MDI definiert als Maß für die diskriminative Potenz eines Parameters die durchschnittliche Abnahme der *Gini impurity*, durch die Verwendung des Parameters innerhalb eines Entscheidungsbaums. Diese Art der Bewertung der Parameter ist jedoch unter Verwendung hoch korrelierter Parameter problematisch. Um dies zu umgehen, kann die Anzahl hoch korrelierter Parameter im Vorhinein in einem semiquantitativen Verfahren reduziert werden. Hierzu werden Parameter hinsichtlich ihres

Korrelationskoeffizienten nach Pearson hierarchisch geclustert [82]. Für die Parameterselektion wird anschließend ein repräsentativer Parameter jedes Clusters manuell ausgewählt.

Entscheidungsbaum-Klassifikator

Der Entscheidungsbaum-Klassifikator ist ein Algorithmus zur Entscheidungsfindung und Klassifikation von zwei oder mehr Klassen [83]. In der hier verwendeten Definition werden auf Basis der zuvor beschriebenen *Gini impurity* einzelne Parameter als Entscheidungsknoten des Entscheidungsbaums ausgewählt, um Klassen regelbasiert zu unterscheiden. Der Entscheidungsbaum-Klassifikator besticht durch seine Einfachheit in der Evaluation, da Eigenschaften einzelner Klassen direkt aus der resultierenden Baumstruktur abgeleitet werden können.

Bagged decision tree-Klassifikator

Das *bagging* setzt sich aus den Verfahren des *Bootstrappings* und Aggregierens zusammen [84]. Hierbei wird der Datensatz zum Training des Klassifikators, hier dem Entscheidungsbaum-Klassifikator, zunächst *gebootstraped*, also n -mal zufällig aufgeteilt. Auf Basis dieser Daten werden n Entscheidungsbäume trainiert. Im Schritt der Aggregation wird die Klasse eines zu klassifizierenden Objekts durch eine Mehrheitsentscheidung der zuvor generierten Entscheidungsbaum-Klassifikatoren bestimmt. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass das *overfitting* eines Klassifikators reduziert werden kann. Auch ist die Anwendung auf einen Datensatz mit ungleich verteilten Klassengrößen möglich.

Random forest-Klassifikator

Der *Random forest*-Klassifikator ist ein Ensemble-Klassifikator, der sich aus einem „Zufallswald“ aus Entscheidungsbäumen zusammensetzt [85]. Hierbei werden eine zuvor definierte Anzahl Entscheidungsbäume mit differierenden, reduzierten Parametermengen trainiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch das *bootstrapping* eingesetzt, sodass die generierten Entscheidungsbäume mit differierenden Datenteilmengen trainiert wurden. Die Klassifikation basiert auf der Mehrheitsentscheidung der zugrunde liegenden Entscheidungsbäume. So kann auch hier das *overfitting* des Klassifikators reduziert werden.

3.5 Hardware

Die physische Größe medizinischer Bilddaten, beispielsweise WSIs (0,5 GB – 3 GB), übersteigt die physische Größe herkömmlicher Bilddaten bei Weitem. Dies ist essenziell, da die Wahrung der Reliabilität und Qualität der Diagnostik einer immensen Auflösung bedarf. Hieraus folgt jedoch, dass die Speicherung und Verarbeitung medizinischer Bilddaten hohe hardwaretechnische Anforderungen aufweist. Um dies zu bewerkstelligen, wurde eine Kombination aus einer mobilen Workstation (Dell Precision 3541, Intel Core i7-9850H mit 6 Kernen a 2,6 GHz, NVIDIA Quadro P620, 32 GB Arbeitsspeicher), einer stationären Workstation (Altair Workstation, AMD Epyc 7452 mit 32 Kernen a 2,35 GHz, NVIDIA Quadro RTX 5000, 128 GB Arbeitsspeicher), einem NAS-System (QNAP TS-2483

XU-RP-E216 mit 24 x 12 TB WDC Ultrastar) und einem NETGEAR ProSAFE XS708T Switch eingesetzt. Diese Systeme ermöglichen in ihrer Gesamtheit die effektive und wartungsarme Speicherung, Verwaltung und Verarbeitung der Bilddaten.

3.6 Software

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diverse externe Softwarelösungen eingesetzt, welche im Folgenden beschrieben werden.

3.6.1 Fiji

Fiji ist eine Bildverarbeitungssoftware mit vorwiegend biologischen und medizinischen Anwendungen, basierend auf ImageJ2 [86]. Sie ist Open-Source und bietet Schnittstellen zur Neuintegration von Plug-ins. Daraus resultiert eine Softwarelösung, welche durch eine breite Community gepflegt und stetig erweitert wird. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete *color deconvolution*-Plug-in ermöglicht die manuelle Extraktion von Farbvektoren aus einem RGB-Bild.

3.6.2 VGG Image Annotator

Der *VGG Image Annotator (VIA)* ist ein Programm zur Annotation von Bildern [87]. Das Programm ist eine Open-Source-Software der *Visual Geometry Group (VGG)*, welche in *Hypertext Markup Language (HTML)*, *JavaScript* und *CSS* implementiert wurde.

3.6.3 Imaris

Imaris ist eine Softwarelösung zur Analyse von dreidimensionalen und vierdimensionalen Bilddaten. Es wurde und wird durch die Firma Bitplane AG (Badenerstraße 682, CH-8048 Zürich, Schweiz) entwickelt. Die hier eingesetzten Programmpakete umfassen zunächst Lösungen zur Berechnung von Oberflächen in Mikroskopiebildern. Hierbei werden Objektpixel durch den Einsatz eines *K-Means*-Clustering-Verfahrens definiert und entsprechende Oberflächen durch den Einsatz des *Marching Cubes*-Algorithmus ermittelt. Die vorwiegend eingesetzte Softwarelösung war Imaris Advanced Tracking 9.2.

3.6.4 Verwendete Softwarepakete für die Python-Programmierung

| Paket | Erklärung | Version | Zitat |
|--------------------------|--|----------------|--------------|
| <i>imageio</i> | Paket zum Laden und Speichern von Bildern | 2.19.3 | [88] |
| <i>joblib</i> | Paket um Funktionen gebündelt als Pipelines auszuführen | 1.1.0 | [89] |
| <i>mahotas</i> | Paket für die Computer Vision-basierte Bildanalyse | 1.4.13 | [90] |
| <i>matplotlib</i> | Paket zum Plotten von Ergebnissen | 3.5.2 | [91] |
| <i>networkx</i> | Paket für den Umgang mit Graphen | 2.6.3 | [92] |
| <i>numpy</i> | Paket, welches diverse mathematische Algorithmen umfasst | 1.21.6 | [93] |
| <i>pandas</i> | Paket für das Verarbeiten von tabellarischen Daten | 1.1.5 | [94] |
| <i>pillow</i> | Paket zum Laden und Speichern von Bildern | 9.1.1 | [95] |
| <i>python-bioformats</i> | Paket zum Laden von medizinischen Bilddaten | 4.0.5 | [96] |
| <i>python-javabridge</i> | Paket zum Ausführen von Java-basiertem Code in Python | 4.0.3 | [97] |
| <i>scikit-image</i> | Paket für die Bildverarbeitung | 0.19.3 | [98] |
| <i>scikit-learn</i> | Paket für das maschinelle Lernen | 1.0.2 | [62] |
| <i>scikit-posthocs</i> | Paket, welches statistische Post-hoc Tests beinhaltet | 0.7.0 | [63] |
| <i>scipy</i> | Paket, welches mathematische Algorithmen beinhaltet | 1.7.3 | [55] |
| <i>seaborn</i> | Paket zum Plotten von Ergebnissen | 0.11.2 | [99] |
| <i>statannotations</i> | Paket zum Annotieren statistischer Signifikanzen innerhalb eines Plots | 0.5.0 | [100] |
| <i>tqdm</i> | Paket für die Visualisierung von Fortschrittsbalken | 4.64.0 | [101] |

Tabelle 1: Verwendete Python-Programmbibliotheken. Diese Tabelle zeigt alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Programmbibliotheken der Programmiersprache Python. Es ist jeweils der Paketname, eine kurze Beschreibung des Pakets, die verwendete Versionsnummer und eine Referenz angegeben

4 Ergebnisse: Entwickelte Software

Ziel der Arbeit ist die digital-pathologische Charakterisierung reaktiver und neoplastischer Veränderungen lymphoider Gewebeproben. Hierzu sollten medizinische Bilddaten, beschrieben in Kapitel 3.1, manuell und (semi-)automatisch ausgewertet werden. Um eine solche Auswertung zu ermöglichen, war die Etablierung adäquater Softwarelösungen unumgänglich. Diese Softwarelösungen sollten der Speicherung, Verwaltung und Auswertung medizinischer Bilddaten dienen.

4.1 *Digital tissue management suite*

Neben einer adäquaten Hardwarelösung ist für die Untersuchung medizinischer Bilddaten hinsichtlich diagnostisch relevanter Muster ein umfangreicher Datensatz notwendig. Um eine solche digitale Gewebedatenbank aufbauen zu können, wurde zunächst eine individuelle Softwarelösung zum Speichern und Verwalten der medizinischen 2D-, 3D- und 4D-Bilddaten, sowie korrespondierenden Metadaten entwickelt. Diesen Funktionsumfang bildet das implementierte CMS DTMS ab. DTMS ist eine Open-Source-, Public-Domain-Software zur Verwaltung histopathologischer, multidimensionaler Bilddaten auf Basis von *Comma-separated values* (CSV)-Dateien. Die Implementierung des Frontends und des Backends wurde in *JavaFX_8.0.161* und *Java_8.0.161* vorgenommen.

Backend

Das Backend von DTMS speichert und verwaltet Bildinformationen mithilfe von vier CSV-Dateien. Diese Bildinformationen werden in generelle Bildinformationen und dimensionsspezifische Bildinformationen unterteilt. Alle generellen Bildinformationen werden in einer CSV-Datei gespeichert. Diese umfassen obligatorische und optionale Bildinformationen, beschrieben in Tabelle 2. Für dimensionsspezifische Bildinformationen besteht je eine CSV-Datei, welche die in Tabelle 2 beschriebenen, optionalen Informationen enthält. Zur schnelleren Interaktion mit dem Benutzer und zur Vermeidung von Performanceverlusten durch die Verwendung ineffizienter Speichermöglichkeiten wurde ein Zwischenschicht innerhalb von DTMS implementiert. Dieser lädt und verwaltet alle in den CSV-Dateien abgespeicherten Metadaten in Form von *HashMaps* und *ObservableLists*. Werden diese nun durch den Benutzer reduziert, erweitert oder geändert, wird das durch einen externen Thread registriert und in die entsprechenden CSV-Dateien übertragen. Weiterhin werden durch DTMS verwaltete Bilddaten in einer zuvor definierten Ordnerstruktur an einem zuvor definierten Speicherort abgelegt. Hierbei wird der jeweilige Dateipfad relativ zum Speicherort gespeichert. So kann der in den CSV-Dateien gespeicherte Dateipfad auf weitere Systeme übertragen werden, ohne dass der zuvor angegebene Dateipfad angepasst werden muss. Weiterhin wird durch das Backend jede Eingabe regelbasiert hinsichtlich Syntax und Plausibilität überprüft.

Frontend

Die in Abbildung 13 dargestellte Benutzeroberfläche ermöglicht die Interaktion

| Bezeichnung | Erklärung | Relevanz |
|--------------------------|--|----------------------|
| General | | |
| <i>ImageID</i> | Von DTMS zugewiesene, eindeutige Bild-ID, welche aus einem Nummernkreis und einer fortlaufenden Nummer besteht | Automatisch vergeben |
| <i>CaseID</i> | Von DTMS zugewiesene, eindeutige und numerische Fall-ID | Automatisch vergeben |
| <i>CaseNumber</i> | Anonymisierte, klinische Fallnummer | obligatorisch |
| <i>EntryDate</i> | Datum des Falleingangs | optional |
| <i>CaptureDate</i> | Datum der Aufnahme des Bildes | optional |
| Diagnose | Die Diagnose des Falls | optional |
| <i>PrimaryStaining</i> | Primäre, angewandte immunhistologische Färbung | optional |
| <i>SecondaryStaining</i> | Sekundäre, angewandte immunhistologische Färbung | optional |
| <i>TertiaryStaining</i> | Tertiäre, angewandte immunhistologische Färbung | optional |
| <i>FileType</i> | Spezifikation der Bilddimension | obligatorisch |
| <i>FilePath</i> | Relativer Pfad des Bildes | obligatorisch |
| <i>Comment</i> | Freifeld zur Speicherung von Zusatzinformationen | optional |
| 2D | | |
| <i>Cellgraph</i> | Relativer Pfad des korrespondierenden Zellgraphen | optional |
| 3D und 4D | | |
| <i>Tiles</i> | Anzahl aufgenommener Bildkacheln | optional |
| <i>ImarisFile</i> | Relativer Pfad der korrespondierenden Imaris-Datei | optional |
| <i>OverviewFile</i> | Relativer Pfad des korrespondierenden Übersichtsbildes | optional |

Tabelle 2: Übersichtstabelle der in DTMS gespeicherten Metadaten.

des Benutzers mit der Datenbank selbst. Die initiale Benutzeroberfläche besteht

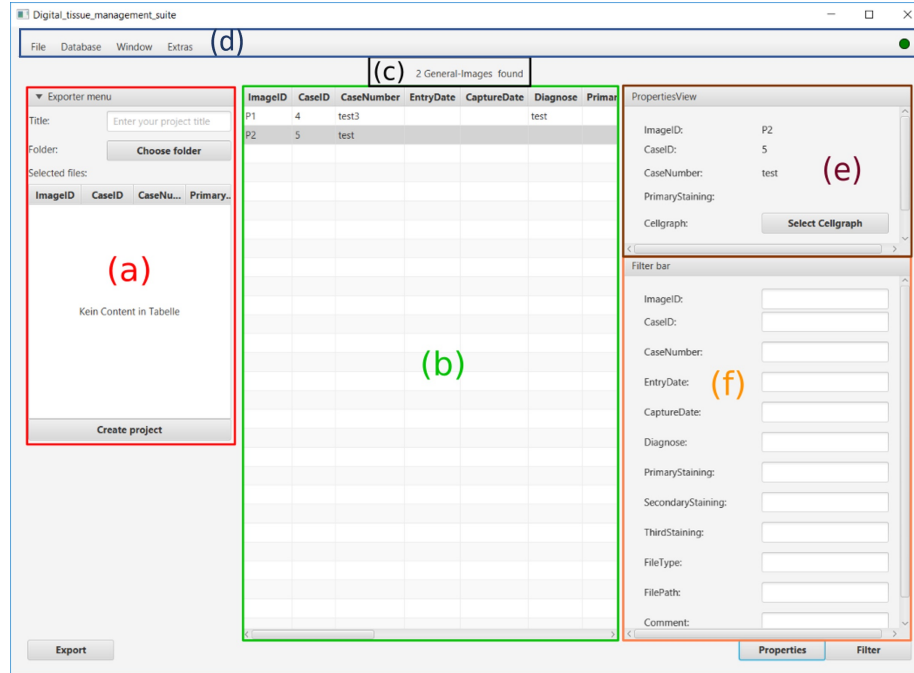


Abbildung 13: Oberfläche der Software DTMS zum Speichern und Verwalten von histopathologischen, multidimensionalen Bilddaten. (a) beinhaltet das Menü zum Exportieren von Bild- und Metadaten. (b) zeigt die gespeicherten Metadaten pro Bild. (c) zeigt die Anzahl der den Filterkriterien entsprechenden Bildern innerhalb der Datenbank. (d) enthält die Menüleiste inklusive der indikativen Fehleranzeige. (e) beschreibt zuvor definierte, Bild-spezifische Zusatzinformationen. (f) zeigt die Filterleiste.

aus einer interaktiven Tabelle, dargestellt in Abbildung 13 (b). Jede Zeile der Tabelle stellt ein Bild sowie die korrespondierenden Metadaten, beschrieben in Tabelle 2, dar. Bilder können singular per Rechtsklick editiert, gelöscht oder aber geöffnet werden. Per Doppelklick kann das Bild geöffnet werden.

Allgemeine Einstellung können über die in Abbildung 13 (d) dargestellte Menüzeile vorgenommen werden. Diese werden in Tabelle 3 vorgestellt und erläutert. Abschließend enthält dieser Bereich einen farbkodierten Informationskreis. Dieser zeigt per *Drag-over*-Menü zuletzt durchgeführte Aktionen (grün), sowie aufgetretene Warnungen (gelb) und Fehlermeldungen (rot). Zusätzliche Funktionen bietet DTMS durch die Buttons *Properties*, *Filter* und *Export*. Der Button *Properties* öffnet ein *inplace*-Fenster zur Darstellung der Dimension-spezifischen Informationen des selektierten Bildes. *Filter* bietet die Möglichkeit, die Datenbank nach spezifischen Bildeigenschaften zu filtern. Die den Filterkriterien entspre-

| Funktion | Erklärung |
|-------------------------------------|--|
| <i>File>Add image</i> | Menüpunkt zum Einpflegen neuer Bilddaten. |
| <i>Database>Import</i> | Menüpunkt zum Importieren von vorformatierten Datensätzen. Dies bezieht sich auf den Re-Import von Datensätzen im DTMS-Backup-Format. Ebenso können mit DTMS-LP (Kapitel 4.2) erzeugte 2D Datensätze importiert werden. |
| <i>Database>Save BackUps</i> | Menüpunkt zum Abspeichern eines Abbildes der zugrundeliegenden CSV-Dateien. |
| <i>Database>Inspect database</i> | Menüpunkt zur automatisierten Überprüfung der Datenbank hinsichtlich falscher oder fehlender Dateiverknüpfungen. |
| <i>Extras>Settings</i> | Menüpunkt für die Anzeige aller Einstellungen der Konfigurationsdatei. Diese umfassen den Installationsspezifischen Nummernkreis und die absoluten Pfade der zugrunde liegenden CSV-Dateien. Ebenso können über dieses Fenster individuelle Tastenkombinationen zur erleichterten Bedienung von DTMS definiert werden. |
| <i>Extras>help</i> | Menüpunkt zur Anzeige eines Tutorials bezüglich der Verwendung von DTMS. |

Tabelle 3: Allgemeine Funktionen des DTMS-Frontends. Die Tabelle zeigt Menüpunkte des DTMS-Frontends und gibt Erläuterungen bezüglich des Funktionsumfangs.

chenden medizinische Bilddaten werden in einer reduzierten Ansicht der Haupttabelle angezeigt. Weiter zeigt das in Abbildung 13 (c) dargestellte Etikett die Anzahl der den Filterkriterien entsprechenden Bilddaten. Export ermöglicht das Exportieren der Bilddaten und optional das Exportieren von korrespondierenden Metadaten. Hierzu werden Bilddaten per *Drag-and-drop*-Funktion in das Exportfenster gezogen. Anschließend können mittels *Dropdown*-Menü die Sortierung, der Umfang und die Anonymisierung des exportierten Datensatzes festgelegt werden. Abschließend kann der Export durch den *Button* „*Create Project*“ durchgeführt werden.

4.2 *Digital tissue management suite – Labelprinter*

Nachdem durch DTMS in Kombination mit der entsprechenden Hardware ein Framework zur Speicherung und Verwaltung von medizinischen Bilddaten implementiert wurde, lag nun das Hauptaugenmerk auf der zeiteffizienten Datengenerierung. Hierzu stand das Archiv des Konsultations- und Referenzzentrums für Lymphknotenpathologie, geleitet durch Prof. Dr. Dr. hc Martin-Leo Hansmann zur Verfügung. Dieses Archiv umfasst mehrere zehntausend Objektträger mit immunhistologisch präparierten Gewebeproben von Patienten mit diagno-

stizierten reaktiven und neoplastischen Lymphknotenveränderungen. Um diese effizient und semi-automatisch mithilfe des Hamamatsu NanoZoomer S360 zu digitalisieren und prospektiv automatisch mit DTMS zu katalogisieren, sollten bestehende Objektträger neu und maschinenlesbar etikettiert werden. Hierfür wurde auf Basis von *Java_8.0.161* und *JavaFX_8.0.161* das Programm DTMS-LP implementiert, dass die Generierung maschinenlesbarer Etiketten in Kombination mit einem Zebra GX430-t Etikettendrucker ermöglicht.

Backend

Das Backend von DTMS-LP verwaltet und generiert Patienten-spezifische Etiketten auf Basis von CSV- und PRN-Dateien. Hierzu wird zunächst hierarchisch zwischen Patienten und Gewebeproben unterschieden. Zur Generierung neuer Etiketten muss zunächst ein Patient unter Angabe der in Tabelle 4 aufgeführten Metadaten angelegt werden. Ist dies geschehen, werden durch DTMS-LP Diag-

| Bezeichnung | Erklärung | Relevanz |
|---------------------|--|---------------|
| Patient | | |
| <i>CaseID</i> | Patienten-spezifische Identifikationsnummer | obligatorisch |
| <i>Diagnosis</i> | Diagnose des Patienten | obligatorisch |
| Objektträger | | |
| <i>Stain</i> | Angewendete immunhistologische Färbung | obligatorisch |
| <i>BlockID</i> | Identifikationsnummer des verwendeten Gewebeblocks | optional |
| <i>Origin</i> | Ursprung der Gewebeprobe (Nodal, Extranodal) | optional |

Tabelle 4: Übersichtstabelle über obligatorische und optionale Metadaten zur Charakterisierung eines Objektträgers innerhalb der Software DTMS-LP.

nose-spezifisch vordefinierte Objektträger automatisch generiert und registriert. Abschließend kann für jeden registrierten Objektträger ein korrespondierendes Etikett gedruckt werden. Hierzu wird für jedes Etikett eine PRN-Datei generiert, welche alle Informationen bezüglich des Patienten und des Objektträgers in einem vordefinierten Format enthält. Dieses Format beinhaltet alle Informationen in Klarschrift und auch in Form einer maschinenlesbaren Datenmatrix.

Frontend

Das Frontend von DTMS-LP ermöglicht die Benutzer-gesteuerte Verwaltung und Generierung von Patienten-spezifischen Etiketten für Objektträger. Die Benutzeroberfläche, dargestellt in Abbildung 14 (a), enthält eine interaktive Tabelle mit einer Übersicht über alle registrierten Patienten. Diese sind unter Angabe der Patienten-ID, der korrespondierenden Diagnose und dem Druckstatus zeilenweise aufgeführt. Weiterhin kann mithilfe des *Remove*-Buttons der Eintrag gelöscht werden. Neben der Patientenübersicht bietet das Hauptmenü die Möglichkeit neue Patienten anzulegen und nach Patienten zu suchen. Ab-

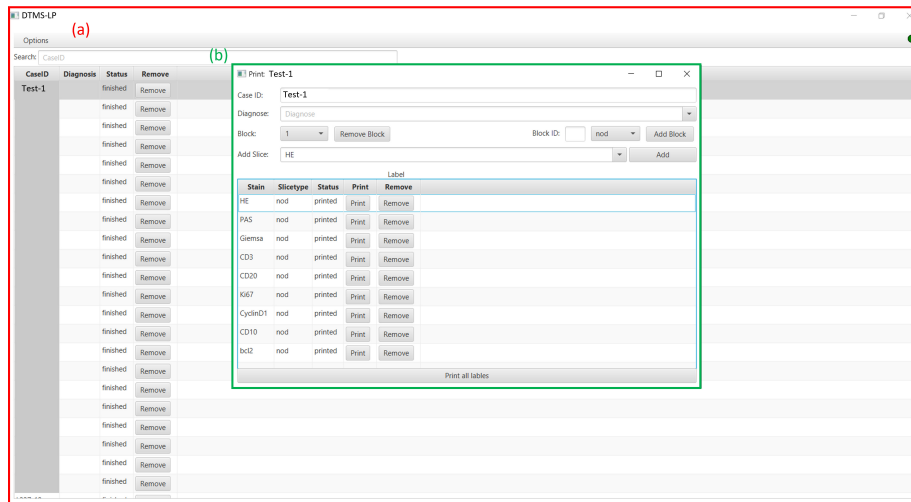


Abbildung 14: Oberfläche der Software DTMS-LP zum Generieren neuer Etiketten für Objektträger. (a) zeigt das Hauptprogramm und eine Übersicht über alle registrierten Patienten. (b) zeigt die Ansicht eines Patienten mit allen obligatorischen und optionalen Informationen, wie auch alle hierzu angelegten Etiketten.

schließend kann der Arbeitsverlauf mithilfe des farbkodierten Informationskreises nachvollzogen werden. Durch einen Doppelklick auf einen Patienten gelangt man in die korrespondierende Patientenansicht. Diese bietet eine Übersicht über gespeicherte obligatorische und optionale Metadaten. Weiterhin können alle registrierten Etiketten blockweise eingesehen werden. Die Ansicht bietet weiterhin die Möglichkeit, Gewebelöcke neu zu registrieren oder aber zu löschen. Pro registriertem Gewebelöcke können abschließend Etiketten ergänzt, editiert, reduziert und gedruckt werden.

4.3 Feature analysis in tissue histomorphometry

Die so geschaffenen technischen Voraussetzungen ermöglichen den Aufbau und die Verwaltung einer digitalen Gewebedatenbank, die anschließend hinsichtlich Diagnose-spezifischer digital-pathologischer Muster untersucht werden kann. Zur Analyse der digitalisierten Gewebeproben sollte eine individuelle und erweiterbare Softwarelösung geschaffen werden, die medizinische (Bild-) Daten einlesen und verarbeiten kann. Diesen Funktionsumfang bildet die Software *FAITH* ab. *FAITH* ist eine Adaption und Weiterentwicklung der im Arbeitskreis *Molekulare Bioinformatik* der Goethe-Universität Frankfurt, geleitet durch Prof. Dr. Ina Koch, entwickelten Software *Impro* [102, 103, 58, 104]. Im Rahmen der Reimplementierung der Software *Impro* wurde ein vollständiges Redesign und Refactoring vorgenommen. Dies geschah initial in Kooperation mit Herrn Henrik Gollek im Rahmen eines Forschungspraktikums [105]. Im Fokus der Reim-

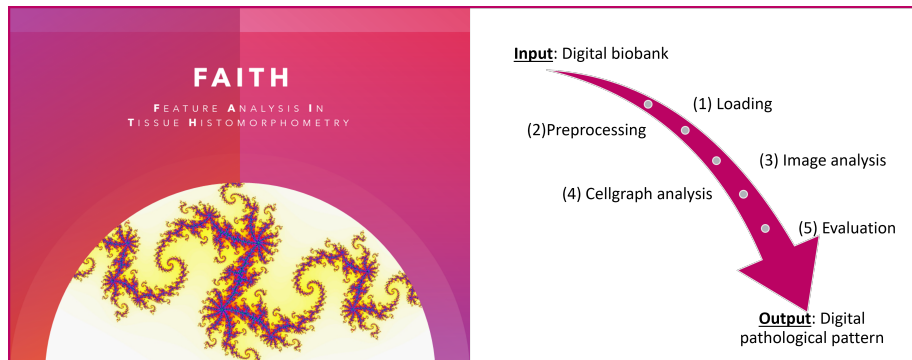


Abbildung 15: *FAITH*. *FAITH* ist eine Softwarelösung zur Analyse von digitalisierten, histopathologischen Gewebeproben. Die Software hat einen Plug-in-basierten Aufbau. Das Kernprogramm ermöglicht das Laden und den Zugriff auf WSI. Weiterhin werden im Funktionsumfang von *FAITH* 1.0 Plug-ins für die Bildanalyse, die Zellgraphanalyse und die Evaluation der zuvor ermittelten Eigenschaften zur Verfügung gestellt. Zusehen ist hier das Logo und der Funktionsumfang der Software *FAITH*.

plementierung stand hierbei die Portierung der Software von *Java* zu *Python* und die Entkopplung des Hauptprogramms von Plug-in-basierten Programm-erweiterungen. Die Codeportierung von *Java* zu *Python* diente der Erweiterung des Umfangs zur Verfügung stehender Programmbibliotheken zur Bildverarbeitung und Datenevaluation, im Speziellen aus dem Bereich der Datenanalyse. Die Entkopplung des Hauptprogramms und der Plug-ins, sowie das Redesign der Schnittstellen diente der Vereinfachung der unabhängigen Neuentwicklung weiterer Programm-erweiterungen. Im Folgenden wird das Design und der Funktionsumfang des Kernprogramms von *FAITH* vorgestellt. Auch werden derzeit verfügbare Plug-ins beschrieben. Die zur Verwendung von *FAITH* obligatorisch zu installierenden Programmpakete sind in Tabelle 1 aufgeführt.

4.3.1 Hauptprogramm

Das Hauptprogramm dient vorwiegend dem Ausführen einer vordefinierten Pipeline zur Analyse und Evaluation medizinischer (Bild-) Daten, dargestellt in Abbildung 15. Diese Pipeline, sowie assoziierte Parameter kann in einer *FAITH*-spezifischen Konfigurationsdatei definiert werden, beschrieben in den Tabellen 5 und 6. Eine Pipeline enthält eine Auswahl der zur Verfügung gestellten Plug-ins. Diese Pipeline wird durch den *Executor* des Hauptprogramms ausgeführt.

Der *Executor* übernimmt im Rahmen der Datenanalyse den Datenimport, die Datenverwaltung und die sequentielle Ausführung der vordefinierten Plug-ins. Der Datenimport der Bilddaten wird hierbei mithilfe des Programmpaketes *python-bioformats* bewerkstelligt [106]. Zunächst werden im Rahmen des Imports Fall-

und Bild-spezifische Metadaten geladen. Dies geschieht durch den Programm-internen *Datahandler*. Dieser parst die durch DTMS anonymisierten Bildpfade und generiert ein *Faith-image*. Im Weiteren werden Bildinformationen in Form von *Accessed images* zugänglich gemacht. Diese *Accessed images* können anschließend durch die sequentielle Ausführung von Bildanalyse-, Graphanalyse- und Datenanalyse-Plug-ins durch den *Executor* ausgewertet werden. Die Daten- und Ergebnisverwaltung wird während des Programmdurchlaufs durch die *FAITH*-interne, lokale, temporäre Datenbank bewerkstelligt. Diese setzt sich im Kern aus diversen *pandas Dataframes* zusammen, die einen effizienten Daten-zugriff und eine effiziente Evaluation der Daten ermöglichen. Das *Application Programming Interface* (API) der Datenbank ist im *Singleton*-Design gestaltet, sodass im Rahmen des Programmaufrufs ein universeller Zugriff zur Laufzeit ermöglicht wird, ohne die Integrität der Daten zu gefährden. Diese Datenbank kann auch im *Excel*- und *Pickle*-Format gespeichert und geladen werden. Neben diesen obligatorischen Funktionalitäten des *Executors* und der Datenbank stellt das Hauptprogramm diverse Funktionalitäten zur Bild- und Datenverarbeitung zur Verfügung, die im Folgenden beschrieben werden.

Gewebeerkennung

Medizinische Bilddaten, speziell WSI von gescannten Gewebeproben auf Objekt-trägern, weisen oftmals einen hohen Prozentsatz irrelevanter Hintergrundpixel auf. Hintergrundpixel sind hier als nicht Gewebepixel definiert. Um eine effiziente Verarbeitung der Gewebeproben zu gewährleisten, sollen im Rahmen der Bildanalyse ausschließlich Gewebepixel betrachtet werden. Hierzu muss vorhandenes Gewebe innerhalb der WSI erkannt und maskiert werden.

Für die Detektion des Gewebes wird zunächst das Bild in der gewünschten Auflösung als RGB-Bild durch den *Executor* geladen und in ein 8-Bit-Graustufenbild umgewandelt. Auf Basis des Graustufenbildes wird anschließend ein multiples Otsu-Verfahren mit drei Klassen zur Diskriminierung von Gewebepixeln eingesetzt, beschrieben in Abschnitt 3.4.1. Pixel mit einer niedrigen Intensität definieren Pixel des Objektträgers. Pixel mit einer mittleren Intensität repräsentieren in diesem Kontext die Klasse der unspezifischen Färbung. Pixel, welche hohe Intensitäten aufweisen, repräsentieren hier Gewebepixel. So können Klasse 1 und 2, demnach Pixel mit niedrigen und mittleren Intensitäten, als Hintergrundpixel definiert werden und Klasse 3 als Vordergrundpixel. Die Definition der Klassen wurde manuell evaluiert. Im darauf folgenden Prozess wird das Graustufenbild gekachelt und anhand der Durchschnittsintensität und des zuvor ermittelten Schwellenwerts für Vordergrundpixel klassifiziert. Diese Kacheln werden anschließend reaggregiert, sodass sich eine binäre Maskierung des Gewebes ergibt. Für die Rauschunterdrückung werden abschließend Objekte mit einer Fläche kleiner ein Prozent des Gesamtbildes eliminiert.

Multiprocessing

Aufgrund der Größe medizinischer Bilddaten ist das effiziente Laden der Bilddaten in voller Auflösung unabhängig von speziellen Workstations und Groß-

| Parameter | Erklärung |
|---------------------------------|--|
| <i>images</i> | Pfad zu dem Ordner der die zu verarbeitenden Bilder enthält |
| <i>imaris</i> | Angabe, ob Bilddaten oder der Export aus Imaris analysiert werden soll |
| <i>image result storage</i> | Pfad zu einem Ordner zum Abspeichern Bildspezifischer Ergebnisse |
| <i>database</i> | Pfad zu einem Ordner zum Abspeichern Fallspezifischer Ergebnisse |
| <i>tmp</i> | Pfad zu einem Ordner zum Speichern temporärer Ergebnisse |
| <i>debug</i> | Pfad zu einem Ordner zum Debuggen von <i>FAITH</i> |
| <i>annotation</i> | Pfad zu einem Ordner mit Fall-/Bild-spezifischen Annotationen |
| <i>output</i> | Pfad zu einem Ordner zum Abspeichern von Ergebnissen |
| <i>image analysis pipelines</i> | Kommagetrennte Auflistung von auszuführenden Plug-ins zur Bildverarbeitung |
| <i>graph analysis pipelines</i> | Kommagetrennte Auflistung von auszuführenden Plug-ins zur Zellgraphanalyse |
| <i>evaluation pipelines</i> | Kommagetrennte Auflistung von auszuführenden Plug-ins zur Datenanalyse |
| <i>available pipelines</i> | Kommagetrennte Auflistung zur Verfügung stehender Plug-ins |
| <i>cores</i> | Maximale Anzahl verwendbare Prozessorkerne |
| <i>max heap size</i> | Maximale Größe des verwendbaren Arbeitsspeichers |
| <i>tile size</i> | Kachelgröße zu verarbeitender Teilbilder im Rahmen des <i>Multiprocessings</i> |
| <i>overlap</i> | Überlapp zu verarbeitender Teilbilder im Rahmen des <i>Multiprocessings</i> |
| <i>ndpi</i> | Dimensionsangabe des Bildformats |
| <i>svs</i> | Dimensionsangabe des Bildformats |
| <i>lif</i> | Dimensionsangabe des Bildformats |
| <i>CD30 cellsize</i> | Minimale und maximale Größe in Pixel CD30-positiver Zellen |

Tabelle 5: Übersichtstabelle über Parameter der *FAITH*-spezifischen Konfigurationsdatei des Hauptprogramms.

rechnern nicht möglich. Da der strukturelle Kontext für bestimmte Aufgabenbereiche, wie beispielsweise der Zellerkennung, auch nicht zwingend erforderlich ist, konnte eine Parallelisierung durch die partielle Kachelung des Bildes erreicht werden. Die Kachelung erfolgt hierbei mit in der Konfigurationsdatei individu-

| Parameter | Erklärung |
|------------------------------|--|
| <i>Plugin-version</i> | Versionsnummer des registrierten Plug-ins |
| <i>Plugin-type</i> | Typ des Plug-ins |
| <i>Plugin-result type</i> | Spezifikation des Ergebnisses |
| <i>Plugin-postprocessing</i> | Mögliche Postprocessing Plug-ins, die mit diesem Plug-in assoziiert sind |

Tabelle 6: Übersichtstabelle über Parameter der *FAITH*-spezifischen Konfigurationsdatei zur Registrierung von Plug-ins.

ell anpassbaren Parametern für Kachelgröße und Überlapp. Weiterhin können unter Einbeziehung der Gewebeerkennung irrelevante Kacheln, hier definiert als Kacheln, die ausschließlich Hintergrundpixel enthalten, von der Verarbeitung ausgeschlossen werden. Die Plug-ins zur Bildanalyse können abschließend parallel auf die einzelnen Kacheln angewendet werden.

Color deconvolution

Die digitale Gewebedatenbank enthält zweidimensionale, medizinische Bilddaten, welche klassischerweise im RGB-Format vorliegen. Im Rahmen der immunhistologischen Präprozessierung der Gewebeproben wurden meist Zellkerne durch Einsatz von Hämatoxilin visualisiert. Zusätzlich wurde je eine weitere Zellentität mithilfe von Neufuchsin gefärbt. Für diverse Anwendung ist eine Trennung des Hämatoxilin- und Neufuchsin-Kanals essenziell.

Hierbei stellt sich der Hämatoxilin-Kanal als bläuliche Färbung und der Neufuchsin-Kanal als rötliche Färbung dar. Zur Trennung der Farbkanäle wurden zunächst die spezifischen Farbvektoren von Hämatoxilin und Neufuchsin manuell mithilfe des *color deconvolution*-Plug-ins der Open-Source-Plattform *Fiji* bestimmt [51, 86]. Anschließend wird ein eventuell vorhandener Transparenzkanal des RGB(A)-Bildes entfernt. Mithilfe der invers geladenen Farbvektoren wird nun das hieraus resultierende RGB-Bild in drei Farbkanäle separiert. Hierbei enthält Kanal 1 Bildinformationen der Neufuchsin-Färbung und Kanal 2 die Bildinformationen der Hämatoxilin-Färbung. Kanal 3 enthält die Information über mögliche Rest- und Artefakt-Färbung. Durch die manuelle Extraktion und die unvollständige Generalisierung der approximierten Farbvektoren entstehen nicht optimale Darstellungen der einzelnen Farbkanäle. Dies macht eine Postprozessierung der Farbkanäle unumgänglich. Im Rahmen der Postprozessierung wird zunächst eine logarithmische Kontrastverstärkung vorgenommen, siehe Abschnitt 3.4.1. Dieser Effekt wird durch die Durchführung einer Intensitätsspreizung verstärkt. Abschließend werden unspezifische Pixel unter Anwendung eines multiplen Otsu-Schwellenwertverfahrens entfernt.

4.3.2 Plug-ins

FAITH enthält drei Schnittstellen zur Integration von Plug-ins. Diese umfassen Schnittstellen zur Integration von Plug-ins zur Bildverarbeitung, Zellgraphanalyse und Datenanalyse. Weiterhin können Postprozessierungs-Plug-ins integriert werden. Für die Integration eines Plug-ins müssen diese mit *FAITH*-spezifischen Parametern in der Konfigurationsdatei registriert werden, siehe Tabelle 6. Derzeit umfasst die Bibliothek drei Plug-ins zur Bildverarbeitung, ein Plug-in zur Zellgraphanalyse, zwei Plug-ins zum Thema Datenanalyse und zwei Postprozessierungs-Plug-ins. Im Folgenden wird die Funktionalität der Analyse-Plug-ins, exklusive der Postprozessierungs-Plug-ins und die korrespondierende Laufzeit beschrieben. Die Laufzeit bezieht sich auf die singuläre Ausführung des Plug-ins inklusive Laden des Bildes, der Ausführung des Plug-ins, sowie Postprozessierung und Speicherung der Ergebnisse. Für die Evaluation der Laufzeit wurde die in Abschnitt 3.5 beschriebene mobile Workstation in Kombination mit einer mittels *Universal Serial Bus (USB)-3.0* Port verbundenen externen Festplatte des Typs *Seagate Backup Plus Hub* von 2018 eingesetzt.

Tissueanalysis

Das Plug-in *tissueanalysis* dient der Berechnung des prozentualen Anteils immunhistologischer Neufuchsin-Färbung in Bezug auf die gesamte Gewebeprobe. Hierzu wird zunächst eine Gewebeerkenkung mithilfe des Hauptprogramms durchgeführt. Auf Basis dessen kann die Größe der vorliegenden Gewebeprobe berechnet werden. Darauf folgend wird eine *color deconvolution* durchgeführt, um die gewünschten Primärpixel zu separieren und zu extrahieren. Abschließend können die so berechneten Primärpixel in das Verhältnis zur Größe der Gewebeprobe gesetzt werden. Hierfür beträgt die Laufzeit im Durchschnitt ca. 47 Sekunden pro Bild.

Cell detection

Das Plug-in *cell detection* segmentiert und detektiert Zellobjekte in WSI und berechnet diverse morphologische Deskriptoren pro Objekt. Für die Segmentierung der Zellobjekte findet zunächst eine *color deconvolution* statt. Anschließend wird zunächst der Primärkanal binarisiert. Der binarisierte Primärkanal wird nun in fünf Iterationen jeweils dilatiert und erodiert. Abschließend werden vollständig von Primärpixeln umschlossene Hohlräume invertiert. Die so binarisierten und segmentierten Zellobjekte können anschließend als Zusammenhangskomponenten, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, detektiert werden. Ebenso werden für die detektierten Zellobjekte die in Tabelle 7 beschriebenen morphologischen Deskriptoren berechnet. Die Laufzeit des Plug-ins beläuft sich auf durchschnittlich 554 Sekunden pro WSI.

Follicle detection

Das Plug-in *follicle detection* ermöglicht die Detektion von Lymphfollikeln in Aktin-gefärbten histologischen Bilddaten, beschrieben durch Wurzel et al. (2020) [107]. Lymphfollikel stellen sich als ovale, ungefärbte Objekte in Aktin-gefärbten,

| Parameter | Beschreibung | Ursprung |
|-----------------|--|---|
| X | Globale X-Koordinate des Mittelpunkts der Zelle | X + X-Koordinate des Bildursprungs |
| Y | Globale Y-Koordinate des Mittelpunkts der Zelle | Y + Y-Koordinate des Bildursprungs |
| Area | Fläche der Zelle in Pixel | scikit-image 0.19.3 |
| Orientation | Winkel der längsten Achse der Ellipse, die dieselben sekundären Momente aufweist wie die Zelle | scikit-image 0.19.3 |
| Circumference | Umfang der Zelle | Summe der Distanzen berechnet durch eine euklidische Distanz-Transformation |
| Perimeter | Umfang der Zelle | scikit-image 0.19.3 |
| Roundness | Rundheit der Zelle (0–1,1 = Rund) | $(4 \cdot \pi \cdot \text{Area}) / \text{Circumference}$ |
| Eccentricity | Exzentrizität der Zelle | scikit-image 0.19.3 |
| Solidity | Solidität der Zelle | scikit-image 0.19.3 |
| Majoraxislength | Längste Achse der Ellipse, die dieselben sekundären Momente hat wie die Zelle | scikit-image 0.19.3 |
| Intensitymean | Durchschnittsintensität der Primärfärbung innerhalb der Zelle | scikit-image 0.19.3 |

Tabelle 7: Parameter zur morphologischen Charakterisierung detektierter Zellobjekte mithilfe des Programms *celldetection* der Software *FAITH*.

histologischen Gewebeproben dar. Zur Detektion der Follikel werden gemittelte Intensitätsprofile mithilfe eines *Shock filters* vorverarbeitet. Der Einsatz des *Shock filters* induziert einen abrupten Abfall der Intensität an fluiden Übergängen des Interfollikularbereichs in einen Lymphfollikel. Durch einen eigens entwickelten Clustering-Algorithmus können anschließend detektierte Bruchpunkte innerhalb der Intensitätsprofile geometrisch gruppiert werden [107]. Auf Basis der gruppierten Randpunkte kann abschließend die Lymphfollikelmorphologie durch die Berechnung der konvexen Hülle der Randpunktgruppen approximiert wer-

den.

Save image

Das Plug-in *save image* dient dazu, medizinische Bilddaten in gebräuchliche Dateiformate zu konvertieren und zu speichern. Hierzu wird das Bild geladen und in der gewünschten Auflösung gespeichert. Weiterhin ermöglicht das Plug-in detektierte Zellobjekte zu visualisieren. Die Laufzeit des Plug-ins hängt hierbei stark von der gewünschten Auflösung und der optionalen Visualisierung der Zellobjekte ab. Wählt man eine Auflösung von 1200 dpi bei gleichzeitiger Visualisierung der detektierten Zellen, erhält man eine durchschnittliche Laufzeit von 16 Sekunden pro Bild.

Cellgraph analysis

Das Plug-in *cellgraph analysis* ermöglicht die graphentheoretische Charakterisierung detektierter Zellobjekte. Hierzu werden Zellgraphen, beschrieben in Abschnitt 3.3.1, auf Basis der detektierten Zellpositionen berechnet. Als Schwellenwert für die Initialisierung der Kanten des Zellgraphen wurde der 2-fache mediane Durchmesser eines Zellobjekts innerhalb eines Bildes definiert. Für eine genauere Approximation möglicher Zellkontakte wurde das deterministische Verfahren um ein probabilistisches Waxmann-Modell, beschrieben in Abschnitt 3.3.1, ergänzt. Dies wurde vorgenommen, da eine räumliche Nähe zwischen zwei Zellen nicht zwingend einen intrazellulären Kontakt impliziert, sondern nur die Wahrscheinlichkeit für einen Zellkontakt erhöht. Die Wahrscheinlichkeit für die Interaktion zwischen zwei Zellen bemisst sich jedoch nicht nur an der räumlichen Entfernung. Vielmehr ist die Wahrscheinlichkeit für eine solche direkte Interaktion auch von der Anzahl der Zellen abhängig, die sich zwischen den zu untersuchenden Zellen befinden. Um dies in dem Wahrscheinlichkeitsmodell abzubilden, wurde eine Adaption des Modells nach Waxmann vorgenommen. Hierzu wurde die intrazelluläre, quadratische Fläche zwischen den Zellen bestimmt und die hierin enthaltene Zellanzahl ermittelt. Mithilfe dieser Summe blockierender Zellen wird die Wahrscheinlichkeit nach Waxmann wie folgt adaptiert:

$$P^*(u, v) = P(u, v) * \left(\frac{1}{5}\right)^n \quad (7)$$

$P(u, v)$ ist hierbei die Wahrscheinlichkeit für einen Zellkontakt zwischen zwei Zellen u und v nach Waxmann (siehe Material und Methoden, Abschnitt 3.3.1 „Zellgraphen“) und n die Anzahl detektierter Zellen im intrazellulären Raum. Unter Anwendung einer der drei Definitionen für einen Zellkontakt werden anschließend in einem *sliding window*-Ansatz iterativ potenzielle Zellkontakte detektiert und als Kante E innerhalb des Zellgraphen $Z(N, E)$ initiiert. Zur Charakterisierung der Zellgraphen werden abschließend die in Tabelle 8 beschriebenen Graphparameter berechnet. Die Laufzeit der Zellgraphanalyse belief sich mit der deterministischen Definition von Zellkontakten auf durchschnittlich 8 Sekunden pro Zellgraph.

| Parameter | Beschreibung | Ursprung/Formel |
|--------------------------------|---|--|
| Average local graph efficiency | Die multiplikative inverse kürzeste Distanz einer Zelle zu jeder anderen Zelle im Teilgraphen | networkx 2.6.3 |
| Percentage of isolated points | Anteil von Zellen ohne Kante am Gesamtgraphen | $\frac{\text{number of isolates}}{\text{number of cells}}$ |
| Average degree | Durchschnittliche Anzahl von Kontakten einer Zelle | $\frac{\sum \text{degree of each cell}}{\text{number of cells}}$ |
| Average clustering coefficient | Der durchschnittliche Clustering-Koeffizient einer Zelle | networkx 2.6.3 |
| Transitivity | Die Transitivität des Zellgraphen | networkx 2.6.3 |
| Degree assortativity | Präferenz zur Gruppierung ähnlich vernetzter Zellen | networkx 2.6.3 |

Tabelle 8: Parameter zur Charakterisierung der zellulären Distribution und Organisation mittels Zellgraphen, mithilfe des Plug-ins *cellgraphanalysis* der Software *FAITH*.

Inspect data

Das Plug-in *inspect data* dient der statistischen Untersuchung diagnostischer Entitäten. Für die Untersuchung hinsichtlich signifikant unterschiedlicher Eigenschaften wird der *Dunn's-Test* eingesetzt [69, 108]. Auch werden alle Eigenschaften der diagnostischen Entitäten in Form von Boxplots visualisiert. Die Laufzeit der statistischen Analyse beträgt weniger als eine Sekunde.

Feature selection

Im Rahmen der Doktorarbeit sollten verschiedene entitätsspezifische digital-pathologische Profile entwickelt werden. Hierfür wurde das Plug-in *feature selection* entwickelt. Für die Evaluation einzelner digital-pathologischer Parameter wurde ein semi-automatisches Verfahren implementiert. Dieses setzt sich aus der semi-automatischen Parameterevaluation mithilfe eines hierarchischen Clusterverfahrens und einer darauffolgenden Parameterselektion durch den Einsatz eines *Random Forest*-Klassifikators zusammen. Auf Basis eines zu analysierenden Datensatzes wird hierfür zunächst der Korrelationskoeffizient nach Pearson für jedwede Parameterkombination berechnet. Anschließend werden die Parameter hinsichtlich ihrer Korrelation hierarchisch geclustert. Für jeden Cluster wird daraufhin ein repräsentativer Parameter manuell ausgewählt. Die hieraus resultierende Parametermenge wird nun verwendet, um einen *Random forest*-Klassifikator zu trainieren. Auf Basis dieses Klassifikators wird abschließend die MDI-basierte *Feature importance* eines jeden Parameters ermittelt. Die bis zu zehn besten Parameter werden abschließend als digital-pathologisches Profil definiert.

Classification

Das Plug-in *classification* dient einer ersten Einschätzung der diskriminativen Potenz berechneter Parameter, unter Anwendung eines überwachten Klassifikators. Zur Auswahl stehen hierfür der *Random Forest*-Klassifikator, der *Bagged Decision Tree*-Klassifikator und der Entscheidungsbaum-Klassifikator. Für die jeweilige Untersuchung wird ein *Stratified K-fold split* angewendet. In diesem Fall werden zehn Test- und Trainingsmengen mit konstantem Intra-Klassen-Verhältnis generiert. Auf Basis der Trainingsdatensätze wird anschließend ein Klassifikator trainiert und mithilfe des Trainingsdatensatzes evaluiert. Hierzu wird eine gemittelte Konfusionsmatrix erstellt, wie auch der durchschnittliche *balanced-accuracy*-Score und dessen Standardabweichung berechnet. Der *balanced-accuracy score* ist hierbei die gemittelte Sensitivität des Klassifikators über alle Klassen.

Clustering

Das Plug-in *clustering* dient der Einschätzung der Ähnlichkeit einzelner Fälle innerhalb und über diagnostische Entitäten hinweg. Auch soll das Auffinden neuer diagnostischer Sub-Entitäten durch das digital-pathologische Clustern der Fälle ermöglicht werden. Hierfür wurden die in Abschnitt 3.4.3 beschriebenen Clustering-Algorithmen des hierarchischen Clusterings, *k-Means*-Clustering und DBSCAN mithilfe der Open-Source-Software *scikit-learn* implementiert. Anschließend wird mittels Hauptkomponentenanalyse das digital-pathologische Profil der Fälle in einen zweidimensionalen Raum projiziert. Die reduzierten digital-pathologischen Profile werden anschließend fallweise geplottet und die ermittelten Cluster innerhalb des Plots Form-kodiert und die bestehenden Diagnosen farbkodiert dargestellt.

5 Ergebnisse: Die digital-pathologische Charakterisierung reaktiver und neoplastischer Lymphknoten

Das Ziel dieser Doktorarbeit besteht in der digital-pathologischen Charakterisierung reaktiver und neoplastischer sekundärer lymphatischer Organe. Hierfür wurden Teilprojekte definiert, benötigte Datensätze zusammengetragen und teils in Kooperation mit Doktoranden der (Zahn-) Medizin durchgeführt. Diese werden im Folgenden motiviert, beschrieben und diskutiert.

5.1 Projektdesign



Abbildung 16: Projektdesign. Aufgezeigt ist ein Projektzyklus und korrespondierende Methoden und Verantwortlichkeiten für die Bearbeitung interdisziplinärer Fragestellungen.

Für eine umfassende Beantwortung der Fragestellungen wurden einzelne Teilprojekte, im speziellen Projekte auf Basis dreidimensionaler Bilddaten, in Kooperation mit Doktoranden der (Zahn-) Medizin bearbeitet. Dies war essenziell, um die generierten und analysierten Bilddaten im medizinischen Kontext bestmöglich beurteilen zu können. Für eine effektive Bearbeitung der Fragestellung und eine bestmögliche interdisziplinäre Kooperation wurden einzelne Arbeitspaketen und Verantwortlichkeiten in enger Zusammenarbeit aller Projektbeteiligten entwickelt und definiert, dargestellt in Abbildung 16. Ebenso wurden Projektverantwortliche für jedes Teilprojekt benannt, aufgeführt in Tabelle 9.

Vorbereitung und Datengenerierung

Betrachtet man nun einen Projektzyklus nach der Definition der Fragestellung, so beginnt dies stets mit einer umfassenden Literaturrecherche durch den Projektverantwortlichen. Darauf folgend wurden durch den Projektverantwortlichen alle, für das Projekt benötigten Bilddaten mithilfe der Software DTMS zusammengetragen und anonymisiert exportiert, siehe Abschnitt 4.1. Nun galt es, Eigenschaften der medizinischen Bilddaten digital-pathologisch zu parametrisieren. Dies wurde durch den Projektverantwortlichen unter Verwendung der

| Projekt | Projektverantwortung | Kapitel |
|--|--|----------------|
| Digital-pathologische Charakterisierung des Keimzentrums | Constantin Maximilian Schemel | 5.2.1 |
| Die strukturelle Integrität des Keimzentrums | Dr. Miguel Thomos | 5.2.2 |
| Verlust der strukturellen Integrität des Lymphknotens durch die Tumorgenese-induzierte Modulation fibroblastischer Retikulumzellen | Dr. Marvin Oswald | 5.3.1 |
| Verlust der strukturellen Integrität des Keimzentrums in einem angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphom | Dr. Miguel Thomos | 5.3.2 |
| Veränderung der CD20-Expression in neoplastischen B-Zellen | Nicole Dehnfeld | 5.4.1 |
| Pathologische Veränderungen tumorassoziierter Makrophagen durch die Tumorgenese | Aleksandar Vladislavljevic | 5.4.2 |
| Die Morphologie der Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle | Dr. Julia Liebers (3D) und Patrick Wurzel (2D) | 5.5.1 |
| Das Konnektom der Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle | Dr. Julia Liebers (CD30-CD30-Netzwerke) und Dr. Lukas Lumer (CD30-TME-Netzwerke) | 5.5.2 |
| Die Tumormikroumgebung der Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle | Aleksandar Vladislavljevic (3D) und Patrick Wurzel (2D) | 5.5.3 |
| Die diagnostische Potenz digital-pathologischer Eigenschaften | Patrick Wurzel | 5.5.4 |

Tabelle 9: Projektverantwortlichkeiten. Dargestellt sind die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten, interdisziplinären Teilprojekte und die jeweiligen Projektverantwortlichen.

Softwarelösungen *Imaris*, *FAITH*, *VIA* und *Fiji*, beschrieben in den Abschnitten 3.6.3, 4.3, 3.6.2 und 3.6.1, vorgenommen. Die Parametrisierung erfolgte (semi-) automatisch, teils aber auch manuell, und resultierte stets in einer tabellarischen Beschreibung der Bilddaten.

Datenanalyse

Für eine Weiterverarbeitung der tabellarischen Daten mussten diese neu formatiert und validiert werden. Hierzu wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit individuelle Softwarelösungen in Form von Python 3.6-basierten Pipelines für das Data engineering geschaffen. Dies ermöglichte eine anschließende Datenana-

lyse mit Methoden des Data science. Auch hierfür wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit individuelle Softwarelösungen auf Basis von Python 3.6-basierten Pipelines implementiert. Diese umfassten zunächst Methoden zur Visualisierung der Daten. Weiterhin fand eine statistische Beurteilung der Daten statt. Abschließend wurden zusätzlich zur Analyse möglicher Korrelationen nach Pearson auch Methoden des überwachten und unüberwachten Lernens, sowie korrespondierende Validierungstechniken eingesetzt. Diese dienen der Suche nach Zusammenhängen und Mustern innerhalb der Daten. Hierfür wurden verschiedene Clustering-Verfahren und Klassifikatoren des maschinellen Lernens verwendet. Alle angewandten Python-Bibliotheken sind in Kapitel 3.6.4 aufgeführt.

Interpretation und Diskussion

Die final vorliegenden digital-pathologischen Ergebnisse wurden in Kooperation aller Projektbeteiligten im medizinischen Kontext der vorliegenden Gewebeprobe diskutiert und interpretiert. Weiterhin wurden morphologische und distributionale Veränderungen hinsichtlich bekannter funktioneller Aberrationen evaluiert.

5.2 Digital-pathologische Charakterisierung reaktiver Lymphknoten

Um neoplastische Veränderungen detektieren und definieren zu können, ist eine hinreichende Charakterisierung reaktiver lymphoider Organe als Goldstandard unerlässlich. Hierbei ist zu beachten, dass die Definition des Goldstandards auf inflammatorischen lymphoiden Gewebeprobe beruht. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass innerhalb der zu untersuchenden Gewebeprobe eine Immunreaktion lokalisiert ist oder war. Diese bedingt pathophysiologische Veränderungen innerhalb des Lymphknotens, beschrieben in Abschnitt 2.2. Eine der weitreichendsten Veränderung bezieht sich hierbei auf die potenzielle Bildung sekundärer Lymphfollikel im Rahmen der MHC-II-vermittelten Immunreaktion. Die strukturelle und zytologische Charakterisierung dieses Kompartiments ist Inhalt dieses Kapitels.

5.2.1 Digital-pathologische Charakterisierung des Keimzentrums

Im Rahmen einer MHC-II-vermittelten Immunreaktion kommt es zu einer Einwanderung eines B-Zell-T-Zell-Antigen-Komplexes in einen Primärfollikel. Dies resultiert in der Differenzierung des Primärfollikels zu einem sekundären Follikel. Hierbei findet durch zelluläre Proliferations-, Expansions- und Reorganisationsprozesse eine Polarisierung und Kompartimentalisierung, wie auch ein Wachstum des Follikels statt. Der sekundäre Follikel lässt sich in eine Mantelzone und in ein Keimzentrum unterteilen. Das Keimzentrum kann in eine helle und dunkle Zone untergliedert werden. Diese Kompartimentalisierung spiegelt sich auch in einer heterogenen Zellverteilung wider. Innerhalb der Mantelzone sind vorwiegend Mantelzellen lokalisiert, welche von einem Netzwerk aus FRC durchzogen sind. Die helle Zone des Keimzentrums setzt sich vorwiegend

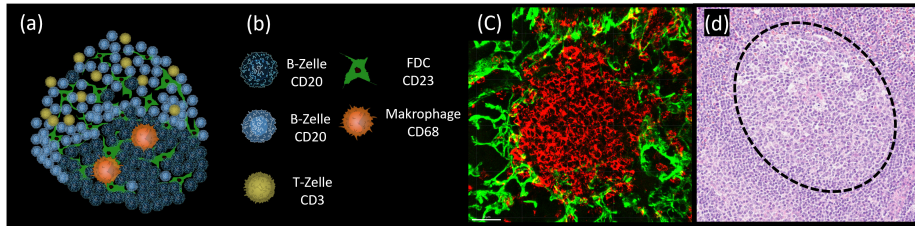


Abbildung 17: Digital-pathologische Charakterisierung des Keimzentrums. (a): Schematische Darstellung eines Keimzentrums. (b): Schematische Darstellung untersuchter Zelltypen. (c): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines reaktiven Keimzentrums. Rot sind CD20-positive B-Zellen eingefärbt. Grün sind α -Aktin-positive fibroblastische Retikulumzellen eingefärbt. (d): Darstellung eines Keimzentrums in einem Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Dünnschnitt.

aus Zentrozyten, FDC und TFH-Zellen zusammen. Die dunkle Zone hingegen ist vorwiegend durch das Auftreten von Zentroblasten, FDC, TFH-Zellen und Sternhimmelmakrophagen charakterisiert.

Die Kompartimentalisierung und damit die heterogene Komposition einzelner Zelltypen in den Kompartimenten, dargestellt in Abbildung 17, ist essenziell für die Funktionalität des Keimzentrums. Im Rahmen dieses Projekts soll die zelluläre Komposition des Keimzentrums quantitativ evaluiert werden. Auch soll untersucht werden, wie sich das zelluläre Gleichgewicht durch den Wachstumsprozess der sekundären Follikel verändert. Hierfür sollte zunächst die Größenverteilung der Keimzentren innerhalb einer Gewebeprobe und über Gewebeproben hinweg bestimmt werden.

Um diese zu ermitteln, wurden zunächst HE-gefärbte Gewebeproben (Gewebeproben: 17, Fälle: 11) verschiedener Fälle mit vorliegender Lymphadenitis digitalisiert. Die hieraus resultierenden zweidimensionalen WSI wurden anschließend mit einer Auflösung von $3,96\mu m$ pro Pixel mithilfe von *FAITH* exportiert. Auf Basis der exportierten WSI konnten nun einzelne Keimzentren ($n = 1012$) in den Gewebeproben mithilfe von *VIA* annotiert werden, siehe Kapitel 3.6.2. Abschließend wurden die annotierten Keimzentren analysiert. Hierfür wurden auf Basis der Annotationen binäre Masken der Follikel erstellt, detektiert und anschließend vermessen. Die Keimzentren wiesen hierbei eine durchschnittliche Fläche von $0.1\mu m^2$ auf. Darüber hinaus wurde für eine verbesserte Vergleichbarkeit die durchschnittliche Ausdehnung der Keimzentren ermittelt. Hierzu wurde die Keimzentren mithilfe approximierter Ellipsen modelliert. Diese Ellipsen wiesen im Durchschnitt eine Ausdehnung von $349\mu m$ in ihrer längsten Achse und $239\mu m$ in ihrer kürzesten Achse auf.

Für die anschließende Bestimmung der zellulären Komposition sollten Keimzentren ($n = 73$) in dreidimensionalen Fluoreszenzaufnahmen von Gewebeproben

in Fällen mit Lymphadenitis ($n = 7$) untersucht werden. Diese Gewebeproben waren jeweils gegen DAPI und CD23 zur Definition der Keimzentren und einem weiteren Antikörper zur Visualisierung einer distinkten Zellpopulation gefärbt. Diese Zellpopulationen umfassten M1-Makrophagen (CD68), B-Zellen (CD20) und T-Zellen (CD3). Zur Bestimmung der Zellvolumina wurde zunächst das Keimzentrum kubisch als *Region of interest* (ROI) auf Basis der CD23 Verteilung approximiert. Anschließend wurde mithilfe des Programms *create surface* der Software Imaris die Zellpopulation innerhalb der ROI detektiert und dessen Anteil an der ROI bestimmt. Hieraus resultieren die in Tabelle 10 präsentierten Werte. T-Zellen wiesen den höchsten Anteil am Keimzentrum auf, gefolgt von B-Zellen, FDC und Makrophagen. In Summe konnte ein Anteil von 27,56% der analysierten Zellpopulationen am Keimzentrum ermittelt werden [109]. Darüber

| Zelltyp | Färbung | Prozentualer Anteil | Pearson-Korrelation |
|-------------|---------|---------------------|---------------------|
| T-Zellen | CD3 | 10,95% | 0,918 |
| B-Zellen | CD20 | 9,22% (43,8%) | 0,988 |
| FDC | CD23 | 5,64% | 0,799 |
| Makrophagen | CD68 | 1,75% | 0,462 |
| Gesamt | | 27,56% (62,14%) | |

Tabelle 10: Zelluläre Zusammensetzung des Keimzentrums in Prozent. Weiterhin ist der Korrelationskoeffizient nach Pearson hinsichtlich des prozentualen Anteils in Bezug auf die Keimzentrumsgröße aufgeführt.

hinaus konnte eine mäßige bis nahezu perfekte lineare Korrelation der Zellvolumina und dem approximierten Volumen des Keimzentrums beobachtet werden [109]. Dies impliziert, dass im Zuge des Keimzentrumswachstums das zelluläre Gleichgewicht nahezu konstant bleibt.

Auffällig ist jedoch, dass die hier gemessenen Daten nur einen geringen Anteil des Gesamtvolumens des Keimzentrums beschreiben. was auf einen hohen Anteil extrazellulärer Matrix (EZM) hindeuten könnte. Dies ist jedoch anhand der zuvor untersuchten HE-gefärbten Aufnahmen nicht ersichtlich. Weiterhin wiesen zusätzliche Untersuchungen des B-Zell-Anteils an der hellen und dunklen Zone des Keimzentrums einen erhöhten B-Zell-Anteil in der hellen Zone im Vergleich zur dunklen Zone auf, was den bisherigen, in der Literatur beschriebenen Ergebnissen, ebenfalls entgegensteht. Eine manuelle Untersuchung bestätigte die mit Imaris ermittelten Werte. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass eine membranständige Färbung der B-Zellen durch die dichte Mikroumgebung potenziell nicht zielführend ist. Um dies zu verifizieren, wurden weitere B-Zell-Färbungen unter Einsatz des Kernmarkers Pax5 angefertigt. Auf Basis dieser Daten konnte die erhöhte B-Zell-Dichte in der dunklen Region des Keimzentrums nachgewiesen werden. Für die Messung des korrigierten prozentualen Anteils der B-Zellen am Keimzentrum musste nun jedoch das Volumen des Zellkörpers ausgehend vom Kernvolumen approximiert werden. Hierfür wurde in Aufnahmen von CD20 und Pax5 gefärbten Gewebeproben das Verhältnis des Durchmes-

sers des Zellkerns zum Durchmesser des Zellkörpers manuell bestimmt. Dieses betrug im Durchschnitt 1,853. Abstrahiert man nun den B-Zell-Anteil am Keimzentrum mittels des B-Zellkern-Anteils und dem Verhältnis des Durchmessers von Zellkörper zu Zellkern, so erhält man einen durchschnittlichen B-Zell-Anteil von 43,8%. In Summe beträgt damit der hier durchschnittlich gemessene Anteil der einzelnen Zelltypen am Keimzentrum 62,14%.

5.2.2 Die strukturelle Integrität des Keimzentrums

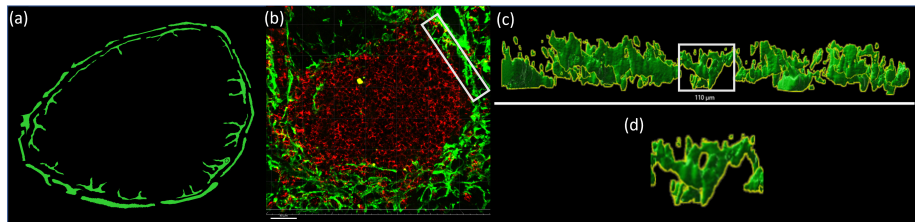


Abbildung 18: Die strukturelle Integrität des Keimzentrums. (a): Schematische Darstellung der Keimzentrums-umgebenden Stützstrukturen. (b): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Keimzentrums in einem reaktiven Lymphknoten. CD20-positive B-Zellen sind rot dargestellt. α -Aktin-positive fibroblastische Retikulumzellen sind grün visualisiert. (c): Vergrößerung des weiß umrandeten Bereichs aus Teilbild (b). In grün werden mithilfe von Imaris berechnete Oberflächen der fibroblastischen Retikulumzellen visualisiert. Es werden Keimzentrums begrenzende Wälle dargestellt. (d): Vergrößerung des weiß umrandeten Bereichs aus Teilbild (c). In grün werden mithilfe von Imaris berechnete Oberflächen der fibroblastischen Retikulumzellen visualisiert. Es werden Öffnungen der Wälle dargestellt.

Eine heterogene Zellverteilung innerhalb eines Keimzentrums ist für die Funktionalität und Effizienz der Keimzentrumsreaktion im Rahmen der humoralen Immunantwort essenziell. Diese ist unter anderem auf eine zellulär kontrollierte, lokale Proliferation, Differenzierung und Verteilung der Zellen zurückzuführen. Auch ist der kontrollierte, intrakompartimentelle Austausch verschiedener Zelltypen unerlässlich. Hierbei steht einerseits die selektive Migration der B-Zell-T-Zell-Antigen-Komplexe in den Primärfollikel, andererseits aber auch die Auswanderung der gebildeten Gedächtnis- und Plasmazellen im Fokus. Diese zelluläre Migration wird unter anderem molekularbiologisch durch Exkretion von Zytokinen selektiert. Betrachtet man diese Prozesse im Kontext weiterer Kompartimente wie den Sinusstrukturen, so kann davon ausgegangen werden, dass neben dem zellulären Einfluss auch eine mechanische Begrenzung des Keimzentrums besteht.

Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden α -Aktin-positive FRC-Netzwerke in direkter Umgebung der Keimzentren manuell evaluiert. Hierbei konnte eine

physische Barriere, im Folgenden als Wall bezeichnet, beobachtet werden, die mit einem massiven Abfall der T-Zell-Konzentration im Übergang zur T-Zone einhergeht [9]. Die erstmals durch Thomos et al. (2020) definierten Wälle unterschieden sich morphologisch eindeutig von den regulären FRC-Netzwerken der T-Zone, dargestellt in Abbildung 18. Wälle zeichnen sich durch breitwandige, abgegrenzte Oberflächen aus. Diese Oberflächen sind stets in Richtung des Follikels ausgerichtet. Auch ist die Ausrichtung der Wälle einheitlich. Innerhalb der T-Zone ist eine Verdichtung der T-Zell-Population entgegen dem Wall zu verzeichnen. Betrachtet man die Wall-Morphologie entlang der Ausdehnung der Follikel, so ist eine zunehmende Fragmentierung der Wälle in Richtung der kortikal verorteten Mantelzone zu verzeichnen. Abschließend weisen die Wälle einzelne Öffnungen innerhalb und zwischen einzelnen Wällen auf.

Diese Wälle, wie auch die Öffnungen wurden anschließend unter Verwendung der Software Imaris vermessen und digital-pathologisch untersucht. Die Vermessung von 78 Wällen in 14 Gewebeproben mit Lymphadenitis ergab hierbei eine durchschnittliche Länge von $98,65 \mu m (\pm 33,26)$ bei einer durchschnittlichen Dicke von $1,925 \mu m (\pm 0,56)$. Die Vermessung der Öffnung auf Basis von 11 analysierten Bildern und 61 darin enthaltenen Strukturen ergab eine Breite von $5,88 \mu m (\pm 1,965)$. Um diese Öffnungen klar von den perifollikularen Sinusstrukturen abzugrenzen, wurden daran anschließend 44 sinusoide Strukturen vermessen. Diese zeigten einen durchschnittlichen Durchmesser von $12,8 \mu m (\pm 5,59)$. So konnte gezeigt werden, dass die Öffnungen in und zwischen FRC-Wällen klar von perifollikularen Sinusstrukturen abzugrenzen sind.

5.3 Digital-pathologische Charakterisierung Tumorgenese-induzierter struktureller Destruktion des Lymphknotengewebes

Durch die Tumorgenese eines Lymphoms und der damit einhergehenden funktionellen Adaption einzelner Zellpopulationen entstehen nicht nur zelluläre Veränderungen innerhalb des Lymphknotens. Auch erfährt der Lymphknoten oftmals strukturelle Veränderungen. Diese strukturellen Veränderungen spiegeln sich oft in einer Dekompartimentalisierung und damit einer Homogenisierung des Lymphknotengewebes wider. Die Kompartimentalisierung des Lymphknotens wird vorwiegend durch fibroblastische Strukturen gebildet, welche durch die homöostatische Eigenschaft der Makrophagen kontrolliert wird. Werden fibroblastische Zellen oder Makrophagen durch die Initiation eines Tumors in ihrer Funktion angegriffen, so kann es zu einer Veränderung bis hin zu einer Aufhebung der Kompartimentalisierung kommen.

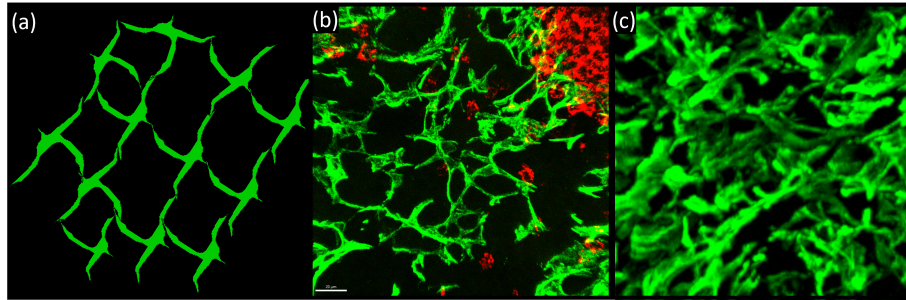


Abbildung 19: Verlust der strukturellen Integrität des Lymphknotens durch die Tumorgenese. (a): Schematische Darstellung der Struktur-gebendenden Netzwerke des Lymphknotens. (b): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der interfollikulären Zone eines reaktiven Lymphknotens. Rot sind CD20-positive B-Zellen eingefärbt. Grün sind α -Aktin-positive fibroblastische Retikulumzellen eingefärbt. (c): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Stützstrukturen eines Lymphknotens mit einem angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphom. Grün sind α -Aktin-positive fibroblastische Retikulumzellen eingefärbt.

5.3.1 Verlust der strukturellen Integrität des Lymphknotens durch die Tumorgenese-induzierte Modulation fibroblastischer Retikulumzellen

Es ist bekannt, dass tumorassoziierte Fibroblasten (TAF) durch die Initiation eines Tumors funktional adaptiert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die potenzielle funktionelle Adaption der TAF in einer morphologischen Veränderung derer widerspiegelt.

Hierzu wurden FRC untersucht, welche eine Subpopulation der Fibroblasten darstellen. FRC sind innerhalb des Lymphknotens in der T-Zone und der Medulla lokalisiert und sind wie zuvor beschrieben positiv für α -Aktin. FRC bilden netzwerkartige Strukturen, welche neben ihrer Funktion als strukturelles Grundgerüst auch die Migration und Diffusion der Zellen ermöglichen, dargestellt in Abbildung 19. Um eine potenzielle morphologische Alteration der FRC innerhalb der EZM und TME zu detektieren und zu charakterisieren, wurden Gewebeprobe von Patienten mit LA mit einer vorliegenden folliculären Hyperplasie ($n = 6$), FL Grad 1 ($n = 5$), AITL ($n = 5$) und NScHL ($n = 5$) untersucht. Diese Gewebeprobe wurden gegen α -Aktin gefärbt und mithilfe eines Zeiss LSM 780 digitalisiert. Anschließend wurden je drei ROI innerhalb der Gewebeprobe ausgewählt und analysiert. Hierbei wurde je eine ROI interfollikulär links, interfollikulär rechts und entfernt von einem Follikel in Gewebeprobe mit LA und FL betrachtet.

In Fällen mit NScHL und AITL war eine solche regionale Lokalisierung der ROI ausschließlich auf Basis einer α -Aktin-Färbung durch die Tumor-induzierte

Dekompartimentalisierung des Gewebes nicht möglich. Zur Evaluation der FRC-Morphologie wurden anschließend mithilfe des Programms *calculate surface* der Software Imaris Zelloberflächen detektiert und digital-pathologisch ausgewertet. Im Speziellen wurde hierbei das Verhältnis der Oberfläche zum Volumen zur morphologischen Charakterisierung der Netzwerke betrachtet. Hierbei zeigte sich, dass FRC-Netzwerke in Fällen der FL im Vergleich zu Netzwerken der LA keine Veränderung aufweisen. Dem entgegen steht das strukturelle Erscheinungsbild in Fällen mit einer AITL und NScHL. Hierbei zeigte sich in der Untersuchung eine starke Reduktion des Oberflächen-Volumen-Koeffizienten [110].

5.3.2 Verlust der strukturellen Integrität des Keimzentrums in einem angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphom

Im Rahmen dieses Kapitels soll untersucht werden, wie sich die zuvor beschriebene morphologische Änderung der FRC-Netzwerke auf die strukturelle Integrität des Keimzentrums auswirkt.

Hierfür wurden neun dreidimensionale Aufnahmen von α -Aktin (FRC) und CD23 (FDC) gefärbten Gewebeproben mit vorliegender AITL untersucht. Innerhalb dieser Aufnahmen wurden 56 Wälle vermessen und hinsichtlich ihrer Länge und der Größe der Öffnungen untersucht.

Hierbei konnte eine durchschnittliche Länge der Keimzentrums begrenzenden FRC-Wälle von $68,24 \mu\text{m}$ ($\pm 29,71$) bei einer durchschnittlichen Walldicke von $1,925 \mu\text{m}$ ($\pm 0,56$) gemessen werden. Vergleicht man nun die hier gemessenen Walllängen mit den Walllängen, welche in reaktivem Gewebe gemessen wurden, so lässt sich eine signifikante Verkürzung der Wälle feststellen ($p = 0,00003$ nach Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests).

5.4 Digital-pathologische Charakterisierung Tumorgenese-induzierter zytologischer Veränderungen

Die Tumorgenese hat neben den zuvor beschriebenen strukturellen Auswirkungen auch zelluläre Auswirkungen. Diese spiegeln sich einerseits in morphologischen, aber auch distributionalen Eigenschaften der Tumorzelle wider. Diese Veränderungen sind explizit oder aber implizit auf molekular-pathologische Veränderungen der Tumorzelle zurückzuführen. Die molekular-pathologische Veränderung der Tumorzelle spiegelt sich jedoch nicht ausschließlich in Aberrationen der Tumorzelle selbst wider, sondern hat auch einen Einfluss auf das TME. Im Folgenden werden Veränderungen der Tumorzelle und deren TME beschrieben.

5.4.1 Veränderung der CD20-Expression in neoplastischen B-Zellen

CD20 ist ein B-Zell-spezifisches Membranprotein [111]. Das Antigen ist essenziell für die humorale Immunantwort und ist direkt an der Differenzierung von B-

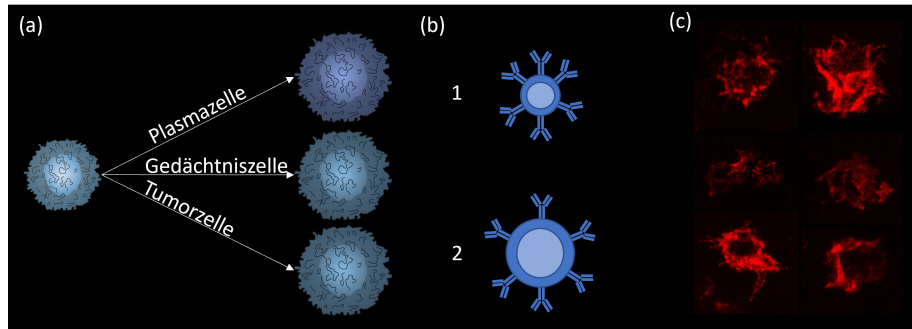


Abbildung 20: Veränderung der CD20-Expression in neoplastischen B-Zellen. (a): Schematische Darstellung der B-Zell-Differenzierung und Tumorgene- se. (b): Schematische Darstellung unterschiedlicher CD20-Antigendichten (1=hoch, 2=niedrig) auf der Oberfläche von reaktiven und neoplastischen B-Zellen. (c): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme unterschiedlicher CD20- Expressionsstärken auf der Oberfläche von B-Zellen.

Zellen zu Plasmazellen beteiligt [112]. CD20 wird durch fast alle B-Lymphozyten exprimiert, wobei die CD20-Dichte auf der Zelloberfläche mit zunehmendem Differenzierungsgrad zunimmt [112]. Lediglich Pro-B-Zellen in einem sehr frühen Stadium und ausdifferenzierte Plasmazellen sind negativ für CD20. Auch viele Tumore mit einem B-Zell-Ursprung, wie beispielsweise Tumorzellen der DLBCL und CLL erhalten ihre Positivität für CD20 [113, 114]. So rückte das Anti- gen CD20 auch therapeutisch in den letzten Jahren immer mehr in der Fokus. CD20 ist das Target für den ersten therapeutisch zugelassenen monoklonalen Antikörper *Rituximab* [115]. Dieser stellt heutzutage in Kombination mit einer Chemotherapie wie *CHOP* oder *R-CHOP* eine Standardtherapie für eine Viel- zahl verschiedener Non-Hodgkin Lymphome dar. Hierbei wird durch die systemi- sche Applikation von *Rituximab* eine gezielte Zelldepletion der CD20-positiven Tumorzellen erreicht. Die Effektivität der Therapie hängt hierbei auch mit der Expressionsstärke von CD20 zusammen, wie Tam et al. (2008) für Patienten mit vorliegender CLL zeigen konnte [116]. Auch konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass die Expressionsstärke auch als genereller prognostischer Marker dienen kann [117].

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte im Rahmen dieser Arbeit die Exp- ressionsstärke von CD20 und im Speziellen die CD20-Dichte auf der Zellober- fläche verschiedener reaktiver und neoplastischer B-Zellen, wie in Abbildung 20 dargestellt, untersucht werden. Hierfür wurde ein Datensatz zusammengestellt, welcher 374 dreidimensionale Aufnahmen von CD20 gefärbten Gewebeproben aus 123 Fällen umfasst. Der Datensatz beinhaltet Fälle mit Adenoid (AD) (11 Fälle, 21 Bilder), LA (27 Fälle, 72 Bilder), FL (19 Fälle, 97 Bilder), CLL (13 Fälle, 38 Bilder), DLBCL (13 Fälle, 50 Bilder), HL (11 Fälle, 24 Bilder), NLPHL

(12 Fälle, 26 Bilder), MC (7 Fälle, 15 Bilder) und MZ (10 Fälle, 31 Bilder).

Auf der Grundlage des Datensatzes sollte zunächst die Eignung der Intensität des Fluoreszenzsignals als Approximation der Expressionsstärke untersucht werden. Unter Einsatz der Software Imaris wurden zunächst die Oberflächen der Zellen detektiert und ausgewertet. Hierfür wurden unter Anwendung eines manuell ermittelten Schwellenwerts ($35,57 \mu m^3$ bis $3822,74 \mu m^3$) potenzielle Einzelzellen extrahiert. Die so extrahierten Einzelzellen wurden anschließend hinsichtlich ihrer aufsummierten CD20-Intensität gemittelt pro Diagnose beurteilt und mit Literaturwerten verglichen. Die in der Literatur bekannten Expressionswerte beziehen sich auf Daten der Durchflusszytometrie [118, 119, 120, 121]. Da ein direkter numerischer Vergleich der Werte aufgrund der unterschiedlichen Skalen nicht möglich war, wurde hierbei die Hierarchie der Diagnosen hinsichtlich ihrer gemittelten Expressionsstärke verglichen, siehe Tabelle 11.

Im Vergleich mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie zeigt sich eine hohe

| | | | | | | | | | | | |
|-------|----|-----|----|----|----|----|-------|----|-------|----|----|
| [118] | MC | CLL | HL | LA | MZ | MC | NLPHL | FL | DLBCL | | AD |
| [119] | | CLL | | | | | | FL | DLBCL | | LN |
| [121] | | CLL | | | | | | FL | DLBCL | MC | |
| [120] | | CLL | | LN | | MC | | | | | |

Tabelle 11: Vergleich der Hierarchie der CD20-Expressionsstärke. Die erste Zeile zeigt die Rangfolge der in dieser Arbeit berechneten Werte. In den Zeilen zwei bis vier sind die Rangfolgen entsprechend der Durchflusszytometrie-Auswertungen aufgeführt. LN steht für Werte eines normalen Lymphknotens. Alle weiteren Abkürzungen entsprechen den hier in der Arbeit eingeführten Diagnosen. Der gezeigte Vergleich der Expressionsstärken zeigt eine hohe Übereinstimmung zwischen den Resultaten dieser Arbeit und den bereits publizierten Rangfolgen.

Übereinstimmung. Dies lässt die Annahme zu, dass die Expressionsstärke über die Intensität der CD20-Färbung in Fluoreszenzaufnahmen approximiert werden kann. Im Anschluss sollte die Expressionsstärke im Kontext der Zellvolumina untersucht werden. Hier konnte mit einem Korrelationskoeffizient nach Pearson von 0,65 ein linearer Zusammenhang festgestellt werden. Dies impliziert, dass aus der erhöhten CD20-Expression nicht zwingend eine erhöhte Antigendichte auf der Oberfläche der Zellen abgeleitet werden kann. Neben der quantitativen Menge ist dies jedoch ebenfalls ein Faktor für die Funktionalität der Zelle [122, 123, 124]. Um die Expressionsstärke hinsichtlich der Oberfläche zu normalisieren, wurde der Parameter *Antigendensity* eingeführt:

$$Antigendensity = \frac{Sum_of_intensity}{Cellsurface} \quad (8)$$

Betrachtet man nun die mittlere Antigendichte auf der Oberfläche reaktiver und neoplastischer B-Zellen, so ergibt sich folgende Hierarchie:

$$MC < CLL < FL < DLBCL < MZ < HL < LA < NLPHL < AD$$

5.4.2 Pathologische Veränderungen tumorassoziierter Makrophagen durch die Tumorgenese

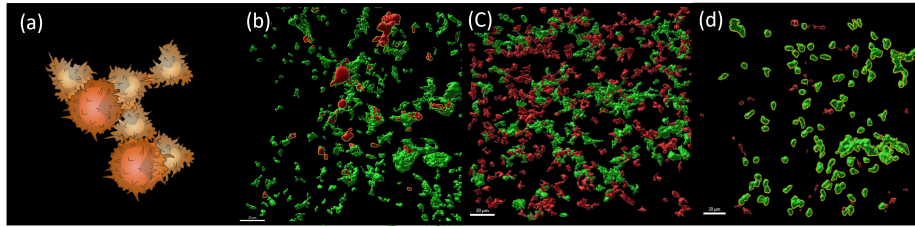


Abbildung 21: Pathologische Veränderung tumorassoziierter Makrophagen durch die Tumorgenese. (a): Schematische Darstellung reaktiver Makrophagen. (b): Oberflächen von CD68-positiven Makrophagen (rot) und CD163-positiven Makrophagen in einer Gewebeprobe mit der Diagnose Lymphadenitis. (c): Oberflächen von CD68-positiven Makrophagen (rot) und CD163-positiven Makrophagen in einer Gewebeprobe mit einem vorliegenden Hodgkin-Lymphom, Mischtyp. (d): Oberflächen von CD68-positiven Makrophagen (rot) und CD163-positiven Makrophagen in einer Gewebeprobe mit der Diagnose chronisch lymphatischer Leukämie.

Die Tumorgenese bedingt nicht nur eine pathologische Veränderung der Tumorzelle selbst, sondern auch pathologische Veränderungen verschiedener, nicht neoplastischer Zellen im TME der Tumorzelle. Eine besondere Bedeutung nehmen hier TAM ein. Es ist bekannt, dass oftmals ein vermehrtes Vorkommen von TAM im TME der Tumorzelle mit einer schlechteren Prognose einhergeht [17]. Dies ist auf die tumorunterstützende Wirkung der TAM zurückzuführen. Makrophagen als solche spielen eine essenzielle Rolle in der zellulären und strukturellen Homöostase des Lymphknotens, beschrieben in Abschnitt 2.1.2. Hierbei lassen sich vier Prozesse beschreiben, in welche Makrophagen vorwiegend involviert sind: Reparaturmechanismen, Phagozytose, zelluläre Attraktion und zelluläre Stimulation [17, 18]. Diese, für den Erhalt des Lymphknotens, unerlässlichen Prozesse können jedoch durch die Tumorzelle genutzt werden, um den eigenen Erhalt zu fördern. So kann durch Makrophagen die Invasion weiterer Tumorzellen, die Angiogenese, wie auch die Proliferation der Tumorzellen unterstützt werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich diese bekannten funktionellen Veränderungen in einer morphologischen und distributionalen Änderung der Makrophagen widerspiegeln, siehe Abbildung 21.

Hierzu wurde ein Datensatz zusammengestellt, welcher 160 dreidimensionale

Bilddaten von insgesamt 82 Fällen umfasst. Es wurden Fälle mit LA (20 Fälle, 44 Bilder), CLL (15 Fälle, 25 Bilder), DLBCL (15 Fälle, 28 Bilder), FL (11 Fälle, 20 Bilder), MCcHL (9 Fälle, 16 Bilder) und NScHL (12 Fälle, 27 Bilder) betrachtet. Die zugrunde liegenden Gewebeproben wurden immunhistologisch gegen CD68 (M1-Makrophagen, klassisch aktivierte Makrophagen (CAM)) und CD163 (M2-Makrophagen, alternativ aktivierte Makrophagen (AAM)) gefärbt. Die so visualisierten Makrophagen wurden zunächst mithilfe von Imaris detektiert und anschließend digital-pathologisch parametrisiert. Ebenso wurden deterministische Zellgraphen berechnet, beschrieben in Abschnitt 3.3.1. Für den Vergleich der Makrophagen wurden die in Tabelle 12 beschriebenen Parameter verwendet. Für eine erste Evaluation der histomorphometrischen und distributionalen Differenzen der einzelnen Diagnosen wurde ein *Bagged Decision Tree*-Klassifikator auf Basis des Medians pro Fall trainiert und validiert, siehe Abschnitt 3.4.4. Hierfür wurde der Datensatz 100-mal zufällig in einen Trainings- und Testdatensatz aufgetrennt und mithilfe des Klassifikators evaluiert. Es zeigte sich mit einer 73,5% *True positive rate* (TPR) eine gute Klassifikationsrate für TAM der CLL. Ebenfalls gute Ergebnisse (57,5% TPR) konnten für TAM der DLBCL erzielt werden. Diese Ergebnisse implizierten teilweise diagnosespezifische Veränderungen der TAM-Populationen. Basierend auf dieser Implikation wurden digital-pathologische Eigenschaften der TAM-Populationen auf signifikante ($p < 0,05$) Veränderungen gegenüber der reaktiven TAM-Population der LA unter Anwendung eines MWU-Test untersucht. Hierbei zeigte sich, dass TAM in der CLL reduziert sind. Auch weisen sie kleinere und rundlichere Morphologien auf. TAM in der DLBCL sind hingegen stark vernetzt und vergrößert. Abschließend konnte festgestellt werden, dass TAM im TME des FL reduziert sind, jedoch keine histomorphometrischen Veränderungen feststellbar waren.

5.5 Digital-pathologisches Profil des Hodgkin-Lymphoms

Das HL stellt durch seine geringe Tumormasse eine einzigartige neoplastische Lymphadenopathie dar. Die häufigsten Unterformen des HL sind das NScHL und das MCcHL. Das NScHL und das MCcHL sind zellulär durch das Auftreten mono- und multinukleärer HRS-Zellen charakterisiert. HRS-Zellen sind positiv für CD30 und teilweise positiv für CD15 und haben in den meisten Fällen einen B-Zell-Ursprung [125, 126]. Neben dieser zellulären Ähnlichkeit weisen die Unterformen des HL in ihrer maximalen Ausprägung Unterschiede in ihrem strukturellen Erscheinungsbild auf. Strukturell charakteristisch für das NScHL ist das Auftreten von vollständig umschlossenen Tumorknoten, wie auch das Auftreten von sklerotischen Bändern. Das MCcHL zeichnet sich hingegen durch bunte Infiltrate innerhalb des Lymphknotengewebes aus. Ist eine strukturelle Abweichung jedoch nicht evident, kann eine klare Abgrenzung gegenüber reaktiven Lymphadenopathien manchmal schwierig sein, da auch einzelne. Dies ist ebenfalls gegeben, da aktivierte Subpopulationen von B- und T-Lymphozyten CD30 exprimieren. Um diese Subpopulationen zukünftig individuell beschreiben zu können, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine digital-pathologische Charakterisierung der CD30-positiven Zellen unter reaktiven und neoplastischen Bedin-

| Parameter | Bedeutung | Implementierung |
|----------------------------------|---|--|
| Morphologie | | |
| <i>Ellipticity (oblate)</i> | Parameter zur Beschreibung der „Scheibenförmigkeit“ der Zelle | Imaris |
| <i>Ellipticity (prolate)</i> | Parameter zur Beschreibung der „Zigarrenförmigkeit“ der Zelle | Imaris |
| <i>Mean intensity DAPI</i> | Durchschnittsintensität der DAPI-Färbung der Zelle | Imaris |
| <i>Mean intensity CD68/CD163</i> | Durchschnittsintensität der korrespondierenden CD68/CD163-Färbung der Zelle | Imaris |
| <i>Antigendensity</i> | Durchschnittsdichte der korrespondierenden CD68/CD163-Färbung der Zelle | siehe Formel 8 |
| <i>Sphericity</i> | Parameter zur Beschreibung der „Rundlichkeit“ der Zelle | Imaris |
| <i>Volume</i> | Größe des Volumens der Zelle | Imaris |
| <i>Major axis length</i> | Länge der längsten Achse der Zelle | Imaris |
| <i>Surface</i> | Größe Oberfläche der Zelle | Imaris |
| Zellgraph | | |
| CD68 Density | Anzahl CD68-positiver Makrophagen pro Fläche | $\frac{\# CD68^+ \text{ Zellen}}{\text{Fläche}}$ |
| CD163 Density | Anzahl CD163-positiver Makrophagen pro Fläche | $\frac{\# CD163^+ \text{ Zellen}}{\text{Fläche}}$ |
| Average connections | Durchschnittliche Anzahl der Interaktionen einer Zelle | $\frac{\sum_i^n \text{Knotengrad } i}{\# \text{Zellen}}$ |
| 3D packing | Dreidimensionale Kompaktheit des Zellgraphen | Estrada Index |
| Communication efficiency | Lokale Kommunikationseffizienz basierend auf den Zellgraphen | <i>Local efficiency</i> |
| Isolated macrophages | Anteil der Makrophagen ohne Interaktion | $\frac{\text{Isolierte Zellen}}{\# \text{Zellen}}$ |

Tabelle 12: Beschreibung der Parameter zur digital-pathologischen Charakterisierung der tumorassoziierten Makrophagen.

gungen vorgenommen werden.

5.5.1 Die Morphologie der Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle

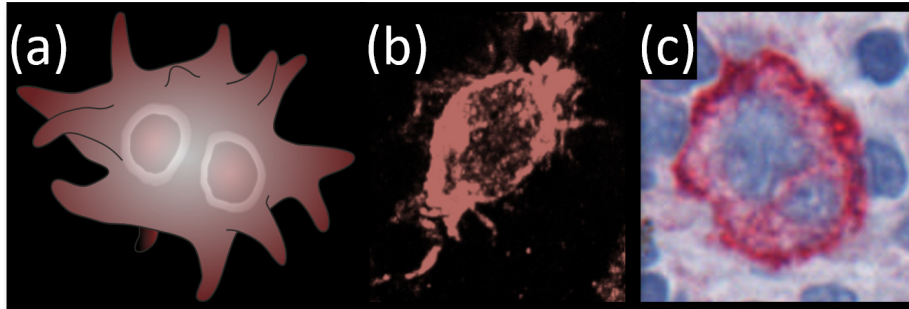


Abbildung 22: Die Morphologie der Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle. (a): Schematische Darstellung einer Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle. (b): CD30-positive Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle in einer Fluoreszenzaufnahme einer Gewebeprobe mit vorliegendem Hodgkin-Lymphom, noduläre Sklerose. (c): CD30-positive multinukleäre Reed-Sternberg-Zelle in einer immunhistologisch vorverarbeiteten Gewebeprobe mit vorliegendem Hodgkin-Lymphom, Mischtyp. Zusätzlich zur CD30-Färbung wurde hier eine Hämatoxilin-Färbung zur Visualisierung der Zellkerne eingesetzt.

Die Population der HRS-Zellen setzt sich aus mononukleären Hodgkin-Zellen und multinukleären Reed-Sternberg-Zellen zusammen, dargestellt in Abbildung 22. Da multinukleäre Reed-Sternberg-Zellen im Zuge der Proliferation aus refusionierten HRS-Zellen hervorgehen, sollte zunächst untersucht werden, inwiefern die Volumenverteilung reaktiver und neoplastischer CD30-positiver Zellen differiert ist.

Hierzu wurde zunächst ein Datensatz zusammengestellt, welcher Gewebeproben aus AD (10 Fälle) und Lymphknoten mit LA (10 Fälle), NScHL (10 Fälle) und MCcHL (10 Fälle) umfasste. Die Gewebeproben der MCcHL beinhalteten zusätzlich fünf Gewebeproben mit einer nachgewiesenen EBV Infektion. Die Gewebeproben wurden gegen CD30 immungefärbt und dreidimensional visualisiert. Anschließend wurden mithilfe von Imaris Zelloberflächen detektiert und digital-pathologisch untersucht. Hierbei zeigten Einzelzellen der EBV-infizierten Fälle mit MCcHL ($1335 \mu\text{m}^3 (\pm 515 \mu\text{m}^3)$) und Fälle der MCcHL ohne EBV-Bezug ($978 \mu\text{m}^3 (\pm 264 \mu\text{m}^3)$) die größten Zellvolumina. Darauf folgten Einzelzellen der NScHL ($672 \mu\text{m}^3 (\pm 190 \mu\text{m}^3)$). Die kleinsten Volumina zeigten CD30-positive Zellen der AD ($458 \mu\text{m}^3 (\pm 92 \mu\text{m}^3)$) und der LA ($464 \mu\text{m}^3 (\pm 207 \mu\text{m}^3)$) [127]. Da die Auswertung auf dreidimensionalen Ausschnitten der Gewebeproben beruhte, sollten in einem zweiten Experiment die Ergebnisse anhand konventioneller Dünnschnitte bestätigt werden. Hierzu wurde ein Datensatz zweidimensionaler WSI von CD30-gefärbten Gewebeproben erstellt, welcher Fälle mit MCcHL (45 Fälle), NScHL (56 Fälle) und LA (58 Fälle) umfasste. Dieser wurde mithilfe der Software *FAITH* analysiert.

Hierzu wurde zunächst eine Zellerkennung durchgeführt. Diese wurde anschließend hinsichtlich der Qualität der erfolgten Zellerkennung manuell evaluiert und technisch schlechte Fälle ausgeschlossen. Hieraus resultierte ein Datensatz, der 35 Fälle mit MCcHL, 36 Fälle mit NScHL und 22 Fälle mit LA umfasste. Die darauf folgende Evaluation der durchschnittlichen Zellfläche ergab eine vergleichbare Hierarchie der Zellgröße. Die Zellgröße reaktiver CD30-positiver Zellen war hier signifikant reduziert gegenüber den Zellgrößen der HRS-Zellen. Im Rahmen dieser Analyse wurde ebenfalls die durchschnittliche Expression des CD30-Antigens durch eine Zelle gemessen. Hierbei zeigten CD30-positive Zellen der LA signifikant geringere Expressionsstärken im Vergleich zu HRS-Zellen des NScHL und MCcHL ($p < 0,05$). Die Expressionsstärke der HRS-Zellen der NScHL und der MCcHL war untereinander vergleichbar.

5.5.2 Das Konnektom der Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle

Daran anknüpfend wurde untersucht, inwiefern reaktive und neoplastische CD30-positive Zellen interagieren. Hierfür wurde der in Abschnitt 5.5.1 beschriebene, dreidimensionale Datensatz manuell auf das Verhältnis interzellulärer Netzwerke zu Einzelzellen untersucht, dargestellt in Abbildung 23. Hierbei zeigte sich, dass HRS-Zellen gegenüber reaktiven CD30-positiven Zellen zu einer vermehrten Netzwerkbildung neigen. Dies wurde besonders in Fällen mit NScHL deutlich. Hier lagen 75% der untersuchten HRS-Zellen in einem Netzwerkverbund vor. Doch auch HRS-Zellen der MCcHL zeigten mit einem Anteil von 51% ein solches Verhalten. Dies wurde jedoch durch das Auftreten eines EBV bis auf 20% reduziert. Im Vergleich zeigten reaktive CD30-positive Zellen zu 28% in Lymphknoten mit LA und zu 33% in AD eine Präsenz in Form eines Zellverbunds.

Auch dies wurde auf Basis des in Abschnitt 5.5.1 beschriebenen zweidimensionalen Datensatzes im Rahmen dieser Doktorarbeit validiert. Durch eine automatisierte Zellgraphuntersuchung mithilfe der Software *FAITH* konnte hier durch die Berechnung des durchschnittlichen Knotengrades ein ähnliches Verhalten festgestellt werden.

Neben der Untersuchung der Kontakte zwischen HRS-Zellen ist die Betrachtung der Kontakte der HRS-Zellen mit den Zellen des TME wichtig. Wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, findet im Rahmen der Tumorgenese eine Remodellierung und Orchestration der TME statt. Diese ist unter anderem auf direkte Zellkontakte der HRS-Zellen mit Zellen der TME zurückzuführen [28]. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass sich auch das generelle Konnektom der HRS-Zellen im Vergleich zu reaktiven CD30-positiven Zellen ändert.

Zunächst wurde ein Datensatz konfokaler, dreidimensionaler Fluoreszenzscans zusammengestellt, welcher auf Gewebeproben mit LA (5 Fälle), MCcHL (2 Fälle) und NScHL (3 Fälle) beruhte. Die Gewebeproben wurden jeweils immunhistologisch für CD30 und einen weiteren Zelltyp gefärbt. Hierbei wurden M1-

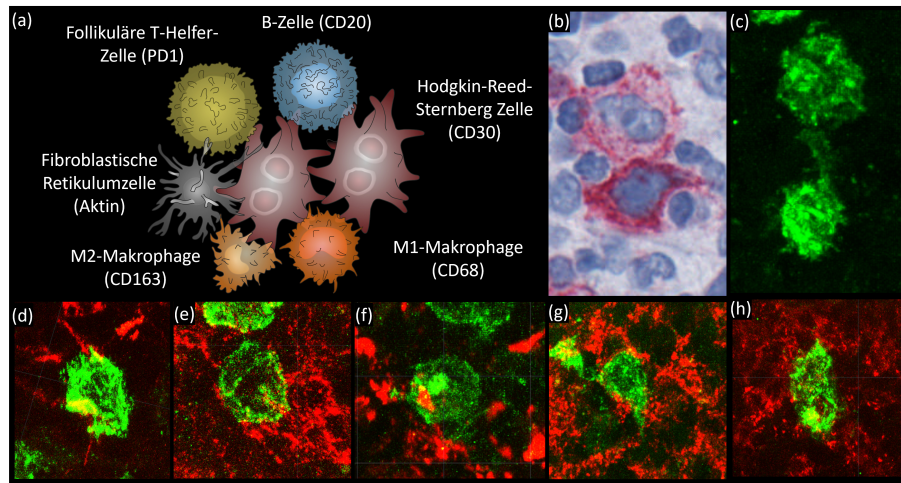


Abbildung 23: Das Konnektom der Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle. (a): Schematische Darstellung des Konnektoms der Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle. (b): CD30-positives Zellnetzwerk zweier Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen in einer immunhistologisch vorverarbeiteten Gewebeprobe mit vorliegendem Hodgkin-Lymphom, Mischtyp. Zusätzlich zur CD30-Färbung wurde hier eine Hämatoxylin-Färbung zur Visualisierung der Zellkerne eingesetzt. (c): CD30-positives Netzwerk zweier Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen in einer Fluoreszenzaufnahme einer Gewebeprobe mit vorliegendem Hodgkin-Lymphom, noduläre Sklerose. (d): Interaktion zwischen einer Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle und α -Aktin positiven fibroblastischen Retikulumzellen. (e): Interaktion zwischen einer Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle und CD20-positiven B-Zellen. (f): Interaktion zwischen einer Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle und CD68-positiven Makrophagen. (g): Interaktion zwischen einer Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle und CD163-positiven Makrophagen. (h): Interaktion zwischen einer Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle und PD1-positiven T-Helfer-Zellen.

Makrophagen (CD68), M2-Makrophagen (CD163), TFH-Zellen (PD1), B-Zellen (CD20) und FRC (α -Actin) visualisiert. Auf die Visualisierung CD4-positiver T-Zellen wurde verzichtet, da bereits eine manuelle Detektion der Einzelzellen durch die hohe Zelldichte nicht möglich war.

Für die folgende Untersuchung wurden mithilfe der Software Imaris die Oberflächen der Zellen detektiert. Anschließend wurde jede CD30-positive Zelle manuell hinsichtlich möglicher Zellkontakte mit einem weiteren Zelltyp untersucht und evaluiert.

So konnte zunächst gezeigt werden, dass HRS-Zellen gegenüber reaktiven CD30-positiven Zellen weitaus mehr Kontakte aufweisen (LA: 3,819, NScHL: 4,266, MCcHL: 5,801) [128]. Auch konnte gezeigt werden, dass eine leichte positive

Korrelation der Kontakte mit dem Zellvolumen vorliegt (Korrelationskoeffizient nach Pearson für LA: 0,235). Diese nimmt jedoch durch die Tumorgenese ab (Korrelationskoeffizient nach Pearson für NScHL: 0,175 und für MCcHL: 0,126). Neben der quantitativen Änderung des Konnektoms ist auch eine qualitative Änderung des Konnektoms zu verzeichnen. Hierbei zeigte sich, dass HRS-Zellen speziell zu M1-Makrophagen vermehrt Kontakte ausbilden. Die Kontakte zu B-Zellen nehmen im Vergleich neoplastischer HRS-Zellen zu reaktiven, CD30-positiven B-Zellen ab. Weiterhin haben HRS-Zellen der MCcHL vermehrt Kontakt zu M2-Makrophagen, wohingegen HRS-Zellen der NScHL mehr Kontakte zu TFH-Zellen ausbilden. Die Kontakte zu FRC bleiben in reaktiven und neoplastischen Gewebeproben konstant [128].

5.5.3 Die Tumormikroumgebung der Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle

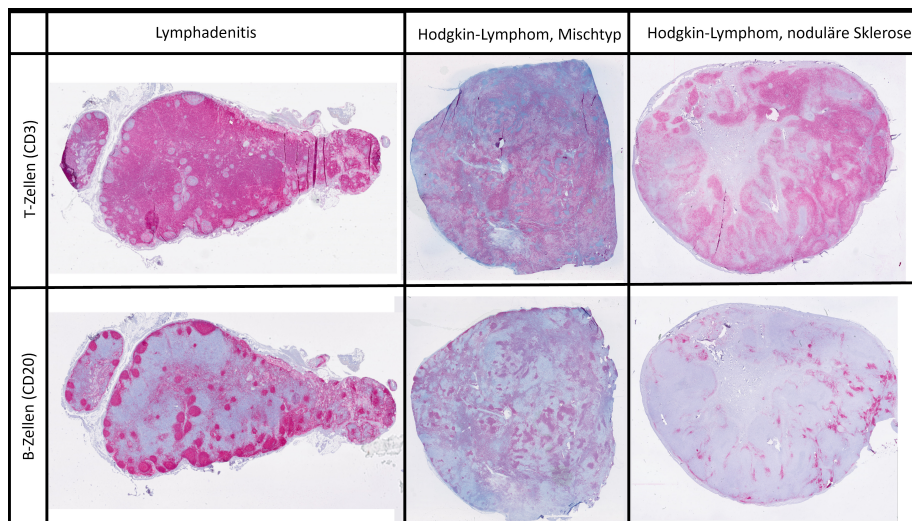


Abbildung 24: Die Tumormikroumgebung der Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle. Die Gewebeproben mit einer Lymphadenitis, Hodgkin-Lymphom, Mischtyp und Hodgkin-Lymphom, noduläre Sklerose wurden je mit Neu-Fuchsin gegen CD20 oder CD3 und Hämatoxilin zur Visualisierung der Zellkerne immunhistologisch gefärbt.

Neben den Kontakten der HRS-Zellen mit der Tumormikroumgebung findet auch eine quantitative und qualitative Remodellierung der TME der HRS-Zellen statt, zu sehen in Abbildung 24. So zeigte sich eine generelle Zunahme der M1-Makrophagendichte in der TME der HRS-Zellen. Speziell für die TME der HRS-Zellen der MCcHL war eine Zunahme der M2-Makrophagendichte zu verzeichnen. Im gleichen Zug konnte eine starke intrazelluläre Vernetzung und eine kompakte räumliche Reorganisation der TAM aufgezeigt werden. Histomorphometrisch spiegelte sich dies in einer Reduktion der Volumina der M2-

Makrophagen wider. Diese wiesen ebenso eine geringere Intensität der DAPI-Färbung auf. Bezüglich der M1-Makrophagen konnte eine Abnahme der Antigendichte von CD68 festgestellt werden.

Neben den TAM spielt die Reorganisation der B-Lymphozyten und T-Lymphozyten in der TME der HRS-Zellen eine Rolle. B- und T-Lymphozyten sind die Hauptbestandteile des adaptiven Immunsystems, welches die Bekämpfung potenzieller Tumore im Körper ermöglicht. Eine Immunflucht und damit das Entgehen einer adaptiven Immunantwort ist essenziell für das Überleben eines Tumors. Hierbei spielt unter anderem die remodellierte, protektive Wirkung CD4-positiver T-Zell-Rosetten eine Rolle. Doch auch eine vollständige Remodellierung der B- und T-Zell-Verhältnisse im TME birgt die Möglichkeit einer Immunflucht.

Um dies zu untersuchen, wurde die B-Zell- und T-Zell-Konzentration auf Basis des in Abschnitt 5.5.1 vorgestellten zweidimensionalen Datensatzes im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht. Hierbei zeigte sich eine Reduktion der B-Zell-Konzentrationen in Gewebeproben mit einem HL gegenüber Gewebeproben einer LA. Weiterhin konnte eine signifikante Reduktion der T-Zell-Konzentration in Gewebeproben mit NScHL im Vergleich mit MCcHL und LA festgestellt werden, siehe Abbildung 25.

5.5.4 Die diagnostische Potenz digital-pathologischer Eigenschaften

Auf Basis der zuvor beschriebenen Eigenschaften sollte ein parametrisiertes digital-pathologisches Profil für LA, NScHL und MCcHL erstellt und hinsichtlich dessen diagnostischer Potenz untersucht werden. Hierzu wurde der in Abschnitt 5.5.1 beschriebene Datensatz zweidimensionaler WSI verwendet. Daraufhin wurden unter Einsatz der Software *FAITH* die in Tabelle 13 beschriebenen Parameter für jeden Fall ermittelt, siehe Abbildung 25. Auf Basis des parametrisierten Datensatzes wurde ein *Random forest*-Klassifikator mithilfe des Plugins *classification* der Software *FAITH* trainiert und unter Durchführung einer *10-fold stratified crossvalidation* evaluiert, dargestellt in Abbildung 26. Hierbei konnte eine durchschnittliche *balanced accuracy* von 0,66 mit einer Standardabweichung von 0,17 erreicht werden, was einen gegebenen Informationsgehalt des digital-pathologischen Profils impliziert. Evaluiert man die Ergebnisse genauer, so erhält man für MCcHL eine TPR von 71,4%, sowie eine Rate der Falschklassifikation in NScHL von 20,0% und in LA von 8,6%. Für NScHL ergibt sich eine TPR von 69,4%, bei einer Falschklassifikationsrate von 19,4% für MCcHL und 11,1% für LA. Abschließend lässt sich für LA eine TPR von 59,1%, bei simultaner Falschklassifikationsrate von 27,3% für MCcHL und 13,6% für NScHL aufzeigen. Dies impliziert, dass eine Unterscheidung mit den gegebenen Parametern zwischen dem NScHL und der LA prinzipiell möglich ist. Jedoch zeigt sich auch, dass speziell einzelne Fälle der LA eine hohe Ähnlichkeit zu Fällen des MCcHL aufweisen können.

| Parameter | Bedeutung |
|----------------------------|--|
| Morphologie | |
| <i>Area</i> | Fläche der Zelle |
| <i>Major axis length</i> | Länge der längsten Achse der Zelle |
| <i>Intensity mean CD30</i> | Durchschnittliche CD30-Intensität der Zelle |
| <i>Roundnes</i> | Rundlichkeit der Zelle |
| Zellgraph | |
| <i>CD3 proportion</i> | Anteil CD3-positiver Pixel an der Gewebeprobe |
| <i>CD20 proportion</i> | Anteil CD20-positiver Pixel an der Gewebeprobe |
| <i>Average connections</i> | Durchschnittliche Anzahl der Interaktionen einer Zelle |
| <i>Cell density</i> | Anzahl der Zellen gemittelt durch die Größe der Gewebeprobe |
| <i>Isolated cells</i> | Anteil isolierter CD30-positiver Zellen an der Gesamtpopulation der Zellen |

Tabelle 13: Parameter des digital-pathologischen Profils reaktiver und neoplastischer Gewebeproben. In dieser Tabelle werden Parameter vorgestellt, welche mithilfe der Software *FAITH* auf Basis von zweidimensionalen WSI berechnet wurden. Diese Parameter beschreiben die Morphologie, Mikroumgebung und die Verteilung der Zellen.

6 Diskussion

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden reaktive und neoplastische Lymphadenopathien digital-pathologisch charakterisiert. Es wurden reaktive Lymphadenopathien unter funktionellen Gesichtspunkten analysiert und als Goldstandard zur Untersuchung etwaiger neoplastischer Veränderungen lymphoider Gewebeproben etabliert. Die Grundlage für die digital-pathologische Analyse stellten zweidimensionale und dreidimensionale Aufnahmen histopathologisch gefärbter, humaner Gewebeproben dar. Diese wurden mit kommerziellen (Imaris) und individuellen Softwarelösungen (*FAITH*) untersucht. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten digital-pathologischen Analysen basierten im Kern auf der Betrachtung und Auswertung morphologischer Eigenschaften und der Verteilungsanalyse (semi-) automatisch detektierter Zellobjekte.

6.1 Bildqualität

Essenziell für die Validität einer solchen Analyse ist eine ausreichende Bildqualität. Eine generalisierte Definition des Qualitätsbegriffs im histopathologischen Kontext ist jedoch bis heute nicht möglich [129, 130, 131].

Dies hat verschiedene Gründe. Vorwiegend ist zu nennen, dass sich die benötigte Bildqualität, wie auch die zu betrachtenden Qualitätskriterien stets aus dem Verwendungszweck und der gewählten Methode zur Verarbeitung der Bildda-

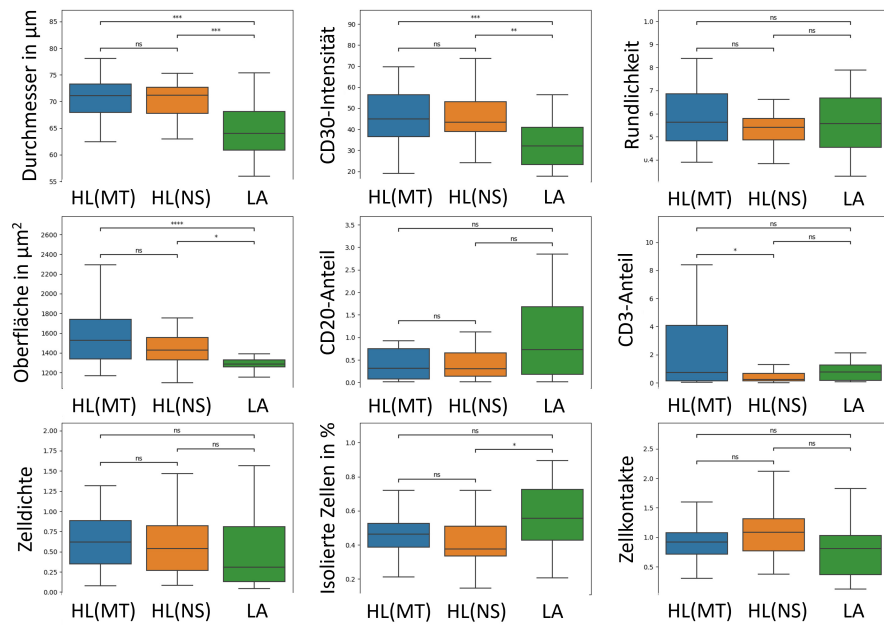


Abbildung 25: Die digital-pathologischen Eigenschaften CD30-positiver Zellen. Die Berechnungen basieren auf der Analyse zweidimensionaler WSI mithilfe der Software *FAITH*.

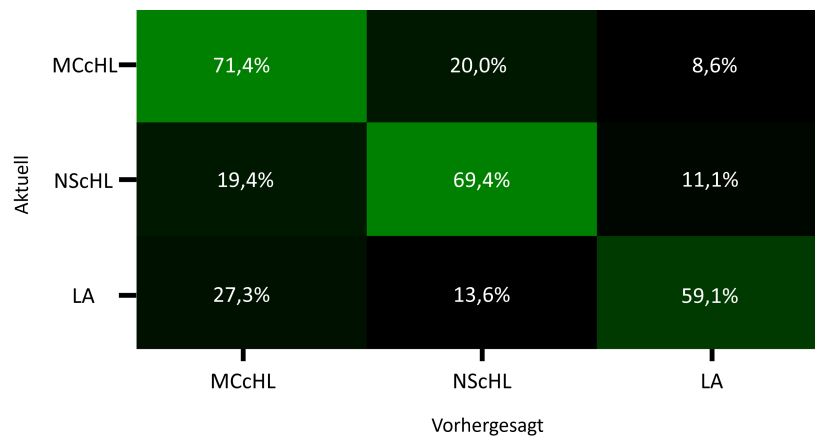


Abbildung 26: Die diagnostische Potenz des digital-pathologischen Profils des HL. Die Berechnungen basieren auf der Analyse zweidimensionaler WSI mithilfe der Software *FAITH* unter Anwendung eines *Random forest*-Klassifikators.

ten ableiten. Beispielsweise ist eine manuelle Analyse weitaus weniger anfällig für Varianzen der Qualität innerhalb eines Bildes als automatische Methoden der digitalen Pathologie. Dies führte dazu, dass im Rahmen jedes Projektes der Bild-bezogene Qualitätsbegriff neu definiert wurde. Auf Basis dieser individuellen Qualitätsdefinitionen wurde jeder Datensatz manuell validiert.

Für die individuelle Definition des Qualitätsbegriffs wurden technische und

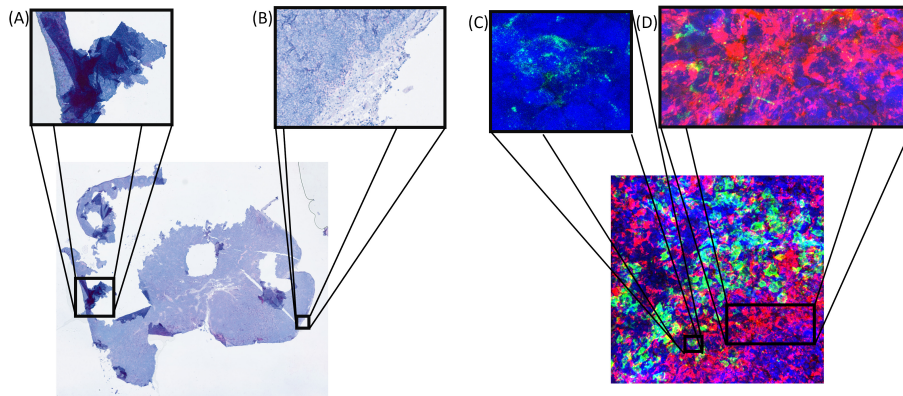


Abbildung 27: Definition des Qualitätsbegriffs. Aufgezeigt sind zweidimensionale und dreidimensionale Bilddaten, welche Herausforderungen in Bezug auf die Zellerkennung aufweisen. In (A) ist eine Faltung in einem zweidimensional geschnittenen Dünnschnitt einer Gewebeprobe aufgezeigt. (B) zeigt einen Bildausschnitt, welcher in Bezug auf die vorgenommene Neu-Fuchsinfärbung keine Positivpixel aufweist. (C) zeigt eine unvollständig gefärbte CD30-positive Zelle in einer dreidimensionalen Fluoreszenzaufnahme. (D) zeigt einen dichten Bereich CD68-positiver Makrophagen.

biologische Eigenschaften der Bilddaten betrachtet und manuell ausgewertet. Hinsichtlich der Technik musste ein Bild ausreichende Kontraste aufweisen und wenig Hintergrundrauschen vorliegen. Auch definierte sich die Qualität in Bezug auf die Integrität des Gewebes. Hierbei war es wichtig, dass keine Risse oder Faltungen im Gewebe vorlagen, siehe Abbildung 27 (A). Hinsichtlich der Biologie, wurde darauf geachtet, dass die Zellen separiert und homogen gefärbt auftraten, siehe Abbildung 27 (D). Membranfärbungen zeigen sich aufgrund der inhomogenen Lokalisation der Antigene oftmals unvollständig, siehe Abbildung 27 (C). Für die Analyse von WSI mit Hilfe eines *Sliding window*-Ansatzes ist auch eine homogene Verteilung positiver Zellen vonnöten. Dies gründet darauf, dass lokale Schwellenwertverfahren ohne Vorliegen von Positivpixeln fehlschlagen und damit zu einer zunehmenden Erkennung falsch-positiver Objekte führt, siehe Abbildung 27 (B).

Die manuell erfolgte Qualitätsanalyse ist essenziell, um eine zuverlässige In-

terpretation zu gewährleisten. In der Literatur gibt es viele Ansätze zur Bildnormalisierung und automatischen Quantifizierung der Bildqualität [129, 130, 131, 132]. Diese Konzepte wurden partiell im Rahmen der Implementierung der Software *FAITH* umgesetzt und getestet. Als Beispiel ist hier unter anderem die Histogramm-Normalisierung zu nennen. Auch wurde die Entropie der Färbung als Maß für den Bildkontrast getestet. Jedoch musste festgestellt werden, dass die Leistungsfähigkeit solcher Algorithmen und Metriken im Rahmen dieser Arbeit zu begrenzt erschienen, um eine manuelle Vorselektion zu ersetzen.

6.2 Datensatz

Die manuelle Selektion resultiert in einem reduzierten Datensatz. Diese Reduktion wiegt im hier bestehenden medizinischen und humanen Kontext besonders schwer, da aufgrund der limitierten Datengewinnung, der Datensatz bereits begrenzt ist. Wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, ist auch die Verteilung der Auftrittshäufigkeiten einzelner Lymphadenopathien sehr heterogen. Hieraus resultiert daher nicht nur ein sehr begrenzter Datensatz, sondern auch ein Datensatz mit einer inhomogenen Verteilung der Subentitäten. Dies gepaart mit der Individualität eines Tumors macht die Generalisierung digital-pathologischer Muster über einzelne Tumorentitäten hinweg herausfordernd. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit von dem Einsatz hochkomplexer Modelle des Tiefenlernens, wie beispielsweise dem Einsatz von konvolutionalen neuronalen Netzen, Abstand genommen. Auch wurden Verfahren wie die stratifizierte Kreuzvalidierung eingesetzt, um das Verhalten des maschinellen Lernmodells bestmöglich zu untersuchen. Abschließend impliziert speziell die Begrenztheit der Daten, aber auch die Individualität des Tumors und des Patienten selbst, dass im Rahmen dieser Arbeit definierte digital-pathologische Muster vorwiegenden Tendenzen aufzeigen.

6.3 Korrelation von Funktion, Morphologie und Verteilung

Ist man sich der Einflüsse der Qualität und des Aufbaus des Datensatzes bewusst, so ermöglicht die digitale Pathologie valide Einblicke in die zelluläre und strukturelle Konstitution des Gewebes.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde zunächst der zelluläre und anatomische Aufbau eines reaktiven Keimzentrums untersucht. Es wurde untersucht, welchen Einfluss Wachstums- und Differenzierungsprozesse des Keimzentrums auf die Massenverhältnisse von B-Zellen, T-Zellen, FDC und Makrophagen haben. Diese Untersuchung zeigte erstmals, dass bei allen betrachteten Zellmassen eine nahezu lineare Korrelation mit der Keimzentrumsgröße besteht [109]. Hieraus lässt sich ableiten, dass das Verhältnis der Zelltypen auch im Rahmen des Keimzentrumswachstums nahezu konstant bleibt. Die vorliegende Homöostase der Zellpopulationen kann biologisch auf benötigte *Checkpoint*-Prozesse zurückgeführt werden. Hierbei müssen Zellen mit entsprechenden Antagonisten interagieren,

um aktiviert oder selektiert zu werden. Verschiebt sich das Verhältnis der Zellen, so sinkt die Auftreffwahrscheinlichkeit der Zellpaare. Auch erhöhen sich zurückzulegende Wegstrecken, was wiederum die Geschwindigkeit der Reaktion einschränkt.

Im Fortlauf der Analyse fiel jedoch auf, dass im Rahmen der Untersuchung lediglich 62,14% des Keimzentrumsvolumens zellulär aufgeklärt werden konnte. Ein Vergleich mit HE-gefärbten Dünnschnitten und elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Keimzentrums zeigte, dass die fehlenden 38% nicht ausschließlich durch Hohlräume und die EZM erklärt werden können. Daraus lässt sich ableiten, dass dieses Keimzentrumsvolumen durch nicht betrachtete Zellpopulationen gefüllt wird. Diese Zellpopulationen können weitere Subpopulationen der FDC darstellen. Auch sind lediglich CD68-positive Makrophagen dargestellt. Darüber hinaus ist bekannt, dass Keimzentren teils mit großen Gefäßen vergesellschaftet sind. Die hierin befindlichen endothelialen Gewebeanteile und Erythrozyten sind ebenfalls nicht in der Population visualisierter Zelltypen enthalten.

Neben der zellulären Komposition des Keimzentrums wurde der mechanische Aufbau des Keimzentrums untersucht. Im Rahmen dieser Analyse konnten erstmals Keimzentrums-begrenzende Wälle aus FRC beschrieben werden [9]. Diese Wälle scheinen eine mechanische Abgrenzung zwischen dem Keimzentrum und dem Interfollikularbereich darzustellen. Vor allem der abrupte Abfall der T-Zell-Konzentration an den Wällen deutete auf die Barrierefunktion der Wälle hin. Weiterhin konnten diese Wälle morphologisch von umgebenden, perifollikulären Sinusstrukturen abgegrenzt werden.

Ein weiteres Indiz für die Barrierefunktion der Wall-Strukturen findet sich in Fällen mit diagnostizierter AITL. In diesen Fällen konnte eine Verkürzung der Wall-Strukturen und eine Verbreiterung der Wall-assoziierten Durchtrittsstellen gezeigt werden. Die Tumorgenese der AITL kann einen fokalen Ursprung haben. Wenn nun die mechanische Barrierefunktion des Keimzentrums im Rahmen der Tumorgenese der AITL aufgehoben wird, so kann dies die gegebene, unkontrollierte Ausbreitung des Tumors begünstigen.

Damit korrelierend, konnte im Rahmen dieser Arbeit eine generelle Tumor-induzierte Modulation der FRC-Morphologie in der AITL und NScHL gezeigt werden. Diese Alteration kann vielerlei Ursachen haben. Einerseits ist bekannt, dass in verschiedenen Lymphomen tumorassoziierte dendritische Zellen auftreten. Andererseits kann eine solche Alteration auch ihre Ursache in der fehlenden kostimulatorischen Interaktion der IDZ mit den neoplastischen T-Zellen haben. Abschließend kann diese morphologische Veränderung der FRC durch eine funktionelle Aberration der TAM in der Neoplasie hervorgerufen werden. Interessanterweise ist eine solche morphologische Veränderung in Fällen mit diagnostiziertem niedriggradigem FL nicht zu beobachten. Das niedriggradige FL ist jedoch im Vergleich zum AITL und NScHL meist innerhalb der Keimzentren zonal begrenzt. Diese zonale Abgrenzung verhindert indirekt eine Interaktion der neoplastischen B-Zellen mit den FRC, wodurch dieses Phänomen erklärt

werden kann.

Neben den indirekten und direkten Auswirkung der Neoplasie auf die Lymphknotenstruktur sollten im Rahmen dieser Arbeit auch zytologische Veränderungen der Tumorzellen selbst untersucht werden. Eine Studie beschäftigte sich hierbei mit den Veränderungen der CD20-Expression neoplastischer B-Zellen. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass neoplastische B-Zellen eine verminderte CD20-Antigendichte auf der Zelloberfläche gegenüber reaktiven B-Zellen aufweisen. Diese verminderte Antigenexpression spiegelt indirekt molekularpathologische Veränderungen der Tumorzelle wider. Einzig das HL verhielt sich hierbei konträr zu den weiteren B-Zell-Lymphomen. Betrachtet man das TME des HL, so stellt dies jedoch keinen Widerspruch dar. Tumorzellen des HL nehmen lediglich 1% – 3% des Tumorgewebes ein. Dies impliziert, dass im TME des HL vorwiegend reaktive B-Zellen vorzufinden sind. Unter dieser Annahme zeigt sich, dass neoplastische B-Zellen über alle Diagnosen hinweg eine geringere Antigen-dichte als reaktive B-Zellen aufweisen.

Im Rahmen dieser Studie konnten darüber hinaus weitere technische Grundlagen für die Analyse der Antigenexpression mittels Fluoreszenzmikroskopie gelegt werden. Für die Validierung der indirekten Analyse der Expressionsstärke über die Fluoreszenzstärke der Zellfärbung wurde eine Rangfolge der mittleren CD20-Expressionsstärke einzelner B-Zell-Lymphome erstellt und mit Ergebnissen der Durchflusszytometrie aus der Literatur verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die publizierten Rangfolgen über die aufsummierte Fluoreszenzstärke einer Zellfärbung reproduziert werden können. Einzig das Mantelzellymphom zeigte, verglichen mit den Literaturwerten, eine weitaus geringere CD20-Expression. Doch variiert auch innerhalb der Literatur die Hierarchie bezogen auf das Mantelzellymphom [119, 121]. Betrachtet man darüber hinaus den hier analysierten Datensatz, so lässt sich feststellen, dass das Mantelzellymphom die kleinste Entität innerhalb des Datensatzes einnahm. So kann dies ebenfalls auf natürliche Schwankungen zwischen einzelnen Patienten zurückzuführen sein. Abschließend kann dies auch aus der in Abschnitt 6.1 beschriebenen, qualitätsbedingten Unschärfe der Zellerkennung resultieren.

Abschließend konnte die positive Korrelation der Zellgröße mit der CD20-Expressionsstärke aufgezeigt werden. Dies ist im ersten Moment trivial. Doch ist diese Korrelation für die Interpretation der qualitativen CD20-Expression essenziell. So konnte beispielsweise für die DLBCL gezeigt werden, dass diese, wie publiziert, die höchste CD20-Expressionsstärke aufweist, jedoch eine verminderte Antigen-dichte im Vergleich zu reaktiven B-Zellen aufzeigt. Dies kann speziell für den Einsatz einer Immuntherapie interessant sein. Das CD20-Antigen ist ein weitverbreitetes Ziel für die Immuntherapie. Monoklonale Antikörper, wie beispielsweise Rituximab oder auch Chimärer Antigenrezeptor (CAR)-T-Zellen, stellen eine CD20-gerichtete Therapie zur Depletion neoplastischer B-Zellen dar. Die Literatur zeigt, dass die CD20-Expressionsstärke der Tumorzellen mit dem Erfolg einer solchen Therapie korreliert. Jedoch gibt es hierbei stets Ausnahmen. Einer der Ursachen für einen Misserfolg der Therapie trotz nachgewiesener hoher Expressionsstärke könnte potenziell auf eine verminderte Antigen-dichte

zurückgeführt werden. Tumorzellen werden im Rahmen der Therapie über das CD20-Antigen detektiert. Sinkt nun die entsprechende Antigendichte, so kann die Interaktion des Antikörpers oder auch der CAR-T-Zelle mit der Tumorzelle gehemmt oder vermindert sein. Dies kann zu einer verringerten Effizienz der Therapie führen.

Speziell in therapeutischen Ansätzen und im funktionellen Verständnis verschiedener Tumorentitäten rückt heutzutage immer mehr das TME eines Tumors in den Mittelpunkt. Ein wichtiger Faktor im TME eines Tumors sind TAM. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Veränderungen der Morphologie und Verteilung der TAM in verschiedenen Tumorentitäten untersucht und erstmals quantitativ im dreidimensionalen Kontext beschrieben.

TAM im TME der CLL und des FL zeigten sich reduziert und weisen speziell in Bezug auf die CLL kleinere und rundlichere Morphologien auf. Dies kann ein Hinweis auf eine verminderte Aktivität der TAM sein. TAM phagozytieren apoptotische Zellen. Wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, zeigen Tumorzellen des FL durch die vermehrte Expression des *BCL-2*-Proteins eine geringere Apoptoseaktivität. Dies kann darin resultieren, dass es einer geringeren Phagozytoseaktivität aufgrund der reduziert vorliegenden Zelldebris bedarf, sodass ein Rückgang des TAM-Volumens zu erwarten wäre. Speziell rundlichere und kleinere Morphologien der TAM im TME der CLL können ebenfalls auf eine Reduzierung der Zelloberfläche mit einer korrelierenden Verringerung der Interaktion der TAM hindeuten.

Im TME der DLBCL wiederum reichern sich TAM an und sind zusätzlich stärker vernetzt. Die Vernetzung kann jedoch auch aus der Anreicherung der TAM abzuleiten sein, da der Grad der Vernetzung mittels geometrischer Graphen auf Basis des euklidischen Abstands der Zellen ermittelt wird. Dennoch kann speziell die Anreicherung der TAM auf eine verstärkte Reaktion, in reaktivem wie auch neoplastischem Sinne, hindeuten. Eine stärkere Vernetzung der TAM im TME unterstützt diese These. Da in den meisten Fällen eine Vermehrung der TAM im TME des Tumors mit einer schlechteren Prognose für den Patienten einhergeht, deutet dies auf eine tumorunterstützende Wirkung hin.

Mit dieser Analyse kann gezeigt werden, dass morphologische und distributionale Veränderungen der TAM durch die Tumorgenese erklärt werden können. Dies zeigt, dass funktionelle Veränderungen in der Neoplasie direkt und direkt aus dem TME abgeleitet werden können. Eine Spezifität der Veränderungen in Bezug auf einzelne Tumorentitäten zeigte sich in einer durch maschinelles Lernen gestützten Analyse jedoch nur bei der CLL und DLBCL. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die funktionellen Veränderungen der TAM Tumorentitäts-übergreifend vergleichbar sind und nur in ihren Maximalvarianten eine eindeutige Spezifität aufweisen.

Die zusammengetragenen Erkenntnisse, bezüglich der Veränderungen der Morphologie und der Verteilung der Tumorzellen wie auch deren TME wurde im Folgenden dafür genutzt, um im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein umfangreiches digital-pathologisches Profil des HL auf Basis von 2D- und 3D-Daten zu

erstellen.

Dieses Profil umfasst zunächst die morphologische Beschreibung der HRS-Zellen. Es zeigte sich, dass CD30-positive HRS-Zellen größer sind als CD30-positive Zellen in reaktivem Gewebe. Dies ist zu erklären, da die Population der HRS-Zellen große, refusionierte, multinukleäre Zellen mit einschließen. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass speziell HRS-Zellen in neoplastischem Gewebe mit vorliegender EBV-Infektion die größten Zellvolumina aufzeigen. Diese Assoziation kann auf eine erhöhte Stimulation der HRS-Zellen hindeuten.

Weiterhin wurde die Vernetzung der CD30-positiven Zellen mit deren TME charakterisiert. Dies ist im Besonderen charakteristisch für das HL, da bekannt ist, dass HRS-Zellen das TME umfangreich remodellieren. In einer manuellen Untersuchung wurde zunächst die Interaktion der HRS-Zellen untereinander untersucht. Hierbei zeigte sich ein verstärktes Netzwerkverhalten bei HRS-Zellen im Vergleich zu reaktiven CD30-positiven Zellen. Besonders ausgeprägt war dies in der NScHL. Diese interzelluläre Vernetzung kann eine kostimulatorische Erhöhung der Zellaktivität hervorrufen. Auch ist bekannt, dass sich HRS-Zellen für eine Immunflucht mit inaktivierten, CD4-positiven T-Helfer-Zellen umgeben. Dies kann durch ein netzwerkartiges, dichtes TME aus HRS-Zellen begünstigt werden.

Neben der Interaktion mit CD30-positiven Zellen wurde das Makrophagen, B-Zellen, Fibroblasten und T-Zellen umfassende Konnektom des HL und der LA untersucht. Es zeigte sich wie erwartet eine generelle Erhöhung der Interaktionen CD30-positiver Zellen des HL mit deren Mikroumgebung gegenüber reaktiven, CD30-positiven Zellen.

Betrachtet man die Verteilung der Interaktionen, so kann festgestellt werden, dass HRS-Zellen vermehrt Kontakte zu inflammatorischen CAM aufweisen. Diese vermehrte Interaktion kann, wie zuvor beschrieben, die Attraktion weiterer HRS-Zellen mit anschließender Netzwerkausbildung begünstigen. Auch kann eine Entzündungsreaktion ausgelöst werden. Weiterhin ist eine Reduktion der Kontakte von HRS-Zellen zu B-Zellen zu beobachten, was auf Prozesse der Immunflucht hindeuten könnte.

Vergleicht man die Konnektome des NScHL und des MCcHL, so zeigt sich für HRS-Zellen des NScHL eine gesteigerte Interaktion mit T-Helfer-Zellen und für HRS-Zellen des MCcHL eine gesteigerte Interaktion mit AAM. Vergleicht man das strukturelle Erscheinungsbild der beiden Subtypen, so zeigt das MCcHL eine eher diffuse Infiltration des Gewebes. Das NScHL ist strukturell hingegen durch eine zunehmende Sklerosierung des Gewebes und das Auftreten sklerotischer Bänder charakterisiert. Dieser Unterschied kann unter anderem auf die vermehrte Interaktion der HRS-Zellen mit AAM im MCcHL zurückzuführen sein. AAM haben eine antiinflammatorische Wirkung und sind damit Antagonisten der CAM. Dies kann zu einem Gewebeerhalt im MCcHL führen.

Neben der Analyse der Zellkontakte wurden Makrophagen im TME des HL auch im Hinblick auf Morphologie und Verteilung näher charakterisiert. Hierbei konnte eine generelle Anreicherung der CAM festgestellt werden. Speziell im TME des MCcHL ist auch eine Vermehrung der AAM zu beobachten. Dies unterstützt die zuvor festgestellte, gesteigerte Interaktion der HRS-Zellen mit

Makrophagen, speziell die Interaktion der HRS-Zellen des MCcHL mit AAM. Doch weist eine Reduktion der Volumina der AAM auf eine verminderte Aktivität der Zellen hin, was der zuvor gestellten Hypothese des Gewebeerhalts durch eine gesteigerte Interaktion mit antiinflammatorischen AAM entgegensteht. Dies weist vielmehr auf eine suppressive Wirkung der HRS-Zellen auf die AAM hin. Weiterhin konnte eine kompakte Reorganisation der Makrophagen im TME der HRS-Zellen beobachtet werden. Dies korreliert mit der gesteigerten Interaktion der Makrophagen mit den HRS-Zellen und deren attraktive Eigenschaft. Doch konnte diese These in der angesprochenen Studie aufgrund der fehlenden CD30-Färbung nicht validiert werden. Abschließend wurde die T- und B-Zell-Masse im TME des HL untersucht. Hierbei zeigte sich eine Verringerung der Lymphozyten. Dies kann als Indiz für eine vorliegende Immunflucht gewertet werden kann.

6.4 2D-, 3D- und 4D-Bildgebung im Vergleich

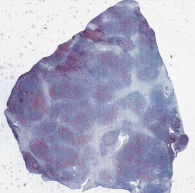
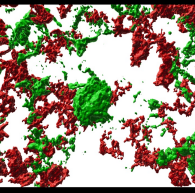
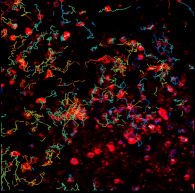
| | | |
|---------------|--|---|
| 2D Histologie | <ul style="list-style-type: none"> • Makroskopische Veränderung • Lokalisation einzelner Zelltypen • Zellverteilung • Zellkernmorphologie • Chromatinverteilung |  |
| 3D Histologie | <ul style="list-style-type: none"> • Zellmorphologie • Netzwerkbildung • Antigenverteilung • Lokale 3D Zellverteilung |  |
| 4D Histologie | <ul style="list-style-type: none"> • Zellbewegung • Zellkontakte • Kontaktzeiten • Zellmorphologie |  |

Abbildung 28: 2D-3D-4D-Histologie im Vergleich. Es werden Möglichkeiten der 2D-, 3D- und 4D-Bildgebungsverfahren aufgezeigt.

Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Analyse zweidimensional gescannter Dünnschnitte und dreidimensional gescannter Dickschnitte unterschiedliche Einblicke in die Konstitution humaner, lymphoider Gewebeproben ermöglicht. Darüber hinaus entstand in den letzten Jahren die Möglichkeit der Visualisierung humaner Gewebeproben in Raum und Zeit [10, 11, 12, 133].

Vergleicht man diese drei Techniken, so lassen sich unterschiedliche, ergänzende Anwendungsfelder ausmachen, siehe Abbildung 28. Die klassische 2D-Mikroskopie immunhistologisch gefärbter Dünnschnitte ermöglicht eine Untersuchung der strukturellen Konstitution des Gewebes. Es zeigen sich Veränderungen der Kompartimentalisierung, aber auch beispielsweise sich bildende Sklerosen. Darüber hinaus ermöglicht die 2D-Mikroskopie einen Überblick über die Verteilung und Lokalisation einzelner Zelltypen und Zellpopulationen. Tumorinfiltrate und deren TME können detektiert werden. Dies ist speziell für die Detektion partieller Infiltrate und dem simultanen Auftreten verschiedener Lymphome in einem Lymphknoten notwendig. Hier kann beispielsweise die ausschließliche Durchführung einer (Fein-) Nadelbiopsie zu Problemen in der Diagnostik führen [134, 135]. Abschließend ermöglicht der Anschnitt der Zellkerne in der klassischen Histopathologie Aussagen über die Zellkernmorphologie und die Chromatinverteilung, welche eine essenzielle Basis der histopathologischen Diagnostik darstellen.

In der 3D-Histologie ist eine solche visuelle Analyse der Zellkerne durch die hohe Informationsdichte schwierig. Auch ist eine Generalisierung der Aussagen für eine gesamte Gewebeprobe aufgrund der kleinen Ausschnitte nicht möglich. Diese Technik erlaubt jedoch eine genaue Beurteilung der Zellmorphologie. Der Anschnitt der Zellen in der klassischen 2D-Histologie negiert bereits rein technisch die Analyse der dreidimensionalen Morphologie der Zellen und lässt ausschließlich Vermutungen zu. Die dreidimensionale Visualisierung der Zellen in Kombination mit der konfokalen Lasermikroskopie bieten darüber hinaus die Möglichkeit, Aussagen über den Antigenbesatz einer Zelle zu treffen, siehe Abschnitt 5.4.1. Auch können lokale, dreidimensionale Zellverteilungen analysiert werden, wie in Abschnitt 5.4.2 beschrieben. Abschließend ist ein großer Vorteil die Beurteilung zellulärer Netzwerke und Interaktionen. Hierbei konnte speziell in Abschnitt 5.5.2 gezeigt werden, dass diese Untersuchung weitreichende funktionelle und diagnostische Einblicke ermöglichen kann.

Diese Aussagen können im Rahmen der 4D-Histologie noch vertieft und erweitert werden. Während die 3D-Histologie keine Aussagen über die Beständigkeit solcher Netzwerke ermöglicht, können mittels 4D-Histologie auch temporäre und kurzweilige Zellkontakte bestimmt werden. Auch konnte in der Arbeit von *Hartmann et al. (2021)* gezeigt werden, dass speziell die Kontaktzeiten der Zellen über einzelne diagnostische Entitäten verschieden sind [12]. Es lassen sich Aussagen über die Zellbewegung treffen, um beispielsweise so die zelluläre Fitness zu beurteilen. Abschließend ermöglicht die 4D-Histologie eine mögliche Definition neuer funktionelle Subgruppen, welche über die reine CD-Klassifikation hinausgeht [133].

6.5 Etablierung und Möglichkeiten der computerassistierten Detektion in der klinischen Routine

Das in Abschnitt 6.3 definierte digital-pathologische Profil wurde im Rahmen dieser Arbeit als Ausgangspunkt genutzt, um eine generelle Evaluation der computerassistierten Detektion in der klinischen Routine vorzunehmen. Die im Rahmen der Routine eingesetzten WSI wurden als Basis verwendet, um ein maschinelles Lernmodell zu trainieren und hinsichtlich dessen diagnostischer Potenz zu evaluieren. Es zeigte sich eine generelle, diskriminative Potenz des digital-pathologischen Profils. Dennoch trifft dies nicht auf alle Fälle zu. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zunächst lässt sich hier festhalten, dass nur ein Teil der diagnostischen Parameter digital definiert werden konnten. So sind speziell Eigenschaften des Zellkerns hier außer Acht gelassen. Auch fehlt die Detektion einer vorliegenden Sklerose. Betrachtet man darüber hinaus die weltweit varierende Abgrenzung des NScHL und des MCcHL, so ist ein gewisser Überlapp durch den fluiden Übergang dieser zwei Entitäten ebenso erwartbar. Auch spielt die histopathologische Variabilität eines reaktiven Lymphknotens eine Rolle. Diese spiegelt sich vor allem in den falsch klassifizierten Fällen der LA wider. So kann eine LA mit vielen reaktiven CD30-Zellen speziell dem MCcHL sehr ähneln. Abschließend ist hier auf die Individualität des Patienten und den, im Rahmen dieser Arbeit, unbekannt B-Symptomatiken, wie auch die generelle, unbekannt Konstitution des Patienten hinzuweisen. Das Gewebe, die Neoplasie und die Tumorgenese sind letztendlich so individuell wie der Patient selbst.

Trotz dieser Limitationen konnte gezeigt werden, dass digital-pathologische Analysen multidimensionaler Bilddaten weitreichende funktionelle und diagnostische Aufschlüsse über einzelne Gewebeprobe geben können, siehe Abschnitt 6.4. Doch bleibt auch festzuhalten, dass speziell für die Anwendung in der Routine zukünftig massive Veränderungen und Anpassungen des klinischen *Workflows* notwendig sein werden. Hierbei steht zunächst die Geschwindigkeit der Digitalisierung von Gewebeprobe im Fokus. Modernste *Whole slide scanner*, wie der hier vorwiegend eingesetzte NanoZoomer S360 der Firma Hamamatsu, ermöglichen die hochaufgelöste Digitalisierung einzelner Schnitte in wenigen Minuten. Doch die 3D- und 4D-Histologie bedarf noch eines weitaus höheren zeitlichen Aufwands, um hochaufgelöste mehrdimensionale Aufnahmen zu erzeugen. Dies ist in der klinischen Routine zuweilen nicht darstellbar. Auch ist der kurzfristige finanzielle Mehraufwand, bezogen auf die digitale Transformation des *Workflows* und die Etablierung der Geräte, verglichen mit bereits etablierten Methoden immens [136].

Neben dem benötigten technischen Fortschritt und der zu tätigen Investitionen bedarf es auch vor allem der Standardisierung und einer neudefinierten Qualitätssicherung der immunhistologischen Präprozessierung. Es ist bekannt, dass aufgrund der Variabilität des Gewebes die Möglichkeiten hier begrenzt sind und doch ist eine Angleichung der Prozesse und damit der Bildqualität über Kliniken hinweg unerlässlich, um einen sicheren Einsatz Computer-gestützter, (semi-

) automatischer Methoden zu gewährleisten. Gleichzeitig müssen Computergestützte Methoden robuster für Variationen der Bild- und Gewebequalität werden. Modernste Algorithmen, vorwiegend aus dem Bereich des maschinellen Lernens, liefern hier erste Ansätze [137, 138, 139]. Derzeit bezieht sich der Einsatz solcher Methoden noch meist auf die Segmentierung von Zellen und Tumorgeweben [139, 140, 141]. Doch werden Modelle des maschinellen Lernens auch mehr und mehr genutzt, um direkt Differenzen zwischen einzelnen Tumorantizitäten zu lernen und aufzuzeigen.

Eine weitere Rolle spielt die Erklärbarkeit solcher Modelle. Neueste Techniken ermöglichen hier nicht nur Neoplasien initial zu erkennen und einzelne Diagnosen zu unterscheiden, vielmehr können solche Modelle auch genutzt werden, um tumorspezifische, morphologische und funktionelle Rückschlüsse aus solchen Lernprozessen zu ziehen [142, 143].

Abschließend können Methoden des *data science*, im Speziellen dem maschinellen Lernen, zukünftig genutzt werden, um interdisziplinäre Datensätze zu verarbeiten, was aufgrund der steigenden Komplexität der Daten manuell nicht mehr darstellbar sein wird. So kann zukünftig die Reintegration medizinischer Fachgebiete gefördert werden, um schließlich eine ganzheitliche Betrachtung des Patienten zu ermöglichen [136].

Neben den positiven Aspekten zeigen sich jedoch auch Grenzen der digitalen Transformation der Pathologie. Betrachtet man die Möglichkeiten des maschinellen Lernens und der digitalen Pathologie im Kontext der angestrebten, individualisierten und personalisierten Diagnostik und Medizin, so zeigt sich, dass diese Methoden den Menschen im *Workflow* der Pathologie nicht substituieren können. Viel mehr erscheint das Konzept der CAD praktikabel. Diese umfasst die Inkorporation digital-pathologischer Methoden und Methoden des maschinellen Lernens zur Unterstützung des Pathologen im klinischen Alltag. Dies wird dazu führen, dass zukünftig ein weiterer Schritt in Richtung einer individuellen, objektiven und ganzheitlichen Diagnostik zugunsten des Patienten durch die Einbeziehung digitaler Parameter, wie sie im Rahmen dieser Doktorarbeit vorgestellt wurden, ermöglicht werden wird.

7 Zusammenfassung, Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden reaktive und neoplastische Lymphknotenpräparate digital-pathologisch phänotypisiert. Um dies zu realisieren, wurde zunächst eine digitale Gewebedatenbank aufgebaut. Ebenso war die Implementierung einer geeigneten IT-Infrastruktur vonnöten. Diese bestand aus diversen Hardwarekomponenten, wie auch aus dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten CMS DTMS. Darüber hinaus wurde ein effektiver Prozess zur Digitalisierung bestehender Objektträger entwickelt. Hierfür wurde die Softwareerweiterung DTMS-LP implementiert. DTMS-LP ermöglicht die Generierung neuer Label für Objektträger, welche alle relevanten Daten in maschinenlesbarer Form kodiert aufzeigen. Diese Daten können im Rahmen des Scanprozesses innerhalb des Dateinamens der Bilddaten gespeichert werden, sodass ein anschließender automatischer Import der Daten in die mittels DTMS verwaltete Datenbank möglich wird. Weiterhin wurde die Software *FAITH* zur (semi-) automatischen Analyse der gescannten WSI entwickelt. Die IT-Infrastruktur umfasst darüber hinaus die proprietäre Software IMARIS, sowie korrespondierende, individuelle Softwarelösungen zur Visualisierung der Daten und deren statistischen Auswertung.

Basierend auf der generierten digitalen Gewebedatenbank und der implementierten IT-Infrastruktur konnte eine digital-pathologische Phänotypisierung der Gewebeproben ermöglicht werden. Im Rahmen dieser Phänotypisierung wurden neue makroskopische, Keimzentrums-begrenzende Strukturen erstmals aufgedeckt und charakterisiert. Auch konnte das zelluläre Gleichgewicht innerhalb eines reaktiven Keimzentrums quantitativ beschrieben und nachgewiesen werden. Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurden mikroskopische und makroskopische Veränderungen in Neoplasien des Lymphknotens charakterisiert. Hierbei zeigten sich insbesondere morphologische Aberrationen des FRC-Netzwerks, welche meist mit einer strukturellen Destruktion des Lymphknotengewebes einhergeht. Diese Destruktion steht nachweislich in enger Verbindung mit der funktionellen Adaptionen der TAM im TME einer Neoplasie. Diese bekannten, funktionellen Aberrationen der TAM konnten teilweise mit morphologischen und distributionellen Veränderungen der TAM korreliert werden. Diese Aberrationen sind durch die Tumorgenese induziert und gehen auf genetische und funktionelle Veränderungen neoplastischer Zellen zurück. Diese Veränderungen spiegeln sich oftmals molekular in einer Veränderung des Antigenbesatzes dieser Zellen wider. Eine solche Veränderung konnte in Bezug auf eine generelle Reduktion der CD20-Antigendichte auf neoplastischen B-Zellen gezeigt werden.

All diese Erkenntnisse wurden abschließend dafür genutzt, um eine umfangreiche digital-pathologische Charakterisierung des HL zu ermöglichen. Es gelang zunächst morphologische Aberrationen der HRS-Zellen gegenüber reaktiven, CD30-positiven Zellen zu beschreiben. Diese Untersuchung belegte die in

der Literatur beschriebene Vergrößerung CD30-positiver Zellen in der HL. Auch konnte eine Veränderung des Konnektoms und des TME der HRS-Zellen aufgedeckt und parametrisiert werden. Es zeigte sich eine erhöhte Interaktionsrate der HRS-Zellen. Im Speziellen wiesen HRS-Zellen der NScHL eine verstärkte Tendenz zur Ausbildung von Zellnetzwerken auf. Verglichen hierzu zeigten HRS-Zellen der MCcHL eine erhöhte Tendenz zur Interaktion mit M1-Makrophagen. Bezüglich des TME der HRS-Zellen konnte eine Verringerung der B-Lymphozytenkonzentration aufgezeigt werden.

Abschließend wurden die gemessenen Parameter hinsichtlich der Berechenbarkeit in zweidimensionalen WSI untersucht. Nachweisbare Parameter wurden als digital-pathologisches Profile pro Gewebeprobe mithilfe von *FAITH* definiert und hinsichtlich ihrer diagnostischen Wertigkeit unter Einsatz eines *Random forest*-Klassifikators evaluiert. Es konnte eine diagnostische Potenz des digital-pathologischen Profils aufgezeigt werden. Dieser Prozess zeigte aber auch die Variabilität humaner Gewebeproben. Vor allem zeigte sich auch, dass große Überschneiden digital-pathologischer Eigenschaften zwischen reaktiven neoplastischen Subentitäten zu verzeichnen sind.

Daraus lässt sich ableiten, dass das Konzept verallgemeinerter Diagnosen Grenzen hat und zukünftig durch eine individuellere Betrachtung der vorliegenden Krankheiten abgelöst werden muss, um dem Patienten bestmöglich helfen zu können. In diesem Prozess können zukünftig digitale Biomarker eine tragende Rolle spielen. Diese können dazu dienen, Ausreißer zu detektieren, neue Subdiagnosen zu definieren und morphologische Manifestationen funktioneller Aberrationen aufzuzeigen. Auch werden zukünftig solch umfassende Untersuchungen, die ganzheitliche, interdisziplinäre Analyse der Lymphknoten, bis hin zu einer Modellierung reaktiver und pathologischer Prozesse und dem Generieren digitaler Zwillinge ermöglichen [144, 145, 136, 146]. Bis dies jedoch möglich ist, ist noch ein weiter Weg in der Vereinheitlichung immunhistologischer Präprozessierungsprozesse, der Digitalisierung der klinischen Routinen und einer fortschreitenden Robustheit digital-pathologischer Methoden zu gehen [136, 147, 148].

Literatur

- [1] PJ Delves und IM Roitt. „The Immune System“. In: *New England Journal of Medicine* (2000).
- [2] C Schütt und B Bröker. *Grundwissen Immunologie*. Springer-Verlag, 2011.
- [3] CL Willard-Mack. „Normal Structure, Function, and Histology of Lymph Nodes“. In: *Toxicologic Pathology* (2006).
- [4] G Höfler, H Kreipe, H Moch, W Böcker und H Denk. *Pathologie - Das Lehrbuch*. Elsevier, 2019.
- [5] K Murphy und C Weaver. *Janeway Immunologie*. Springer-Verlag, 2018.
- [6] P Dey. „Digital Pathology“. In: *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. Springer, 2023.
- [7] Y Song, K Kang, I Kim und TJ Kim. „Pathological Digital Biomarkers: Validation and Application“. In: *applied sciences* (2022).
- [8] Elisa Lin, Franklin Fuda, Hung S Luu, Andrew M Cox, Fengqi Fang, Junlin Feng und Mingyi Chen. „Digital pathology and artificial intelligence as the next chapter in diagnostic hematopathology“. In: *Seminars in Diagnostic Pathology* (2023).
- [9] M Thomos, P Wurzel, S Scharf, I Koch und ML Hansmann. „3D investigation shows walls and wall-like structures around human germinal centres, probably regulating T-and B-cell entry and exit“. In: *PLOS ONE* (2020).
- [10] E Donnadieu, Y Michel und ML Hansmann. „Live Imaging of Resident T-Cell Migration in Human Lymphoid Tissue Slices Using Confocal Microscopy“. In: *T-Cell Motility* (2019).
- [11] E Donnadieu, KB Reisinger, S Scharf, Y Michel, J Bein, S Hansen, AG Loth, N Flinner, S Hartmann und ML Hansmann. „Landscape of T Follicular Helper Cell Dynamics in Human Germinal Centers“. In: *The Journal of Immunology* (2020).
- [12] S Hartmann, S Scharf, Y Steiner, AG Loth, E Donnadieu, N Flinner, V Poeschel, S Angel, M Bewarder, J Bein, U Brunnberg, A Bozzato, B Schick, S Stilgenbauer, RM Bohle, L Thurner und ML Hansman. „Landscape of 4D Cell Interaction in Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphomas“. In: *Cancers* (2021).
- [13] S Hartmann und MK Hansmann. „Reaktive Lymphadenopathien“. In: *Die Pathologie* (2022).
- [14] SHE Kaufmann. „Organe des Immunsystems“. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 2020.
- [15] C Young und R Brink. „The unique biology of germinal center B cells“. In: *Immunity* (2021).

- [16] KM Hamel, VM Liarski und MR Clark. „Germinal Center B-cells“. In: *Autoimmunity* (2012).
- [17] B Ruffell, NI Affara und LM Coussens. „Differential macrophage programming in the tumor microenvironment“. In: *Trends in Immunology* (2012).
- [18] CP Verschoor, A Puchta und DME Bowdish. „The Macrophage“. In: *Leucocytes* (2012).
- [19] M Seifert und R Küppers. „Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation“. In: *Journal of Experimental Medicine* (2009).
- [20] R Küppers, M Zhao, ML Hansmann und K Rajewsky. „Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections“. In: *The EMBO Journal* (1993).
- [21] M Seifert, M Przekopowitz, S Taudien, A Lollies, V Ronge, B Drees, M Lindemann, H Hillen, H Engler, BB Singer und R Küppers. „Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2015).
- [22] L Mesin, J Ersching und GD Victora. „Germinal Center B Cell Dynamics“. In: *Immunity* (2016).
- [23] T Hodgkin. „On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen“. In: *Medico-Chirurgical Transactions* (1832).
- [24] A Mottok und C Steidl. „Biology of classical Hodgkin lymphoma: implications for prognosis and novel therapies“. In: *Blood* (2018).
- [25] R Küppers und ML Hansmann. „The Hodgkin and Reed/Sternberg cell“. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2005).
- [26] C Sternberg. „Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates“. In: *Zeitschrift für Heilkunde* (1898).
- [27] DM Reed. „On the Pathological Changes in Hodgkin’s Disease, with Special Reference to Its Relation to Tuberculosis“. In: *The Johns Hopkins Hospital Reports* (1902).
- [28] R Küppers, A Engert und ML Hansmann. „Hodgkin lymphoma“. In: *The Journal of Clinical Investigation* (2012).
- [29] LM Weiss, JKC Chan, K MacLennan und RA Warnke. „Pathology of classical Hodgkin’s disease“. In: *Hodgkin’s disease* (1999).
- [30] R Küppers. „The biology of Hodgkin’s lymphoma“. In: *Nature Reviews Cancer* (2009).

- [31] R Küppers, K Rajewsky, M Zhao, G Simons, R Laumann, R Fischer und M Hansmann. „Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1994).
- [32] M Müschen, K Rajewsky, A Bräuninger, A Sylvia Baur, JJ Oudejans, A Roers, ML Hansmann und R Küppers. „Rare Occurrence of Classical Hodgkin’s Disease as a T Cell Lymphoma“. In: *The Journal of Experimental Medicine* (2000).
- [33] RJ Lukes und JJ Butler. „The pathology and nomenclature of Hodgkin’s disease“. In: *Cancer research* (1966).
- [34] S Hartmann und ML Hansmann. „Hodgkin-Lymphome“. In: *Pathologie* (2019).
- [35] S Mathas, S Hartmann und R Küppers. „Hodgkin lymphoma: Pathology and biology“. In: *Seminars in Hematology*. 2016.
- [36] A Freedman und E Jacobsen. „Follicular lymphoma: 2020 update on diagnosis and management“. In: *American Journal of Hematology* (2020).
- [37] R Kridel, LH Sehn und RD Gascoyne. „Pathogenesis of follicular lymphoma“. In: *The Journal of Clinical Investigation* (2012).
- [38] Y Xie, S Pittaluga und ES Jaffe. „The Histological Classification of Diffuse Large B-cell Lymphomas“. In: *Seminars in Hematology*. 2015.
- [39] MP Menon, S Pittaluga und ES Jaffe. „The Histological and Biological Spectrum of Diffuse Large B-Cell Lymphoma in the World Health Organization Classification“. In: *The Cancer Journal* (2012).
- [40] A Dogan, AD Attygalle und C Kyriakou. „Angioimmunoblastic T-cell lymphoma“. In: *British Journal of Haematology* (2003).
- [41] A Attygalle, R Al-Jehani, TC Diss, P Munson, H Liu, MQ Du, PG Isaacson und A Dogan. „Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10“. In: *Blood* (2002).
- [42] SL Asplund, RW McKenna, MS Howard und SH Kroft. „Immunophenotype Does Not Correlate With Lymph Node Histology in Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma“. In: *The American Journal of Surgical Pathology* (2002).
- [43] M Bonato, S Pittaluga, A Tierens, A Criel, G Verhoef, I Wlodarska, L Vanutysel, L Michaux, P Vandekerckhove, H Van den Berghe und CMD De Wolf-Peeters. „Lymph Node Histology in Typical and Atypical Chronic Lymphocytic Leukemia“. In: *The American Journal of Surgical Pathology* (1998).
- [44] D Rossi, F Bertoni und E Zucca. „Marginal-zone lymphomas“. In: *New England Journal of Medicine* (2022).
- [45] PL Zinzani. „The many faces of marginal zone lymphoma“. In: *Hematology* (2012).

- [46] DD Weisenburger, H Kim und H Rappaport. „Mantle-zone lymphoma: A follicular variant of intermediate lymphocytic lymphoma“. In: *Cancer* (1982).
- [47] JO Armitage und DL Longo. „Mantle-cell Lymphoma“. In: *New England Journal of Medicine* (2022).
- [48] SA Pileri und B Falini. „Mantle cell lymphoma“. In: *Haematologica* (2009).
- [49] PS Liao, TS Chen und PC Chung. „A fast algorithm for multilevel thresholding“. In: *Journal of Information Science and Engineering* (2001).
- [50] S Arora, J Acharya, A Verma und PK Panigrahi. „Multilevel thresholding for image segmentation through a fast statistical recursive algorithm“. In: *Pattern Recognition Letters* (2008).
- [51] AC Ruifrok und DA Johnston. „Quantification of histochemical staining by color deconvolution“. In: *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* (2001).
- [52] B Belean, M Borda, J Ackermann, I Koch und O Balacescu. „Unsupervised image segmentation for microarray spots with irregular contours and inner holes“. In: *BMC bioinformatics* (2015).
- [53] WE Lorensen und HE Cline. „Marching Cubes: A High Resolution 3D Surface Construction Algorithm“. In: *ACM SIGGRAPH Computer Graphics* (1987).
- [54] JR Weaver. „Centrosymmetric (Cross-Symmetric) Matrices, Their Basic Properties, Eigenvalues, and Eigenvectors“. In: *The American Mathematical Monthly* (1985).
- [55] R Gommers, P Virtanen, E Burovski, TE Oliphant, W Weckesser, D Cournapeau, M Haberland, T Reddy, P Peterson, A Nelson, J Wilson, MN Endolith, I Polat, S Van Der Walt, D Laxalde, M Brett, E Larson, J Millman, P Lars, P Van Mulbregt, P ROY, CCJ Eric-Jones, A Sakai, E Moore, R Kern und T Leslie. „scipy/scipy: SciPy 1.7. 3“. In: *Zenodo* (2021).
- [56] C Bilgin, C Demir, C Nagi und B Yener. „Cell-Graph Mining for Breast Tissue Modeling and Classification“. In: *29th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. 2007.
- [57] CC Bilgin, P Bullough, GE Plopper und B Yener. „ECM-aware cell-graph mining for bone tissue modeling and classification“. In: *Data Mining and Knowledge Discovery* (2010).
- [58] H Schäfer, T Schäfer, J Ackermann, N Dichter, V Döring, S Hartmann, ML Hansmann und I Koch. „CD30 cell graphs of Hodgkin lymphoma are not scale-free—an image analysis approach“. In: *Bioinformatics* (2016).
- [59] BN Clark, CJ Colbourn und DS Johnson. „Unit disk graphs“. In: *Discrete Mathematics* (1990).

- [60] BM Waxman. „Routing of multipoint connections“. In: *IEEE Journal on Selected Areas in Communications* (1988).
- [61] C Gunduz, B Yener und SH Gultekin. „The cell graphs of cancer“. In: *Bioinformatics* (2004).
- [62] F Pedregosa, G Varoquaux, A Gramfort, V Michel, B Thirion, O Grisel, M Blondel, P Prettenhofer, R Weiss, V Dubourg, J Vanderpals, A Passos, D Cournapeau, M Brucher und M Perrot. „Scikit-learn: Machine learning in Python“. In: *Journal of Machine Learning Research* (2011).
- [63] MA Terpilowski. „scikit-posthocs: Pairwise multiple comparison tests in Python“. In: *Journal of Open Source Software* (2019).
- [64] WH Kruskal und WA Wallis. „Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis“. In: *Journal of the American Statistical Association* (1952).
- [65] HB Mann und DR Whitney. „On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other“. In: *The Annals of Mathematical Statistics* (1947).
- [66] A Di Bucchianico. „Combinatorics, computer algebra and the Wilcoxon-Mann-Whitney test“. In: *Journal of Statistical Planning and Inference* (1999).
- [67] MP Fay und MA Proschan. „Wilcoxon-Mann-Whitney or t-test? On assumptions for hypothesis tests and multiple interpretations of decision rules“. In: *Statistics Surveys* (2010).
- [68] OJ Dunn. „Multiple Comparisons among Means“. In: *Journal of the American Statistical Association* (1961).
- [69] OJ Dunn. „Multiple comparisons using rank sums“. In: *Technometrics* (1964).
- [70] L Sachs und J Hedderich. *Angewandte Statistik - Methodensammlung mit R*. Springer, 2002.
- [71] P Sedgwick. „Multiple significance tests: the Bonferroni correction“. In: *BMJ* (2012).
- [72] Y Benjamini und Y Hochberg. „Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing“. In: *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* (1995).
- [73] J Benesty, J Chen, Y Huang und I Cohen. „Pearson Correlation Coefficient“. In: *Noise Reduction in Speech Processing*. 2009.
- [74] J Cohen. „The t test for means. Statistical power analysis for the behavioural sciences“. In: *Hillsdale, NJ, Earlbaum* (1988).
- [75] N Halko, PG Martinsson und JA Tropp. „Finding Structure with Randomness: Probabilistic Algorithms for Constructing Approximate Matrix Decompositions“. In: *SIAM Review* (2011).

- [76] PG Martinsson, V Rokhlin und M Tygert. „A randomized algorithm for the decomposition of matrices“. In: *Applied and Computational Harmonic Analysis* (2011).
- [77] S Lloyd. „Least squares quantization in PCM“. In: *IEEE Transactions on Information Theory* (1982).
- [78] M Ester, HP Kriegel, J Sander und X Xu. „A Density-Based Algorithm for Discovering Clusters in Large Spatial Databases with Noise“. In: *Proceedings of 2nd International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*. 1996.
- [79] J Sander, M Ester, HP Kriegel und X Xu. „Density-Based Clustering in Spatial Databases: The Algorithm GDBSCAN and Its Applications“. In: *Data Mining and Knowledge Discovery* (1998).
- [80] E Schubert, J Sander, M Ester, HP Kriegel und X Xu. „DBSCAN Revisited, Revisited: Why and How You Should (Still) Use DBSCAN“. In: *ACM Transactions on Database Systems* (2017).
- [81] G Louppe, L Wehenkel, A Sutera und P Geurts. „Understanding variable importances in forests of randomized trees“. In: *Advances in Neural Information Processing Systems* (2013).
- [82] CH Park. „A Feature Selection Method Using Hierarchical Clustering“. In: *Mining Intelligence and Knowledge Exploration*. 2013.
- [83] SB Kotsiantis. „Decision trees: a recent overview“. In: *Artificial Intelligence Review* (2013).
- [84] L Breiman. „Bagging predictors“. In: *Machine Learning* (1996).
- [85] L Breiman. „Random Forests“. In: *Machine Learning* (2001).
- [86] J Schindelin, I Arganda-Carreras, E Frise, V Kaynig, M Longair, T Pietzsch, S Preibisch, C Rueden, S Saalfeld, B Schmid, JY Tinevez, DJ White, V Hartenstein, K Eliceiri, P Tomancak und A Cardona. „Fiji: an open-source platform for biological-image analysis“. In: *Nature Methods* (2012).
- [87] A Dutta und A Zisserman. „The VIA Annotation Software for Images, Audio and Video“. In: *Proceedings of the 27th ACM International Conference on Multimedia*. 2019.
- [88] Imageio Development Team. *Imageio*. 2022. URL: <https://imageio.readthedocs.io/en/stable/>.
- [89] Joblib Development Team. *Joblib: running Python functions as pipeline jobs*. 2021. URL: <https://joblib.readthedocs.io/>.
- [90] LP Coelho. „Mahotas: Open source software for scriptable computer vision“. In: *arXiv* (2012).
- [91] JD Hunter. „Matplotlib: A 2D graphics environment“. In: *Computing in Science & Engineering* (2007).

- [92] A Hagberg, D Schult und P Swart. „Exploring network structure, dynamics, and function using NetworkX“. In: *Proceedings of the 7th Python in Science Conference (SciPy2008)*. 2008.
- [93] CR Harris, KJ Millman, SJ van der Walt, R Gommers, P Virtanen, D Cournapeau, E Wieser, J Taylor, S Berg, NJ Smith, R Kern, M Picus, S Hoyer, MH van Kerkwijk, M Brett, A Haldane, J Fernández del Río, M Wiebe, P Peterson, P Gérard-Marchant, K Sheppard, T Reddy, W Weckesser, H Abbasi, C Gohlke und TE Oliphant. „Array programming with NumPy“. In: *Nature* (2020).
- [94] W McKinney. „Data Structures for Statistical Computing in Python“. In: *Proceedings of the 9th Python in Science Conference*. 2010.
- [95] Pillow Development Team. *Pillow: Python Imaging Library (Fork)*. 2022. URL: <https://pillow.readthedocs.io/en/stable/index.html>.
- [96] python-bioformats Development Team. *Python-bioformats*. 2021. URL: <https://github.com/CellProfiler/python-bioformats/>.
- [97] python-javabridge Development Team. *Python-javabridge*. 2021. URL: <https://github.com/CellProfiler/python-javabridge/>.
- [98] S van der Walt, JL Schönberger, J Nunez-Iglesias, F Boulogne, JD. Warner, N Yager, E Gouillart, T Yu und the scikit-image contributors. „scikit-image: image processing in Python“. In: *PeerJ* (2014).
- [99] Michael LW. „seaborn: statistical data visualization“. In: *Journal of Open Source Software* (2021).
- [100] statannotations Development Team. *Statannotations: add statistical significance annotations on seaborn plots*. 2022. URL: <https://github.com/trevismd/statannotations>.
- [101] CO da Costa-Luis. „tqdm: A fast, extensible progress meter for python and cli“. In: *Journal of Open Source Software* (2019).
- [102] A Schmitz, T Schäfer, H Schäfer, C Döring, J Ackermann, N Dichter, S Hartmann, ML Hansmann und I Koch. „Automated Image Analysis of Hodgkin lymphoma“. In: *arXiv:1209.3189* (2012).
- [103] T Schäfer, H Schäfer, A Schmitz, J Ackermann, N Dichter, C Döring, S Hartmann, ML Hansmann und I Koch. „Image database analysis of Hodgkin lymphoma“. In: *Computational Biology and Chemistry* (2013).
- [104] J Hannig, H Schäfer, J Ackermann, M Hebel, T Schäfer, C Döring, S Hartmann, ML Hansmann und I Koch. „Bioinformatics analysis of whole slide images reveals significant neighborhood preferences of tumor cells in Hodgkin lymphoma“. In: *PLOS Computational Biology* (2020).
- [105] H Gollek. „Praktikumsbericht“. Forschungspraktikum. Goethe University, Frankfurt am Main, 2018.

- [106] J Moore, M Linkert, C Blackburn, M Carroll, RK Ferguson, H Flynn, K Gillen, R Leigh, S Li, D Lindner, WJ Moore, AJ Patterson, B Pindelski, ER Ramalingam, A Tarkowska, P Walczysko, C Allan, JM Burel und J Swedlow. „OMERO and Bio-Formats 5: flexible access to large bioimaging datasets at scale“. In: *Medical Imaging 2015: Image Processing*. 2015.
- [107] P Wurzel, J Ackermann, H Schäfer, S Scharf, ML Hansmann und I Koch. „Detection of follicular regions in actin-stained whole slide images of the human lymph node by shock filter“. In: *Biological Chemistry* (2021).
- [108] SA Glantz. *Primer of biostatistics*. McGraw-Hill Medical, 2012.
- [109] MC Schemel, P Wurzel, S Scharf, H Schäfer, S Hartmann, I Koch und ML Hansmann. „Three-dimensional human germinal centers of different sizes in patients diagnosed with lymphadenitis show comparative constant relative volumes of B cells, T cells, follicular dendritic cells, and macrophages“. In: *Acta Histochemica* (2023).
- [110] MS Oswald, P Wurzel und ML Hansmann. „3D analysis of morphological alterations of the fibroblastic reticular cells in reactive and neoplastic human lymph nodes“. In: *Acta Histochemica* (2019).
- [111] TF Tedder, M Streuli, SF Schlossman und H Saito. „Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1988).
- [112] K Kläsener, J Jellusova, G Andrieux, U Salzer, C Böhler, SN Steiner, JB Albinus, M Cavallari, B Süß, RE Voll, M Boerries, B Wollscheid und M Reth. „CD20 as a gatekeeper of the resting state of human B cells“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2021).
- [113] KC Anderson, MP Bates, BL Slaughenhaupt, GS Pinkus, SF Schlossman und LM Nadler. „Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation“. In: *Blood* (1984).
- [114] J Banchereau und F Rousset. „Human B Lymphocytes: Phenotype, Proliferation, and Differentiation“. In: *Advances in Immunology* (1992).
- [115] GJ Weiner. „Rituximab: mechanism of action“. In: *Seminars in Hematology*. 2010.
- [116] CS Tam, J Otero-Palacios, LV Abruzzo, JL Jorgensen, A Ferrajoli, WG Wierda, S Lerner, S O’Brien und MJ Keating. „Chronic lymphocytic leukaemia CD20 expression is dependent on the genetic subtype: a study of quantitative flow cytometry and fluorescent in-situ hybridization in 510 patients“. In: *British Journal of Haematology* (2008).
- [117] C Fang, Y Zhuang, L Wang, L Fan, YJ Wu, R Zhang, ZJ Zou, LN Zhang, S Yang, W Xu und JY Li. „High levels of CD20 expression predict good prognosis in chronic lymphocytic leukemia“. In: *Cancer Science* (2013).

- [118] VK Prevodnik, J Lavrenčak, M Horvat und BJ Novakovič. „The predictive significance of CD20 expression in B-cell lymphomas“. In: *Diagnostic Pathology* (2011).
- [119] SH Olejniczak, CC Stewart, K Donohue und MS Czuczman. „A Quantitative Exploration of Surface Antigen Expression in Common B-Cell Malignancies Using Flow Cytometry“. In: *Immunological Investigations* (2006).
- [120] L Ginaldi, M De Martinis, E Matutes, N Farahat, R Morilla und D Catovsky. „Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias“. In: *Journal of Clinical Pathology* (1998).
- [121] YO Huh, MJ Keating, HL Saffer, I Jilani, S Lerner und M Albitar. „Higher levels of surface CD20 expression on circulating lymphocytes compared with bone marrow and lymph nodes in B-cell chronic lymphocytic leukemia“. In: *American journal of Clinical Pathology* (2001).
- [122] PC Maity, A Blount, H Jumaa, O Ronneberger, BF Lillemeier und M Reth. „B cell antigen receptors of the IgM and IgD classes are clustered in different protein islands that are altered during B cell activation“. In: *Science Signaling* (2015).
- [123] G Pavlasova und M Mraz. „The regulation and function of CD20: an “enigma” of B-cell biology and targeted therapy“. In: *Haematologica* (2020).
- [124] M Becker, E Hobeika, H Jumaa, M Reth und PC Maity. „CXCR4 signaling and function require the expression of the IgD-class B-cell antigen receptor“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2017).
- [125] R Küppers, ULF Klein, ML Hansmann und K Rajewsky. „Cellular Origin of Human B-Cell Lymphomas“. In: *New England Journal of Medicine* (1999).
- [126] A Bräuninger, ML Hansmann, JG Strickler, R Dummer, G Burg, K Rajewsky und R Küppers. „Identification of Common Germinal-Center B-Cell Precursors in Two Patients with Both Hodgkin’s Disease and Non-Hodgkin’s Lymphoma“. In: *New England Journal of Medicine* (1999).
- [127] J Liebers, P Wurzel, KB Reisinger und ML Hansmann. „3D image analysis reveals differences of CD30 positive cells and network formation in reactive and malignant human lymphoid tissue (classical Hodgkin Lymphoma)“. In: *PLOS ONE* (2019).
- [128] L Lumer, P Wurzel, S Scharf, H Schäfer, J Ackermann, I Koch und ML Hansmann. „3D connectomes of reactive and neoplastic CD30 positive lymphoid cells and surrounding cell types“. In: *Acta Histochemica* (2021).
- [129] L Pantanowitz. „Digital images and the future of digital pathology“. In: *Journal of pathology informatics* (2010).
- [130] LS Chow und R Paramesran. „Review of medical image quality assessment“. In: *Biomedical Signal Processing and Control* (2016).

- [131] MS Hosseini, JAZ Brawley-Hayes, Y Zhang, L Chan, KN Plataniotis und S Damaskinos. „Focus Quality Assessment of High-Throughput Whole Slide Imaging in Digital Pathology“. In: *IEEE Transactions on Medical Imaging* (2019).
- [132] A Janowczyk, A Basavanthally und A Madabhushi. „Stain normalization using sparse autoencoders (StaNoSA): application to digital pathology“. In: *Computerized Medical Imaging and Graphics* (2017).
- [133] P Wagner, N Strodthoff, P Wurzel, A Marban, S Scharf, H Schäfer, P Seegerer, A Loth, S Hartmann, F Klauschen, KR Müller, W Samek und ML Hansmann. „New definitions of human lymphoid and follicular cell entities in lymphatic tissue by machine learning“. In: *Scientific Reports* (2022).
- [134] JY Sung, DG Na, KS Kim, H Yoo, H Lee, JH Kim und JH Baek. „Diagnostic accuracy of fine-needle aspiration versus core-needle biopsy for the diagnosis of thyroid malignancy in a clinical cohort“. In: *European Radiology* (2012).
- [135] MC Skrzynski, JS Biermann, A Montag und MA Simon. „Diagnostic Accuracy and Charge-Savings of Outpatient Core Needle Biopsy Compared with Open Biopsy of Musculoskeletal Tumors“. In: *The Journal of Bone & Joint Surgery* (1996).
- [136] ML Hansmann, F Klauschen, W Samek, KR Müller, E Donnadieu, S Scharf, S Hartmann, I Koch, J Ackermann, L Pantanowitz, H Schäfer und P Wurzel. „Imaging bridges pathology and radiology“. In: *Journal of Pathology Informatics* (2023).
- [137] T Falk, D Mai, R Bensch, Ö Çiçek, A Abdulkadir, Y Marrakchi, A Böhm, J Deubner, Z Jäckel, K Seiwald, A Dovzhenko, O Tietz, C Dal Bosco, S Walsh, D Saltukoglu, LT Tay, M Prinz, K Palme, M Simons, I Diester, T Brox und O Ronneberger. „U-Net: deep learning for cell counting, detection, and morphometry“. In: *Nature Methods* (2019).
- [138] J Van der Laak, G Litjens und F Ciampi. „Deep learning in histopathology: the path to the clinic“. In: *Nature Medicine* (2021).
- [139] C Stringer, T Wang, M Michaelos und M Pachitariu. „Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation“. In: *Nature Methods* (2021).
- [140] K Sharma, A Kaur und S Gujral. „Brain Tumor Detection based on Machine Learning Algorithms“. In: *International Journal of Computer Applications* 103.1 (2014).
- [141] S Försch, F Klauschen, P Hufnagl und W Roth. „Artificial Intelligence in Pathology“. In: *Deutsches Ärzteblatt International* (2021).
- [142] S Bach, A Binder, G Montavon, F Klauschen, KR Müller und W Samek. „On Pixel-Wise Explanations for Non-Linear Classifier Decisions by Layer-Wise Relevance Propagation“. In: *PLOS ONE* (2015).

- [143] G Montavon, W Samek und KR Müller. „Methods for interpreting and understanding deep neural networks“. In: *Digital Signal Processing* (2018).
- [144] S Scharf, J Ackermann, L Bender, P Wurzel, H Schäfer, ML Hansmann und I Koch. „Holistic View on the Structure of Immune Response: Petri Net Model“. In: *Biomedicines* (2023).
- [145] T Sun, X He und Z Li. „Digital twin in healthcare: Recent updates and challengess“. In: *Digital Health* (2023).
- [146] B Fleisher, A N Brown und S Ait-Oudhia. „Application of pharmacometrics and quantitative systems pharmacology to cancer therapy: The example of luminal a breast cancer“. In: *Pharmacological Research* (2017).
- [147] SW Jahn, M Plass und F Moifar. „Digital Pathology: Advantages, Limitations and Emerging Perspectives“. In: *Journal of Clinical Medicine* (2020).
- [148] MKK Niazi, AV Parwani und MN Gurcan. „Digital pathology and artificial intelligence“. In: *The Lancet Oncology* (2019).

Anhang

Links zu den aktuellen Softwareversionen von *Digital Tissue Management Suite* (DTMS), *Digital tissue management suite - Labelprinter* (DTMS-LP) und *Feature analysis in tissue histomorphometry* (FAITH):

<https://github.com/patrick1238/DTMS>

<https://github.com/patrick1238/DTMS-LP>

<https://github.com/patrick1238/FAITH>



Publiziert unter der Creative Commons-Lizenz Namensnennung (CC BY) 4.0 International.
Published under a Creative Commons Attribution (CC BY) 4.0 International License.
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>