

Aus der Klinik und Poliklinik für Radioonkologie und Strahlentherapie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Hypoxie – assoziierte Faktoren als Prädiktoren für das Ansprechen auf eine
kombinierte Radio – und Immuntherapie beim zerebral metastasierten malignen
Melanom

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Maximilian Haist
aus Mainz

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachter:

Tag der Promotion:

06. Juli 2021

-Für meine lieben Eltern und Großeltern-

Inhaltsverzeichnis

ABSTRACT	- 1 -
I. EINLEITUNG	- 3 -
1. Vorwort	- 3 -
2. Das maligne Melanom	- 8 -
2.1. Epidemiologie	- 8 -
2.2. Ätiologie und Pathogenese.....	- 9 -
2.3. Tumormimmunologie des malignen Melanoms.....	- 10 -
2.4. Klinik und Diagnostik	- 12 -
2.5. Histopathologie	- 12 -
2.6. Stadieneinteilung und Staging-Untersuchungen	- 13 -
2.7. Prognosefaktoren des malignen Melanoms.....	- 14 -
2.8. Therapie.....	- 15 -
3. Die Bedeutung der Tumorhypoxie in soliden Tumoren	- 26 -
3.1. Begriffsdefinition „Tumor-Hypoxie“	- 26 -
3.2. Ursachen der Tumorhypoxie	- 27 -
3.3. Auswirkungen der Tumorhypoxie auf das Tumormikromilieu.....	- 29 -
3.4. Zusammenspiel der Tumorhypoxie und der Akkumulation extrazellulären Adenosins bei der Inhibition der anti-Tumor-Immunantwort.....	- 34 -
3.5. Klinische Bedeutung der Tumorhypoxie in der Therapie solider Tumoren.....	- 37 -
4. Rolle der multiplex-Immunfluoreszenz bei der Darstellung der spatialen und zellulären Heterogenität innerhalb des Tumormikromilieus	- 41 -
4.1. Das Konzept der Surrogatmarker zur Bestimmung der Tumorhypoxie und des extrazellulären Adenosins in der multiplex-Immunfluoreszenz.....	- 42 -
4.2. Vorgehen zur Auswahl der Biomarker für die multiplex-Immunfluoreszenz.....	- 45 -
4.3. Klinische Bedeutung der Erfassung spatialer Interaktionen innerhalb des Tumormikromilieus.....	- 47 -
5. Fragestellung und Ziel der Dissertation	- 48 -
II. MATERIAL UND METHODEN	- 49 -
1. Material	- 49 -
1.1. Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte	- 49 -
1.2. Medien und Chemikalien	- 50 -
1.3. Gebrauchslösungen	- 51 -
1.4. Antikörper	- 52 -
1.5. Fluorochrome	- 52 -
1.6. Softwareprogramme zur Bild- und Statistikanalyse.....	- 53 -
2. Methoden	- 54 -

2.1.	Studienprotokoll und Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen	- 56 -
2.2.	Arbeitsablauf der digital-ausgeführten einzelzellbasierten, quantitativen Bildanalyse der Immunfluoreszenzfärbungen in QuPath.....	- 60 -
2.3.	Statistische Datenanalyse	- 64 -
III.	ERGEBNISSE	- 76 -
1.	Visuelle Analyse der tumorimmunologischen Architektur des Melanoms.....	- 76 -
1.1.	GLUT-1 als endogener Surrogat-Marker der Hypoxie im malignen Melanom.....	- 76 -
1.2.	CD73 als möglicher Surrogatmarker des Adenosinstoffwechsels im Melanom.....	- 80 -
1.3.	Darstellung der anti-Tumor Immunantwort durch CD8 positive Lymphozyten.....	- 82 -
2.	Nachweis Hypoxie-vermittelter Mechanismen der Immunsuppression im malignen Melanom mittels spatialer Interaktionsanalysen	- 85 -
2.1.	Hypoxische Inhibition CD8 positiver Immunzellen.....	- 85 -
2.2.	Adenosin-vermittelte Inhibition CD8 positiver Immunzellen.....	- 92 -
3.	Wertigkeit der untersuchten Marker als prädiktive Faktoren für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie beim malignen Melanom.....	- 96 -
3.1.	Das Ausmaß der Tumor-Hypoxie als prädiktiver Faktor für das Therapienansprechen auf eine Radioimmuntherapie beim zerebral metastasierten malignen Melanom.....	- 96 -
3.2.	Die intratumorale CD73 Expression als möglicher prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie beim zerebral metastasierten malignen Melanom.....	- 98 -
3.3.	Bedeutung der intratumoralen Infiltration CD8 positiver Lymphozyten als Prädiktor für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie beim zerebral metastasierten Melanom	- 100 -
3.4.	Relevanz der Therapieabfolge einer Radioimmuntherapie für das klinische Outcome von Patienten mit zerebral metastasiertem Melanom.....	- 102 -
IV.	DISKUSSION	- 103 -
1.	Kartierung der Tumorerogenität mithilfe der digitalisierten Bildanalyse aus whole-slide multiplex-Immunfluoreszenz-Präparaten.....	- 106 -
1.1.	Einordnung des methodischen Vorgehens in den wissenschaftlichen Kontext	- 106 -
1.2.	Die digitalisierte Bildanalyse in QuPath zur Erfassung spatialer Interaktionen	- 108 -
1.3.	Methodische Schwächen der einzelzellbasierten quantitativen Analyse	- 110 -
2.	Nachweis hypoxisch-vermittelter Mechanismen zur Inhibition einer anti-Tumor Immunantwort im Tumormikromilieu des malignen Melanoms	- 112 -
3.	Klinische Relevanz prädiktiver Biomarker für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie beim zerebral metastasierten malignen Melanom	- 115 -
3.1.	CD8 positive zytotoxische Lymphozyten als Prädiktoren eines Ansprechens auf eine Radioimmuntherapie beim zerebral metastasierten malignen Melanom	- 116 -
3.2.	Bedeutung von GLUT-1 als endogener Hypoxiemarker und prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie beim zerebral metastasierten Melanom	- 120 -
3.3.	<i>In-vivo</i> -Relevanz CD73-generierten extrazellulären Adenosins für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie beim zerebral metastasierten malignen Melanom.....	- 122 -
V.	ZUSAMMENFASSUNG	- 126 -

VI.	ABBILDUNGS – UND TABELLENVERZEICHNIS	- 128 -
VII.	BIBLIOGRAPHIE	- 133 -
VIII.	ANHANG	- 145 -
IX.	DANKSAGUNG	- 169 -
X.	ERKLÄRUNGEN	- 170 -
XI.	VERÖFFENTLICHUNG	- 173 -
XII.	LEBENS LAUF	- 174 -

Abkürzungsverzeichnis

A_{2A}R	Adenosin-Rezeptor vom Typ A ₂
ATP	Adenosintriphosphat
ADA	Adenosin-Desaminase
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (engl. antibody-dependent cellular cytotoxicity)
ADO	extrazelluläres Adenosin
Ak	Antikörper (engl. antibody, Ab)
APZ	Antigenpräsentierende Zelle(n) (engl. antigen-presenting cells)
CA	Karboanhydrase (engl. carbonic anhydrase)
CD	Unterscheidungsgruppe(n) (engl. Cluster of differentiation)
CDC	Komplement-abhängige Zytotoxizität (engl. complement-dependent-cytotoxicity)
CT	Computertomographie
CTL	Zytotoxische(r) T-Lymphozyt(en) (engl. cytotoxic T-lymphocytes)
CTLA-4	engl. cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (auch: CD 152)
Cy	Cyanine
DAMP	Schädigungsassoziierte molekulare Muster (engl. danger-associated molecular patterns)
DZ	Dendritische Zelle(n) (engl. dendritic cells)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl. epidermal growth factor receptor)
ENT 1	äquibrativer Nucleosidtransporter 1 (engl. equilibrative nucleoside transporter 1)
<i>et. al.</i>	und andere (lat. et alii (m), et aliae (f) oder et alia (n))
EZR	Extrazellularraum
FDA	Staatliche Arzneimittelbehörde der USA (engl. Federal Drug Agency)
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. fibroblast growth factor)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GLUT	Glukosetransporter
HIF-1α	Hypoxie- induzierbarer Faktor 1 α (engl. Hypoxia-inducible factor 1 α)
ICD	immunogener Zelltod (engl. immunogenic cell death)
IF	Immunfluoreszenz
IFN-γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IPI	Ipilimumab
K	Kilo (=tausend)
95 % KI	95 Prozent-Konfidenzintervall
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LK	Lymphknoten (engl. lymph node, LN)

M	Molar
mAb	monoklonaler Antikörper (engl. monoclonal Antibody)
MDSC	Myeloide Suppressorzelle(n) (engl. myeloid-derived suppressor cells)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
mIHC	multiplex Immunhistochemie
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
Na⁺/ K⁺	Natrium-Kalium
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen (engl. natural killer cells)
OER	Sauerstoffverstärkungsfaktor (engl. oxygen enhancement ratio)
OS	Gesamtüberleben (engl. overall survival)
p	p-Wert, Signifikanzwert (engl. p-value, p)
p.a.	analyserein (lat. pro analysi)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. Phosphate buffered saline)
PD-1	Programmiertes Zelltod-Protein 1 (engl. programmed cell death protein 1)
PD-L1	Programmierter Zelltod Ligand-1 (engl. programmed cell death ligand 1)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFS	Progressionsfreies Überleben (progression free survival)
pO₂	Sauerstoffpartialdruck
ROC-Kurve	Grenzwertoptimierungskurve (engl. receiver operating characteristic-curve)
ROS	reaktive Sauerstoff (O ₂)-Spezies (engl. reactive oxygen species)
ROI	interessierende Region (engl. Region of interest)
STX	stereotaktische Strahlentherapie
TAA	Tumorassoziertes Antigen(e) (engl. tumor associated antigens)
TAM	tumorassozierte Makrophagen (engl. tumor associated macrophages)
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor-Beta (engl. transforming growth-factor-β)
TIL	Tumor-infiltrierend(e) Lymphozyt(en) (engl. tumor-infiltrating lymphocytes)
TLR	Toll-like-Rezeptor (engl. toll-like-receptor)
TME	Tumormikromilieu(s) (engl. tumor microenvironment)
TNF	Tumornekrosefaktor
T_{reg}	regulatorische T-Zelle(n) (engl. regulatory T cells)
TZR	T-Zell-Rezeptor
μg	Maßeinheit Mikrogramm (=ein millionstel Gramm, g)
μm	Maßeinheit Mikrometer (=ein millionstel Meter, m)
μl	Maßeinheit Mikroliter (=ein millionstel Liter, l)
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. vascular endothelial growth factor)
vs.	versus
WBRT	Ganzhirnbestrahlung (engl. whole brain radiotherapy)

Abstract

Malignant melanoma is among the five most common forms of cancer in the western world and has shown the fastest increase in incidence worldwide, presumably due to lifestyle changes. The mortality rate has been reduced by improvements in the therapy of locoregional disease stages. However, at an advanced stage, melanoma still represents a significant threat to public health, requiring various treatments in an interdisciplinary approach. Melanoma is considered a highly immunogenic tumor. Hence, immunotherapy is in the focus of attention to address this problem.

Immunotherapy with the anti-CTLA-4 mAb Ipilimumab (IPI) has led to profound and durable tumor regressions in some patients with melanoma metastatic to the brain but failed to reproduce this effect in others. Here, we have investigated possible mechanisms that may mediate resistance to a combination of radio- and immunotherapy in such patients. We have established predictive markers for the response of patients with metastatic melanoma to combined "radioimmunotherapy." Among these mechanisms of resistance, hypoxia has been reported to tip the scale towards immune escape by the generation of immunosuppressive adenosine (ADO) via 5'-ectonucleotidase (CD73) on malignant cells. Conversely, radiotherapy causes immunogenic cell death and may stimulate anti-tumoral immune reactions, which can be further enhanced by the application of immune checkpoint inhibitors. We reasoned that melanomas with high baseline numbers of CD8⁺ cytotoxic T-lymphocytes, low hypoxia, and low CD73 expression might show a better clinical outcome even in an advanced stage of the disease. We have tested this hypothesis in a cohort of 35 patients who received radiotherapy (either whole-brain radiotherapy, WBRT, or stereotactic radiotherapy, STX, or both) for brain metastases of malignant melanomas in conjunction with IPI.

We have used 4-plex fluorescence immunostains to analyze the number of CD8⁺ cytotoxic T-lymphocytes (CTL), the tumor immune phenotype – assessed by the infiltration pattern of CD8⁺ CTL – the expression of the hypoxia-associated marker glucose transporter (GLUT)-1, and the ADO-generating enzyme CD73 in various archived tumor tissues of these patients. Single-cell-based analyses were carried out using the DAPI channel for the segmentation of cell nuclei in the open-source software QuPath. Of note, IPI was administered within a median time interval of one month before or after irradiation in this cohort of patients. Since the CNS is an immunoprivileged site, we carried out a separate analysis excluding three patients for whom only CNS tissue was available for study (n = 33). A detailed spatial analysis of the relative localization of CD8⁺ CTL and GLUT-1^{high} tumor cells was implemented using the ImageJ/Fiji Plugin MosaicIA.

Results show that CD8⁺ cells regularly show clustering in the stroma and infiltrate melanoma cell aggregates to varying degrees. The expression of CD73, contrary to our expectations, was also predominantly found in stromal areas. CD73 expression was substantially weaker or even absent in the majority of melanoma cells. Conversely, expression of GLUT-1 in melanoma cells was widespread, intense, and followed a pattern which reflects the diffusion properties of oxygen in the tissue.

Spatial analysis in MosaicIA revealed statistically significant clustering of CD8⁺ and CD73⁺ cells in stromal areas. Moreover, we could find evidence for a hypoxic inhibition of CD8⁺ CTL in the spatial analysis. Here, CD8⁺ CTL were excluded from hypoxic, GLUT-1 positive areas in most of the tumor tissues. Besides, correlation analysis also revealed a significant negative correlation between the amount of CD8⁺ CTL and hypoxic tumor cells among the investigated cohort.

Furthermore, we could find that CD8⁺ CTL numbers above the median were correlated with a significantly longer median overall survival. When solely analyzing non-CNS tissue, this correlation became even stronger. As expected, better-oxygenated tumors had better outcomes, as assessed by GLUT-1 expression dichotomized at the median. Contrary, the extent of CD73 expression was not prognostic. However, a subpopulation of patients with a CD73^{high}/GLUT-1^{high} pattern showed a repulsive effect on CTL accumulation in spatial analyses. As reported earlier, patients receiving IPI after radiotherapy survived significantly longer than those who received IPI before brain irradiation.

In conclusion, our data indicate that an "inflamed" tumor phenotype in initial, non-CNS tissue samples is a relatively stable trait that has prognostic relevance even after the disease has later progressed to an advanced metastatic state. The sequence of radiotherapy followed by immune checkpoint inhibition may reactivate an effective anti-tumor immune response. Hypoxia is a robust prognostic factor in these patients as well but may mediate a plethora of effects in addition to the immunosuppressive activity.

I. Einleitung

1. Vorwort

Tumorerkrankungen sind nach wie vor eine große medizinische und gesellschaftliche Herausforderung, was nicht zuletzt Zahlen des Robert-Koch-Instituts zeigen, das aufgrund der demografischen Entwicklung hierzulande mit einem weiteren Anstieg der Krebsneuerkrankungen von mindestens 20 % bis zum Jahr 2030 rechnet (1). Im Fall des malignen Melanoms hält die dramatische Zunahme der Inzidenz nunmehr seit Beginn der 1960er Jahre an und stellt damit große Anforderungen sowohl an die vorhandenen medizinischen Präventionsprogramme, als auch das therapeutische Management der Patienten. Obwohl das maligne Melanom dabei unter allen bösartigen Veränderungen der Haut gerade einmal einen Anteil von ca. 10 % einnimmt, ist es aufgrund seiner starken Tendenz, bereits in frühen Stadien zu metastasieren nach wie vor für etwa 90 % aller Todesfälle, die auf Hautkrebs zurückgehen, verantwortlich (2). Zwar ist im lokalisierten Stadium, in dem das maligne Melanom noch durch eine chirurgische Resektion in-toto entfernt werden kann, eine gute Prognose vorhanden, im metastasierten Stadium zeigte sich allerdings bis zuletzt aufgrund des Mangels therapeutischer Alternativen eine schlechte Prognose (2). Dies sollte sich mit Beginn des Jahres 2011 zunehmend ändern.

So wurde bereits mit den von Hanahan und Weinberg (2000) zusammengefassten Merkmalen maligner Zellen eine neue Systematik für die Tumorgenese geschaffen (3): Diese Merkmale umfassten insgesamt sechs biologische Fähigkeiten, welche Tumoren im Verlauf ihrer mehrstufigen Entstehung erwerben: Zum einen beinhaltete dies die Aufrechterhaltung proliferativer Signale, die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, die Abwendung des Zelltodes, das Ermöglichen eines unbegrenzten Replikationspotentials, die Induktion der Angiogenese und insbesondere die Aktivierung von Invasion und Metastasierung der Tumorzellen (3). Die wissenschaftlichen Fortschritte auf jenem Gebiet zeigten sich alsbald auch in der Klinik, indem verstärkt sogenannte zielgerichtete Krebstherapien (EGFR-Inhibitoren, VEGF-Inhibitoren und viele mehr, kurz: u.v.m.) in Ergänzung zu konventionellen Chemotherapeutika eingesetzt wurden.

Eine wachsende Zahl von Forschungsergebnissen legte in den kommenden Jahren allerdings nahe, dass Tumoren zusätzlich zu den bisher von Hanahan und Weinberg proklamierten Merkmalen (3), zwei weitere entscheidende Charakteristika im Verlauf ihrer Entwicklung aufweisen: Diese in der Publikation „The Hallmarks of Cancer: The Next Generation“ (4) beschriebenen biologischen Fähigkeiten (siehe **Abbildung 1**) betreffen zum einen die Reprogrammierung des zellulären Energiemetabolismus und zum anderen die Überwindung einer Zerstörung durch das Immunsystem. Das erstmals von Otto von Warburg (5) beschriebene Kennzeichen von Tumoren, den zellulären Metabolismus in Richtung einer „aeroben Glykolyse“ neu zu programmieren, um die neoplastische Proliferation am effektivsten zu unterstützen, ist gerade deshalb von Bedeutung, weil die Glykolyse so auch unter hypoxischen Bedingungen, den Energiehaushalt aufrechterhalten kann. Die zweite

Fähigkeit spielt ebenso für die heutige klinische Praxis eine bedeutende Rolle, da es Krebszellen zum einen über eine verminderte Antigenität und zum anderen über die Förderung eines immunsuppressiven Milieus ermöglicht, der immunologischen Zerstörung insbesondere durch T- und B-Lymphozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen zu entkommen. Da beide Fähigkeiten noch nicht verallgemeinert und vollständig validiert wurden, werden sie als „Emerging Hallmarks“ bezeichnet. Als Triebfeder für den Erwerb der oben beschriebenen Tumormerkmale machte man schließlich zwei Mechanismen aus (4): Dies betrifft zum einen die genomische Instabilität und Mutabilität, die den Tumorzellen genetische Veränderungen verleihen, welche diese schließlich im Sinne des darwinistischen Prinzips einer klonalen Selektion des am besten angepassten Phänotyps zum Vorantreiben der Tumorprogression nutzen. Zum anderen betrifft dies die Zellen des angeborenen Immunsystems, die im Rahmen der Immunüberwachung des Organismus die malignen Zellen zwar als körperfremd erkennen, durch ihre unspezifischen Mechanismen zur Bekämpfung maligner Zellen aber letztlich eine tumor-fördernde chronische Entzündungsreaktion verursachen und damit die Tumorprogression vorantreiben (4).

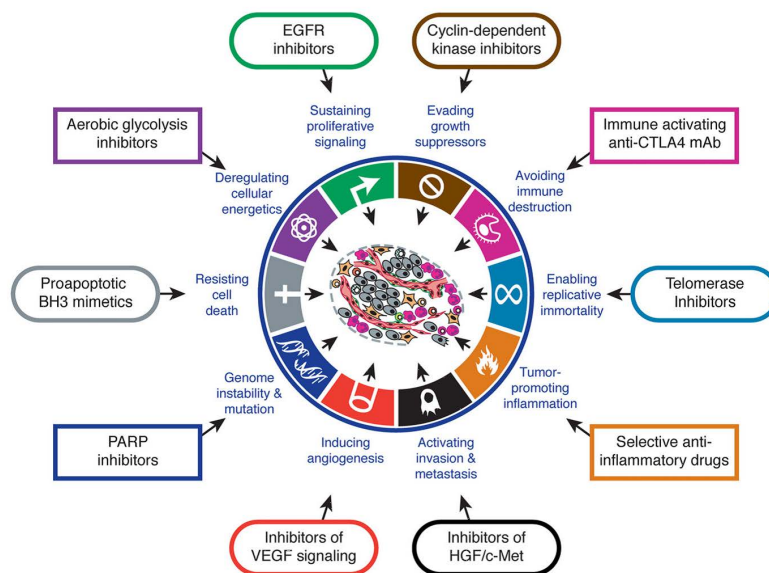


Abbildung 1: Darstellung der "Hallmarks of Cancer". Besonders hervorzuheben sind hierbei die Fähigkeiten der Immunevasion und der Reprogrammierung des zellulären Metabolismus. Weiterhin dargestellt ist eine Auswahl von Medikamenten, die als therapeutische Ziele jene Merkmale des Tumors adressieren, die diese für ein weiteres Wachstum und eine Progression benötigen. Hierbei ist besonders auf den anti-CTLA-4 Antikörper hinzuweisen, der nicht nur aufgrund seiner Bedeutung für diese Arbeit, sondern auch wegen der klinischen Erfolge eine große Aufmerksamkeit genießt (4).

Zeitgleich zu den oben beschriebenen Erkenntnissen fand eine nicht minder wichtige Entwicklung statt, die sich in der zunehmenden Abkehr von der bisherigen Vorstellung, dass Tumoren lediglich eine Ansammlung relativ homogener maligner Krebszellen sei (4, 6), widerspiegelte. Stattdessen betrachtete man fortan solide Tumoren als komplexe, heterogene Gewebe, die ebenso wie korrespondierende Normalgewebe aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen zusammengesetzt sind (4): So ergibt sich innerhalb von Tumoren eine komplexe Interaktion zwischen den Tumorzellen – welche durch den Zustand der pathologischen Entdifferenzierung und durch ein unkontrolliertes,

destruktives, lokales wie systemisches Wachstum gekennzeichnet sind – und den sie umgebenden nicht entarteten Zellen, zu denen unter anderem (kurz: u.a.) Immunzellen, Endothelzellen, Perizyten, Tumor-assoziierte Fibroblasten, sowie Zellen der extrazellulären Matrix, aber auch Stammzellen des Tumorstromas zählen (siehe **Abbildung 2**). Dieses einzigartige Zusammenspiel der verschiedenen Zelltypen sorgt über die Verhinderung einer adäquaten Immunantwort, die Sicherstellung einer adäquaten Gefäßversorgung und die Degradation der extrazellulären Matrix für die weitere Tumorprogression (4) und ist in der Tat so charakteristisch „für das Wachstum von malignen Tumoren, dass man hier explizit vom Tumormikromilieu (engl. tumor microenvironment, TME) spricht“ (7). Das Tumormikromilieu sollte sich in den Folgejahren zunehmend als therapeutisches Ziel in der Krebsbekämpfung herausstellen, da es den Vorteil bietet, dass die Mehrzahl der dort agierenden Zellen eine relative genetische Stabilität aufweist und somit im Gegensatz zu den genetisch instabilen malignen Zellen potenziell weniger Resistenzen bilden können (6, 8).

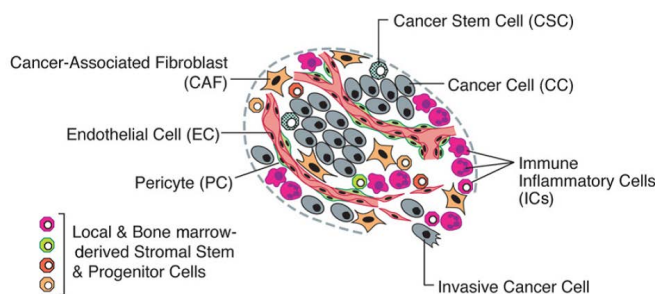


Abbildung 2: Aufbau und Zellen des Tumormikromilieus. Solide Tumoren sind komplexe Gewebe, die aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen- und subtypen aufgebaut sind. Sowohl das Tumorparenchym, als auch das Tumorstroma beinhalten verschiedenste Zelltypen- und subtypen, deren kollektive Interaktionen letztlich das Wachstum und die Progression des Tumors ermöglichen. Es sei zusätzlich erwähnt, dass die hier abgebildeten Immunzellen innerhalb des Tumors nicht nur die tumorfördernden, immuninhibitorischen Subklassen beinhalten, sondern auch jene Subklassen, die für eine antitumorale Immunantwort verantwortlich sind. (4)

Die gewonnenen wissenschaftlichen Erkenntnisse im Rahmen der Tumormikroimmunologie mündeten schließlich in der Zulassung neuer Medikamente, die durch Unterbrechung der Rezeptor-Liganden-Bindung zwischen den Immunzellen und den Tumorzellen die tumorinduzierten immuninhibierenden Signale „abschalten“. Diese Medikamente, weithin auch als Immun-Checkpoint-Inhibitoren bekannt, zeigten vielversprechende Ergebnisse in breit angelegten klinischen Studien (9) und führten bei einigen Patienten im metastasierten Stadium des Melanoms – das aufgrund seiner hohen Immunogenität besonders geeignet für eine Immuntherapie erschien – sogar zu langjährigen Remissionen, was die Immuntherapie in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der wissenschaftlichen Aufmerksamkeit gerückt hat und 2018 gar in der Verleihung des Nobelpreises der Medizin für zwei der Entdecker jener Immuncheckpoints, James Allison und Tasuku Honjo, mündete. Gerade das Jahr 2011 sollte sich deshalb rückblickend als ein Meilenstein für die weitere Entwicklung der Immuntherapie herausstellen, da mit der Zulassung des humanisierten monoklonalen anti-cytotoxic-lymphocyte-antigen (CLTA)-4 Antikörpers Ipilimumab (IPI) durch die FDA, das therapeutische Feld bei Patienten im metastasierten Stadium des malignen Melanoms nachhaltig

verändert wurde und sich die Prognose bei jenen Patienten durch die neuen Therapieformen deutlich verbessert hat (10). Gleichzeitig hat das neue Verständnis der Wichtigkeit des TME solider Tumoren auch ein Umdenken in der Strahlentherapie – seit jeher als eine der drei Säulen onkologischer Therapien anerkannt (11) – ausgelöst und den Fokus der Aufmerksamkeit von den intrinsischen Veränderungen der Krebszelle selbst, zu den sich innerhalb des TME abspielenden Mechanismen und den dortigen immunologischen Vorgängen im Rahmen der Radiotherapie gelenkt (6): So können die zahlreichen immunologischen und metabolischen Veränderungen innerhalb des TME nicht nur zur Entstehung der Strahlenresistenz beitragen, sondern gleichfalls als zukünftige therapeutische Ziele zur Radiosensibilisierung von Tumoren dienen (6). Als ein Resistenzmechanismus sei hier allen voran die Schaffung eines hypoxischen Milieus innerhalb des Tumors erwähnt, das sowohl zur Entstehung der Strahlenresistenz selbst beiträgt, als auch die Immunevasion maligner Zellverbände durch die Generierung von stark immunsuppressivem Adenosin (ADO) über die auf malignen Zellen vorhandene 5'-Ectonucleotidase (CD73) antreibt (12). Die Radiotherapie demgegenüber vermag es, über den strahleninduzierten immunogenen Zelltod antitumorale Immunreaktionen zu stimulieren – ein Effekt der durch die Applikation von Immun-Checkpoint-Inhibitoren wie IPI synergistisch verstärkt werden kann und von dem insbesondere Patienten im metastasierten Stadium des Melanoms profitieren (13).

In der hier vorgestellten Arbeit soll nun die Rolle der Tumorphoxie und Hypoxie-assoziiierter Faktoren erörtert werden, da die Hypoxie-induzierte Produktion von Adenosin, über die Inhibition $CD8^+$ zytotoxischer T-Zellen (CTL), als ein möglicher Mechanismus der Resistenz gegen eine Kombination aus Radiotherapie und Ipilimumab-Gabe identifiziert wurde. Im Rahmen dessen soll insbesondere der Frage nach prädiktiven Faktoren innerhalb des TME für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie beim zerebral metastasierten malignen Melanom nachgegangen werden, um so jene Patienten identifizieren zu können, die von einer Immuntherapie besonders profitieren. In der zunächst dargelegten Literaturdiskussion wird daher, ausgehend von einer Präsentation zum Krankheitsbild des malignen Melanoms die derzeitige Rolle der Radioimmuntherapie als aufkommende Behandlungsstrategie im zerebral metastasierten Stadium näher erläutert. Anschließend soll die Bedeutung der Tumorphoxie als eine der wichtigsten zur Strahlenresistenz beitragenden Mechanismen innerhalb von Tumoren näher eruiert werden, wobei hierbei insbesondere die pathophysiologische Bedeutung der Hypoxie-vermittelten und Adenosin-getriebenen Immunevasion maligner Tumoren im Fokus der Aufmerksamkeit steht. Zum Abschluss wird als Hinleitung zum folgenden methodischen Teil der Arbeit eine kurze Einführung in die klinische Bedeutung der multiplex-Immunfluoreszenz gegeben, bevor schließlich eine präzise Darstellung der Ziele und der Fragestellung der Studie erfolgt.

Als Kernstück der Arbeit wird im sodann folgenden zweiten Kapitel das methodische Vorgehen zur Identifikation von prädiktiven Faktoren für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie erläutert. Hierzu wird zuvorderst die technische Durchführung der multiparametrisch-ausgeführten Immunfluoreszenzfärbung erläutert, die es ermöglicht die Komplexität und Heterogenität des TME

ausreichend gut darzustellen und damit Grundlage für die bildanalytische und morphometrische Auswertung der 4-Farben-Immunfluoreszenz-Färbungen in dem digitalen open-source Bildanalyse-Programm QuPath ist (14). Die für die Färbungen verwendeten Gewebeschnitte stammen aus Biopsien der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz und umfassen ein Kollektiv von 35 Patienten im zerebral metastasierten Stadium des Melanoms, die mittels einer Kombination aus Radiotherapie und Ipilimumab-Gabe behandelt wurden, wobei etwa 25 % dieser Patienten zum Teil (z.T.) langjährige Remissionsphasen zeigten. Da sowohl die Tumorphoxie, wie auch die extrazelluläre Akkumulation von Adenosin als potentielle prädiktive Faktoren für das Outcome eine Radioimmuntherapie identifiziert wurden, soll in dieser Arbeit in erster Linie auf die Antigene CD73, als Surrogatmarker für den Adenosinstoffwechsel, GLUT-1 als endogener Hypoxiemarker und CD8 als Repräsentant der zytotoxischen antitumoralen Immunantwort näher eingegangen werden. Im folgenden Ergebnisteil werden die aus der Analyse der multiparametrischen Färbungen gezogenen Erkenntnisse detailliert dargestellt, mit deskriptiven Statistiken zu den einzelnen – mithilfe der Antigen-detektion identifizierten – Zellpopulation, untermauert, sowie durch spatiale Analysen der Interaktionsmuster zwischen den Zellpopulationen innerhalb des TME ergänzt, sodass ein möglichst ganzheitliches Bild der intratumoralen Zellinteraktionen im Rahmen des Hypoxie-Adenosin-Signalwegs gezeichnet werden kann. Durch die Verknüpfung der quantitativen Daten aus QuPath mit den klinischen Daten aus dem untersuchten Patientenkollektiv der retrospektiven Kohortenstudie soll sodann die klinische Bedeutung der Ergebnisse im Rahmen der Radioimmuntherapie aufgezeigt werden. In der nachfolgenden Diskussion werden die in der experimentellen Arbeit gewonnenen Ergebnisse in den Kontext der aktuellen wissenschaftlichen Forschung eingeordnet, neue Erkenntnisse herausgestellt, aber auch im Hinblick auf das methodische Vorgehen kritisch betrachtet und nicht zuletzt auf deren klinische Relevanz für die Strahlentherapie und die onkologische Forschung hin bewertet, bevor die wesentlichen Schlussfolgerungen, gezielt in einer kurzen Zusammenfassung festgehalten werden.

Durch die stetig wachsende Bedeutung der resistenzvermittelnden immunologischen und metabolischen Anpassungen innerhalb des TME für die Strahlentherapie wird in dieser Arbeit ein Themenkomplex behandelt, der aktuell immer weiter in den Mittelpunkt der onkologischen Forschung rückt. Die Erfolge der Immuntherapeutika haben dabei die klinische Relevanz dieser Mechanismen nochmals verdeutlicht. Die vorliegende Arbeit will deshalb nicht nur neue Erkenntnisse für die Behandlung des malignen Melanoms im zerebral metastasierten Stadium liefern, sondern gleichfalls grundlegende onkologische Fragestellungen – wie die nach der *in-vivo*-Bedeutung des extrazellulären Adenosinmetabolismus für das TME – aufgreifen, und somit durch die Identifikation prädiktiver Faktoren für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie, einen Beitrag bei der Verbesserung der sogenannten personalisierten Tumormedizin liefern. Zuletzt will sie auch Anstoß sein für die weitere wissenschaftliche Erarbeitung der Vorgänge im Mikromilieu solider Tumoren, welche relevante pathophysiologische Mechanismen der Resistenz gegen Strahlen – und Immuntherapie vermitteln.

2. Das maligne Melanom

Das maligne Melanom der Haut, der sogenannte schwarze Hautkrebs, ist ein bösartiger Tumor des melanozytären Systems. Obwohl deutlich seltener als der nicht-melanotische Hautkrebs besteht aufgrund der Tendenz zur frühzeitigen Metastasierung eine ungünstige Prognose, weshalb das maligne Melanom letztlich für etwa 90 % der Todesfälle an Hautkrebs verantwortlich ist (15-18).

2.1. Epidemiologie

Die weltweite Inzidenz des schwarzen Hautkrebses nimmt gerade in der weißen kaukasischen Bevölkerung in den letzten Jahren ständig und dramatisch schnell zu – so weit, dass das maligne Melanom aktuell zu den soliden Tumoren mit der höchsten Steigerung der Inzidenzrate (4.7 % / Jahr bei Männern und 4.3 % /Jahr bei Frauen) zählt (16, 19). Während die altersstandardisierte Inzidenz 1970 noch bei 3 pro 100.000 lag, stieg sie zuletzt auf bis zu 20 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr in Deutschland (siehe **Abbildung 63**), was einem Lebenszeitrisiko von etwa 1 – 2 % entspricht (15, 19). Damit zählt das maligne Melanom mittlerweile zu einer der häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland (siehe **Abbildung 64**). Es ist zu erwarten, dass der Trend zur Zunahme der Inzidenz maligner Melanome gerade in Nord- und Mitteleuropa weiter anhalten wird (20) und gar mit einer Verdopplung der Inzidenzraten bei Männern in den nächsten 20 bzw. bei Frauen in den nächsten 30 Jahren zu rechnen sein muss (17), wobei erhebliche geographische Unterschiede für die Inzidenz des malignen Melanoms weltweit und selbst innerhalb Europas bestehen (siehe **Abbildung 65**) (19). Gleichzeitig hielten sich die Mortalitätsraten des malignen Melanoms in den letzten Jahrzehnten konstant auf einem Niveau von etwa 2 Fällen pro 100.000 Einwohner (siehe **Abbildung 63**) (17), was nicht zuletzt auf eine Verbesserung der Früherkennungsmaßnahmen des malignen Melanoms mit einer folgend beständig abnehmenden Tumordicke bei der Primärdiagnose zurückzuführen ist (17). Nichtsdestotrotz ist die Prognose gerade im Stadium der zerebralen Metastasierung weiterhin oft infaust, sodass im Jahre 2013 in Deutschland von 21.410 Menschen (10.940 Männer und 10.470 Frauen), die an einem malignen Melanom der Haut erkrankten, 3.042 Deutsche (1.787 Männer und 1.255 Frauen) an dessen Folgen verstarben (18, 19).

Bei Menschen mit stärkerer Pigmentierung ist das Melanom demgegenüber selten und kommt nahezu ausschließlich palmoplantar und im Schleimhaubereich, als mukosales Melanom, vor (21).

Der Großteil der Melanome wird im mittleren Lebensalter (50.-60. Lebensjahr) diagnostiziert (siehe **Abbildung 66**), wobei Männer und Frauen gleichermaßen betroffen sind (17). Allerdings ist auch eine Zunahme bei jungen Menschen zu beobachten, sodass das maligne Melanom, neben Brustkrebs, mittlerweile der häufigste Tumor bei jungen Frauen im 30. bis 50. Lebensjahr ist (22). Bei Männern finden sich Melanome meist am Stamm, während sie bei Frauen vorwiegend an der unteren Extremität lokalisiert sind (15, 17). Die Häufigkeitsverteilung der anatomischen Lokalisation variiert hierbei allerdings mit dem Alter, sodass mit zunehmenden Alter, bei Abnahme der Häufigkeit am Stamm und der unteren Extremität, vermehrt Melanome im Kopf-Hals-Bereich festgestellt werden (17).

2.2. Ätiologie und Pathogenese

Während der genaue molekulare Mechanismus zur Entstehung derjenigen für die Melanomentwicklung entscheidenden Mutationen noch umstritten ist (17), wurden in den letzten Jahren dennoch zahlreiche Risikofaktoren identifiziert, die mit dem malignen Melanom assoziiert sind (15, 21, 22): Dabei spielt gerade das UV-Licht als relevanter Risikofaktor für epitheliale Hauttumoren eine entscheidende Rolle. So zeigte sich ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen der UV-Exposition und dem Melanomrisiko, wobei dies insbesondere für schwere und gehäufte Sonnenbrände in der Kindheit (bis zum 20. Lebensjahr) gilt (17, 20). Besonders betroffen sind hierbei Menschen mit den hellen Hauttypen I und II (helle oder sehr helle Haare, Sommersprossen, rote Haare und helle Augen), da mit abnehmendem Pigmentierungstyp die Sonnenempfindlichkeit zunimmt (17). Auch zeigte sich, dass gerade die intermittierende Exposition hoher UV-Dosen das Melanomrisiko signifikant erhöht (16). Dies erklärt insbesondere die Zunahme der Melanominzidenz in Körperregionen, die durch die Änderung der Freizeit- und Urlaubsgewohnheiten in den letzten Jahrzehnten vermehrt der Sonne exponiert waren (17). Nicht zuletzt werden durch die Sonnenexposition aber auch benigne melanozytäre Nävi als potentielle Vorläuferläsionen des Melanoms bereits im Kindesalter induziert (17, 20). Solche multiplen (>100) und atypischen Nävi (>5) stellen als Vorläuferläsionen unabhängige Risikofaktoren für die Entwicklung eines Melanoms dar, wobei die Gesamtzahl melanozytärer Nävi am Körper generell als der größte Risikofaktor zu betrachten ist (17). Der statistische Zusammenhang der Risikofaktoren UV-Licht, melanozytäre Nävi und spätere Melanomentwicklung spiegelt hierbei möglicherweise die Mutationsentstehung wider, die zunächst zur Induktion von Nävi und im späteren Leben durch die weitere Akkumulation von Risikofaktoren zur Entstehung eines Melanoms führt. Zu beachten ist hierbei allerdings, dass sich nur etwa 20-50 % der Melanome aus den sogenannten Vorläuferläsionen entwickeln und demgegenüber etwa 60 % auf gesunder Haut (15, 17, 22).

Neben den verhaltensbedingten Risikofaktoren wird das Risiko zur Entwicklung eines Melanoms gleichfalls durch die genetische Disposition modifiziert. So entwickeln sich schätzungsweise 5-10 % der Melanome aufgrund familiärer Häufung von sogenannten Melanomsuszeptibilitätsgenen, zu denen unter anderem Mutationen im BRAF-Gen, aber auch die Tumorsuppressorgene CDKN2A und CDK4 zählen (15, 17, 20). Weiterhin zeigte sich, dass eine gleichzeitig bestehende Immundefizienz, beispielsweise im Rahmen einer medikamentösen Immunsuppression oder einer HIV-Infektion, das Risiko zur Melanomentstehung weiter signifikant erhöht, was als ein Hinweis auf die besondere Rolle des Immunsystems in der Pathophysiologie des malignen Melanoms zu werten ist (20).

Die genannten Risikofaktoren tragen letztlich auf noch unbekanntem Wege zur Entstehung derjenigen Mutationen bei, die zur konsekutiven Aktivierung der RAS-RAF-MEK-ERK-, PI3K-AKT und β -Catenin Signaltransduktionswege führen, die beim malignen Melanom eine Schlüsselfunktion bei der Entwicklung und Progression einnehmen und damit bereits heute im Rahmen zielgerichteter Therapien wichtige therapeutische Angriffspunkte bilden (17, 20).

2.3. Tumorimmunologie des malignen Melanoms

Die Haut besitzt ein hoch entwickeltes und koordiniertes Immunsystem, das durch seine enge Verbindung zum lymphatischen System ein Milieu schafft, in dem unspezifische und spezifische Immunantworten effektiv eingeleitet werden können. Obwohl das lokale Milieu hauptsächlich der Abwehr pathogener Organismen dient, erfolgt gleichsam eine Immunüberwachung von neoplastischen Zellen. Gerade das kutane Melanom unterliegt als ein hochgradig antigener und immunogener Tumor dieser Immunüberwachung, was durch Beobachtungen zur spontanen Regression sowohl von Primärmelanomen, als auch von Erkrankungen im metastasierten Stadium unterstrichen wird (17). Gleichzeitig induziert das Melanom aber auch eine Modulation des immunologischen Mikromilieus der Haut und beeinflusst damit die antitumorale Immunantwort (20), sodass es in den meisten Fällen über eine Reihe von Immunescape-Mechanismen zu einer nicht ausreichenden immunologischen Kontrolle des Tumors kommt (20). Im Folgenden sollen kurz die Grundlagen des Immunsystems der Haut und der natürlichen anti-Tumor-Immunantwort umrissen werden, bevor anschließend die Aspekte der Immunevasion des Melanoms dargelegt werden.

2.3.1. Natürliche anti-Tumor-Immunantwort und die Rolle zytotoxischer Lymphozyten

Grundvoraussetzung für die Induktion einer effektiven Immunantwort ist die Ausbildung spezifischer tumorassoziierter Antigene (TAA), die Tumorzellen von normalen Körperzellen unterscheiden und für das Immunsystem erkennbar machen (17). Diese TAA werden initial insbesondere von den spezifischen kutanen antigenpräsentierenden dendritischen Zellen (APZ), den sogenannten Langerhans-Zellen, sowie den T- und B-Zellen erkannt, die eine spezifische Immunantwort einleiten. Die Interaktion des T-Zell-Rezeptors (TZR) mit antigenbeladenen MHC-I-Molekülen auf den Zielzellen ist dabei der zentrale Vorgang für die Induktions- und die Effektorphase. Zur Aktivierung der T-Zelle, im Rahmen des sogenannten Primings, wird dabei gleichzeitig ein kostimulatorisches Signal benötigt, das von den APZ durch Expression der sogenannten B7-Moleküle CD80 und CD86 bereitgestellt wird, um eine überschießende Immunreaktion zu vermeiden. In der Folge kann es über multiple Mechanismen zu einer Zerstörung der Melanomzellen kommen: Haupteffektorzellen der anti-Tumor Immunantwort sind dabei $CD8^+$ CTL, die daher auch im Rahmen dieser Arbeit eine besondere Rolle einnehmen. Diese sezernieren nach ihrer Aktivierung Zytokine wie $IFN-\gamma$ oder $TNF-\alpha$, zum anderen vermitteln sie insbesondere aber eine zytotoxische Immunantwort, welche über den FAS-Signalweg und die Ausschüttung von Perforinen und Granzymen, die Apoptose der Tumorzellen einleitet (17). Bei der humoralen Immunantwort unterscheidet man demgegenüber die Komplement-abhängige-Zytotoxizität (CDC) mit Ausbildung eines Membranangriffskomplexes von der Antikörper-abhängigen-zellulären-Zytotoxizität (ADCC), die im Rahmen der Bildung spezifischer Antikörper durch B-Zellen gegen Epitope auf Melanomzellen eingeleitet wird und mit der Initiierung einer zellulären Immunreaktion durch NK-Zellen und Makrophagen einhergeht (20). NK-Zellen sind dabei Haupteffektoren der unspezifischen Immunantwort, indem sie eine verminderte Expression von MHC-I-Rezeptoren auf Tumorzellen erkennen und diese über den Perforin-Granzym-Weg lysieren (17).

2.3.2. Mechanismen der Immunevasion im malignen Melanom

Weshalb es trotz der hohen antigenen Eigenschaften der Melanomzellen und der vielfältigen anti-Tumor Immunantworten oft zur letalen Progression kommt, liegt nicht unwesentlich in den Immunevasions-Mechanismen des Tumors begründet: Als wesentliches Merkmal, wodurch es der Melanomzelle dabei gelingt, der Immunüberwachung zu entgehen, gilt deren genetische Instabilität, aufgrund derer es zur Selektion von resistenten Tumorzellen hinsichtlich der endogenen und therapeutisch induzierten Immunantwort oder auch der Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika kommt (17). So werden im Rahmen der Tumorprogression zunehmend diejenigen Tumorzellklone, in denen mutationsbedingt eine Herabregulation von TAA induziert wurde, selektiert und damit die Möglichkeit zur immunologischen Erkennung des Tumors bedeutend eingeschränkt (20). Hierbei konnte gezeigt werden, dass gerade diejenigen Tumoren mit einer besonders hohen Mutationslast besser durch das Immunsystem erkannt und damit bekämpft werden können, als Tumoren mit einer stabilen Mutationslast (23). Ein weiterer Mechanismus der Immunevasion besteht daher in der Herabregulation von MHC-I-Molekülen, was zu einem Verlust der Erkennbarkeit der Tumorzellen durch CTL führt. Gleichzeitig wird die NK-Zell-vermittelte Immunantwort durch Freisetzung von löslichen inhibitorischen Rezeptoren stark herabgesetzt oder die Präsentation der Peptide auf MHC-I-Rezeptoren soweit verändert, dass es in der Folge zu keiner adäquaten Antigenerkennung kommt (17). Ferner wurde beobachtet, dass Melanomzellen selbst durch Expression des FAS-Liganden die Apoptose in CTL auslösen können. Dieser als „counter-attack“ bekannte Mechanismus basiert darüber hinaus auf einer Resistenz der Melanomzellen gegen die Fas-induzierte-Apoptose, sodass die Effektorantwort der CTL wesentlich eingeschränkt wird. Zuletzt bedient sich das maligne Melanom zum Entkommen einer adäquaten Immunantwort aber auch physiologisch vorkommender Immunzellen, allen voran sogenannten regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), myeloider Suppressorzellen (MDSC) und Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM), welche ursprünglich die Aufgabe der Aufrechterhaltung einer peripheren Toleranz gegenüber Autoantigenen besitzen. Diese T_{reg} werden durch das von dem Tumor geschaffene Zytokinmuster (u.a. IL-10 und TGF- β) angelockt und inhibieren über Interaktion ihres inhibitorischen Rezeptors CTLA-4 mit den kostimulatorischen B7-Molekülen der APZ und durch die Sekretion immunsuppressiver Moleküle eine effektive Immunantwort (17). Zusammenfassend scheint das maligne Melanom also durch vielfältige Mechanismen ein peritumorales Mikromilieu zu schaffen, welches die Induktion einer effektiven durch $CD8^+$ CTL-vermittelte Immunantwort wirksam verhindert. Hierzu zählt insbesondere aber auch die im Rahmen der metabolischen Reprogrammierung des Tumors geschaffene intratumorale Mangelsituation an Nährstoffen und Sauerstoff, die in der vorliegenden Arbeit näher evaluiert werden soll. Nicht zuletzt gilt ebenso die Schaffung einer morphologischen Barriere für Immunzellen durch stromale Zellen, die ein effektives Eindringen in den Tumor verhindert, zu einer wesentlichen Eigenschaft der Architektur des Tumormikromilieus, da sie zugleich ein effektives Umprogrammieren stromaler Zellen, sowie die Rekrutierung weiterer immuninhibitorischer Zellen und Sekretionsfaktoren, im Sinne einer Tumorprogression, ermöglicht (23, 24).

2.4. Klinik und Diagnostik

Das maligne Melanom entwickelt sich überwiegend de novo aus primär gesunder Haut, in etwa 30 % der Fälle kann es allerdings auch aus Nävuszellnävus entstehen (15). Die sogenannte ABCDE-Regel bietet hierbei eine Hilfestellung zur Unterscheidung benignen Veränderungen vom malignen Melanom. Als melanomsuspekt gelten demnach asymmetrische, irregulär begrenzte, heterogen kolorierte und große, erhabene Nävi >5-6 mm (17). Als weitere Malignitätszeichen gelten die Blutung, Ulzeration oder Knotenbildung der Nävi, sowie jede Größenveränderung oder das Neuauftreten von Läsionen (22). Bei Pigmentmalen der Haut, die nicht eindeutig als benigne klassifiziert werden können, sollte stets eine Auflichtmikroskopie erfolgen, durch die sich Verdachtskriterien wie eine vermehrte Gefäßzeichnung mit irregulären Gefäßabbrüchen und Haarnadelgefäßen, sowie radiäre Pigmentzeichnung oder ein irreguläres Pigmentnetz darstellen lassen (15): Ist ein Pigmentmal der Haut klinisch und auflichtmikroskopisch nicht eindeutig benigne, sollte im Zweifel immer eine in-toto-Exzisionsbiopsie des gesamten Pigmentmales mit einem Sicherheitsabstand von 0,2 cm erfolgen (16). Durch die histologische Aufarbeitung wird schließlich die Diagnose gesichert. (15).

Klinisch und histologisch existieren vier Subtypen, die sich u.a. anhand ihres Wachstumsmusters unterscheiden (15): Das superfiziell-spreitende Melanom stellt mit 55 % dabei die größte Untergruppe dar, das durch sein primär horizontales, langsames Wachstum eine gute Prognose aufweist (17, 20). Gefolgt wird es vom nodulären Melanom, das etwa 20 % aller Melanomsotypen ausmacht und gleichzeitig aufgrund seines primär vertikalen und häufig erosiven Wachstums die schlechteste Prognose besitzt (15). Seltener sind das Lentigo-maligna Melanom mit 5-10 %, das sich vor allem (kurz: v.a.) bei älteren Menschen an lichtexponierten Arealen im Gesicht findet und sich zumeist aus einem Melanoma-in-situ entwickelt, sowie das oft erst spät diagnostizierte akro-lentiginöse Melanom (5 %), das zumeist bei dunkelhäutigen Menschen in subungaler und palmoplantarer Lokalisation gefunden werden kann (15).

2.5. Histopathologie

Aufgrund der für diese Arbeit besonderen Bedeutung der histologischen Identifikation der Tumorzellen im Melanom soll in diesem Kapitel kurz auf die Histopathologie des Melanoms eingegangen werden. Im histologischen Präparat (siehe **Abbildung 3**) erweist sich das Melanom als ein Tumor aus dicht nebeneinanderliegenden und diffus verteilten atypischen Zellen, die zur Bildung sogenannter Tumornester neigen (25). Aufgrund des enthaltenen grobkörnigen intrazellulären Melaninpigments der Tumorzellen präsentiert sich das Melanom als ein überwiegend stark pigmentierter Tumor, der ausgehend von basalen intraepidermalen Melanozyten invasiv in die Dermis wächst (26). Weitere Merkmale sind die ausgeprägte Kernpleomorphie mit großen Nukleoli und vermehrten Mitosen, sowie eine oftmals nicht-invasive Randzone (17). Interessanterweise weist das maligne Melanom oft ein entzündliches Infiltrat, bestehend vornehmlich aus lymphozytären Zellen auf, die sich um die Tumornester herum anordnen, was für die hohe Immunogenität des Tumors spricht (20).

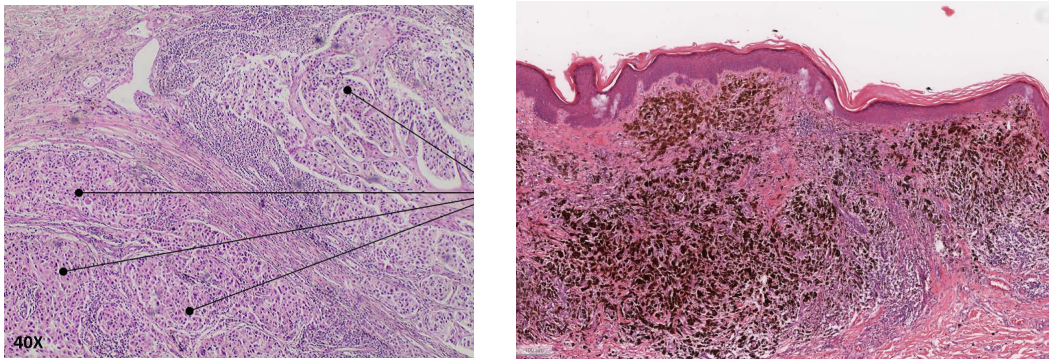


Abbildung 3: Histologische Präparate eines Hämatoxylin/ Eosin (HE)-gefärbten malignen Melanoms. In der linken Abbildung (25) sind die mit den Pfeilen gekennzeichneten Nester atypischer Melanozyten mit Infiltration in die Dermis zu sehen. Rechts (26) sind stark Melanin-haltige Zellnester am Übergang zur Dermis zu erkennen, die ebenso wie in der Abbildung links von einem ausgeprägten lymphozytären Begleitinfiltrat umgeben sind.

Im histopathologischen Befund werden neben der Diagnose und dem vorliegenden Melanomsubtyp, aber auch die Tumordicke nach Breslow, der Invasionslevel nach Clark und das Vorhandensein von Ulzerationen angegeben, die gleichzeitig wichtige prognostische Parameter für den Krankheitsverlauf darstellen (17). Die Tumordicke nach Breslow gilt dabei als wichtigster prognostischer Parameter und entspricht der absoluten vertikalen Ausdehnung des Tumors (in mm) vom Stratum granulosum bis zur tiefsten nachweisbaren Tumorzelle (15). Demgegenüber wird die Eindringtiefe nach Clark (siehe **Abbildung 68**), welche die Infiltration der Melanomzellen nach Hautschichten beschreibt, in aktuellen Leitlinien nicht mehr empfohlen, da gezeigt werden konnte, dass sie keine zusätzliche Aussagekraft für die Prognose besitzt (16).

2.6. Stadieneinteilung und Staging-Untersuchungen

Standard in der histopathologischen Befundung des Melanoms stellt seit 2009 die überarbeitete TNM-Klassifikation des American Joint Committee on Cancer (AJCC) dar. Die aktuelle Klassifikation berücksichtigt dabei nicht nur die Tumordicke des Primärtumors, sondern auch Ulzerationen und die Mitoserate, den Befall von Lymphknoten sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen (16). Insgesamt werden vier Stadien (I-IV) unterschieden, von denen Stadium I und II als lokalisiertes Stadium zusammengefasst werden (siehe **Tabelle 12**). Das regionale Stadium III wird durch das Ausmaß und die Anzahl der Lymphknotenmetastasierung definiert, wohingegen das Stadium der Fernmetastasierung, Stadium IV, nach Lokalisation der Metastasierung und dem Serum-Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Level eingeteilt wird (27).

Aufgrund der starken Tendenz des malignen Melanoms zur Metastasierung – etwa 25 % der Patienten zeigen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose bereits lokoregionäre oder Fernmetastasen (17) – erfolgen nach histologischer Sicherung und Beurteilung der Tumordicke, Staging-Untersuchungen, die eine weitere Einschätzung der Tumorausbreitung ermöglichen. Da das Risiko zur Metastasierung mit zunehmender Tumordicke und dem histologischen Vorhandensein von Ulzerationen steigt, werden hier, gemäß den Empfehlungen der Leitlinie, dem Tumorstadium angepasste Staginguntersuchungen durchgeführt (eine Übersicht findet sich in **Tabelle 13**) (17).

Insgesamt kann für das maligne Melanom eine bevorzugte lokale Metastasierung in regionale Lymphknoten (50 %) oder eine lokale Metastasierung in die Haut und das Subkutangewebe (25 %) als Satelliten, - (in unmittelbarer Umgebung des Primärtumors) oder als In-Transit-Metastasen (in den ableitenden Lymphwegen zwischen dem Primärtumor und den regionalen Lymphknoten gelegen) beobachtet werden (15).

Die hämatogene Fernmetastasierung (ca. 25 %) findet hingegen hauptsächlich in Haut, Lunge (relativer Anteil von 30 %), ZNS (20 %) und Leber (20 %) statt. Seltener betroffen sind die Niere (bis zu 10 %), Nebenniere, Milz, Skelettsystem (bis zu 15 %) und der Gastrointestinaltrakt (5%) (17, 22).

2.7. Prognosefaktoren des malignen Melanoms

Entsprechend den Klassifikationskriterien im lokalisierten Stadium stellt die Tumordicke nach Breslow in den Stadien I und II den wichtigsten prognostischen Faktor dar, gefolgt von der Ulzeration des Primärtumors und der Mitoserate. Weiterhin zeigte sich, dass auch der histologische Subtyp, das Alter, das Geschlecht und die Lokalisation des Primärtumors signifikanten Einfluss auf die Prognose haben, sodass gerade das Vorliegen von Primärtumoren an Stamm, Nacken und behaartem Kopf bei älteren, männlichen Patienten im lokalisierten Stadium mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (21). Im Stadium der Metastasierung hingegen sind insbesondere der Befall des Wächter-Lymphknotens, die Anzahl befallener Lymphknoten und die Tumormasse entscheidende Prognosefaktoren (17, 20).

Die relativen 5-Jahresüberlebensraten sind im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen sehr günstig (10,15), da 90 % der diagnostizierten Melanome in einem frühen Stadium entdeckt werden (siehe **Abbildung 67**) und durch die guten therapeutischen Möglichkeiten im lokalisierten Stadium ca. 75 % der Patienten geheilt werden können. Es ist allerdings zu beachten, dass es im Fall des Melanoms auch Jahre nach der chirurgischen Entfernung des Primarius zu einer Metastasierung aus sogenannten schlafenden Tumorzellen kommen kann (26). Im fortgeschrittenen Stadium mit Fernmetastasen und insbesondere mit zerebralen Metastasen, wie im vorliegend untersuchten Patientenkollektiv, ist die Prognose hingegen äußerst schlecht, zumal hier bisher kaum – oder wenig überzeugende Parameter zur Prognoseabschätzung, wie das sogenannte Melanom-spezifische Assessment (msGPA) (28), vorliegen (29). Dies zeigt sich gerade mit Blick auf die relative 5-Jahres-Überlebensrate, die im lokalisierten Stadium noch 98 % beträgt, sich hingegen im regionalen Stadium auf 63 % und beim Auftreten von Fernmetastasen auf 17 % verringert (15, 30) (siehe **Tabelle 14**), wobei Patienten nach Manifestation der ersten Fernmetastase im Median innerhalb eines Jahres sterben (17). Zumal das maligne Melanom im metastasierten Stadium als besonders aggressiver Tumor mit Tendenz zur zerebralen Metastasierung gilt – schätzungsweise 50-75 % der Patienten im Stadium IV entwickeln im weiteren Verlauf Hirnmetastasen (28) – zielt die vorliegende Studie deshalb auf die Identifikation neuer einfach zu erfassender prädiktiver Faktoren, welche das Ansprechen einer wirksamen Therapie in jenem Patientenkollektiv zuverlässig anzeigen und damit ein leichteres Assessment ermöglichen können.

2.8. Therapie

Die Therapie des malignen Melanoms orientiert sich generell am diagnostizierten Tumorstadium. Da in der vorliegenden Arbeit insbesondere prädiktive Faktoren für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie für Patienten mit zerebral metastasiertem malignen Melanom zu identifizieren sind, werden die therapeutischen Möglichkeiten im lokalisierten Stadium des malignen Melanoms nur kurz erläutert, bevor anschließend die Therapiestrategien im Rahmen der Fernmetastasierung und hierbei besonders die Rolle der Radio – und Immuntherapie und deren pathophysiologischen Grundlagen, gerade im Hinblick auf die immunologische Wirksamkeit, dargestellt werden.

2.8.1. Therapie des malignen Melanoms im lokalisierten und metastasierten Stadium

Die wichtigste therapeutische Maßnahme des malignen Melanoms im lokalisierten Stadium stellt nach wie vor die in-toto-Exzision dar. Wurde histologisch die Diagnose bestätigt, erfolgt vier Wochen nach der Exzisionsbiopsie eine Nachexzision mit dem notwendigen Sicherheitsabstand in Abhängigkeit der Tumordicke (15, 17). Können die Sicherheitsabstände nicht eingehalten werden zum Beispiel (z.B.) in akraler Lokalisation oder im Kopf-Hals-Bereich kann alternativ eine Schnittrandkontrolle die in-toto-Entfernung sicherstellen, da in diesem Fall die Größe des Sicherheitsabstandes keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben gezeigt hatte (15, 17, 31).

Im Anschluss an die Exzision wird eine dem jeweiligen Tumorstadium angepasste Therapie eingeleitet (21): Bei Tumoren bis Stadium Ia erfolgt aufgrund der sehr guten Prognose eine engmaschige Verlaufskontrolle alle 3-6 Monate in den ersten 5 Jahren. Bei einer Tumordicke >1 mm sollte demgegenüber zusätzlich eine präoperative Lymphknoten-Szintigrafie zur Identifikation und anschließender Untersuchung des Wächter-Lymphknotens erfolgen, da dessen Befall ein wesentlicher prognostischer Faktor und damit entscheidend für die weitere Therapiewahl ist (31). Bei positivem Befund erfolgt schließlich eine radikale regionäre Lymphadenektomie und ab Stadium IIb eine adjuvante Immuntherapie mit Interferon- α (IFN- α) (16, 17). Im Stadium III der regionären Metastasierung, das heißt (kurz: d.h.) bei Satelliten- und In-Transit-Metastasen, erfolgen abhängig vom weiteren Lymphknotenbefall entweder eine Exzision des Primärtumors mit hyperthermer Chemoperfusion des umliegenden Tumorbetts, eine intratumorale Applikation von IL-2, eine radikale Lymphadenektomie oder eine adjuvante Therapie mit IFN- α über 18 Monate (16). Innerhalb des interdisziplinären Behandlungskonzepts kann bereits im lokalisierten Stadium eine Tumorbestrahlung notwendig werden: So wird eine Bestrahlung insbesondere bei inoperablen oder R1 reserzierten Primärtumoren, dem Lentigo maligna Melanom und als adjuvante Bestrahlung bei regionärem Lymphknotenbefall empfohlen, wodurch die lokale Tumorkontrolle, wie auch die Überlebensrate positiv beeinflusst wird (17). Durch die Effektivität adäquater chirurgischer und adjuvanter Therapien konnte die Prognose von Melanompatienten im lokalisierten Stadium in der Vergangenheit zunehmend verbessert werden (9).

Demgegenüber stellt die Therapie des metastasierten malignen Melanoms nach wie vor eine große Herausforderung in der interdisziplinären Tumorthherapie dar. Gerade Patienten im fortgeschrittenen

Stadium mit bereits vorhandenen Fernmetastasen hatten aufgrund des aggressiven Charakters des malignen Melanoms bis zuletzt eine infauste Prognose mit einer mittleren Gesamtüberlebenszeit von acht Monaten bei einer gleichzeitig überschaubaren Zahl von Therapiealternativen. Patienten mit Hirnmetastasen wiesen typischerweise sogar ein noch geringeres mittleres Gesamtüberleben auf (9).

Durch neue zielgerichtete Therapieansätze konnten in den letzten Jahren zunehmend Fortschritte in der Behandlung des Melanoms im Stadium der peripheren Metastasierung erreicht werden (28). Diese stellen nunmehr nicht nur eine Ergänzung bisheriger Therapieansätze dar, sondern haben u.a. die systemische Chemotherapie mit Dacarbazin, welche aufgrund der geringen Rate objektiver Remissionen und einer nur geringen Verlängerung der Überlebenszeit als rein palliative Therapie angesehen werden muss (17), immer mehr in den Hintergrund gedrängt. Insbesondere die Zulassung der Immuncheckpoint-Inhibitoren und des BRAF-Inhibitors Vemurafenib im Jahr 2011 haben die Therapie des metastasierten Melanoms so nachhaltig verändert (9).

Trotz der neuen Entwicklungen auf dem Feld der gezielten Krebstherapie bleibt die operative Metastasen-Entfernung, gerade wenn das Erreichen einer R0-Resektion möglich und sinnvoll ist, eine wichtige therapeutische Option im metastasierten Stadium, weil durch radikale Entfernung singulärer pulmonaler oder zerebraler Metastasen das Überleben nicht nur verlängert, sondern der Tumor gar kurativ behandelt werden kann (17, 26). Demgegenüber wird die Strahlentherapie gerade zur lokalen Tumorkontrolle bei inoperablen Lymphknoten- oder Knochenmetastasen eingesetzt, wobei die stereotaktische Einzeithherapie bei singulären Hirnmetastasen eine ebenso effektive, wie auch im Vergleich zur Ganzhirnbestrahlung (WBRT) schonendere Therapieoption darstellt (17, 31).

Die gezielte molekulare Krebstherapie, auch als „targeted therapy“ bezeichnet, richtet sich im Gegensatz zur konventionellen Chemotherapie gegen Strukturen, die nur im Tumor verändert und für das Tumorwachstum relevant sind. Solche Mutationen in Onkogenen, die entweder die Proliferation des Tumorklons fördern oder aber dessen Apoptose verhindern, treiben das Tumorwachstum entscheidend voran, weshalb sie auch „Driver-Mutationen“ genannt werden und einen selektiven Angriffspunkt darstellen. Im Melanom betreffen solche Driver Mutationen insbesondere aktivierende Mutationen in Rezeptor-Tyrosinkinasen wie BRAF, NRAS oder cKit: Das BRAF-Protein ist ein wichtiger Bestandteil des RAS-RAF-MEK-ERK-(MAPK)-Signalweges, der am normalen Wachstum und Überleben von Zellen beteiligt ist. Die besonders häufig im Melanom auftretende BRAF^{V600E} Mutation bewirkt, dass dieser Signalweg überaktiv wird, was in Kombination mit weiteren Mutationen zu unkontrolliertem Zellwachstum führen kann (32). BRAF-Inhibitoren wie Vemurafenib blockieren spezifisch diese BRAF^{V600E} Mutation, sodass zunächst ein rascher Therapieeffekt bei 80 % der Patienten eintritt. Bei einer Monotherapie tritt nach einigen Monaten allerdings eine Selektion von BRAF-Inhibitor-resistenten Tumorzellklonen auf, wodurch es zum Progress kommt (17, 22, 33). Aufgrund dieser Resistenzbildung bei gleichzeitig günstigerem Nebenwirkungsprofil stellt die Kombination von BRAF- mit MEK-Inhibitoren – wie Binimetinib – die Therapie der Wahl bei BRAF-mutierten Patienten im metastasierten Stadium dar, weil die Kombination beider Inhibitoren sowohl die Ansprechrate, als auch die Dauer eines Therapieansprechens signifikant verbessert (22, 34).

Nichtsdestoweniger stellen Patienten im Stadium der zerebralen Metastasierung nach wie vor eine enorme Herausforderung in der Therapie des malignen Melanoms dar. Es konnte dabei gezeigt werden, dass jene Patienten ein weitaus schlechteres progressionsfreies Überleben (PFS), als auch ein signifikant geringeres Gesamtüberleben (engl. overall survival, kurz: OS) im Vergleich zu Patienten mit Metastasen aus anderer Organlokalisation aufweisen (35) und die Hirnmetastasen dabei einen wichtigen limitierenden Faktor des Gesamtüberlebens darstellen (36).

Gerade vor dem Hintergrund, dass Zytostatika aufgrund der limitierten Penetrationsmöglichkeit über die Blut-Hirn-Schranke keine adäquaten intrazerebralen Wirkspiegel erreichen können, war die Prognose von Melanompatienten mit vorhandenen Hirnmetastasen mit einem medianen Gesamtüberleben von nur drei bis neun Monaten bis zuletzt infaust. Die neurochirurgische Entfernung singulärer Metastasen, wie auch die Strahlentherapie in Form einer Ganzhirnbestrahlung oder einer stereotaktischen Bestrahlung werden daher trotz der Fortschritte auf dem Feld der gezielten Krebstherapie, weiterhin als effektive Behandlungsmöglichkeiten für solche Patienten betrachtet (11, 37, 38).

2.8.2. Immunmodulatorische Effekte der Strahlentherapie

Die Effekte der Strahlentherapie werden durch multiple biologische Mechanismen vermittelt: So kommt es beim Einsatz von ionisierenden Strahlen zu physikalischen und chemischen Veränderungen in der Zelle, die einerseits direkte Strahlenschäden an der DNA verursachen, „andererseits kommt es zur Ionisation und Anregung von Atomen und Molekülen mit Bildung von Radikalen und Störung wichtiger Makromoleküle“, welche letztlich die Apoptose maligner Zellen einleiten (38). Neben diesen direkten Effekten Strahlentherapie spielen auch komplexe immunmodulatorische Vorgänge eine wichtige Rolle – manche Autoren gehen gar davon aus, dass ein Großteil der strahlentherapeutischen Effekte von der Antwort $CD8^+$ CTL und dem Typ-I-Interferon-Signalweg abhängen (39). Aufgrund der Bedeutung dieser immunologischen Effekte für die Strahlentherapie und auch im Hinblick auf die Bedeutung der Tumorimmunologie in dieser Arbeit, soll daher kurz auf die immunvermittelten Wirkungen eingegangen werden (39):

Wie bereits einleitend dargelegt wurde, leistet der Mechanismus der Immunevasion von Tumorzellen einen wichtigen Beitrag für die Entstehung manifester Tumoren aus malignen Vorstufen. Insbesondere die verminderte Antigenität und die Etablierung immunsuppressiver Mechanismen – die sowohl innerhalb des TME, als auch systemisch im Gesamtorganismus wirksam sind – stellen wesentlichen Elemente dieser Immunevasion dar (4, 40). Die Strahlentherapie fördert demgegenüber die Reaktivierung anti-tumoraler Immunantworten durch vielfältige Mechanismen (siehe **Abbildung 4**): Zum einen verstärkt die Bestrahlung von Tumorgewebe die Inhibition von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), wie auch von proangiogenen TAM und vermindert die Expression von inhibitorischen Rezeptoren, wie dem „programmierbaren Zelltod“-Rezeptor-1 (PD-1) oder dem CTLA-4-Rezeptor auf T-Zellen, was einem ähnlichen Wirkmechanismus wie dem der Immuncheckpoint-Inhibitoren entspricht. Zum anderen kommt es durch die Radiotherapie zur Verstärkung der Aktivität von

Immuneffektorzellen, für die CD8⁺ CTL eine herausragende Rolle spielen. So hängt die Wirksamkeit der Radiotherapie u.a. wesentlich von der T-Zell-Antwort ab, indem es infolge der Radiotherapie zu einem verstärkten Priming von T-Zellen in lymphatischen Geweben kommt (41) und durch eine vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (wie IFN- α) eine vermehrte Tumordinfiltration von CD8⁺ CTL stattfindet (42). Bedeutsam ist weiterhin die Wiederherstellung der Antigenität maligner Zellen (6, 40) durch die Bestrahlung, weil hierdurch eine effektive immunologische Erkennung von Tumorzellen erst ermöglicht wird. Dies geschieht u.a. durch die Freisetzung von Tumorantigenen, die via Präsentation auf dendritischen Zellen (DZ) eine Aktivierung von CD8⁺ CTL induzieren, was einem „Re-Priming“ der Zellen des adaptiven Immunsystems innerhalb des TME gleichkommt (6). Nicht zuletzt kommt es infolge der Bestrahlung zur Alteration des Gefäßsystems innerhalb des TME, welches die Migration von Immunzellen durch eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwand und einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen erleichtert (6, 40).

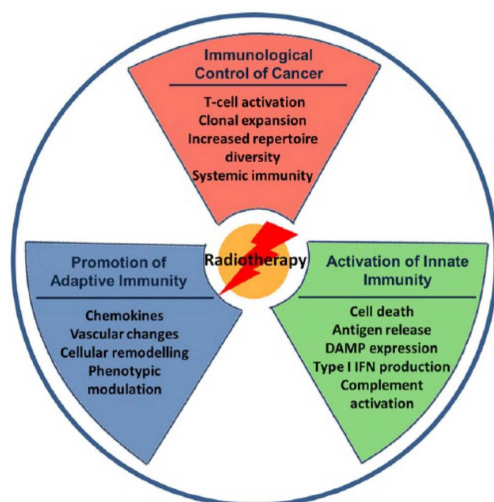


Abbildung 4: Immunmodulatorische Effekte der Radiotherapie. Die Bestrahlung von Tumorgewebe resultiert in multiplen proimmunogenen, immunmodulatorischen und das TME betreffende Veränderungen. Dabei kann man eine Aktivierung und Verstärkung der adaptiven Immunantwort, als auch der innate Immunantwort beobachten. So führt die Bestrahlung von Tumorzellen über die Freisetzung von TAA und durch den immunogenen Zelltod zur Freisetzung von DAMPs und über die Freisetzung von Typ I IFN zur Komplementaktivierung, was die Rekrutierung, Reifung und Aktivierung von APZ fördert. Darüber hinaus wird die Antigenität der Tumorzellen weiter erhöht und Veränderungen im TME induziert, die eine verstärkte T-Zell-Aktivität und damit antitumorale Effekte unterstützen. Diese molekularen Veränderungen ermöglichen nicht zuletzt eine Verknüpfung der Antworten des angeborenen und spezifischen Immunsystems, was die Verstärkung der anti-Tumor Immunantwort und schließlich eine dauerhafte Immunität fördert (43).

Zunehmend in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt sind in den letzten Jahren zudem die proimmunogenen Effekte, welche infolge des strahleninduzierten Zelltodes durch sogenannte Danger-associated molecular patterns (DAMPs) wie beispielsweise (bspw.) Adenosintriphosphat (ATP), sowie durch proinflammatorische Zytokine (wie IL-1 β , fibroblast-growth-factor; FGF; oder TNF- α) vermittelt werden (siehe **Abbildung 69**) und eine antitumorale humorale und zelluläre Antwort auslösen (6, 38). Diese bewirken nicht nur eine vermehrte Infiltration von CTL in den Tumor, sondern locken gleichfalls Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und Neutrophile Granulozyten an, die die Entzündungsreaktion und Abräumvorgänge weiter unterhalten (38).

Im Rahmen der strahleninduzierten Antitumorreaktion sollte auch der sogenannte cyclic guanosine-monophosphate adenosine-monophosphate (cGAMP) synthase (cGAS)/ Stimulator of interferon genes (STING)-Signalweg nicht unberücksichtigt bleiben, der u.a. die DZ-vermittelte Erkennung zytoplasmatischer Tumor-DNA ermöglicht (siehe **Abbildung 5**) und mittlerweile als zentraler Mechanismus angesehen wird, über den systemische Antitumorreaktionen der Radiotherapie vermittelt werden (44-46):

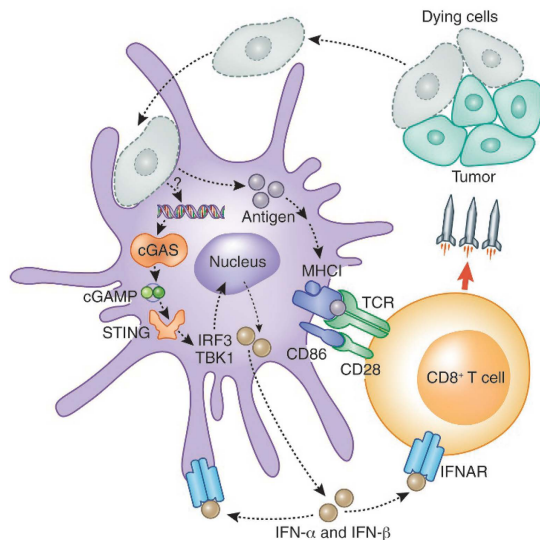


Abbildung 5: Übersicht des cGAS-STING-Signalweges: Hierbei werden sterbende Tumorzellen oder bereits aus den Tumorzellen freigesetzte DNA-Bruchstücke durch dendritische Zellen aufgenommen. Die zytoplasmatische DNA wiederum aktiviert den cGAS/STING-Signalweg, einen essentiellen Schutz des Wirts gegen DNA-Pathogene. STING ist ein residentes Protein des endoplasmatischen Retikulums, das sich als bedeutend für die Induktion der erworbenen, aber auch der angeborenen Immunantwort erwiesen hat. Am Ende dieser Signalkaskade steht die Initiation einer effektiven Immunantwort im Sinne (i.S.) einer Aktivierung von CD8⁺ CTL, die wiederum – ebenso wie die aktivierten DZ – eine Typ-I-Interferon-Reaktion (Sekretion von IFN- α/β) anstoßen, welche die Antitumorreaktion über Aktivierung des angeborenen Immunsystems verstärken und schließlich zu einer starken Tumorregression führen. (45)

So kommt es im Rahmen der Bestrahlung maligner Zellen, wie auch durch die Aufnahme von sterbenden Tumorzellen durch DZ, zu einer Abgabe der Tumor-DNA ins Zytoplasma und schließlich einer Prozessierung dieser DNA durch DZ, was zu einer Aktivierung des cGAS-Weges führt, an dessen Ende cGAMP gebildet wird (44). Das im Rahmen des DNA-Sensing-Mechanismus der DZ gebildete cGAMP wiederum ist ein potenter Aktivator des STING-Signalweges, der für die entsprechende Reifung und Aktivierung der DZ sorgt und folgend über ein Priming von CD8⁺ CTL sowohl die Induktion einer adaptiven Immunantwort, als auch die Förderung der Typ-I-Interferon-Reaktion über IFN- α initiiert. Typ-I-Interferone fördern eine anti-Tumor-Immunantwort, indem sie die Immunreaktion des erworbenen Immunsystems über eine verstärkte Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen, wie auch die angeborene Immunität durch Verstärkung der Zytotoxizität von NK-Zellen unterstützen (39, 44, 46). Zusätzlich leiten Typ-I-Interferone direkt die Apoptose von Tumorzellen ein und verstärken die Antigenexpression auf neoplastischen Zellen, was die Immunogenität des Tumors weiter erhöht (44). Es lässt sich schließlich festhalten, dass eine Tumorbestrahlung durch Induktion des cGAS/STING-DNA-Sensing-Signalweges in DZ zu einer Verstärkung der adaptiven Immunantwort und damit zu einer effektiven radio-gen-vermittelten Antitumorreaktion beiträgt.

Interessanterweise wurde insbesondere in Fallberichten zum metastasierten Melanom wiederholt ein Phänomen, der sogenannte abskopale Effekt beschrieben, bei dem auch eine lokale Bestrahlung eine systemische, durch das Immunsystem vermittelte Wirkung entfalten kann. Diese Tumorregression an nicht bestrahlten Orten ist auf die Initiation der oben beschriebenen systemischen Immunantwort im Rahmen der lokalen Strahlentherapie zurückzuführen und führt auf eindrucklichste Weise die immunologischen Wirkungen einer Strahlentherapie vor Augen (38).

Bei der Bewertung strahlentherapeutischer Therapieeffekte sollte man aber nicht außer Acht lassen, dass auch immunsuppressive Reaktionen durch die Bestrahlung gefördert werden (38). So werden durch die Radiotherapie u.a. auch Signalwege angestoßen, die die Expression des programmierten Zelltod-Liganden-1 (PD-L1) auf Tumorzellen und die Migration von MDSC in den Tumor fördern (6). Das Zusammenspiel dieser immunsuppressiven und immunfördernden Einflüsse beeinflusst so die Gesamtwirksamkeit der Strahlentherapie und ob diese eine therapeutisch relevante antitumorale Immunantwort stimulieren kann, die zur Tumoreradikation führt (siehe **Abbildung 6**) (43, 47).

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die Wirksamkeit der Radiotherapie zu einem nicht unwesentlichen Teil von der Stärke der systemischen Immunantwort abhängt, die im Rahmen der Bestrahlung von Tumorgewebe induziert wird (48). Wie stark diese Immunantwort schließlich ist, wird dabei weiterhin durch den vorbestehenden individuellen Immunphänotyp des Patienten, innerhalb des Tumors wirksame intrinsische Resistenzmechanismen, sowie der Wahl des Fraktionierungsschemas bestimmt, wobei abgeschlossene Studien zeigen konnten, dass hohe Einzelfractionen vermeintlich stärker wirksam sind als normofraktionierte Regimes (11, 38).

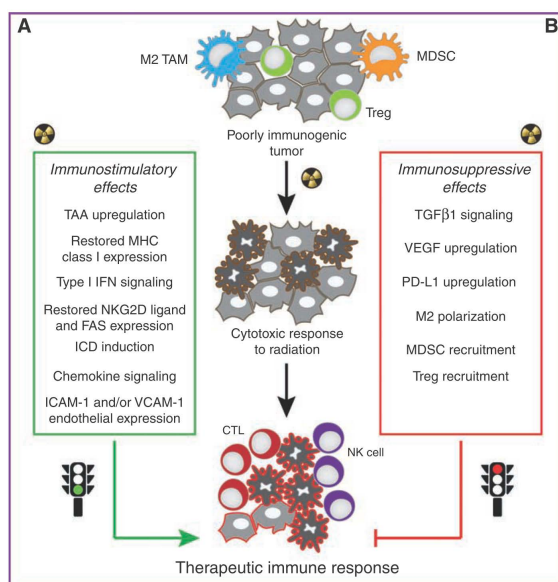


Abbildung 6: Mechanismen der Immunstimulation und Immunsuppression durch die Strahlentherapie. Hier sind die immunstimulatorischen, sowie immunsuppressiven Effekte, die durch eine Strahlentherapie vermittelt werden in einer Übersicht dargestellt. Es wurde beobachtet, dass sich ein zu Beginn immunologisch aneurer Tumor mit einem vorherrschenden Pool immunsuppressiver Immunzellen (bestehend aus M2 Makrophagen, regulatorischen T-Zellen und Myeloiden Suppressorzellen) nicht nur über den strahleninduzierten Zelltod einiger Tumorzellen verändert, sondern durch den gleichsam aktivierten Typ-I-Interferon-Signalweg, eine veränderte Zytokinausschüttung und über eine vermehrte Antigenität zu einem immunogenen Tumor wird. Dieser lässt sich sodann durch eine stärkere Immunantwort mit dem Einwandern aktivierter NK-Zellen und CTL charakterisieren (47).

2.8.3. Immun-Checkpoint-Inhibitoren in der Therapie des metastasierten malignen Melanoms

Mit der Zulassung von IPI als Zweitlinientherapie im metastasierten Stadium des malignen Melanoms rückte zunehmend die Immuntherapie in den Mittelpunkt der wissenschaftlichen Forschung, zumal sich der klinische Erfolg der Immuntherapeutika nicht nur auf das maligne Melanom beschränkte, sondern in groß angelegten klinischen Studien für zahlreiche weitere solide Tumoren beobachtet werden konnte (49). Die Entwicklung der Immun-Checkpoint-Inhibitoren fußte dabei im Wesentlichen auf der Erkenntnis, dass das Immunsystem eine entscheidende Rolle in der Kontrolle von malignen Erkrankungen spielt. Dies konnte in der Vergangenheit durch die Erfolge mit immunstimulierenden Zytokinen wie Interferon- α und IL-2 in der Melanomtherapie verdeutlicht werden. Phase III Studien von Hodi *et. al.* (50) sowie von Robert *et. al.* (51) konnten alsdann beobachten, dass es durch die Gabe von IPI bei Patienten im metastasierten Stadium des malignen Melanoms zu einer signifikanten Verlängerung des Gesamtüberlebens im Vergleich zur Standardtherapie mit der Melanom-Vakzine gp100 bzw. Dacarbazin gekommen war. Die pathophysiologischen Mechanismen hinter jenem durchschlagenden Erfolg der Immuntherapeutika liegen insbesondere in der Überwindung derjenigen intratumoralen Resistenzmechanismen, die dazu dienen, der Erkennung, Bekämpfung und Zerstörung durch das Immunsystem zu entgehen.

Von besonderer Bedeutung für die hier beschriebene Immunevasion von Tumoren stellten sich zwei Rezeptoren auf Immunzellen heraus, die aufgrund inhibitorischer Funktion auf die Immunzellen auch als Immun-Checkpoints bezeichnet werden: Dies ist zum einen der auf T-Zellen exprimierte inhibitorische Rezeptor CTLA-4, der bei Bindung des auf APZ exprimierten B7-1/2 (CD 80/86) Rezeptors konsekutiv zur Blockade der Antigenpräsentation führt. Nach Aktivierung der T-Zellen wird der CTLA-4 Rezeptor heraufreguliert und an die Zelloberfläche verlagert, um die Entwicklung einer überschießenden Immunantwort zu verhindern. CTLA-4 wird daher auch als negativer Regulator der endogenen T-Zell-gebundenen Immunantwort bezeichnet i.S. einer natürlichen „Bremse“ des Immunsystems und damit ein physiologisch-angelegter Mechanismus zur Verhinderung von Autoimmunität (9). Durch die Rezeptorblockade kommt es zur Re-Aktivierung der T-Zellen durch APZ im lymphatischen Gewebe und damit der Re-Induktion einer starken Immunantwort. Die Therapie mit IPI zeigte in den randomisiert-kontrollierten Studien zwar einen langsamen Wirkungseintritt, allerdings wurde das Überleben von Patienten mit fortgeschrittenem malignen Melanom durchschnittlich um zwei bis vier Monate verlängert, wobei es in 20 % der Fälle gar zu Langzeit-Remissionen kam, die unter Standardtherapie nicht beobachtet werden konnten (10, 51). Der zweite funktionell relevante inhibitorische Rezeptor auf T-Zellen ist der sogenannte PD-1-Rezeptor. Durch Interaktion dieses PD-1-Rezeptors mit seinem zugehörigen Liganden PD-L1 auf APZ und Tumorzellen kommt es nicht nur zur Blockade der Antigenpräsentation, sondern auch zur Blockade der Effektorfunktion zytotoxischer T-Zellen.

Eine Kombinationstherapie von Anti-CTLA-4 und Anti-PD-1-Inhibitoren ist derzeit die Therapie der ersten Wahl, da diese nicht nur eine höhere Ansprechrate (60 %) zeigte (52), sondern auch dauerhafte und teilweise komplette Remissionen bei gleichzeitig rascherem Wirkungseintritt als bei einer

Monotherapie, ermöglichte (53, 54). Gerade im Hinblick auf diese Arbeit zeigte sich beim Einsatz von CTLA-4 und PD-L1-Inhibitoren interessanterweise eine gesteigerte Glykolyse in T-Zellen, was darauf hindeutet, dass es durch diese Antikörper ebenso gelingt eine für die adäquate antitumorale Immunantwort ausreichende Versorgung mit Nährstoffen sicherzustellen und damit einen weiteren wichtigen Immunevasionsmechanismus des Tumors umgehen zu können (55, 56). Die Effektivität einer Immuntherapie scheint demnach nicht nur durch die Verstärkung der anti-Tumor-Immunantwort, sondern ebenso durch die Veränderung des Tumormetabolismus vermittelt zu werden.

Dem gegenüber stehen allerdings die Gefahren einer zu starken Immunantwort, die sich im Nebenwirkungsprofil jener Immuntherapeutika finden: Dabei wird insbesondere in den ersten 12 Wochen nach Therapiebeginn mit IPI der Großteil der toxischen Nebenwirkungen beobachtet, zu denen u.a. immunvermittelte Reaktionen wie Diarrhö, Hepatitis, Dermatitis, Rash, Hypophysitis und Colitis zählen (49). Interessanterweise konnten vergangene Studien eine enge Korrelation zwischen der Häufigkeit des Auftretens jener autoimmunen Nebenwirkungen und einem besseren klinischen Outcome beobachten, was die Hypothese einer autoimmunogenen Wirksamkeit unterstreicht (10). Im Kontext der personalisierten Medizin ist es daher von besonderem Interesse prädiktive Faktoren zu identifizieren, die zuverlässig ein Ansprechen auf eine Immuntherapie anzeigen können, um so gleichzeitig die potentiell schweren Nebenwirkungen für Non-Responder zu vermeiden (57).

2.8.4. Evidenz einer kombinierten Radio- und Immuntherapie mit Ipilimumab beim zerebral metastasierten Melanom

Da groß angelegte Studien bisher zumeist unter Ausschluss derjenigen Patienten mit aktiven Hirnmetastasen des malignen Melanoms durchgeführt wurden, fehlten bis zuletzt zuverlässige Daten aus prospektiven Studien zur Effektivität von IPI in der Therapie von Hirnmetastasen. Nichtsdestotrotz lassen Ergebnisse aus retrospektiven Analysen bereits vermuten, dass die Therapie mit IPI auch in der Therapie derjenigen Melanompatienten mit bereits stattgehabter zerebraler Metastasierung zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens beiträgt. So konnte die Effektivität von IPI in der Behandlung von Patienten im Stadium der zerebralen Metastasierung des malignen Melanoms erstmals durch Knisely *et. al.* (58) gezeigt werden: Hierbei wurde im Rahmen vergleichender Analysen zwischen Patienten, die eine stereotaktische Radiochirurgie (engl. stereotactic radiosurgery, SRS) oder eine kombinierte Behandlung aus IPI und Radiochirurgie erhielten, ein signifikant längeres medianes Überleben in jenem Patientenkollektiv beobachtet, dass eine kombinierte Therapie mit IPI und SRS erhalten hatte (medianes Überleben 21.3 vs. 4.9 Monate). Demgegenüber konnte eine retrospektive Analyse von Mathew *et. al.* in einer Kohorte von 58 Patienten, welche als Standardtherapie eine stereotaktische Radiochirurgie erhielten, keine Unterschiede in der Krankheitskontrolle des malignen Melanom unter zusätzlicher Gabe von IPI feststellen (59). Nicht zuletzt haben aber u.a. Untersuchungen von Silk *et. al.* (13) nachweisen können, dass Patienten, die im metastasierten Stadium des malignen Melanoms eine Immuntherapie mit IPI in Kombination mit einem Radiotherapie-Regime (bestehend entweder aus WBRT oder SRS) erhalten

hatten, ein signifikant längeres medianes Überleben (18.3 Monate) im Vergleich zu einer Patientengruppe, die keine Immuntherapie erhalten hatten (5.3 Monate), aufwiesen. Interessanterweise konnte hier nicht nur ein längeres Gesamtüberleben unter Therapie mit IPI beobachtet werden, sondern es zeigte sich auch, dass gerade die sequentielle Abfolge der Therapie entscheidenden Einfluss auf das klinische Outcome hat, sodass diejenigen Patienten, die eine Bestrahlung vor der Gabe von IPI erhalten hatten, ein signifikant längeres Gesamtüberleben aufwiesen, als diejenigen Patienten, die eine Bestrahlung erst nach der IPI-Gabe erhalten hatten (13, 36).

Ausgehend von den gesammelten Erkenntnissen zu der Wirkungsweise der Radio- und Immuntherapie kamen u.a. Schmidberger *et. al.* zu der Schlussfolgerung, dass die genaue zeitliche Abfolge der beiden Behandlungs-Modalitäten kritisch für eine mögliche pathophysiologische Interaktion ist (36). Dabei wurde angenommen, dass die Effektivität einer Immuntherapie mit IPI dahingehend gefördert werden kann, als dass eine initiale Bestrahlung zerebraler Metastasen über den dadurch ausgelösten ICD die Wiederherstellung der Antigenität der Melanomzellen ermöglicht und damit eine Erkennung der Epitope durch CD8⁺ CTL wesentlich erleichtert wird. Die folgende Applikation von IPI kann sodann die bereits eingeleitete zytotoxische anti-Tumor-Immunantwort weiter verstärken, sodass es potentiell zu einer effektiven und langfristigen anti-Tumor Immunität kommt. Es ist daher nicht verwunderlich, dass manche Autoren von der „radiosensibilisierenden Immuntherapie“ (60) sprechen, zumal durch den Synergismus von Radio - und Immuntherapie bei der Behandlung des Melanoms im fortgeschrittenen Stadium – und insbesondere im Stadium der Hirnmetastasierung (13, 61) – deren Wirkungen sinnvoll ergänzt werden, sodass insgesamt eine verstärkte anti-Tumor Immunantwort (38, 62) erzielt werden kann. Zwar liegen bislang noch keine Zahlen aus groß angelegten Studien vor (38), nichtsdestotrotz konnte bereits im Mausmodell und in kleineren Studien (63) tendenziell eine verstärkte Immunantwort beobachtet werden. In derzeit laufenden klinischen Studien (36), wie auch in dieser Arbeit, soll daher die Wirksamkeit einer Kombinationstherapie weiter untersucht werden.

2.8.5. Bedeutung CD8 positiver Lymphozyten für die Wirksamkeit einer Radioimmuntherapie

Die ausgeprägte Immunogenität des Melanoms und die klinischen Erfolge immunmodulatorischer Substanzen in der Behandlung des malignen Melanoms haben früh erste Hinweise auf die Bedeutung des Immunsystems für die Therapie des malignen Melanoms geliefert. Dabei werden in der Literatur weithin CD8⁺ CTL als die Haupteffektorzellen bei der Exekution einer anti-Tumor-Immunantwort beschrieben. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Strahlentherapie, wie auch die Immuntherapie, zahlreiche Effekte über die Förderung jener zytotoxischen anti-Tumor Immunantwort vermitteln.

Es wurde daher von zahlreiche Autoren angenommen, dass die Aktivität CD8⁺ CTL eine wesentliche Determinante sowohl für die Prognose von Patienten mit malignem Melanom, wie auch das therapeutische Ansprechen einer Strahlen-, - bzw. einer Immuntherapie ist. Zur Überprüfung jener Hypothese wurde mithilfe immunhistochemischer Untersuchungen das Ausmaß der Infiltration CD8⁺ CTL in Biopsien unterschiedlichster solider Tumoren quantifiziert und mit dem Überleben des untersuchten Patientenkollektivs korreliert: Hierbei zeigte sich, dass eine starke Infiltration CD8⁺ CTL

mit einer signifikant besseren Prognose einhergeht (64) und gleichfalls die Wahrscheinlichkeit des Therapieansprechens erhöht (23, 65, 66). Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass auch die Verteilung der Tumor-infiltrierenden CD8⁺ CTL innerhalb des Tumors signifikanten Einfluss auf die Prognose der Patienten hat, weshalb das Infiltrationsmuster CD8⁺ T-Zellen im malignen Melanom in den letzten Jahren zunehmend als möglicher prädiktiver Parameter für das Ansprechen auf eine Immuntherapie in der Wissenschaft diskutiert wurde (24). So konnten in histologischen Präparaten von Tumorbiopsien drei verschiedene Phänotypen der Tumorimmunität beobachtet werden, welche in statistischen Analysen einen signifikanten Einfluss für das Ansprechen auf eine Immuntherapie mit PD-1/PD-L1-Inhibitoren (24), wie auch mit IPI (23), gezeigt haben (siehe **Abbildung 7**):

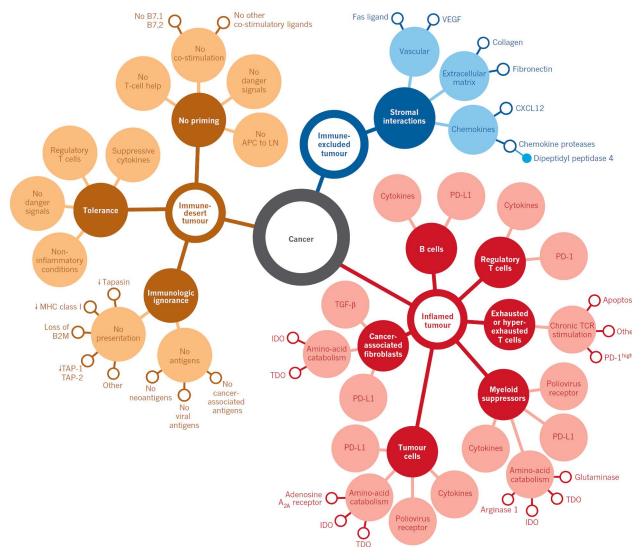


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Phänotypen der Tumorimmunität. Die anti-Tumor Immunität kann in drei Hauptphänotypen unterteilt werden: den Phänotyp der immunologischen Wüste oder auch des anergen Tumors (braun), den Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats (blau) und den Phänotyp der vorbestehenden Immunität (rot). Jedem Phänotyp liegen spezifische biologische Mechanismen zugrunde, die eine effektive Immunantwort verhindern. So kann der Phänotyp der immunologischen Wüste beispielsweise aus einer verminderten Aktivierung von T-Zellen oder einer immunologischen Ignoranz resultieren, wohingegen der Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats durch spezifische stromale Interaktionen charakterisiert ist, die letztlich zur Inhibition der T-Zell-Infiltration beitragen. Demgegenüber kann in entzündlichen Tumoren eine große Zahl tumorinfiltrierender Lymphozyten (engl. tumor infiltrating lymphocytes; TIL) beobachtet werden, wobei die charakteristische Verteilung des Immunzellpopulationen im TME, wie auch deren spezifische Rezeptorexpression entscheidenden Einfluss auf den individuellen Phänotyp der Tumorimmunität haben. (24)

Der inflammatorische Tumorphänotyp (engl. inflamed tumor, kurz: IT), der durch die Präsenz einer großen Dichte tumorinfiltrierender CD8⁺ CTL, eine starke PD-L1-Expression auf TIL und eine hohe genetischen Instabilität des Tumors charakterisiert ist, zeigt dabei zentrale Charakteristika einer vorbestehenden Immunität, sodass für jenen Phänotyp ein starkes Ansprechen auf Immuntherapeutika beobachtet werden konnte (23). Nichtsdestotrotz war ein Therapieansprechen in diesen Tumoren keinesfalls garantiert, was wiederum dafür spricht, dass die Immunzellinfiltration zwar eine wichtige Voraussetzung für das Therapieansprechen ist, aber keinesfalls zwingend zu einem Ansprechen führt (24). Als ein möglicher Grund für dieses variable Therapieansprechen bei gleichem Infiltrationsmuster wurde u.a. die Interaktion CD8⁺ CTL mit anderen Zellen innerhalb des TME angenommen, die deren zytotoxische Aktivität fördern oder aber inhibieren kann. Aktuelle Studien rücken daher gerade diese spatialen Interaktionen innerhalb des TME zunehmend in den Fokus ihrer Analyse (67, 68).

Zum anderen konnte der Phänotyp des sogenannten ausgeschlossenen Infiltrats (engl. immune excluded tumor, kurz: IET) identifiziert werden, in dem eine geringe Anzahl CD8⁺ CTL im Tumorparenchym gefunden werden kann, sondern CTL vielmehr im Stroma zurückgehalten wurden (69, 70) und nur vereinzelte Penetrationen in den Tumor selbst aufwiesen (24). In diesem Phänotyp wurde nach einer Immuntherapie zwar eine Aktivierung der im Stroma befindlichen CD8⁺ CTL, aber nur eine geringfügige Infiltration in den Tumor festgestellt, sodass sich ein klinisches Ansprechen nur in einer Teilmenge zeigte und die T-Zell-Migration in den Tumor somit als erfolgslimitierender Schritt in diesem Phänotyp betrachtet werden kann (71). Zuletzt konnten Tumoren vom Phänotyp der „immunologischen Wüste“ (engl. immunologically ignorant tumor, kurz: IIT) definiert werden, die als zentrale Eigenschaft ein Fehlen bzw. eine Mangelsituation CD8⁺ CTL im kompletten Tumor, einschließlich des Stromas, aufwiesen und wenig überraschend das schlechteste Ansprechen auf eine Immuntherapie zeigten. Der immunologisch anerge Tumorphänotyp und der Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats, werden auch als „nicht-inflammatorische Tumoren“ zusammengefasst. Welche Determinanten letztlich für die Ausprägung des individuellen Phänotyps der Tumorimmunität ausschlaggebend sind, ist aufgrund der Fülle unterschiedlicher Einflussfaktoren weitestgehend ungeklärt, da bereits geringe Variationen einzelner Faktoren, angefangen mit den individuellen Charakteristika des Tumors, den spatialen Zellinteraktionen, über eingesetzte therapeutische Agentien, Umweltfaktoren und die genetische Ausstattung des Individuums (siehe **Abbildung 8**), große Auswirkungen auf deren komplexes Zusammenspiel und damit das Kontinuum der Tumorimmunität haben können (24). Im Rahmen dieser Arbeit wurden insbesondere die Tumorhypoxie und die Akkumulation extrazellulären Adenosins als mögliche als mögliche negative Einflussfaktoren für die Infiltration und die Aktivität CD8⁺ CTL in den Tumor und damit als therapiemodifizierende Resistenzmechanismen identifiziert, weshalb deren Rolle nun fokussiert beschrieben werden soll.

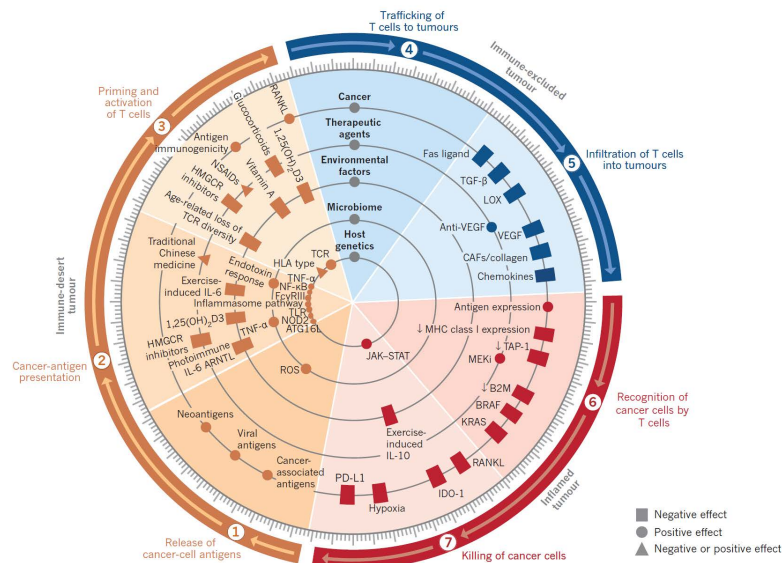


Abbildung 8: Einflussfaktoren des Tumor-Immunitäts. Die Einflussfaktoren für den Phänotyp der Tumorimmunität sind hier in Form eines zyklisch aufgebauten Schemas dargestellt, um zum einen immunologische Veränderungen zwischen den Phänotypen aufzeigen und gleichzeitig verdeutlichen zu können, dass jene Veränderungen auf einem Kontinuum stattfinden und keinesfalls als strikte Trennung zu verstehen sind. Wie hier gezeigt werden kann, ist auch die Tumorhypoxie eine bedeutende negative Determinante für die Ausprägung des Tumor-Immunitäts (24).

3. Die Bedeutung der Tumorhypoxie in soliden Tumoren

Hypoxie ist ein charakteristisches Merkmal solider Tumoren und stellte sich als ein Schlüsselfaktor in der Tumorpathophysiologie heraus, da sie nicht nur zur Förderung der Tumorprogression, im Sinne eines aggressiven Wachstums und Wiederauftretens des Primärtumors, sowie seiner Metastasierung beiträgt, sondern gleichfalls wichtige Resistenzmechanismen gegen die Tumortherapie vermittelt (72). Gleichzeitig repräsentiert die Hypoxie gewissermaßen das Janusgesicht in der Tumorbiologie, da sie einerseits durch den mit ihr assoziierten metabolischen Mangelzustand die Tumorproliferation u.a. durch Initiierung der Tumorzell-Apoptose bzw. Nekrose hemmt, andererseits durch die folgenden Anpassungsreaktionen zur Entwicklung eines aggressiven Tumorphänotyps beiträgt (73).

Im Folgenden sollen ausgehend von einer kurzen Begriffsdefinition der Tumorhypoxie die pathophysiologischen Ursachen bei der Entstehung von Hypoxie erläutert und anschließend deren Auswirkungen für das Tumormikromilieu beschrieben werden. Hierbei sollen besonders die Bedeutung der Tumorhypoxie für den Adenosinstoffwechsel, sowie die damit einhergehende Inhibition antitumoraler Immunantworten innerhalb des TME herausgestellt werden. Es wird sodann in einem kurzen Beitrag die klinische Bedeutung der Tumorhypoxie, gerade im Hinblick auf deren bedeutende Rolle als tumorspezifischer Resistenzmechanismus und Einflussfaktor für die Ausprägung des Tumor-Immunistatus dargelegt, bevor abschließend die Bedeutung der multiplex-Immunfluoreszenz als morphometrische Methode zur genauen Analyse des Zusammenspiels der Tumorhypoxie und des extrazellulären Adenosin-Metabolismus mit CD8⁺ CTL als Haupteffektoren der anti-Tumor-Immunantwort erläutert werden soll.

3.1. Begriffsdefinition „Tumor-Hypoxie“

Im Allgemeinen bezeichnet der Begriff der Hypoxie einen Sauerstoffpartialdruck (pO_2), der nicht ausreicht, um physiologische Zell- und Organfunktionen aufrecht zu erhalten. Demgegenüber wird der Begriff Anoxie als das vollständige Fehlen von Sauerstoff definiert. Da maligne Tumoren wie eingangs beschrieben durch den Zustand der pathologischen Entdifferenzierung allerdings keine physiologische Funktion haben, ist die oben genannte Definition auf diese Gewebeentität nicht stringent zu übertragen (74). Aufgrund des Fehlens einer allgemein-verbindlichen Alternativdefinition haben sich in der Praxis verschiedene Gebrauchsarten herausgebildet: So werden zum einen Sauerstoffkonzentrationen, die im Vergleich zum Ursprungsorgan des Tumors signifikant niedriger ausfallen, als hypoxisch bezeichnet, zum anderen werden unter Tumorhypoxie aber auch solche Sauerstoffkonzentrationen bezeichnet, die mit einer erhöhten Therapieresistenz, einer Verstärkung der Aggressivität des Tumors und folglich einer Verschlechterung der Prognose des Patienten einhergehen (73, 74). Erste Hinweise auf die Existenz von Hypoxie in Tumoren zeigten die Arbeiten von Thomilson und Gray (75), die aus dem histologischen Aufbau von soliden Tumoren Rückschlüsse auf das Vorhandensein eines intratumoralen Sauerstoffgradienten zogen. Durch die Analyse, dass mit zunehmenden Abstand der Tumorzellen zum gefäßführenden Stroma verstärkt Nekrosen auftreten, in Verbindung mit dem Wissen über die Gesetzmäßigkeiten der Sauerstoffdiffusion gelangten die

Autoren schließlich zu der Hypothese, dass Tumornekrosen zumindest teilweise durch einen Mangel an Sauerstoff verursacht werden und dass Gradienten des Sauerstoffpartialdrucks ein typisches Element des Wachstumsmusters solider Tumoren sind (72, 74).

Die klinische Bedeutung der Hypoxie war spätestens zu diesem Zeitpunkt evident, da sich historisch bereits früh herausgestellt hatte, dass die Wirkung locker ionisierender Strahlung in Anwesenheit von Sauerstoff wesentlich größer ist als bei Sauerstoffmangel (11). Die Entstehung von hypoxischen Gewebearealen als ein charakteristisches Merkmal solider Tumoren wurde deshalb schon bald als ein wesentlicher zur Strahlenresistenz beitragender Mechanismus angesehen (11, 74).

3.2. Ursachen der Tumorhypoxie

Ursache der Hypoxie in Tumoren ist ebenso wie in Normalgeweben ein Ungleichgewicht zwischen der Sauerstoffversorgung und dem Sauerstoffverbrauch (73, 74). Während in Normalgeweben die Sauerstoffversorgung und die metabolischen Anforderungen weitestgehend übereinstimmen, sind die neoplastischen Zellen solider Tumoren durch ihren hohen Sauerstoffverbrauch dem gleichzeitig eingeschränkten Sauerstoffangebot entwachsen, was in der Entwicklung von hypoxischen Gewebearealen resultiert (73). In vielen Fällen bleiben diese hypoxischen Areale über längere Zeit konstant, allerdings kann die Versorgung in einigen Tumoranteilen auch zeitlichen Schwankungen unterliegen. Man unterscheidet heute deshalb chronische Hypoxie einerseits und akute (oder auch intermittierende, fluktuierende oder zyklische) Hypoxie andererseits (72), wobei für beide Formen der Tumorhypoxie die strukturellen Besonderheiten in der Mikrozirkulation maligner Tumoren als ursächlich betrachtet werden (74). Diese strukturellen Besonderheiten sind zurückzuführen auf die von dem wachsenden Tumor u.a. durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) angestoßene Neovaskulogenese, die sich letztlich allerdings aufgrund ihres chaotischen Charakters im Vergleich zu Normalgewebe als inadäquat zur Versorgung der wachsenden Tumormasse herausstellt (72). So zeigen sich im Verlauf der Gefäßneubildung folgende pathophysiologische Mechanismen, die zentral an der Entstehung der chronischen Hypoxie in menschlichen Tumoren beteiligt sind:

- a. Durch die abnorme Gefäßdichte und die vergrößerten Abstände zwischen den Gefäßen im Tumor kommt es zur Ausbildung teilweise sehr großer Diffusionsdistanzen, die nach dem ersten Fick'schen Diffusionsgesetz und dem Modell von Krogh (76) zu einem massiven Abfall der Gewebeoxygenierung führen (74). Man spricht hier auch von einer diffusionslimitierten O₂-Versorgung (**Abbildung 9**) verursacht durch die Heterogenität der intratumoralen Mikrozirkulation (73).
- b. Aufgrund der aufgehobenen physiologischen hierarchischen Untergliederung des Gefäßsystems in funktionell und anatomisch getrennte Gefäßabschnitte (Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen, Venen) (77) kommt es in nicht unerheblichem Ausmaß zur Ausbildung von abnormen arteriovenösen Kurzschlussverbindungen, sodass ein erheblicher Teil der Tumorperfusion nicht genutzt werden kann (74).

- c. Außerdem zeigen sich vermehrt Irregularitäten im Gefäßprofil, sodass durch eine starke Elongation der Gefäße am „venösen“ Ende der Mikrozirkulation sehr niedrige O_2 – Partialdruckwerte in den Tumorkapillaren auftreten und es so entsprechend dem „Prinzip der letzten Wiese“ (77) zu einer chronischen Verminderung des O_2 -Partialdrucks in dem betroffenen Gewebe (siehe **Abbildung 70**) kommt (78). Weiterhin können diese Irregularitäten im Gefäßprofil auch zur Ausbildung von interkapillären Gegenstromphänomenen führen, was letztlich in einer Zunahme des funktionellen Shuntvolumens resultiert (74).
- d. Infolge der VEGF-vermittelten chaotischen Vaskulogenese ergibt sich eine Instabilität und Permeabilitätserhöhung der Gefäßwände von Tumorkapillaren, die durch die unvollständige Auskleidung mit Endothelzellen, interendotheliale Lücken, unterbrochene Basallamina und einen Perizytenmangel gekennzeichnet ist. Diese führt zum Austritt von Plasma (79) in das umliegende Interstitium und folglich zu einer Hämokonzentration in den Kapillaren (72, 77), die wiederum über Erhöhung des viskosen Strömungswiderstandes eine Verminderung des Blutflusses bis hin zu einer Stase und damit eine Verschlechterung der Oxygenierung bewirkt (74). Diese kann weiterhin verschlechtert werden, wenn infolge der Plasmaextravasation ein steigender interstitieller Flüssigkeitsdruck zu einer Kompression der Tumorgefäße führt (74).

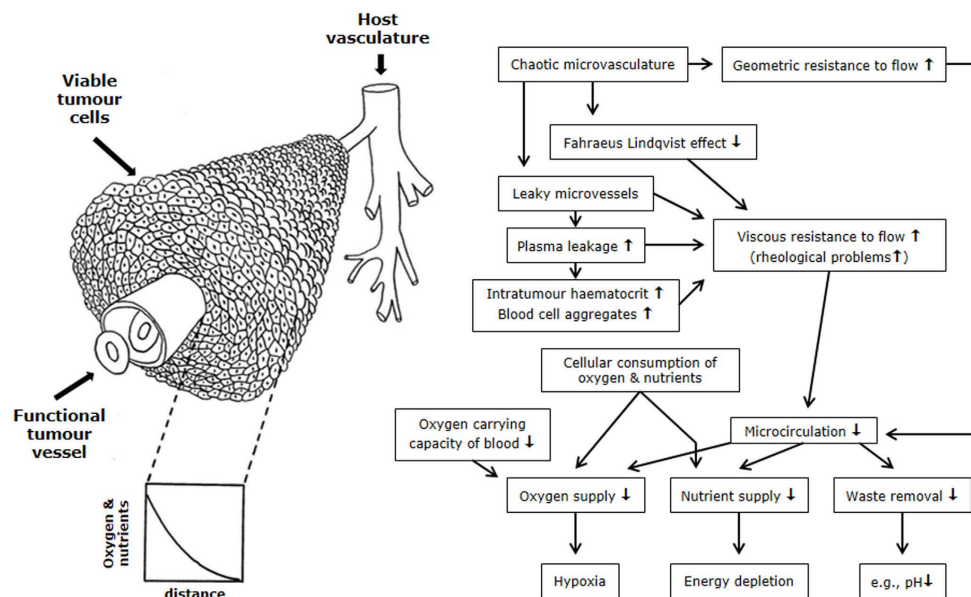


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Wechselwirkung zwischen der Tumervaskularisation und dem TME. Auf der linken Seite ist ein Modell des Wachstums maligner Zellen um ein funktionelles Gefäß des TME gezeigt, das für die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der umliegenden Zellen sorgt. Durch die Anordnung der Tumorzellen um das Gefäß entsteht letztlich ein Gradient für den aus dem Gefäß diffundierenden Sauerstoff, sodass sich sowohl diejenigen Tumorzellen mit zunehmendem Abstand vom Stroma, wie auch diejenigen am venösen Ende des Gefäßschenkels in einem chronischen Mangelzustand befinden. Das Flussdiagramm auf der rechten Seite zeigt demgegenüber die Beziehungen zwischen dem TME und den wachstumsfördernden Faktoren solider Tumoren mit den sich daraus ergebenden Konsequenzen (72).

Im Gegensatz zu den oben genannten Veränderungen gibt es aber auch Faktoren, die sehr kurzfristige Schwankungen der Oxygenierung innerhalb von Minuten oder Stunden verursachen, weshalb man an dieser Stelle von akuter oder intermittierender Hypoxie spricht (74, 80). Ursächlich für die akute Form der Hypoxie ist die veränderte Rheologie in der Tumormikrozirkulation, die durch die Sludge-Bildung

von Erythrozyten, eine vermehrte Plättchenaggregation oder über die Ausbildung von thrombotischen Verschlüssen (74) teilweise zu einer kompletten Unterbrechung der Perfusion führen können (81).

Generell bedeutsam für die Oxygenierung von Tumorgeweben sind natürlich auch Einflussfaktoren, die die O₂-Transportkapazität des arteriellen Blutes verändern. Die wesentliche Determinante der Transportkapazität des Blutes ist dabei die Menge und die funktionelle Verfügbarkeit von Hämoglobin (74): So trägt die tumorassoziierte, wie auch durch die Therapie bedingte Anämie oft zur Entwicklung einer „Anämie-bedingten Hypoxie“ bei (73). Dieser Effekt kann durch die Gabe von Erythropoetin oder Bluttransfusionen zwar umgekehrt werden und zu einer Verbesserung der Tumoroxygenierung führen, inwieweit dies aber die klinische Wirksamkeit von sauerstoffabhängigen Therapien verbessert müssen weitere Studien zeigen (74). Neben einer Anämie trägt ebenso das Vorhandensein von Carboxyhämoglobin zu einer Reduktion der Sauerstoffversorgung von Tumoren bei. So führt der vermehrte Gehalt an CO-Hb bei starken Rauchern nicht nur zu einer verminderten O₂-Transportkapazität des Hämoglobins, sondern es kommt durch die Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve ebenso zu einer erschwerten Sauerstoffabgabe im Gewebe, was in der Summe zu einer massiven Reduktion der Sauerstoffversorgung des Tumors beiträgt (74).

Es lässt sich schließlich festhalten, dass bei der Entstehung hypoxischer Gewebeareale innerhalb von Tumoren, zum einen systemische Faktoren wie die Sauerstofftransportkapazität des Blutes und die Leistung des Herz-Kreislauf-Systems von Bedeutung sind. Gleichzeitig aber die Merkmale maligner Tumoren selbst, die deren Wachstumsverhalten mit einem konsekutiv erhöhten Sauerstoffverbrauch und die strukturellen und funktionellen Besonderheiten innerhalb ihrer Mikrozirkulation betreffen, zu der Entstehung der Tumorphypoxie beitragen. Dabei ist die Tumorphypoxie keinesfalls als ein statisches Phänomen zu betrachten, sondern vielmehr als ein plastischer Prozess, in dem der Oxygenierungsgrad der Gewebe sowohl zeitlichen und auch regionalen Fluktuationen unterliegt (4).

3.3. Auswirkungen der Tumorphypoxie auf das Tumormikromilieu

Das Tumormikromilieu spiegelt – wie bereits eingangs in aller Kürze umrissen wurde – in seiner Komplexität, die sich aus der wechselseitigen Interaktion der maligne transformierten Tumorzellen mit den supportiven Zelltypen des umliegenden Tumorstromas ergibt, die Heterogenität solider Tumoren wider. Für ein näheres Verständnis der mannigfaltigen Auswirkungen der Tumorphypoxie auf das TME muss man zurückgehen auf die im Rahmen des Tumorstromas initiierte – aber letztlich aufgrund ihres chaotischen und unorganisierten Charakters – inadäquate Vaskulogenese, die nicht nur zur Entstehung hypoxischer Gewebeareale beiträgt, sondern in einem generellen Mangel für Sauerstoff, Glukose und andere Nährstoffe mündet (72). Resultat der strukturellen und funktionellen Abnormalitäten innerhalb des Gefäßsystems ist ein vermindertes Angebot an Sauerstoff und Nährstoffen, das hinter der erhöhten Nachfrage der wachsenden Tumormasse zurückbleibt, wodurch sich eine perpetuierte Mangelsituation ergibt, die charakteristisch für das TME ist (74, 82). Als Antwort auf diese Sauerstoff-Mangelsituation, kommt es zur Induktion einer Reihe von Genen (83) – eine besondere Rolle spielt die Induktion des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF)-1 α – die Treiber

für Veränderungen im TME und die Entwicklung des aggressiven Phänotyps maligner Tumoren sind. Zu diesen Anpassungen zählen insbesondere die im Rahmen Reprogrammierung des Tumormetabolismus stattfindende Induktion der Glykolyse, eine Ansäuerung innerhalb des TME und die Akkumulation extrazellulären Adenosins, welche gemeinsam zu einer massiven Inhibition der anti-tumoralen Immunantwort beitragen. Gleichzeitig kommt es zur Induktion der Angiogenese und zur Steigerung des interstitiellen Flüssigkeitsdrucks infolge der strukturellen Gefäßalterationen im TME (72), einer genetische Instabilität und Immortalität durch eine verstärkte Induktion von DNA-Schäden und der Förderung der Telomerase-Aktivität in Tumorzellen (83) und nicht zuletzt zu einem Begünstigen der Tumorzellinvasion. Diese ermöglicht durch die Förderung der Tumorzellmobilität, die Herabregulation von Zell-Zell-Kontakten und die Sekretion von Matrix-Metalloproteinasen zur Degradation der Extrazellulärmatrix letztlich die Entwicklung eines invasiven Phänotyps (84). Aufgrund der Bedeutung für diese Arbeit soll nun explizit auf die Hypoxie-vermittelte Reprogrammierung des Tumormetabolismus, deren Veränderungen innerhalb des TME – namentlich auf den Warburg Effekt und die extrazelluläre Akkumulation von Adenosin – eingegangen und schließlich erläutert werden, wie diese Vorgänge, die auch als metabolische Immun-Checkpoints bekannt sind, zur Inhibition der antitumoralen Immunantwort beitragen.

3.3.1. Reprogrammierung des Tumormetabolismus

In den 1920er Jahren machten Otto Warburg und Kollegen die Beobachtung, dass Krebszellen nicht nur eine erhöhte Glukoseaufnahme zeigen, sondern dass sie die aufgenommene Glukose selbst in der Anwesenheit von Sauerstoff und bei komplett funktionsfähigen Mitochondrien bevorzugt in der Glykolyse weiter zu Laktat fermentieren (83, 85), was in der Folge den Begriff der aeroben Glykolyse prägte (86). Dieses Phänomen war in der Tat so charakteristisch für maligne Tumoren, dass man heute im Rahmen dieses veränderten Glukosemetabolismus maligner Tumoren vom sogenannten „Warburg-Effekt“ (87) spricht, auch wenn sich dieses rückblickend z.T. als Artefakt herausstellte.

Zumal im TME oft hypoxische Verhältnisse vorherrschen, wird die Verlagerung des zellulären Energiemetabolismus hin zur Glykolyse weiter akzentuiert, da es unter Hypoxie über HIF-1 α verstärkt zur Expression von Enzymen der Glykolyse und insbesondere des Glukosetransporters (GLUT-1) 1 kommt (83). Die erhöhte Aufnahme von Glukose, wie auch die gesteigerte Glykolyse gehen dabei konsekutiv mit einer gesteigerten Produktion und Akkumulation von Laktat einher (72, 88), dessen klinische Bedeutung nicht zuletzt durch Studien in Kopf-Hals Tumoren bestätigt werden konnte (89). Obwohl normoxische Tumorzellen einen Teil des anfallenden Laktats anstelle von Glukose über die oxidative Phosphorylierung weiterverwenden können (4), ergibt sich insgesamt durch den vermehrten Anfall von Kohlendioxid, der gesteigerten Sekretion von Protonen in den Extrazellulärraum (EZR), einer gesteigerten Laktatsekretion, sowie der extrazellulären Verarmung an Bikarbonat, eine Erniedrigung des pH im TME (siehe **Abbildung 10**) (72).

Die durch Hypoxie induzierbare Karboanhydrase IX (engl. carbonic anhydrase, kurz: CA), die im Gegensatz zu allen anderen CA-Subtypen auch in Tumoren exprimiert wird, spielt bei der

Entwicklung dieser Tumorzidose eine wichtige Rolle, da sie Reaktionen im Rahmen des Jacob-Steward-Zyklus katalysiert (90) und zugleich für einen Großteil aggressiver Tumoren als Markerenzym der Hypoxie gilt (91).

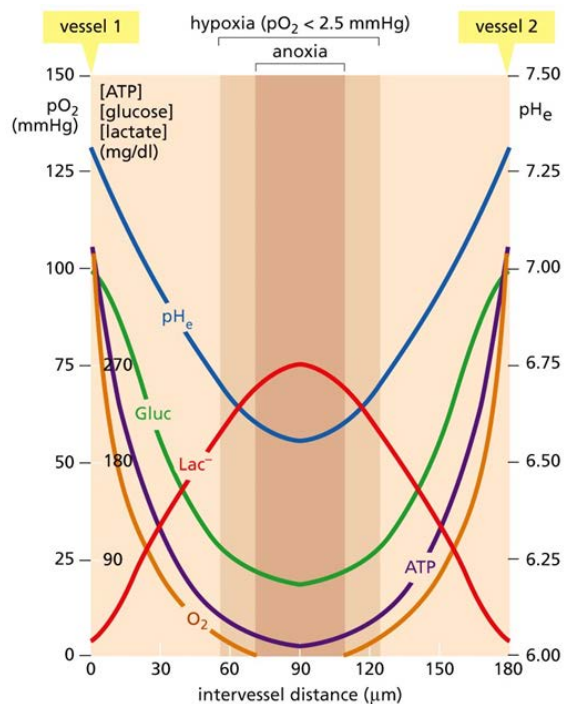


Abbildung 10: Vereinfachte Darstellung zur Entstehung der intratumoralen Mangelsituation, die hier anhand eines Diffusionsmodells veranschaulicht wird (92). Gezeigt ist, dass mit zunehmendem Gefäßabstand das Angebot an Sauerstoff und anderen Nährstoffen (hier Glukose und ATP) sinkt und es aufgrund des Zellmetabolismus gleichzeitig zum vermehrten Anfall von Laktat und anderen Metaboliten kommt, die zu einem sinkenden Gewebe-pH beitragen. Diese Hypoxie-induzierten Veränderungen (wobei die Tumorphypoxie hier als Sauerstoffpartialdruck von weniger als 2,5 mmHg definiert ist) des Tumormetabolismus sind in der Folge Treiber multipler resistenzvermittelnder Effekte innerhalb des TME. Zahlreiche Untersuchungen haben dabei ergeben, dass Tumorzellen, die weiter als 100 µm von Blutgefäßen entfernt sind, einem Zustand der chronischen Hypoxie ausgesetzt sind und bei Entfernungen von mehr als 180 µm zunehmend nekrotisieren (72, 74, 83).

Die Vorteile die sich aus der gesteigerten Glykolyse, wie auch der folgenden Azidose des Gewebes ergeben sind mehrschichtig: Einerseits unterstützt die Ansäuerung des tumorumgebenden Stromas die Invasion der Tumorzellen, sowie die Rekrutierung immuninhibitorisch-wirksamer Tumor-assoziiierter M2-Makrophagen (TAM) (93), andererseits kommt es durch die perpetuierte Mangelsituation im TME, zu einem Wettlauf um Glukose zwischen Tumorzellen und den für zur Exekution ihrer Effektor-Funktionen obligat auf die Glykolyse angewiesenen TIL (55, 56, 94) und als Resultat dessen zu einer Inhibition des Immunsystems (85).

Zusammenfassend stellt der Warburg Effekt also einen wichtigen Wachstumsvorteil für die malignen Zellen in einem Zustand der konstanten Mangelversorgung dar, weil er durch die auf eine intensive Glukosenutzung ausgerichteten Anpassungsvorgänge und die konsekutive Azidifikation des TME sowohl eine Immunevasion unterstützt, als auch die maligne Progression durch eine Selektion aggressiverer Tumorzellklone vorantreibt (85).

3.3.2. Hypoxie-induzierte Akkumulation von extrazellulärem Adenosin

Die Verarmung an Sauerstoff und die damit einhergehende Limitierung von Energiere Ressourcen im TME wird regelhaft von einer Akkumulation großer Mengen extrazellulären Adenosins (ADO) in Bereichen von 50-100 μM (95) (ADO-Level in Normalgeweben bewegen sich demgegenüber zwischen 10-100 nM) begleitet (72). Die Quelle für ADO ist dabei zu einem Großteil das im EZR befindliche ATP (96), das insbesondere aus Tumor - aber auch Immunzellen in den EZR freigesetzt wird (72). Diese Freisetzung geschieht entweder spezifisch über Membrantransporter oder als Folge von Apoptose oder Nekrose im Rahmen von hypoxischem Stress (97). Das extrazelluläre ATP tritt in den Nukleotidkatabolismus ein, wo es sequentiell zu ADO dephosphoryliert wird. Im EZR wird dieser Stoffwechselweg durch das Zusammenspiel der an der Zelloberfläche gebundenen Ekto-5'-Nukleotidasen CD39 und CD73 vermittelt: Dabei katalysiert CD39 (Ekto-Apyrase) die Hydrolyse von ATP/ADP zu AMP, während CD73 AMP schließlich zu ADO umwandelt (96). Diese Form des ATP-Abbaus scheint eine Hauptquelle für ADO zu sein (96). ADO kann in der Folge über die Adenosin-Desaminase (ADA) zu Inosin umgesetzt oder über Nukleosidtransporter in den Intrazellularraum aufgenommen werden (12). Dort wiederum erfolgt eine ebenfalls durch die ADA vorgenommene Desaminierung zu Inosin oder aber eine Rephosphorylierung zu AMP durch die Aktivität der Adenosin-Kinase, wodurch ADO erneut dem Energiemetabolismus zugeführt werden kann (12, 98).

Daneben kann Adenosin auch über erleichterte Diffusion aus intrazellulären Quellen freigesetzt werden (99). Dieser Weg hat sich letztlich als weniger bedeutend herausgestellt, da in Versuchen mit CD73-defizienten Mäusen, infolge des fehlenden Umsatzes des extrazellulären ATP durch CD73, eine massive Verringerung der ADO-Konzentration beobachtet wurde, was im Umkehrschluss die Bedeutung des Stoffwechselwegs um das Tandem CD39 und CD73 für die Akkumulation von ADO unterstreicht (100). CD73 wird hierbei die Rolle eines Schrittmacherenzym zugeschrieben (101), weil dessen Reaktion erst nach intrazellulärer Aufnahme von Adenosin und Rephosphorylierung durch die zytosolische Adenosin-Kinase reversibel ist. Gleichzeitig wird in der Literatur die Expression von CD73 ebenso wie CD39 auf einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen beschrieben: Eine besonders hohe Expression wurde dabei bisher in zahlreichen Tumoren (u.a. im malignen Melanom), aber auch auf Endothel - und Immunzellen beobachtet (96).

Das Entstehen hypoxischer Areale wird in der Literatur, neben inflammatorisch-vermittelten Gewebeschäden, vielfach als die Hauptursache für die Akkumulation von ADO angesehen, da sie sowohl die ADO-Produktion steigert, als auch die Entfernung von vorhandenem ADO aus dem EZR verringert (96). So induziert die Hypoxie über HIF-1 α die enzymatische Aktivität und die Expression der Ektoenzyme CD73 und CD39 (72). Gleichzeitig wird durch die hypoxische Inhibition der Adenosin-Kinase die Entfernung von ADO aus dem EZR verhindert (102). Durch die Hypoxie-induzierte Akkumulation von ADO werden in der Folge zahlreiche Signalwege angestoßen, die physiologischerweise im Sinne einer negativen Rückkopplung einen zusätzlichen Gewebeschaden durch eine überschießende Immunantwort verhindern sollen, in Tumoren allerdings zur Immunevasion genutzt werden (96). Einige Studien konnten gleichfalls eine Hypoxie-unabhängige Hoch-Regulation

des ADO-generierenden Enzyms CD73 beobachten (103), was als ein möglicher Grund für die ADO-Akkumulation in normoxischen Tumorarealen angeführt werden kann.

Extrazelluläres ADO wirkt dabei über autokrine und parakrine Signalwege, die in Tumor-, - Immun – und Endothelzellen über sogenannte Adenosin-Rezeptoren (AR) eine Reihe intrazellulärer Signalkaskaden anstoßen, die letztlich die Effekte des ADOs vermitteln (95, 96): Hierbei nimmt der A_{2A} -Rezeptor ($A_{2A}R$) eine dominierende Rolle ein (104), weil dieser insbesondere die starken immunsupprimierenden ADO-Effekte durch Modulation des angeborenen und spezifischen Immunsystems vermittelt und es den Tumorzellen damit erleichtert einer gegen sie gerichteten Immunantwort zu entkommen (72). Zu den wesentlichen zur Immunevasion beitragenden Mechanismen zählen hierbei die Inhibition von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, NK-Zellen und dendritischen Zellen, sowie die Stimulation regulatorischer T-Zellen (95).

Gleichzeitig werden „das Wachstum und die Progression des Tumors auch direkt über die Adenosin-vermittelte Stimulation der Tumorzellproliferation, - migration, - invasion - und metastatischer Dissemination“ (95) gefördert, sowie durch eine gesteigerte Tumor-Angiogenese unterhalten (72). So konnte mittels in-vitro Experimenten gezeigt werden, dass insbesondere der $A_{2A}R$ die Tumorzellproliferation und die anti-apoptischen Effekte von ADO vermittelt (105), wohingegen die Gabe von CD73-Inhibitoren eine Hemmung des Tumorzellwachstums und eine gesteigerte Apoptose in $CD73^+$ Tumoren zur Folge hatte (106). Weiterhin wurde beobachtet, dass ADO und die Expression von CD73 eine bedeutende Funktion bei der Tumorzellmetastasierung einnehmen: So führte eine Herabregulation von CD73 durch anti-CD73 Antikörper zu einer signifikanten Reduktion von Adhäsion, Invasion als auch Migration $CD73$ -exprimierender Tumorzellen (107). Demgegenüber bewirkte die Zugabe von Adenosin zu Tumorzellkulturen eine gesteigerte Tumorzelladhäsion - und migration (108), die sich allerdings in der Abwesenheit des $A_{2A}R$ nicht mehr nachweisen ließ (109). Dies führte zu der Hypothese, dass der $A_{2A}R$ nicht nur durch die Vermittlung immunsuppressiver Effekte, sondern gleichfalls durch eine direkte Aktivierung von Tumorzelladhäsion – und migration die Tumorzellmetastasierung unterstützt (96, 107, 110).

Zudem wird das Tumorwachstum durch die ADO-vermittelten Wirkungen auf Endothelzellen gefördert. Diese nehmen sowohl eine bedeutende Rolle für die Tumolvaskularisation und damit die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen ein, beeinflussen über die Steuerung der Immunzelladhäsion – und migration aber auch die intratumorale Immunantwort: So stimuliert ADO über den $A_{2A}R$ die Synthese von VEGF (111), was unter physiologischen Bedingungen zwar eine bewährte Lösung für das Aufkommen von hypoxischen Arealen darstellt um den Teufelskreis aus Inflammation, der Entstehung von Hypoxie und der folgenden Immunsuppression zu durchbrechen, in Tumoren allerdings dazu führt, dass deren Wachstum weiter gefördert wird (96). Vor diesem Hintergrund erscheint es pathophysiologisch durchaus plausibel, dass eine vermehrte intratumorale $CD73$ -Expression unabhängig von der potentiellen Inhibition $CD8^+$ CTL einen negativen Prädiktor für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie darstellt.

Es lässt sich schließlich festhalten, dass die Hypoxie-induzierte ADO-Akkumulation im TME, insbesondere durch Inhibition einer zielgerichteten antitumoralen Immunantwort, einen wichtigen metabolischen Immun-Checkpoint einnimmt und dadurch im Zusammenspiel mit den direkten Adenosin-vermittelten Effekten auf die Tumorzellen selbst eine bedeutende Rolle für das Wachstum und die Progression von Tumoren spielt (96).

3.4. Zusammenspiel der Tumorhypoxie und der Akkumulation extrazellulären Adenosins bei der Inhibition der anti-Tumor-Immunantwort

Die durch die Tumorhypoxie im Rahmen der metabolischen Reprogrammierung des Tumors getriggerten Mechanismen, die zur Aktivierung der Glykolyse und Förderung einer extrazellulären Akkumulation von Adenosin führen, gehen mit einer massiven Inhibition der antitumoralen Immunantwort einher, weshalb man hier explizit von metabolischen Immuncheckpoints spricht. Diese werden ebenso wie die allseits bekannten Immuncheckpoints CTLA-4 und PD-1 physiologischerweise zum Schutz des Organismus vor überschießende Immunreaktionen und dem Auftreten von Autoimmunität genutzt, im Rahmen der Tumorgenese von den Tumorzellen allerdings zur Evasion des Immunsystems verwendet (96).

In diesem Kapitel sollen deshalb die genauen Mechanismen der Hypoxie- und Adenosin-vermittelten Immunsuppression als potentielle Resistenzmechanismen im malignen Melanom erläutert werden, bevor abschließend kurz dargelegt wird, wie der durch die metabolische Reprogrammierung verstärkte metabolische Wettlauf um Glukose zu einer Inhibition der antitumoralen Immunantwort beiträgt.

Wie gezeigt werden konnte stellen sowohl die Tumorhypoxie als auch Inflammation von Geweben die wesentliche Triebfeder für eine ADO-Akkumulation dar. ADO wirkt dabei im Wesentlichen über den $A_{2A}R$ auf Immunzellen, da dieser der vorherrschend exprimierte Subtyp auf den meisten Immunzellen ist (96). Die Aktivierung des $A_{2A}R$ führt zu einem breiten Spektrum starker immunsuppressiver Signale, die (1) die Aktivitäten von $CD4^+$, $CD8^+$ T-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen und dendritischen Zellen inhibieren, (2) die Aktivierung von immuninhibierenden Zellen wie T_{reg} , MDSC und M2-Makrophagen (TAM) vorantreiben und (3) die Generierung eines immuninhibierenden Zytokinprofils durch Immunzellen im TME bewirken (72, 96, 98).

Die Bedeutung der $A_{2A}R$ -vermittelten Immunevasion von Tumoren wurde erstmals in einem von Ohta und Kollegen durchgeführten Experiment im Jahr 2006 erfasst, in dem beobachtet werden konnte, dass es in $A_{2A}R$ -defizienten Mäusen zu einer spontanen Tumorregression gekommen war, wohingegen Wildtyp Mäuse keinen vergleichbaren Rückgang der Tumormasse aufwiesen (112). Gleichzeitig konnte es in den $A_{2A}R$ -defizienten Mäusen aber nur in Anwesenheit von $CD8^+$ CTL zur Eradikation des Tumors kommen (112), was die Bedeutung der Effektorfunktionen von CTL zur Generierung einer adäquaten antitumoralen Immunantwort hervorhebt. Weitere Experimente bestätigten die Hypothese der ADO-vermittelten Inhibition $CD8^+$ CTL in malignen Tumoren und konnten zudem die Beobachtung machen, dass es durch $A_{2A}R$ -Agonisten nicht nur zur Inhibition der Proliferation, der Zytokinproduktion (v.a. $IFN-\gamma$) und der Zytotoxizität (113) von T-Zellen und NK-Zellen kam, sondern

diese gleichfalls in einen Zustand der Anergie fielen, d.h. ein vollständiges und permanentes Fehlen einer Immunreaktion auf das Antigen zeigten, der auch lange nach dem Entzug des A_{2A}R-Agonisten noch anhielt (96, 114). Übereinstimmend mit diesem Befund wurde gezeigt, dass eine A_{2A}R-Stimulation die T-Zellaktivierung über eine Behinderung des TZR-Signalweges blockiert (115) und zusätzlich deren Effektorfunktion durch Induktion der immuninhibierenden Rezeptoren CTLA-4 und PD-1 auf T-Zellen weiter gehemmt werden kann (96).

Neben den Effektorzellen sind auch APZ Ziele der immunsuppressiven Wirkung von Adenosin (96). So unterdrücken A_{2A}R-Agonisten einerseits die Produktion von immunogenem IL-12 und induzieren andererseits die Produktion inhibitorischen IL-10 und TGF- β , was das Generieren einer zellulären Immunantwort weiter erschwert (96, 116). In stark hypoxischen Geweben kommt es u.a. durch die Induktion von CD73 zu extrem hohen ADO-Konzentrationen, sodass nicht nur der A_{2A}R, sondern auch der niederaffine A_{2B}R auf APZ aktiviert wird, was über einen sogenannten alternativen Aktivierungspfad zur ineffektiven Aktivierung von T-Zellen führt (12). Weiterhin begünstigt die Aktivierung des A_{2B}R die Induktion von MDSC und TAM, die über ihre immunsuppressiven Eigenschaften ebenfalls zur Inaktivierung von Effektorzellen beitragen (12, 95, 96, 117).

Eine wichtige Rolle bei der Errichtung eines immunsuppressiven TME nehmen auch die T_{reg} ein. Diese CD4⁺ T-Zellen exprimieren CD25 und FoxP3, ein Transkriptionsfaktor, der deren immunsuppressiven Eigenschaften vermittelt (12). Im Gegensatz zu den meisten anderen T-Zellen können T_{reg} im Rahmen ihrer Expression von CD39 und CD73 (118, 119) durch die sequentielle Dephosphorylierung von ATP selbstständig zur Akkumulation von ADO beitragen und exerzieren so gleichfalls ihre immunsuppressiven Eigenschaften (12). Dies belegen nicht zuletzt Untersuchungen in Tumor – und AIDS-Patienten, in denen T_{reg} eine wesentlich höhere Expression von CD39 und CD73 zeigen, als bei vergleichbaren gesunden Probanden (12, 120). Dabei übt das von T_{reg} produzierte Adenosin seine immunsuppressiven Wirkungen insbesondere durch Triggerung der A_{2A}R-abhängigen Inhibition der Effektorzellfunktionen (siehe auch **Abbildung 11**) aus (12, 121). So konnte in Untersuchungen mit A_{2A}R-defizienten CTL, sowie in Experimenten mit A_{2A}R-Antagonisten eine wesentlich geringere die inhibitorische Aktivität der T_{reg} beobachtet werden, was die Bedeutung des A_{2A}R für die Ausübung der T_{reg}-Funktionen verdeutlicht (12, 119). Interessanterweise steigern hohe ADO-Konzentrationen über die Aktivierung von A_{2A}R im Sinne einer positiven Rückkopplung nicht nur die immunsuppressiven Aktivitäten von T_{reg} (u.a. über eine gesteigerte Expression von CTLA-4 Rezeptoren), sondern auch deren absolute Anzahl. Der Grund liegt in der A_{2A}R-abhängigen Induktion von FoxP3 (114), sodass eine T-Zellaktivierung mit gleichzeitiger Stimulation des A_{2A}R zu einem Anstieg der T_{reg}-Population führt (12, 96, 122). Nicht zuletzt diese wechselseitige Verstärkung von Adenosin-Akkumulation und T_{reg}-Aktivität dokumentiert die Bedeutung der T_{reg} für die Schaffung eines TME, das dauerhaft und nicht nur kurzzeitig darauf ausgerichtet ist der antitumoralen Immunantwort zu entkommen (12). Es erscheint deshalb kaum verwunderlich, dass die Elimination von T_{reg} aus dem TME die immunologische Regression von Tumoren verbessert (123, 124).

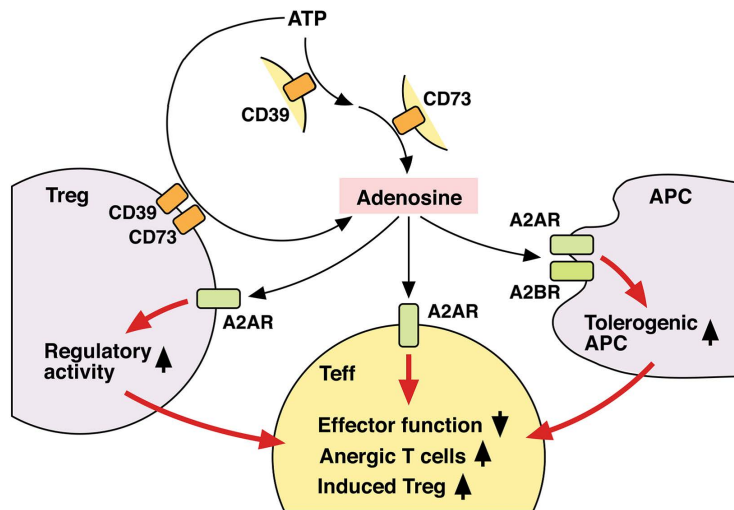


Abbildung 11: Mechanismen der T-Zell-Regulation und deren Adenosin-vermittelter Inhibition (12). ADO wird zu einem Großteil durch die Aktivitäten der Ektoenzyme CD39 und CD73 auf Tumor-, - Immun- und Endothelzellen generiert. Die Interaktion von ADO mit A_{2A}R auf Effektor-T-Zellen hemmt dabei direkt deren Aktivierung und Effektorzellfunktion. Da regulatorische T-Zellen sowohl CD39, als auch CD73 exprimieren, leisten sie gleichfalls direkt einen Beitrag zur ADO-Akkumulation. Gleichzeitig kann ADO die regulatorische Aktivität der T_{reg} im Sinne einer positiven Rückkopplung über A_{2A}R weiter verstärken. Zuletzt vermag ADO antigenpräsentierende Zellen über einen alternativen Aktivierungsweg in einen tolerogenen Zustand zu versetzen, indem diese in der Folge nur noch schwache Stimulatoren der Effektor-T-Zellen sind. Durch die genannten Mechanismen kann ADO eine schnelle, aber auch dauerhafte Immunsuppression durchsetzen.

Durch die im Rahmen der Tumorphypoxie geförderte Einbettung in ein ADO-reiches TME stehen maligne entarteten Zellen demnach multiple Möglichkeiten zur Verfügung, die letztlich eine dauerhafte Immunevasion ermöglichen (12). Es lässt sich deshalb festhalten, dass ADO zweifellos durch die Schaffung eines immunsuppressiven Mikromilieus einen negativen Immun-Checkpoint darstellt (96). Die Bedeutung des Hypoxie-Adenosin-Signalwegs als Resistenzmechanismus maligner Tumoren wird nicht zuletzt durch die Ergebnisse präklinischer Studien unterstrichen, welche nach Aufhebung der Gewebhypoxie, der Inaktivierung von Adenosin-Rezeptoren bzw. der Inhibition von ADO-produzierenden Enzymen eine massive Tumorrepression beobachten konnten (96, 125).

Die hypoxische Inhibition der antitumoralen Immunantwort wird aber nicht nur indirekt durch Förderung der Akkumulation von ADO vermittelt, sondern verminderte O₂-Spiegel sorgen gleichwohl direkt über HIF-1 α für die Entstehung eines immunsuppressiven Milieus innerhalb des TME: So durchlaufen unter hypoxischen Bedingungen kultivierte T-Zellen einen abgeschwächten Aktivierungsprozess (126), der in der Folge in eine verminderte Proliferation, Zytokinproduktion und Zytotoxizität (96, 127) mündet. Dies zeigen auch Studien mit HIF-1 α defizienten T-Zellen, die eine signifikant stärkere Effektorfunktionen aufwiesen als HIF-1 α exprimierende T-Zell-Populationen (128). Gleichzeitig verschlechtern hypoxische Bedingungen die antigenpräsentierende Funktion von DZ und Makrophagen, da sowohl die Antigenaufnahme als auch die Expression von MHC-Molekülen auf den APZ unter Hypoxie herunterreguliert werden (96, 129). Dies resultiert in einer abgeschwächten Aktivierung der T-Zellen durch die APZ (96). Die Generierung eines immunsuppressiven Mikromilieus unter hypoxischen intratumoralen Bedingungen wird weiterhin gefördert durch die Induktion von MDSC und TAM, sowie der Inhibition der NK-Zell-Funktion (96,

130). Dabei scheint die Tumorphoxie ebenso eine bedeutende Rolle für das Anlocken und die Induktion von T_{reg} zu spielen, die eine zentrale Funktion bei der Evasion der antitumoralen Immunantwort in soliden Tumoren einnehmen (96).

Nicht zuletzt trägt der gleichzeitig stattfindende und durch die Tumorphoxie unterhaltene Wettlauf von Tumor- und Immunzellen um das limitierte Angebot an Glukose (55, 56) im TME zu einer Inhibition der Immunantwort bei. Grund für die Induktion dieses Wettkampfes ist die anhaltende Mangelsituation an Nährstoffen innerhalb des TME, die durch den Warburg-Effekt und konsekutiv gesteigerte Glukoseaufnahme der Tumorzellen über GLUT-1 noch verstärkt wird (55). So erfahren gerade die für eine effektive antitumorale Immunantwort so bedeutenden Effektor-T-Zellen (insbesondere die in den Tumor infiltrierenden $CD8^+$ CTL) einen Verlust ihrer Effektorfunktion, da sie obligat auf die aerobe Glykolyse und damit auf Glukose als Energiequelle angewiesen sind (55). Die Tumorzellen demgegenüber können die Immunzellen, aufgrund ihres auf diese Mangelsituation angepassten Stoffwechsels, im Wettkampf um das knappe Nährstoffangebot ausstechen: Ursachen dafür sind zum einen die massive Hoch-Regulation des Glukosetransporters GLUT-1 in Tumorzellen (85), aber auch die tumorzellgetriebene-Akkumulation von Laktat im EZR (131). Diese führt zum Abbau des Konzentrations- und pH-Gradienten im TME und erschwert den T-Zellen damit den Export des Laktats über den Monokarboxylat-Transporter (MCT), was die weitere Aufrechterhaltung der aeroben Glykolyse für die CTL unmöglich macht (132). Schließlich führt der Mangel an Glukose gleichsam zu einer gesteigerten Expression von PD-1 auf aktivierten T-Zellen, was nochmals verdeutlicht, dass auch der Mangel an Nährstoffen im TME essentiell für die Verhinderung einer antitumoralen Immunantwort ist (131, 133).

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass die Tumorphoxie einerseits indirekt über die Förderung der Akkumulation extrazellulären Adenosins, aber auch über Adenosin-unabhängige direkte Effekte zur Immunevasion solider Tumoren beiträgt.

3.5. Klinische Bedeutung der Tumorphoxie in der Therapie solider Tumoren

Die klinische Bedeutung der Tumorphoxie ist vor dem Hintergrund der genannten Anpassungsvorgänge, welche sie in Summe zu einem bedeutenden negativen Einflussfaktor für die Effektivität der anti-Tumor-Immunantwort und damit einem potentiellen Prädiktor für das Therapie-Ansprechen im malignen Melanom machen, evident. Gleichzeitig vermittelt die Tumorphoxie aber zahlreiche weitere Anpassungsreaktionen, welche unabhängig von deren immunmodulatorischen Einfluss den malignen Phänotyp solider Tumoren im Sinne einer malignen Progression verstärken und so direkt zur Therapieresistenz bspw. im Rahmen einer Bestrahlung beitragen (7). So konnten zahlreiche Studien (6, 73) in den letzten Jahren zeigen, dass die Hypoxie-vermittelte Therapieresistenz „mindestens ebenso bedeutsam für die Tumortherapie ist, wie intrinsische Resistenzmechanismen, die auf die genetische Konstitution individueller Tumoren zurückzuführen sind“ (7).

Die von Gray und Kollegen 1953 postulierte Hypothese, dass ein Mangel an Sauerstoff die Hauptursache für das Entstehen von Strahlenresistenz ist (134), beruht dabei auf der Erkenntnis, dass

die Wirksamkeit der Strahlentherapie entscheidend von dem Sauerstoffgehalt des bestrahlten Gewebes abhängig ist (11). So haben Untersuchungen gezeigt, dass sauerstoffhaltige Zellen (mit Sauerstoff-Partialdrücken > 20 mmHg) um den Faktor zwei bis drei strahlenempfindlicher sind als hypoxische (je nach Definition ab einem Sauerstoffpartialdruck < 5 mmHg respektive $< 2,5$ mmHg) oder anoxische Zellen (11). Der Effekt, dass unter Abwesenheit von Sauerstoff die dreifache Strahlendosis (in Gy) zum Erreichen des gleichen biologischen Effekts nötig ist, wie unter normoxischen Bedingungen wird in der Fachliteratur als Sauerstoffverstärkungsfaktor (OER, engl. oxygen enhancement ratio) bezeichnet (72). Ursächlich hierfür ist die zweifache Wirkung ionisierender Strahlung auf biologische Systeme: Zum einen kommt es infolge der direkten Strahlenwirkung durch Wechselwirkung der Strahlung mit der DNA zur Bildung von freien Radikalen in der DNA selbst – was einen kleinen Teil der Gesamtstrahlenwirkung ausmacht – während es im Rahmen der indirekten Strahlenwirkung zur Absorption der Strahlung durch die umliegende Materie, die im Wesentlichen aus Wasser besteht, kommt. In Folge der Strahlenabsorption kommt es nun zur sogenannten Radiolyse des Wassers und damit zur Bildung von Wasserradikalen. Diese Wasserradikale reagieren schließlich sekundär mit biologischen Molekülen wie DNA, Proteinen, Sauerstoff oder mit sich selbst weiter zu Radikalen. In Abwesenheit von Sauerstoff können die in der DNA gebildeten Radikale bspw. mit Wasserstoff-Ionen aus Thiolgruppen reagieren und versetzen die DNA damit wieder in ihren Ausgangszustand. In Anwesenheit von Sauerstoff hingegen kommt es durch die Reaktion der freien Radikale mit Sauerstoff u.a. zur Entstehung giftiger Peroxidradikale, die die Bildung weiterer chemischer Veränderungen bewirken und einen fixierten DNA-Schaden verursachen, der nur durch enzymatische Reparaturmechanismen wieder behoben werden kann (siehe **Abbildung 12**) (11, 72).

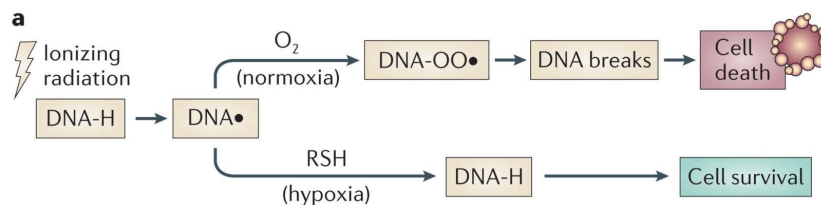


Abbildung 12: Abbildung der strahleninduzierten Folgereaktion in der DNA unter normoxischen bzw. unter hypoxischen Bedingungen. Es wird gezeigt, dass unter hypoxischen Bedingungen die radiogen-induzierten Veränderungen durch die Reaktion mit Thiolgruppen reversibel sind und damit nicht zum Zelltod führen (6)

Mit der Schaffung hypoxischer Areale gelingt es Tumoren also, ihre Strahlenempfindlichkeit empfindlich zu verringern, was einen bedeutenden Resistenzmechanismus für die Radiotherapie darstellt. Übereinstimmend mit diesem Befund wurde in klinischen Untersuchungen von Patienten mit Zervixkarzinomen (135, 136), Weichteilsarkomen (137) bzw. Kopf-Hals-Tumoren (138, 139) ein mit zunehmendem Ausmaß intratumoraler Hypoxie signifikant schlechteres klinisches Outcome nach einer Strahlentherapie beobachtet (72). Aber auch Patientenkollektive mit Zervixkarzinomen bzw. Weichteilsarkomen, welche keine Radiotherapie, sondern primär eine chirurgische Therapie erhalten hatten, zeigten ein schlechteres klinisches Outcome unter hypoxischen Bedingungen (135, 137), was wiederum die Hypothese einer Hypoxie-getriebenen malignen Progression und insbesondere einer

metastatischen Dissemination unterstützt (72). Die Tumorhypoxie ist demnach nicht nur ein Therapie-modifizierender, sondern ebenso ein Tumor-modifizierender Faktor, der sowohl die Strahlenresistenz, als auch die intrinsische Malignität erhöht (74).

Gleichzeitig begünstigen die mit der Hypoxie einhergehenden azidotischen Bedingungen und die Mangelsituation an Nährstoffen im TME als ein weiterer Resistenzmechanismus die Abschwächung der Wirkung zahlreicher Chemotherapeutika (72), da diese nicht nur schlechter von den Tumorzellen aufgenommen werden, sondern – verglichen mit gesunden Zellen – aufgrund des veränderten Zellmetabolismus auch in geringerem Maße dort umgesetzt werden, (72).

Da die Wirksamkeit einer Strahlentherapie aber ebenso entscheidend von der durch sie ausgelösten Immunantwort abhängt, ist es kaum verwunderlich, dass auch die hypoxische Akkumulation von ADO mit der konsekutiven Schaffung eines immunsuppressiven TME einen weiteren wesentlichen Resistenzmechanismus maligner Tumoren darstellt, der das Ansprechen vieler Therapiealternativen, insbesondere der Immuntherapie, in erheblichem Maße beeinflusst. So hat sich in klinischen Studien herausgestellt, dass die Höhe der CD73 Expression auf Tumorzellen von Patienten mit Brust (140), - Ovarial - (141) oder Prostatakrebs (142) mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, da durch die folgende Akkumulation von ADO nicht nur eine effektive antitumorale Immunantwort geschwächt, sondern auch die maligne Progression i.S. einer Metastasierung befördert wurde (72). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Höhe der CD73 Expression mit einer erhöhten Resistenz auf Chemotherapeutika verbunden ist (140), was einen Hypoxie-unabhängigen Resistenzmechanismus extrazellulären ADOs darstellt. Die im Rahmen der Hypoxie-vermittelten Resistenzmechanismen betreffen also nicht nur die direkten Therapieeffekte – wie im Falle der Strahlentherapie die Verminderung der Strahlenempfindlichkeit des hypoxischen Tumorgewebes – sondern beeinflussen gleichfalls durch die Inhibition des Immunsystems indirekt die Gesamtwirkung der Therapie.

Die Identifikation der hier beschriebenen, direkten, wie auch indirekt durch die Tumorhypoxie vermittelten Resistenzmechanismen ist zudem essentiell für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansatzpunkte (siehe **Abbildung 13**). So haben die Experimente von Hatfield und Kollegen gezeigt, dass eine respiratorische Hyperoxie nicht nur die Tumorhypoxie und die Konzentration extrazellulären Adenosins vermindern kann, sondern auch die hypoxisch-adenosinerge Immunsuppression innerhalb des TME aufheben und in der Folge über die antitumoralen Effekte der T- und NK-Zellen zu einer Tumorregression und einem verlängerten Überleben führen kann (125). Dies ist umso beeindruckender, als dass auch andere immuntherapeutische Ansätze zur Überwindung der Immunevasion maligner Tumoren, beispielsweise durch die Blockade von CTLA-4,- PD-L1,- oder A_{2A}- Rezeptoren, diese Effekte durch eine kombinierte Anwendung noch steigern und damit das klinische Outcome wesentlich verbessern könnten.

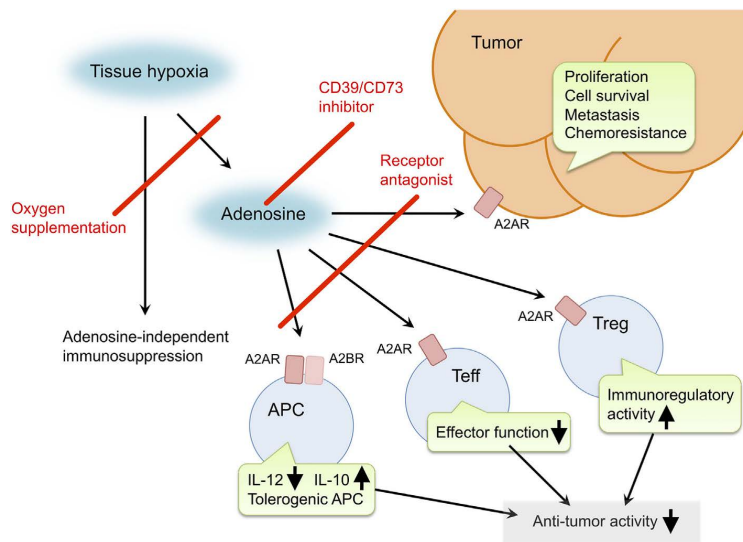


Abbildung 13: Darstellung der tumorfördernden Effekte des Hypoxie-Adenosin-Signalweges und potentielle therapeutische Ziele. Die Gewebhypoxie fördert die ADO-Produktion durch die Induktion der Ektoenzyme CD39 und CD73. Das produzierte ADO vermittelt seine pro-karzinogenen und immunsuppressiven Effekte über zahlreiche Adenosin-Rezeptoren auf Immun- und Tumorzellen. So kommt es nach A_{2A}R-Aktivierung in Effektor-T-Zellen (T_{eff}) zur Blockade des TZR-Signalweges und damit zu einer verminderten Effektorfunktion (IFN- γ -Produktion \downarrow , Zytotoxizität \downarrow). In APZ führen A_{2A}- und A_{2B}R-Stimulation zu einer verminderten Produktion immunstimulierender Zytokine, sodass die Interaktion von T-Zellen mit jenen APZ zu einer eingeschränkten Immunantwort gegen die Tumorzellen führt. Gleichzeitig verstärkt eine A_{2A}R-vermittelte Aktivierung von T_{reg} deren immunregulatorische Aktivität, was in der Summe zu einer stärkeren Inhibition der antitumoralen Immunantwort führt. Zusätzlich kann eine Stimulation des A_{2A}R auf Tumorzellen deren Proliferation, Überleben, Metastasierung und Resistenz auf Chemotherapien fördern. Ein therapeutisches Eingreifen in den Hypoxie-Adenosin-Signalweg (z.B. durch CD39 Antagonisten) könnte diese in der Summe tumorfördernden Effekte abmildern, wenn nicht sogar umkehren. (96). Gleichzeitig vermittelt die Hypoxie aber auch unabhängig von Adenosin eine starke Inhibition der anti-Tumor-Immunantwort, welche hier nicht unberücksichtigt bleiben sollte

Zusammenfassend konnte anhand der aufgeführten Studien nachgewiesen werden, dass sowohl die Tumorphypoxie, wie auch der extrazelluläre Adenosinmetabolismus das Ausmaß der anti-Tumor Immunantwort in soliden Tumoren entscheidend mitbestimmen. Da insbesondere die Wirksamkeit der Strahlen, - wie auch der Immuntherapie entscheidend von der Stärke der körpereigenen anti-Tumor Immunantwort abhängen, kann im Folgenden angenommen werden, dass die Quantifizierung des individuellen Ausmaßes der Tumorphypoxie, wie auch der extrazellulären Adenosinkonzentration, ebenso wie eine Quantifizierung der zytotoxischen Aktivität CD8⁺ CTL, einen wertvollen Beitrag zur besseren Abschätzung eines Therapieansprechens auf eine kombinierte Radio- und Immuntherapie leisten kann. Aufgrund der zahlreichen mit der Tumorphypoxie, wie auch der Akkumulation von ADO einhergehenden intrinsischen Resistenzmechanismen, wurde darüber hinaus vermutet, dass die Quantifizierung jener Parameter neben deren prädiktivem Wert, auch prognostische Abschätzungen erlauben können (72), zumal diese als Determinanten eines Tumorrezidivs bzw. einer potentiellen Metastasierung identifiziert wurden.

Im Folgenden soll daher erläutert werden, wie mithilfe morphometrischer Methoden und digitaler Bildanalyse eine exakte Quantifizierung jener Parameter und die Abbildung von deren Zusammenspiel innerhalb des Tumormikromilieus erfolgen kann. Hierdurch soll sodann eine genaue Evaluation der pathophysiologischen Annahmen einer durch die Tumorphypoxie vermittelten ADO-Akkumulation und insbesondere einer hypoxischen respektive Adenosin-vermittelten Immunsuppression erfolgen.

4. Rolle der multiplex-Immunfluoreszenz bei der Darstellung der spatialen und zellulären Heterogenität innerhalb des Tumormikromilieus

Die multiplex-Immunfluoreszenz eignet sich durch die sequentielle Darstellung der Proteinexpression mehrerer frei wählbarer Biomarker innerhalb eines Gewebeschnitts zur Darstellung multipler, verschiedener Zellpopulationen. Dabei kann auf der Basis einer visuellen und semiquantitativen digitalen Analyse der Expressionsintensität – und Musters der Biomarker der individuelle Phänotyp und die genaue Lokalisation einer Zelle innerhalb des whole-slide Tumorpräparates festgestellt werden, sodass unterschiedliche Zellphänotypen identifiziert und deren Interaktion miteinander in einem spatialen Kontext analysiert werden können (143, 144). Dies prädestiniert sie geradezu zur Charakterisierung des zellulären Aufbaus solider Tumoren und zur Darstellung der Komplexität der Zellinteraktionen innerhalb des TME, zumal durch die multiparametrische Darstellung spatiale und temporale Zellinteraktionen detailliert beschrieben werden können (145).

Gerade die Abbildung verschiedenster Immunzellpopulationen innerhalb des TME, deren Interaktion untereinander und mit anderen Zelltypen innerhalb des Tumors – auch unter dem englischen Namen des „Immune-Profilings“ bekannt – ist mittlerweile ein bedeutendes Werkzeug zur Identifikation prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine Immuntherapie (146). So ermöglichte die nähere Charakterisierung des TME anhand des PD-L1 Status (147) oder der Signatur von TIL (148) zuletzt etwa die Identifikation der verschiedenen immunologischen Phänotypen solider Tumoren, denen eine große Bedeutung für das spätere Ansprechen auf eine Immuntherapie zugesprochen wird (23, 146).

Da zudem mit zunehmender Zahl synchron detektierter Antigene in einem Tumorpräparat eine exaktere Charakterisierung der Zellpopulationen innerhalb des Tumors ermöglicht wird, ist es im Sinne einer umfassenden Darstellung des Tumorphänotyps besonders erstrebenswert eine große Zahl verschiedener Antigene in einem Präparat zu erfassen. Bislang ergab sich durch die Überschneidung der unterschiedlichen Emissionsspektren der verwendete Fluorochrome allerdings eine Limitation auf maximal sieben simultan zu detektierende Antigene. Sowohl in der Literatur (145), wie auch in arbeitsgruppeninternen Versuchen zeigte sich zudem, dass jene 7-Kanal-IF-Färbungen nicht nur mit einem großen zeitlichen Aufwand, sondern auch Einschränkungen in der Qualität der Färbungen verbunden sind, weshalb in dieser Arbeit auf eine etablierte 4-Farben-IF-Färbung zurückgegriffen wurde. Die Fortschritte im Bereich der digitalen Pathologie können hier durch die Anwendung digitaler whole-slide Bildanalysemethoden die objektive Quantifizierung der gewünschten Parameter und damit die systematische Suche nach neuen, in der IF-erfassbaren, Prädiktoren für ein Therapienansprechen auf eine Radioimmuntherapie deutlich erleichtern (57, 149).

Indes ist Adenosin als sehr kleines Molekül, wie auch der Oxygenierungsstatus von Tumoren, *in-vivo* nur mit sehr aufwändigen und in der klinischen Praxis schwer einsetzbaren Methoden zu bestimmen. Es soll daher anhand des Konzepts sogenannter Surrogatmarker erläutert werden, wie mit deren Hilfe in der multiplex-IF eine indirekte Quantifizierung der genannten metabolischen Parameter vorgenommen werden kann, um anhand dieses quantitativen Werts deren prädiktive Bedeutung für ein

Therapieansprechen zu evaluieren. Demgegenüber kann das Ausmaß und die Aktivität der anti-Tumor Immunantwort mit Oberflächen- und Aktivitätsmarkern verschiedener Immunzellen direkt dargestellt und damit unmittelbare Rückschlüsse auf den prädiktiven Wert gezogen werden.

Neben der Identifikation biologisch plausibler Biomarker spielt gleichfalls die Kombination jener Biomarker eine besondere Rolle für die multiplex-IF, gerade um die spatialen Interaktionen verschiedener Zelltypen besser analysieren zu können. In einem kurzen Abriss sollen daher ebenso diejenigen Überlegungen angeführt werden, die zur Auswahl der in der multiplex-IF untersuchten Biomarker geführt haben, bevor abschließend gerade vor dem Hintergrund der pleiotropen Effekte der Tumorphoxie auf verschiedene Zellpopulationen, die Bedeutung spatialer Zellinteraktionen innerhalb des Tumormikromilieus im Kontext der aktuellen wissenschaftlichen Debatte erläutert werden soll.

4.1. Das Konzept der Surrogatmarker zur Bestimmung der Tumorphoxie und des extrazellulären Adenosins in der multiplex-Immunfluoreszenz

In der Vergangenheit wurden zur Identifikation der Tumorphoxie zahlreiche Methoden zur Bestimmung des Oxygenierungsstatus untersucht: Als Goldstandard gilt dabei das „Histograph“ System der Firma Eppendorf, welches auf der Basis der polarographischen Methode mithilfe sauerstoffsensitiver Mikroelektroden eine direkte Bestimmung des intratumoralen Oxygenierungsstatus ermöglicht (74). Diese in zahlreichen klinischen Studien erprobte Methode der Feinnadel-pO₂-Histographie konnte zum einen zeigen, dass Hypoxie quasi in allen menschlichen Tumoren nachweisbar war (78, 150, 151) und zum anderen, dass die Tumorphoxie das Therapieergebnis – besonders nach einer Strahlentherapie – signifikant beeinflusst (72). Dies wurde sowohl für Zervix-, - (135, 136, 152) Kopf-Hals- (138, 139) und Prostatakarzinome (153), als auch für Weichteilsarkome (73, 137) nachgewiesen, wobei gleichzeitig gezeigt werden konnte, dass auch unabhängig von der Therapieform schlechter oxygenierte Tumoren (medianer pO₂<10 mmHg) ein signifikant kürzeres Gesamt- und krankheitsfreies Überleben (154, 155) aufwiesen, was die Hypothese der Hypoxie-getriebenen malignen Progression weitestgehend bestätigte (74). Dies führte schließlich dazu, dass der Tumorphoxie die Rolle eines prognostischen Faktors für das klinische Outcome der Patienten zugeschrieben wurde (74). Trotz der hohen Genauigkeit und der exakten Darstellung der intratumoralen Sauerstoffverhältnisse weist die Feinnadel-pO₂-Histographie einige Nachteile auf, die einer breiten Anwendung in der klinischen Routine entgegenstehen. Dazu zählen die hohe Invasivität der Methode und die damit verbundene Risikosteigerung für den Patienten, sowie die Beschränkung auf solche Tumorentitäten, die einer Nadelelektroden-Messung von außen zugänglich sind (74).

Aufgrund dieser Nachteile und dem Wunsch, die Bestimmung des Oxygenierungsstatus ebenso in der klinischen Routine und der Immunhistochemie zu etablieren, rückten in der Folge sogenannte Surrogatmarker der Hypoxie (auch: endogene Hypoxiemarker) in den Vordergrund: Surrogatmarker stellen körpereigene Proteine dar, die als Messwert ein übergeordnetes klinisches Phänomen darstellen sollen. Mindestvoraussetzung ist dabei, dass zwischen dem klinischen Phänomen und dem ausgewählten Marker ein signifikanter Zusammenhang besteht (156).

Zur Quantifizierung der Tumorphypoxie wurden daher körpereigene Proteine ausgewählt, die „im Rahmen der physiologischen Antwortreaktion auf Hypoxie über HIF-1 α induziert werden“ (74): Zu den am besten untersuchten endogenen Hypoxiemarkern zählen dabei CA-IX, GLUT-1, sowie HIF-1 α selbst (72). Deren Expressionsmuster - und -stärke kann mittels spezifischer monoklonaler Antikörpern (mAb) in immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen werden (72). Im Idealfall korrelieren dabei das Expressionsmuster- und die Expressionsstärke des Surrogatmarkers mit den direkt nachgewiesenen Messwerten des gesuchten Parameters, d.h. in diesem Fall mit der polarographisch gemessenen Sauerstoffverteilung im Gewebe.

Bei der Anwendung von HIF-1 α konnte der Nachweis erbracht werden, dass dessen Expressionsmuster mit den direkten pO₂ Messungen des Eppendorf-Systems weitestgehend übereinstimmt (74) und damit einen guten Marker für die Tumorphypoxie darstellt. Auch für CA-IX und GLUT-1 konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass deren Expression – wenn auch schwach – signifikant mit dem Oxygenierungsstatus korreliert war (74), andere Studien wiederum konnten diesen Zusammenhang nicht finden, weshalb bisher kein eindeutiger Beweis für die hinreichende Genauigkeit endogener Hypoxiemarker als Ersatzparameter für eine invasive Sauerstoffmessung geliefert werden konnte (72). Dies liegt zum einen daran, dass bei der invasiven Sauerstoffmessung der durchschnittliche Oxygenierungsstatus von sehr großen, mehrere hundert Zellen umfassenden Gewebearealen gemessen wird, da die verwendeten Feinnadel-Elektroden einen Durchmesser von ca. 17 μ m besitzen, während bei der Messung mit endogenen Hypoxiemarkern der Sauerstoffgehalt bis hinab auf die zelluläre Ebene dargestellt wird (74). Zum anderen ergeben sich weitere Unterschiede in der Abschätzung des Sauerstoffgehalts im Gewebe im Vergleich zur polarographischen Methode dadurch, dass es in jeder Zelle zu einer zelltypspezifischen HIF1 α -vermittelten Antwort und damit einer von Zelle zu Zelle unterschiedlichen Reaktion auf Hypoxie kommt, was echte quantitative Korrelationen zwischen dem absolut gemessenen Sauerstofflevel und der Expressionsintensität endogener Hypoxiemarker quasi unmöglich macht und die Hypoxie-assoziierten Proteomveränderungen vom tatsächlichen physikalischen Oxygenierungsstatus quantitativ entkoppelt (74, 157, 158). Zuletzt beeinflussen aber ebenso nicht-Hypoxie-spezifische Faktoren die Expression jener Hypoxiemarker (159), sodass man festhalten kann, dass bisherige Surrogatmarker für Hypoxie für eine exakte Darstellung der Sauerstoffverteilung im Gewebe nicht ideal geeignet sind. Sie sind daher nicht als Marker der Tumorphypoxie in dem Sinne anzusehen, dass eine Expressionsanalyse dieser Proteine eine direkte polarographische Bestimmung des Oxygenierungsstatus durch äquivalente Daten ersetzen kann (74). Nichtsdestotrotz war die Expression jener Surrogatmarker – ebenso wie der Hypoxienachweis aus den direkten polarographischen Sauerstoffmessungen – signifikant negativ mit dem Therapieansprechen auf eine Strahlentherapie und dem Gesamtüberleben korreliert, sodass Patienten mit einer hohen Expression jener Marker ein signifikant kürzeres krankheitsfreies Überleben zeigten (74). Nicht zuletzt diese Erkenntnis, wie auch das biologisch plausible und für Hypoxie-induzierte Proteine geradezu typische Expressionsmuster mit einer verstärkten Expression bei zunehmender Distanz zum gefäßführenden Stroma deutet darauf hin, dass endogene Hypoxiemarker

trotz allem den negativen prognostischen Einfluss der Tumorphypoxie für das Therapieansprechen und das Outcome der Patienten ausreichend gut widerspiegeln.

Aus diesem Grund sind die hier beschriebenen endogenen Hypoxiemarker zwar keine „Hypoxiemarker“ im eigentlichen Wortsinne, aber doch Marker der Hypoxie-assoziierten malignen Progression (74). Da in der folgenden Studie Hypoxiemarker insbesondere als prädiktive Faktoren für das Therapieansprechen auf eine Radioimmuntherapie dienen und damit keine exakte Quantifizierung des Oxygenierungsniveaus liefern müssen, wurden für die durchgeführten multiplex-IF-Färbungen die oben genannten HIF-1a, CA-IX und GLUT-1 als ausreichend genaue Hypoxiemarker befunden, wobei deren Anwendbarkeit im malignen Melanom im folgenden weiter geprüft werden soll.

Im Rahmen der vorgestellten Studie sind aber nicht nur Surrogatmarker für Hypoxie, sondern gleichfalls für die extrazelluläre Akkumulation von Adenosin und die Aktivität der antitumoralen Immunreaktion erforderlich. Gerade Adenosin, das als sehr kleines Molekül *in-vivo* nur mit aufwendigen Methoden direkt im Gewebe bestimmt werden kann, wird daher meist indirekt über andere Parameter des Adenosinstoffwechsels bestimmt: Als mögliche Surrogatmarker wurden daher insbesondere die Adenosin-generierenden Oberflächenenzyme CD73 und CD39 identifiziert, da diese die Funktion als Schrittmacherenzyme in der ADO-Synthese einnehmen und damit eine enge Korrelation mit der ADO-Konzentration erwarten lassen. Nichtsdestotrotz ermöglichen auch diese Surrogatmarker, ebenso wie die endogene Hypoxiemarker, keine exakte Quantifizierung der Konzentration extrazellulären Adenosins, weshalb auch aufgrund der Tumorerogenität, zum Teil deutliche Unterschiede zwischen dem Expressionsmuster und der Expressionsstärke von CD73 und der extrazellulären Adenosinkonzentration festgestellt werden können. Da sie dennoch zumindest tendenziell den Einfluss extrazellulären Adenosins innerhalb des TME und dessen prognostische Bedeutung in dem untersuchten Gewebe hinreichend gut abbilden, wurden für die durchgeführten Färbungen CD73, CD39 und auch ENT-1 als ausreichend genaue Surrogats befunden.

Es gilt an dieser Stelle anzumerken, dass im Gegensatz zu den endogenen Hypoxiemarkern GLUT-1 und CA-IX, die prognostische Relevanz von CD73 bzw. dessen mögliche prädiktive Bedeutung für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie noch umstritten ist (108, 118, 142, 160-162): Insgesamt zeigt sich zwar eine verstärkte CD73 Expression in einer Vielzahl von Tumoren, zu denen auch das maligne Melanom zählt (162). Allerdings konnte bisher lediglich in Mamma- und Ovarialkarzinomen eine Förderung der malignen Progression infolge einer vermehrten CD73-Expression nachgewiesen werden (108, 141), wohingegen Untersuchungen im Melanom keine signifikante Assoziation einer erhöhten CD73 Expression auf Tumorzellen mit einem verschlechterten Therapieansprechen zeigen konnten (161, 162). Dies ist für die Bewertung von CD73 als möglichen Surrogatmarker des Adenosins insofern relevant, als dass es man daher zumindest kritisch hinterfragen sollte, ob CD73 tatsächlich die negativen pathophysiologischen Effekte extrazellulären Adenosins *in-vivo* ausreichend genau zu erfassen vermag, zumal sich Adenosin bislang lediglich *in vitro* als signifikant negativer Einflussfaktor für die Stärke einer anti-Tumor-Immunantwort herauskristallisiert hatte.

4.2. Vorgehen zur Auswahl der Biomarker für die multiplex-Immunfluoreszenz

Die Auswahl der als Surrogats identifizierten Biomarker orientiert sich an den pathophysiologischen Annahmen zu den Hypoxie-vermittelten Resistenzmechanismen im malignen Melanom, wie auch deren dortigem Expressionsmuster. Zwar sind Surrogatmarker keinesfalls als Ersatzparameter in dem Sinne, als dass sie eine absolut exakte quantitative Bestimmung eines gesuchten Parameters ermöglichen, zu betrachten, dennoch können sie eine erste Abschätzung anhand der Expressionsintensität ermöglichen und sind ebenso wie die exakten quantitativen Zahlenwerte zumeist signifikant mit Prognose und Therapieansprechen des individuellen Patienten korreliert. Zur besseren Einordnung der Surrogatmarker in die Komplexität des TME sollte nicht zuletzt eine Kombination der Marker ausgewählt werden, welche Rückschlüsse auf die zelluläre Tumorchitektur und die spatialen Zellinteraktionen zulässt und schließlich eine Evaluation der in den Studienzielen aufgeworfenen Hypothesen einer Hypoxie-vermittelten und Adenosin-getriebenen Immunsuppression ermöglicht. Für die Auswahl der Biomarker wurden daher ebenso deren Zuverlässigkeit zur semiquantitativen Abbildung der Hypoxie, des extrazellulären ADOs und der anti-Tumor-Immunantwort im TME, sowie deren Kombinationsfähigkeit mit anderen Surrogatmarkern im Rahmen der multiplex-IF Färbungen herangezogen. Ferner wurde bei der Biomarker-Auswahl die Qualität und Plausibilität der Färbungen berücksichtigt, sodass die mAb entweder bereits etabliert waren oder sich in Probe-Färbungen soweit bewährt hatten, dass sie ein gutes Färberesultat und damit eine valide Auswertung ermöglichen.

Zur semiquantitativen Abschätzung der Hypoxie wurden zunächst die oben identifizierten endogenen Hypoxiemarker (CA-IX, HIF-1 α und GLUT-1) in Erwägung gezogen. Da sich CA-IX bereits in Kopf-Hals-Tumoren als relativ guter Hypoxiemarker herausgestellt hatte (74), wurde nun dessen Expression im malignen Melanom geprüft: Hier konnten IHC-Untersuchungen von Syrjänen *et. al.* (163) allerdings zeigen, dass CA-IX im malignen Melanom nicht exprimiert wird. Daher wurde CA-IX als kein geeigneter Biomarker befunden und lediglich im Rahmen einer Einzelfärbung zur Überprüfung des Untersuchungsergebnisses von Syrjänen *et. al.* gefärbt. Aufgrund der mehrdeutigen Resultate immunhistochemischer Studien zur Expression von HIF-1 α im malignen Melanom (164, 165) und der fehlenden Korrelation der HIF-1 α Expression mit klinisch-pathologischen Charakteristika wurde HIF-1 α gleichfalls als kein geeigneter Biomarker speziell für das maligne Melanom befunden.

Demgegenüber stellte sich GLUT-1 als ein vielversprechender Surrogatmarker der Tumorphoxie und der malignen Progression (166) heraus: Zwar finden sich in bisherigen IHC-Studien ebenso inkonklusive Resultate bzgl. der GLUT-1 Expression im malignen Melanom (167-170). Gerade die groß angelegten Studien von Dura *et. al.* (165) und Koch *et. al.* (170) konnten allerdings eine stabile GLUT-1 Expression in malignen Melanomen beobachten und gleichzeitig Hinweise für eine Korrelation der GLUT-1 Expression mit klinisch-pathologischen Charakteristika finden. Nicht zuletzt aufgrund dieser Beobachtungen, aber auch ob des überzeugenden Expressionsmuster von GLUT-1 in probeweise durchgeführten Einzelfärbungen, welche eine biologisch plausible heterogene GLUT-1-Expression mit einem deutlich sichtbaren hypoxisch vermittelten Gradienten um Gefäße zeigten, wurde GLUT-1 als erster Biomarker einer 4-Farben-IF-Färbung gewählt.

Auf der Grundlage des bereits in der AG Mayer vorbeschriebenen Konzepts der Natrium-Kalium (Na^+K^+) ATPase als möglichem Hypoxiemarker inverser Natur, wurde – i.S. einer Kreuzvalidierung der mithilfe von GLUT-1 erhobenen Befunde – angestrebt, eine zweite Färbung mit diesem unter Hypoxie herunterregulierten Biomarker durchzuführen: Aufgrund der gut etablierten Färbungen, der konstanten Expression im malignen Melanom, wie auch der Befunde von Poulsen *et. al.* (171), welche eine unter Hypoxie verminderte Oberflächen-Expression der Na^+K^+ ATPase beobachtet haben, wurde die Na^+K^+ ATPase als möglicher inverser Hypoxiemarker in eine zweite Färbung aufgenommen.

Für die semiquantitative Bestimmung von ADO wurden v.a. die beiden identifizierten Surrogatmarker CD39 und CD73, wie auch ENT-1 in Erwägung gezogen. Da für die Tandemenzyme CD39 und CD73 eine hypoxische Hochregulation und eine Expression auf Immun-, - Endothel- und auf Melanomzellen vorbeschrieben wurde (104, 172), sind diese weiterhin besonders interessant zur Überprüfung der pathophysiologischen Annahme einer hypoxischen Akkumulation von ADO bzw. einer Adenosin-vermittelten Immuninhibition im Rahmen spatialer Analysen. Eine mögliche endotheliale Expression von CD73 könnte gleichzeitig eine hinreichend gute Abbildung der Gefäßverteilung im Melanom erlauben. Dies ist vor dem Hintergrund der pathophysiologischen Hypothesen eines abnehmenden Oxygenierungsgrades mit zunehmendem Gefäßabstand und einer vermehrten perivaskulären Immunzellinfiltration als überprüfenswerte Annahme zu bewerten. Zumal der zum Zeitpunkt der Untersuchungen verfügbare mAb für CD39 ob seines unspezifischen Expressionsmusters im Melanom zunächst nicht für unsere Färbungen etabliert werden konnte, wurde schließlich CD73 als zweiter zu färbender Biomarker festgelegt. Zur Überprüfung einer endothelialen CD73 Expression wurde zudem entschlossen, den etablierten Gefäßmarker CD34 (173) für eine zweiten Färbeserie zu verwenden.

Der letzte Biomarker der 4-Farben-IF-Färbungen sollte schließlich insbesondere die anti-Tumor Immunantwort zuverlässig abbilden können, sodass diese nicht nur semiquantitativ ermittelt, sondern im Sinne eines Immune-Profilings gleichzeitig in den spatialen Kontext des TME eingeordnet werden kann. Da die natürliche anti-Tumor Immunantwort v.a. von der Effektorfunktion der CD8^+ CTL und der NK-Zellen abhängt und das Ausmaß der CD8^+ -Infiltration gleichfalls in zahlreichen Publikationen mit dem Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie (174), wie auch mit dem weiteren Überleben des Patienten (65, 175-178) korreliert war, wurde CD8 als valider Marker für die Abbildung jener anti-Tumor-Antwort im Melanom befunden. Zwar wurden mit FoxP3^+ T_{reg} und CD56-exprimierenden NK-Zellen weitere pathophysiologisch relevante Biomarker identifiziert (179, 180), aufgrund deren stark variabler Expression im malignen Melanom wurde aber von deren Färbung Abstand genommen und stattdessen mit CD45 ein Pan-Leukozytenmarker für eine zweite Färbung gewählt.

Durch die Kombination der Biomarker GLUT-1, CD73 und CD8 können alle als pathophysiologisch relevant-identifizierten Parameter in einem Tumorpräparat quantitativ anhand der Expressionsmuster- und intensität mittels digitaler Bildauswertungsmethoden objektiv analysiert, als auch deren spatiale Interaktion miteinander evaluiert werden. Welche Bedeutung gerade diese örtliche Komponente für die klinische Prognose ausübt, wird nun im Kontext der derzeitigen Forschung kurz dargelegt.

4.3. Klinische Bedeutung der Erfassung spatialer Interaktionen innerhalb des Tumormikromilieus

Die klinische Bedeutung der Erfassung und Analyse spatialer Interaktionen ist nicht nur vor dem Hintergrund der Veranschaulichung des mikroregionären Zusammenwirkens verschiedener Zellpopulationen innerhalb multipler frei wählbarer Bereiche eines Tumors evident, sondern sie ermöglicht zudem das Aufdecken potentiell bedeutsamer resistenzvermittelnder tumorpathophysiologischer Zellinteraktionen innerhalb verschiedener Mikromilieus des Tumors, was zugleich einen wichtigen Beitrag zur Entschlüsselung von dessen Heterogenität leistet (144, 181).

So haben bereits zahlreiche Studien darlegen können, dass die spatiale Interaktion von Immunzellen innerhalb von Tumoren und insbesondere deren Beziehung zu den sie umgebenden Tumorzellen von klinischem Interesse ist. Für das maligne Melanom konnte so das Infiltrationsmuster $CD8^+$ CTL als stabiler prognostischer Parameter, wie auch als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine Immuntherapie identifiziert werden, sodass in solchen Patienten, welche eine vermehrte intratumorale $CD8^+$ Infiltration gezeigt hatten, ein besseres Ansprechen beobachtet wurde, als für solche mit einem Clustering der $CD8^+$ CTL außerhalb des Tumors, respektive in stromalen Bereichen (23, 182, 183).

Gleichermaßen konnte gezeigt werden, dass die moderne digitale Bildanalyse durch die Generierung spatialer Daten eine exakte Quantifizierung individueller Distanzen zwischen $CD8^+$ CTL und Tumorzellen auf der Basis der Zell-definierenden X-Y-Koordinaten ermöglicht, welche in einzigartiger Weise deren mikroregionäre Interaktion abbilden kann (181). Diese Informationen bezüglich des charakteristischen Immunkontexts von soliden Tumoren sind gerade dahingehend relevant, als dass durch die Hinzunahme zusätzlicher spatialer Informationen wie der PD-L1-Expression auf Tumor- und Immunzellen ein präzises und klinisch praktikables Werkzeug zur Prädiktion eines Therapieansprechens auf Immuntherapeutika bereitgestellt wird (144, 149, 184).

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass auch die Hypoxie-vermittelte Immunsuppression eine bedeutende Determinante zur Charakterisierung des individuellen Immunphänotyps und damit eines möglichen therapeutischen Ansprechens ist: So wurde beobachtet, dass immunologisch-anege Tumoren überproportional häufig eine starke hypoxische Inhibition $CD3^+$ T-Zellen, im Sinne einer inversen Korrelation zwischen der Expression endogener Hypoxiemarker und $CD3^+$ Zellen zeigten, wohingegen in Tumoren vom inflammatorischen Phänotyp oft nur eine äußerst schwache hypoxisch-vermittelte Inhibition $CD3^+$ T-Zellen beobachtet wurde (185). Diesem Befund gilt es gerade vor dem Hintergrund der aufgestellten Hypothese einer hypoxisch-vermittelten Inhibition $CD8^+$ CTL im malignen Melanom im weiteren Verlauf nachzugehen.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass die multiplex-IF als morphometrische Methode zur Darstellung spatialer und morphologischer Zellmuster zu einem besseren Verständnis der Heterogenität des TME beitragen kann, sodass im Folgenden potentielle Resistenzmechanismen im Rahmen der Tumorphypoxie und des Adenosinmetabolismus genauer quantifiziert und phänotypische Charakteristika im Hinblick auf den Immunkontext detailliert analysiert werden können. Der Einsatz digitaler Bildanalysemethoden erleichtert dabei die objektive und umfassende Auswertung (57, 186).

5. Fragestellung und Ziel der Dissertation

Das maligne Melanom ist ein hochimmunogener Tumor, der oftmals durch die Entwicklung einer starken Immunantwort im TME gekennzeichnet ist, welche allerdings in der Folge durch intratumorale Mechanismen der Immunevasion abgeschwächt oder gar umgekehrt wird und so zu einer starken Immunsuppression und einer damit einhergehenden rapiden Tumorprogression führt. Die Strahlentherapie, wie auch die im Jahr 2011 erstmals beim malignen Melanom zugelassene Immuntherapie mit IPI, hatten daher zum Ziel durch die Re-Induktion der antitumoralen Immunantwort diesen pathophysiologischen Mechanismus zu überwinden. In der Tat zeigte sich in Studien mit dem anti-CTLA-4-Antikörper IPI eine eindrucksvolle und stabile Tumorregression in einigen Patienten im metastasierten Stadium des malignen Melanoms, wohingegen andere Patienten, gerade im Stadium der zerebralen Metastasierung, nicht von einer Immuntherapie profitieren konnten. Ziel dieser Studie ist daher die Identifikation von prädiktiven Faktoren für das Ansprechen einer Kombination aus einer Radiotherapie und einer Immuntherapie mit IPI für Patienten im zerebral metastasierten Stadium des malignen Melanoms. Zu diesem Zweck sollten aus einem Kollektiv von 35 Patienten, bei denen sowohl zerebrale, - als auch extrazerebrale Metastasen mit einer Kombination aus einer Radiotherapie und IPI-Gabe behandelt worden sind, Gewebeschnitte mittels multiparametrisch ausgeführten Immunfluoreszenzfärbungen untersucht und anschließend bildanalytisch und morphometrisch ausgewertet werden. Auch in diesem Patientenkollektiv zeigten sich bei ca. 25 % der Patienten lange, teilweise jahrelange Remissionsphasen. Als mögliche Mechanismen der Resistenz gegen die Radioimmuntherapie wurden sowohl die intratumorale Hypoxie – ein bekanntlich die Strahlenresistenz verstärkender Faktor und Mediator der malignen Progression – als auch die Hypoxie-induzierte Produktion von Adenosin durch die 5'-Ektonukleotidase CD73 identifiziert, da zahlreiche *in-vitro*- und tierexperimentelle Untersuchungen in den letzten Jahren gezeigt haben, dass ADO eine große Bedeutung für die direkte Inhibition der antitumoralen Immunantwort zukommt. Weiterhin haben zahlreiche Studienergebnisse gezeigt, dass das Ansprechen auf eine Immuntherapie, wie auch die Prognose des malignen Melanoms, entscheidend vom Ausmaß der Infiltration CD8⁺ CTL in den Tumor abhängt. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass diejenigen Patienten mit einer starken Infiltration von CD8⁺ CTL, einer geringeren Ausprägung der Tumorphypoxie und einer geringen CD73-Expression ein besseres Therapieansprechen und folglich ein besseres klinisches Outcome zeigen. Das primäre Ziel der vorgelegten Studie ist daher die Überprüfung jener Hypothese und damit die Identifikation möglicher prädiktiver Faktoren für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie. Im Rahmen dessen sollen weiterhin folgende Fragen bearbeitet werden: Sind GLUT-1 und CD73 ausreichend gute Surrogatmarker der Hypoxie respektive der Adenosin-Produktion im malignen Melanom? Hat das Infiltrationsmuster CD8 positiver Immunzellen ebenfalls prognostischen Wert im malignen Melanom? Ist in der spatialen Analyse eine hypoxische Inhibition von Immunzellen nachweisbar? Welche *in-vivo*-Relevanz hat die ADO-vermittelte Inhibition der antitumoralen Immunantwort? Und schließlich die Frage, nach einem verbesserten Ansprechen der Immuntherapie mit IPI durch eine Kombination mit der Radiotherapie.

II. Material und Methoden

Die zur Färbung der Immunfluoreszenz-Präparate verwendeten Materialien sind im Folgenden tabellarisch aufgelistet, bevor anschließend als Kernstück der Arbeit eine umfassende Beschreibung des methodischen Vorgehens zur digitalen bildanalytische und morphometrische Auswertung der multiplex-IF-Präparate folgt.

1. Material

1.1. Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Gerät	Firma	Katalognummer	Zusatzbeschreibung
Thermomixer	Eppendorf	535025873	Thermomixer Compact
pH-Meter	Schott Instruments	6110160	Lab 850
Feinwaage	Sartorius	ED124S-OCE	Extend
Waage	Ohaus	8727143362	Adventurer Pro AV2101
Rührer	Heidolph	119907925	MR3000
Mikrowelle	Bosch		
Pipette	Eppendorf	4855156	Eppendorf research 1000 µl
Pipette	Eppendorf	1264836	Eppendorf research 100 µl
Pipette	Eppendorf	4117065	Eppendorf research 10 µl
Pipettenspitze	Tip One	S1111-6701	1000 µl blue graduated tip
Pipettenspitze	Tip One	S1111-0706	200 µl yellow tip
Pipettenspitze	Tip One	S1110-3700	10/20 µl XL graduated tip
Färbekammer	Carl-Roth GmbH + Co. KG (kurz: Carl-Roth GmbH)	HA51.1	Stain Tray Schwarz für 200 Objektträger
Kimtech science	Kimberly-Clark	7552	Präzisionstücher
Nitril-Handschuhe	VWR	112-2373	Größe L
Latex-Handschuhe	VWR	112-2752	Größe L
Timer	Macherey-Nagel	140277-006	
Laborflasche	Schott Duran	21820545	1000 ml Fassungsvermögen
Wärmeschrank	Memmert (Schwabach)	770633	TV-40u
Messröhrchen	Greiner Bio-one	188271	Cellstar Tubes (15ml)
Messröhrchen	Greiner Bio-one	227261	Cellstar Tubes (50ml)
Mikroreaktionsgefäße	Greiner Bio-one	618201	reaction tubes 1,5ml
Gefrierschrank	Liebherr	7083245-00	
Alufolie	Carl-Roth GmbH	AAI 76.1	
Deckgläser	Carl-Roth GmbH	H877	Größe 24x32 mm

Deckgläser	Carl-Roth GmbH	1871	Größe 24x50 mm
Objektträger Thermo-Scientific	Menzel GmbH	1800AMNZ	Superfrost Plus
Schüttler	Heidolph		Polymax 1040
pH-Fix 0-14	Carl-Roth GmbH	0549	100 farbfixierte Indikationsstäbchen
Rotilabo Einmal Wägeschalen aus PS	Carl-Roth GmbH	2150.1	Opak blau, speziell für weißes Wiegegut (89*89mm)
Färbekästen aus Kalk Soda Glas	Carl-Roth GmbH	H554.1	
Färbegestell für 10 Objektträger	Carl-Roth GmbH	H552.1	
Färbesystem aus SMG-Glas	Carl-Roth GmbH	TX87.1	
Färbekästen und Einsätze aus PMP	Carl-Roth GmbH	2290.2 / 2291.2	
Messtrichter	Vit-Lab	710	
Rührstäbe groß/ klein			
Deckglaspinzette 18/8 Stahl gebogen	Carl-Roth GmbH	K718.1	
Axio Imager M2	Carl-Zeiss		

Tabelle 1: Geräte und Gebrauchswaren, die im Rahmen der IF-Färbungen verwendet wurden.

1.2. Medien und Chemikalien

Produkt	Firma	Katalognummer
Phosphat-buffered saline (PBS) Dulbecco ohne Magnesium (Mg) und Calcium (Ca)	Biochrom GmbH, Berlin	L182-50
Tween 20	Carl-Roth GmbH + Co. KG	9127.1
Tris Pufferan, >99,9 % pro analysi (p.a.)	Carl-Roth GmbH + Co. KG	4855.2
Aqua Dest.	Fresenius	7145-6
Aqua Dest.	Braun	0082479E
NaCl >99,8 %	Carl-Roth GmbH + Co. KG	9265.2
Ammoniumacetat, >97 % p.a., ACS	Carl-Roth GmbH + Co. KG	7869.2
EDTA >99 %	Carl-Roth GmbH + Co. KG	CN06.2
Citronensäure-Monohydrat, >99,5 %, Ph. Eur.	Carl-Roth GmbH + Co. KG	5110.1
Kupfer-(II)-Sulfat, >98 %, p.a., wasserfrei	Carl-Roth GmbH + Co. KG	P023.1
Tris-HCl, >99 %, p.a.	Carl-Roth GmbH + Co. KG	9090.3

AVS Titrinorm pH 4	VWR Chemicals	32095.264
AVS Titrinorm pH 7	VWR Chemicals	32096.267
AVS Titrinorm pH 9	VWR Chemicals	32039.261
4Molar (M) NaOH		
1M HCl		
3M KCl		

Tabelle 2: Medien und Chemikalien für die Multiplex-Immunfluoreszenz-Färbungen.

1.3. Gebrauchslösungen

TBS-T (pH=7,6)	PBS (pH=7,4)
65,7 g/l Tris HCl	95,5g PBS Dulbecco ohne Mg ²⁺ / Ca ²⁺
175,3 g/l NaCl	
0,1 % Tween 20	
10,1 g/l Tris Base	

Tabelle 3: Pufferlösungen Tris-buffered saline with Tween20 (TBS-T) und phosphate buffered saline (PBS) zum Waschen der Präparate.

Tris/ EDTA (pH=9)	Citratpuffer (pH=6)
1,21 g/l Tris Base	9ml Stammlösung A (0,1M Citronensäure)
0,292g/l EDTA	41ml Stammlösung B (0,1M Na ⁺ Citrat)

Tabelle 4: Verwendete Puffer zur Antigendemaskierung.

Produkt	Firma	Katalognummer
DAKO Antibody Diluent	DAKO North America Inc.	S0809
DAKO Fluorescent Mounting Medium	DAKO North America Inc.	S3023
Wasserstoffperoxid, 30 %, p.a., ISO, stabilisiert	Carl-Roth GmbH + Co. KG	8070.2
Dulbecco Phosphate buffered Saline	Sigma-Aldrich	D8537
SuperPicture HRP Polymer Conjugate Rabbit Primary	Life technologies	879263
SuperPicture Polymer Detection Kit	Life technologies	879163
Vector ImmPress	Vector Laboratories	MP-7401

Tabelle 5: Reagenzien für die mIHC Färbungen.

1.4. Antikörper

Antikörper	Klon	Firma	Katalognummer	Spezifität	Isotyp
CD73/ NT5E	D7F9A	Cell Signaling	13160	Rabbit Monoclonal	IgG
GLUT-1	EPR3915	GeneTex	GTX62480	Rabbit Monoclonal	IgG
CD8	C8/144B	DAKO	M 7103	Mouse Monoclonal	IgG1, kappa
CD34	EP373Y	abcam	ab81289	Rabbit Monoclonal	IgG
CD39/	IMG17B5F11	abcam	ab178572	Mouse Monoclonal	IgG
NPTD1	2B10	Novus	NBP2-45447		
FoxP3	D2W8E	Cell Signaling	98377	Rabbit Monoclonal	IgG
Granzym B	GrB-7	DAKO	M7235	Mouse Monoclonal	IgG
CD56/	MRQ-42	Roche	760-4596	Rabbit Monoclonal	IgG
NCAM					
Na⁺/K⁺	EP1845Y	abcam	ab76020	Rabbit Monoclonal	IgG
ATPase					
ENT-1	SP120	abcam	ab182023	Rabbit Monoclonal	IgG
Carbonic	EPR4151(2)	abcam	ab108351	Rabbit Monoclonal	IgG
Anhydrase					
IX					
CD45	2B11+PD7/26	DAKO	M0701	Mouse Monoclonal	IgG

Tabelle 6: Für die Färbungen verwendete Antikörper.

1.5. Fluorochrome

Fluorochrom	Firma	Produkt-Nr.
TSA Plus Cyanine (Cy) 3 + Amplification Diluent	Perkin Elmer	NEL744001KT
TSA Plus Cyanine 5 + Amplification Diluent	Perkin Elmer	NEL745001KT
DMSO (Dimethylsulfoxid)		
FITC (Fluoresceinisothiocyanat)	Thermo Fisher	
Biocytin Alexa Fluor 546	Thermo Fisher Scientific	A12923
Alexa Fluor 647	Thermo Fisher Scientific	

Tabelle 7: In den Färbungen verwendete Fluorochrome.

1.6. Softwareprogramme zur Bild- und Statistikanalyse

Für eine erste Bewertung der gefärbten Präparate, deren Digitalisierung und die anschließende Auswertungsmethodik wurde eine Reihe von Softwareprogrammen verwendet, die hier kurz präsentiert werden sollen: Dazu gehört zum einen das Bildbearbeitungs- und Analysesystem AxioVision (AxioVision SE49 Release 4.9.1. März 2013, Carl-Zeiss-Microscopy GmbH, Carl-Zeiss-Promenade 10 07745 Jena, GER), welches zur digitalen Darstellung der von Axio Imager M2 (Carl-Zeiss-Microscopy GmbH) generierten IF-Ausschnitte genutzt wurde. Das Programm ermöglicht ausgehend von Basisfunktionen, wie der Bildaufnahme, eine Reihe weiterer Schritte zur Bildverarbeitung,- analyse und Annotation (187), um bereits vor Ort mithilfe des Axio Imager Mikroskops eine erste Bildbeurteilung vornehmen zu können. Das Programm AxioVision wurde zur Beurteilung der Färbequalität der IF-Präparate im direkten Anschluss an deren Färbung durchgeführt, sodass vor der Digitalisierung der IF-Färbungen Qualitäts -oder Färbefehler erkannt werden konnten. Nach Digitalisierung der IF-Präparate mittels eines Slidescanners der Firma Morphisto (MORPHISTO GmbH Weismüllerstr. 45, 60314 Frankfurt am Main, GER) konnte mithilfe von ZEN 2.3. (ZEN 2.3. Blue Edition, Carl-Zeiss-Microscopy GmbH, Carl-Zeiss-Promenade 10 07745 Jena, GER), einer Software für digitale Mikroskopie, die Qualität und Plausibilität der Färbungen beurteilt und erste visuelle Befunde aus den Färbungen erhoben werden, bevor die Präparate im weiteren Vorgehen eingehend in QuPath (QuPath v 0.1.2., Peter Bankhead, Centre for Cancer Research & Cell Biology, Queen's University Belfast) analysiert wurden.

QuPath (14) ist das zentrale Software-Programm dieser Arbeit, da mittels dessen einzelzellbasierten Segmentierungsalgorithmus die Generierung der quantitativen Datensätze erst ermöglicht wurde. QuPath ist als open source Programm zur digitalen Bio-Marker-Quantifizierung, zur Analyse ganzer Tumorpräparate und zur Interpretation der aus der Analyse gewonnenen Datensätze, gleichfalls als ein „state-of-the-art“ Software Tool der digitalen Pathologie anzusehen, zumal es durch zahlreiche zusätzliche Scripting-Funktionen und Verbindungen mit Programmen wie ImageJ eine Plattform zur ganzheitlichen Analyse von whole-slide Tumorpräparaten bietet. Die Verbindung zu der Fiji.app von ImageJ und dessen Plugin MosaicSuite (MOSAIC Group, MPI-CBG, Dresden; BMC Bioinformatics. 2013; 14: 349), einem open source Programm, wurde zur spatialen Analyse der Zellinteraktionen Mosaic genutzt. Die Ergebnisse der in QuPath durchgeführten Distanzanalyse, welche die Distanzen der Zellpopulationen untereinander für das whole-slide Präparat näher quantifiziert, wurden in Tableau 2018.3 (TABLEAU SOFTWARE, NorthEdge 1621 N 34thSt, Seattle, WA 98103), einem Software Tool zur Datenanalyse, mithilfe von Boxplots und Histogrammen visualisiert. Für die statistische Datenanalyse wurde auf das IBM-Statistikprogramm SPSS 23v5 (IBM SPSS Statistics 23 v5, IBM Deutschland GmbH 71137 Ehningen) zurückgegriffen, mit dessen Hilfe sowohl die deskriptiven Statistiken der in QuPath erfassten quantitativen Daten dargestellt und Korrelationsanalysen für die untersuchten Zellpopulationen durchgeführt werden konnten, bevor schließlich in Kaplan-Meier-Analysen die klinischen Daten zum Gesamtüberleben mit den quantitativen Daten aus QuPath korreliert und alsdann visualisiert und auf statistische Signifikanz hin getestet werden konnten.

2. Methoden

Zunächst wird in dem folgenden Methodenteil die Patientenkohorte vorgestellt, die im Rahmen einer retrospektiven Studie rekrutiert und deren histologische Präparate von malignen Melanomen verschiedenster Lokalisation für die hier durchgeführten multiplex-IF-Färbungen verwendet wurden. Es folgt eine ausführliche Beschreibung des Vorgehens bei der eigens etablierten 4-Farben-Immunfluoreszenzfärbung für die Biomarker CD73, GLUT-1 und CD8. Im Hauptteil dieses Kapitels wird die angewendete Methode der digitalen whole-slide Bildanalyse in QuPath zur visuellen, quantitativen und spatialen Auswertung der gefärbten IF-Präparate erläutert, welche auf der Basis der einzelzellbasierten Segmentierung umfassende Daten zur Überprüfung der aufgestellten Hypothese, sowie der Identifikation weiterer potentieller prädiktiver Faktoren für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie generiert.

Im Anschluss wird die Extraktion dieser statistischen Rohdaten aus QuPath und deren Zusammenfassung mit den erhobenen klinischen Daten des untersuchten Patientenkollektivs in Excel näher beschrieben, wobei die extrahierten Rohdaten insbesondere zur Berechnung des relativen Anteils der identifizierten Zellpopulationen und zur Erfassung der spatialen Lokalisation der einzelnen Zellen innerhalb der Präparate dienen. Auf der Basis der extrahierten Zellkoordinaten folgt eine Erläuterung zum Vorgehen bei der spatialen Analyse der mikroregionären Zellinteraktionsmuster in MosaicSuite. Demgegenüber werden die aus der whole-slide Distanzanalyse in QuPath gewonnenen Resultate mithilfe von Tableau aufgearbeitet und graphisch visualisiert.

Schließlich wird das Verfahren zur statistischen Auswertung der Daten in SPSS beschrieben, bei der zunächst die deskriptive Statistiken zu den in QuPath erhobenen quantitativen Daten berechnet werden, bevor mithilfe von Korrelationsanalysen deren globale Interaktion für das untersuchte Patientenkollektiv abgeschätzt wird. Schließlich wird mittels Kaplan-Meier-Analysen und Log-Rank-Statistiken überprüft, inwiefern der Anteil einer definierten Zellpopulation innerhalb des untersuchten IF-Präparates signifikanten Einfluss auf das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie und damit das klinische Outcome des jeweiligen Patienten besitzt.

Da dieses methodische Vorgehen – insbesondere die digitale bildanalytische und morphometrische Auswertung der IF-Präparate – bisher in der Literatur noch nicht vorbeschrieben ist, stellt dieser Teil der Arbeit das Kernstück der Studie dar und bildet gleichsam die Grundlage für das Verständnis des folgenden Kapitels, in dem die Ergebnisse jener neuen Auswertungstechnik präsentiert werden. Die Beschreibung der Auswertungsmethodik folgt sowohl einer Gliederung nach chronologischer Abfolge der Auswertungsschritte, als auch nach dem verwendeten Software-Programm. Eine Gesamtübersicht des methodischen Vorgehens findet sich in allen Einzelschritten in **Abbildung 14**.

Methodisches Vorgehen der folgenden Arbeit im Überblick:

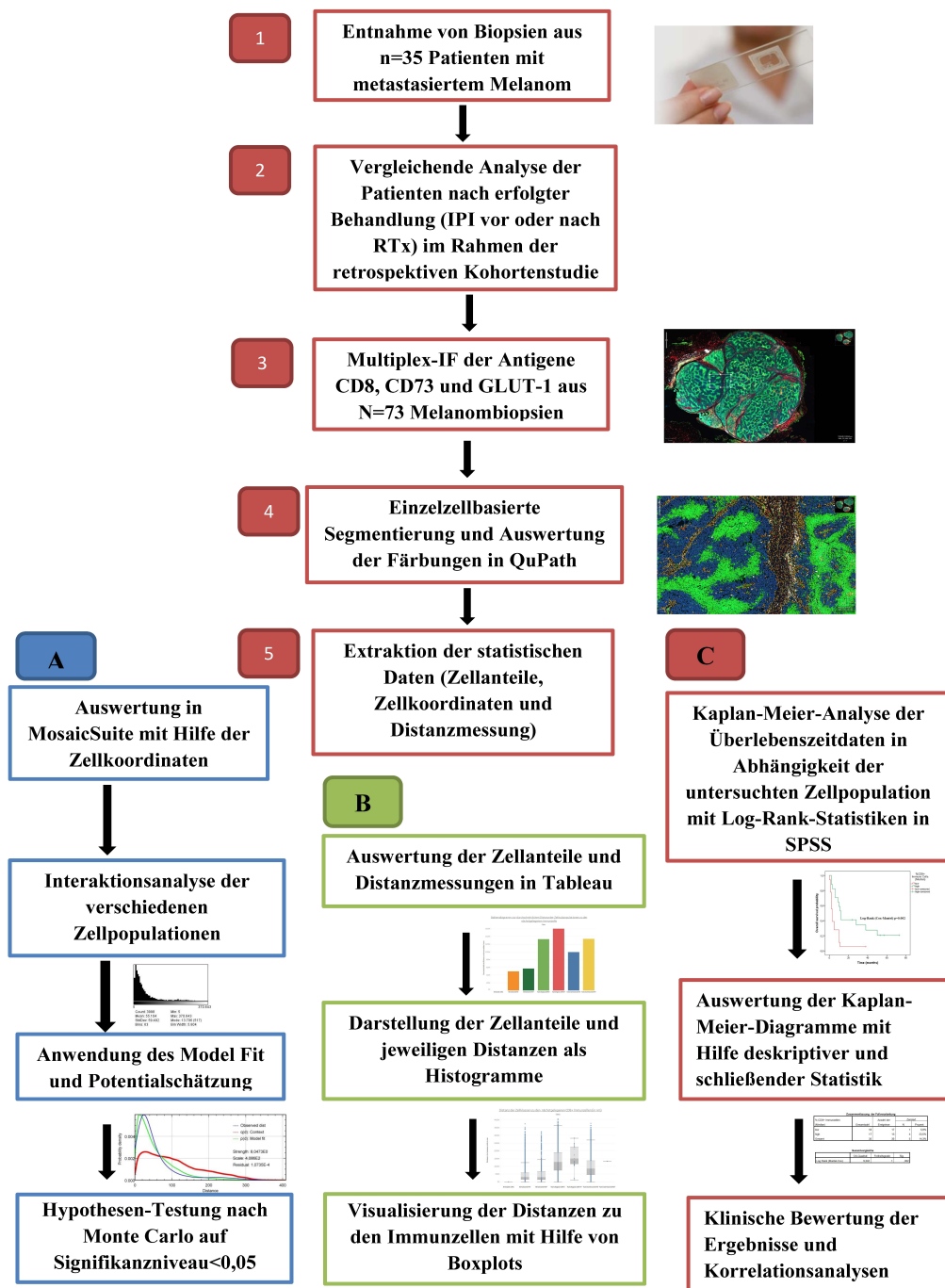


Abbildung 14: Übersicht zum methodischen Vorgehen in der hier vorgestellten Arbeit. Es wurden insgesamt $N=73$ histologische Präparate von malignen Melanomen aus einem Patientenkollektiv von $n=35$ Patienten im zerebral metastasierten Stadium des malignen Melanoms gewonnen. Für jedes Tumorpräparat wurden multiplex-IF-Färbungen für die Antigene CD8, CD73 und GLUT-1 vorgenommen. Die klinischen Daten des untersuchten Patientenkollektivs wurden bereits im Rahmen einer retrospektiven Studie erhoben und nach dem verwendeten Therapieregime, bestehend aus einer Kombination von Radiotherapie und Immuntherapie mit IPI, ausgewertet. Mithilfe des digitalen Bildanalyseprogramms QuPath erfolgte auf Basis der einzelzellbasierten Segmentierung die Auswertung der Färbungen und hiernach die Extraktion der erhobenen quantitativen Rohdaten, welche die relativen Zellanteile, die Zellkoordinaten der klassifizierten Zellpopulationen, wie auch deren Distanzen zueinander beinhaltet. Auf Basis der Zellkoordinaten erfolgte schließlich eine spatiale Analyse der Zellinteraktionen in MosaicIA (blauer Pfad). Die erhobenen Distanzen wiederum wurden in Tableau zur Visualisierung der Distanzmuster innerhalb der whole slide Tumore genutzt (grüner Pfad), wohingegen die relativen Daten zu den Zellanteilen nach Verknüpfung mit den klinischen Daten des untersuchten Patientenkollektivs für Kaplan-Meier-Analysen der Überlebenszeitdaten verwandt wurden (roter Pfad).

2.1. Studienprotokoll und Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen

In der hier vorgestellten Arbeit wurde auf ein etabliertes Verfahren zur Durchführung multiparametrisch ausgeführter IF-Färbungen zurückgegriffen: Dieses Verfahren zur indirekten Immunfluoreszenz orientiert sich in Grundzügen an dem von Tóth und Mezey (2007) beschriebenen Vorgehen zur simultanen Visualisierung multipler Antigene mithilfe Tyramid-konjugierter Antikörper bei der Immunhistochemie (188). Für die Etablierung der 4-Farben-IF-Färbungen wurde jenes Vorgehen entsprechend abgewandelt und an die jeweiligen Erfordernisse der IF angepasst, was letztlich ein speziell auf Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Tumorschnitte zugeschnittenes Verfahren zum Färben multipler Biomarker innerhalb einer einzelnen Gewebesektion ermöglichte.

Im Rahmen der vorgestellten Arbeit wurden insgesamt jeweils 73 Tumorpräparate (N=73) maligner Melanome verschiedenster Lokalisation, darunter sowohl Primär-, - als auch Sekundärtumoren, aufgearbeitet. Die verwendeten Tumorschnitte stammten von 73 chirurgischen Resektionspräparaten der Hautklinik bzw. der Neuropathologie der Universitätsmedizin Mainz und wurden aus einem Kollektiv von 35 Patienten (n=35) mit zerebral metastasiertem malignen Melanom entnommen. Diese 35 Patienten im Stadium der zerebralen Metastasierung des malignen Melanoms wurden bereits im Rahmen einer retrospektiven Kohortenstudie, welche vom Ethik-Komitee der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz (No. 837.281.17 [11115]) bewilligt wurde, auf das Ansprechen auf eine Kombination aus Radio – und Immuntherapie mit IPI hin analysiert (siehe **Tabelle 15**) und insbesondere untersucht, ob die Sequenz der Therapieabfolge Einfluss auf das klinische Outcome besitzt (36). Alle Patienten hatten sich zwischen Oktober 2010 und März 2015 in Behandlung der Universitätsmedizin Mainz befunden und eine Kombination aus einer Strahlentherapie des Gehirns und einer Immuntherapie mit IPI erhalten. Das Radiotherapie-Regime beinhaltete dabei entweder eine hypofraktionierte Ganzhirnbestrahlung mit 30 Gy, eine stereotaktische Radiotherapie mit bis zu 24 Gy oder eine Kombination beider Techniken. IPI demgegenüber wurde in einem Zeitintervall von maximal zwei Monaten, je nach Studienarm entweder vor oder nach der Radiotherapie appliziert, wobei alle Patienten mindestens zwei und maximal vier IPI-Gaben mit einer jeweiligen Dosis von 3mg/kg im dreiwöchigen Abstand erhielten (36). Als Endpunkte der retrospektiven Kohortenstudie wurden das Gesamtüberleben und das zerebrale progressionsfreie Überleben definiert, welche mithilfe von Kaplan-Meier-Analysen und Log-Rank Statistiken ermittelt wurden (36).

Die Fixierung in Formalin, wie auch die Einbettung in Paraffin, erfolgte für alle 73 Tumorresektionspräparate in den resektions-vornehmenden Instituten. Anschließend konnten die histologischen Präparate, welche letztlich für die multiplex-IF-Färbungen genutzt wurden, mithilfe eines Präzisionsmikrotoms seriell von den Paraffinblöcken gewonnen und über Nacht bei 37°C getrocknet werden, bevor Sie bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert wurden. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Färbungen wurden insgesamt 108 histologische Präparate gewonnen (N_{ges}=108), wobei in jedem Tumorpräparat je vier Antigene detektiert wurden.

73 dieser histologische Tumorpräparate (N₁=73) sollten dabei im Rahmen der Untersuchungsserie, welche zur Beantwortung der eingangs gestellten Hypothese dienen soll, mithilfe der 4-Farben-IF

gefärbt und der anschließenden Auswertung in QuPath unterzogen werden. Darüber hinaus wurden mehrere 4-Farben-IF-Färbungen ($N_2=35$) von Präparaten des gleichen Patientenkollektivs mit unterschiedlichen Antikörperkombinationen gefärbt, die zum einen dabei helfen sollten, die „passende“ Antigen-Kombination für die Untersuchungsserie zu finden, gleichwohl konnten diese auch erste Hinweise zu den tumorimmunologischen Eigenschaften innerhalb des TME liefern (eine Detailauflistung der ausgeführten Antigenkombinationen und eine tabellarische Übersicht über alle ausgeführten IF-Färbungen mit zugehörigen Präparaten und klinischen Daten des Patientenkollektivs findet sich in **Tabelle 16** und **Tabelle 8**).

Das Vorgehen der multiplex-IF gliedert sich in acht grundlegende Schritte, die schematisch in **Abbildung 15** dargestellt und im Weiteren ausführlich beschrieben werden sollen:

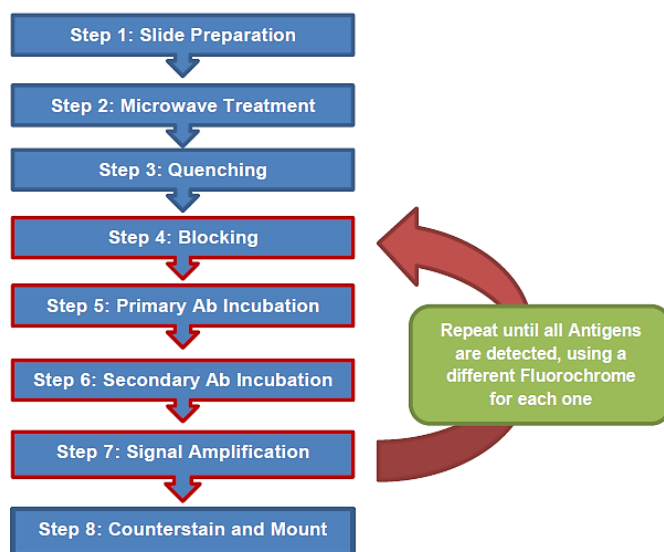


Abbildung 15: Schematische Darstellung des seriellen Vorgehens bei der multiparametrischen IF: In einem ersten Schritt erfolgt die Entparaffinierung. Anschließend wird die Antigendemaskierung mithilfe einer Hitzebehandlung in der Mikrowelle (2) vorgenommen. Es folgt das sogenannte Quenching zur Reduktion der Autofluoreszenz von Erythrozyten. Anschließend wird im Rahmen der ersten Antigenmarkierung, das erste zu untersuchende Antigen mittels der sequentiellen Schritte aus Blockierung (4), Zugabe des Primär-(5) und Sekundärantikörpers (6) und schließlich der Signalamplifikation (7) mithilfe des Fluorochroms dargestellt (Ab=Antibody; dt. Antikörper). Die Färbung des zweiten Antigens wird nach erneuter Antigendemaskierung analog zu dem Vorgehen aus der ersten Antigenmarkierung ausgeführt, ebenso wie die Darstellung des dritten Antigens. Zuletzt erfolgt mithilfe der DAPI-Färbung die sogenannte Zellkernmarkierung, bevor schließlich das Eindecken des IF-Präparats (8) und die Visualisierung des Färberegebnisses am Fluoreszenzmikroskop erfolgt.

Zunächst werden die 4 μm dicken histologischen Präparate für eine Stunde bei 60°C an die Objektträger angebacken. Anschließend erfolgt eine Behandlung in drei aufeinanderfolgenden Xylol-Bädern für jeweils 10 Minuten, zur Entparaffinierung der Präparate, bevor diese sodann in einer absteigenden Alkoholreihe (5 Minuten in 100 % Ethanollösung, 5 Minuten in 95 % Ethanollösung und 3 Minuten in 70 % Ethanollösung) rehydriert und abschließend jeweils 2 Minuten in einer Aqua-Dest.- bzw. einer TBS-T Pufferlösung gewaschen werden. Die Demaskierung der Antigenbindungsstellen, d.h. die Wiederherstellung der Reaktivität des Antigens, erfolgt anhand des sogenannten „heat induced epitope retrieval“ (189, 190) mittels eines in der Mikrowelle vorgewärmten Puffers, dessen Zusammensetzung und pH je nach gesuchten Antigen angepasst wird. Bei diesem Schritt wird der Puffer gemeinsam mit den Proben einer insgesamt 20 minütigen Wärmeinkubation (zu je 6x45sek bei

800W und 15 Minuten bei 180W in der Braun Mikrowelle) mit anschließender 30 minütiger Abkühlphase unterzogen und schließlich durch eine 2 minütige Waschpufferbehandlung mit TBS-T für die Behandlung mit dem ersten Primärantikörper vorbereitet.

Um ein möglichst hintergrundarmes und störungsfreies Immunfluoreszenz-Muster zu generieren, musste zuvor in einem weiteren Schritt die sogenannte Autofluoreszenz reduziert werden. Autofluoreszenz kann sowohl durch exogene wie auch endogene Quellen (allen voran Erythrozyten, pigmentierte Zelltypen und Lipofuscin) entstehen und es letztlich unmöglich machen zwischen einem spezifischen Signal bestimmter Antigene und einem unspezifischen Signal durch Autofluoreszenz zu unterscheiden (191). Zur Reduktion dieses „Störsignals“ wurde in diesem Schritt das sogenannte Quenching durchgeführt, ein in der Literatur vorbeschriebenes Verfahren, bei dem die Präparate einer 10 minütigen Behandlung mit einer 10 mM Lösung von Kupferammoniumsulfat unterzogen werden (192). Nach dem sich anschließenden Vorgang der Blockierung, bei dem die Präparate 10 Minuten mit einem Antikörperverdünnungsmedium (DAKO Antibody Diluent) vorbehandelt werden, wird der erste Primärantikörper in den jeweils spezifischen Konzentrationen (eine Übersicht zu den verwendeten Konzentrationen und Puffern der einzelnen Antikörper findet sich in **Tabelle 17**) eingesetzt und für 1 Stunde bei 28°C in der Wärmekammer inkubiert. Zur Detektion des Antigens werden anschließend in jeweils 10 minütigen Inkubationsphasen der speziesspezifische Sekundärantikörper (VECTOR ImmPress) und das gewünschte Tyramid-gekoppelte Fluorochrom (Cy3⁺, FITC, Cy5⁺ oder Alexa 546) eingesetzt, wobei zwischen den Inkubationsphasen die Präparate für jeweils 3x2 Minuten in TBS-T gewaschen werden. Der Ablauf der Antigendemaskierung wird für die Detektion des zweiten Antigens nach dem gleichen Muster wiederholt und der zweite Primärantikörper nach erfolgter Vorbehandlung mit dem Antikörperverdünnungsmedium ebenfalls in den jeweils spezifischen Konzentrationen eingesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die am folgenden Tag weitergeführte Behandlung zur Detektion des zweiten Antigens mit der 10 minütigen Inkubation des Sekundärantikörpers und dem gewünschten Tyramid-gekoppelten Fluorochrom wurde analog zum Vorgehen bei der ersten Antigenmarkierung durchgeführt.

Das methodisch gleiche Vorgehen (aus Antigendemaskierung, Inkubation von Primär- und Sekundärantikörper, sowie der Signalamplifikation durch ein spezifisch eingesetztes Fluorochrom) wurde so auch bei der Detektion des dritten Antigens angewendet. Schließlich erfolgt nach Durchlaufen aller drei Färberunden und nochmaligem Waschen der Präparate in TBS-T für 3x2 Minuten die DAPI-Zugabe (Verdünnung: 1:2000), mit einer insgesamt 5 minütigen Inkubation in der feuchten Kammer, bevor die Präparate nach dem abschließenden Waschen (2x5 Minuten in PBS) sogleich mithilfe des DAKO Fluorescent Mounting Mediums eingedeckt werden.

Zur Beurteilung der gefärbten Tumorgewebeschnitte wurden die Präparate im Anschluss mithilfe des Axio Imager mikroskopiert, um auffällige Befunde ggf. bereits ausschnittsweise digital festzuhalten, sodass etwaige Schwachstellen und Korrekturmöglichkeiten in der Färbung analysiert werden können. Schließlich wurden die IF-Präparate von der Firma Morphisto mithilfe des Zeiss Digital Slidescanners gescannt und im czi. Format für die weitere Bearbeitung und Analyse in ZEN und QuPath digitalisiert.

Färbe-Nr. /Serien-Nr.	DA PI	Antigen 1	Fluoro- chrom 1	Antigen 2	Fluoro- chrom 2	Antigen 3	Fluoro- chrom 3
IF-104 V55	ja	CD73/NT5E Verdünnung: 1:100 1h bei RT Citratpuffer pH 6	Cy5+ 1:50 Charge vom: 11.04.16	GLUT-1 1:500 ü. Nacht Tris/EDTA pH 9	FITC (gekoppelt am 12.06.15)	Na/K-ATPase 1:100 1h bei RT Tris/EDTA pH 9	Alexa 546 1:100 24.11.2015
IF-104 V56	ja	CD73/NT5E 1:100 1h bei RT Citratpuffer pH 6	Cy5+ 1:50 11.04.16	CAIX 1:50 ü. Nacht 4°C Tris/EDTA pH 9	FITC (gekoppelt am 12.06.15)	CD8 1:50 1h bei RT Tris/EDTA pH 9	Cy3+ 1:50 23.06.16
IF-104 V57	ja	CD73/NT5E 1:100 1h bei RT Citratpuffer pH 6	Cy5+ 1:50 11.04.16	GLUT-1 1:500 ü. Nacht Tris/EDTA pH 9	FITC (gekoppelt am 12.06.15)	ENT1 1:50 1h bei RT Tris/EDTA pH 9	Alexa 546 1:100 24.11.2015
IF-104 V58	ja	FoxP3 1:50 1h bei RT Citratpuffer pH 6	Cy3+ 1:50 23.06.16	CD8 1:50 ü. Nacht Tris/EDTA pH 9	FITC (gekoppelt am 12.06.15)	Granzyme B 1:25 1h bei RT Tris/EDTA pH 9	Cy5+ 1:50 11.04.16
Untersuchungs- Serie 73 Präparate	ja	CD73/NT5E 1:100 1h bei RT Citratpuffer pH 6	Cy5+ 1:50 11.04.16	GLUT-1 1:500 ü. Nacht Tris/EDTA pH 9	FITC (gekoppelt am 12.06.15)	CD8 1:50 1h bei RT Tris/EDTA pH 9	Cy3+ 1:50 23.06.16
IF-111 V89/90	ja	Granzym B 1:25 1h bei RT Tris/EDTA pH 9	FITC (gekoppelt am 12.06.15)	CD56/ NCAM ü. Nacht Tris/EDTA pH 9	Cy5+ 1:50 11.04.16	CD8 1:50 1h bei RT Tris/EDTA pH 9	Cy3+ 1:50 23.06.16
IF-112 V91	ja	CD39/ ENTPD-1 1:100 1h bei RT Citrat pH 6	Cy5+ 1:50 11.04.16	FoxP3 1:50 ü. Nacht Citrat pH 6	FITC (gekoppelt am 12.06.15)	CD34 1:150 1h bei RT Tris/EDTA pH 9	Alexa 546 1:100 24.11.2015
IF-113 V92	ja	CD45 1:50 1h bei RT Tris/EDTA pH9	Cy5+ 1:50 11.04.16	CD34 1:50 ü. Nacht Tris/EDTA pH 9	FITC (gekoppelt am 12.06.15)	CD39 1:25 1h bei RT Tris/EDTA pH 9	Cy3+ 1:50 23.06.16
IF-113 V93	ja	Na/K ATPase 1:100 1h bei Tris/EDTA pH9	Alexa 647 Charge 1:100 13.8.15	CD34 1:50 ü. Nacht Tris/EDTA pH 9	FITC (gekoppelt am 12.06.15)	ENT-1 1:50 1h bei RT Tris/EDTA pH 9	Cy3+ 1:50 23.06.16
Nebenserie 26 Präparate	ja	Na/K ATPase 1:100 1h bei Tris/EDTA pH9	Alexa 647 Charge 1:100 vom 13.8.15	CD34 1:100 ü. Nacht Tris/EDTA pH 9	FITC (gekoppelt am 12.06.15)	CD45 1:50 1h bei RT Tris/EDTA pH9	Cy3+ 1:50 23.06.16

Tabelle 8: Durchgeführte multiplex-IF-Färbungen mit zugehörigen Antigenen und Fluorochromen. Hier findet sich für jede der insgesamt 108 gefärbten multiplex-IF Präparate, die zugehörige Antikörperkombination mit der jeweils verwendeten Verdünnung des Antikörpers, sowie der im Rahmen der Antikörper-Inkubation benötigten Pufferlösung. Weiterhin aufgeführt sind die zu den Antikörpern zugehörigen Fluorochrome, ebenfalls unter Angabe der verwendeten Verdünnung, sowie der genutzten Charge. Grün eingerahmt ist zudem die im Rahmen dieser Arbeit als Untersuchungsserie fungierende Antikörperkombination mit den zugehörigen Fluorochromen. RT=Raumtemperatur, DAPI=4',6-Diamidin-2-phenylindol.

2.2. Arbeitsablauf der digital-ausgeführten einzelzellbasierten, quantitativen Bildanalyse der Immunfluoreszenzfärbungen in QuPath

Die einzelzellbasierte Analyse der 4-Farben-Immunfluoreszenzfärbungen mit dem open source whole-slide-Bildanalyse-Programm QuPath (14) ermöglicht als Kernstück dieser Arbeit in bislang einzigartiger Weise eine exakte und umfassende digitale quantitative Auswertung von whole slide Tumorpräparaten unter gleichzeitiger besonderer Berücksichtigung spatialer Interaktionen innerhalb der Präparate (siehe **Abbildung 16**). Dabei wurde bei jedem der insgesamt 107 (Untersuchungsserie: 72 Auswertungen; Einzelfärbungen: 35 Auswertungen) durchgeführten einzelzellbasierten Auswertungen ein systematisches Vorgehen gewählt, das im Folgenden näher beschrieben werden soll:

1. **Übersicht und visuelle Analyse des Tumorphänotyps:** Zu Beginn wurden in dem Präparat Helligkeit und Kontrast für die Analyse zweckgemäß eingestellt und der whole slide Tumor anschließend in der Übersicht durchgemustert, um eine erste visuelle Analyse der im TME herrschenden tumorimmunologischen Verhältnisse vornehmen zu können. Die dabei beobachteten Befunde zum Phänotyp des individuellen malignen Melanoms wurden anschließend festgehalten und gleichzeitig eine erste Beurteilung der Eignung von CD73 und GLUT-1 als Surrogatmarker anhand der biologischen Plausibilität des Expressionsmusters vorgenommen.
2. **Definition der ROI:** Im Anschluss wurden alle dem Tumorgewebe zugehörigen Gewebestücke mithilfe des „Drawing tools“ durch den Untersucher als „region of Interest“ (engl. kurz: ROI) definiert, sodass die Voraussetzung für eine „echte“ whole slide Analyse“ der Tumorpräparate gegeben war (siehe **Abbildung 71** bis **Abbildung 83** des supplementären Bildatlas). Hierbei wurden nekrotische Areale aufgrund deren unspezifischer Färbung und einer damit einhergehenden unsystematischen Beeinflussung des Auswertungsergebnisses von der Analyse ausgeschlossen. Alternativ konnte die Detektion des Tumorgewebes mittels einer Algorithmus-basierten Funktion „Region-Identification“ ausgeführt werden. Zumal diese zum Zeitpunkt der Auswertung oftmals nur eine ungefähre Darstellung der Tumor-ROI ermöglichte, weil sie bspw. in vielen Präparaten große Teile von nicht tumor-befallenem Fettgewebe mit in die ROI einbezieht, wurde diese nicht standardmäßig zu deren Definition verwendet. Die Entscheidung zugunsten der beschriebenen whole slide Analyse wurde getroffen, weil sie den Störfaktor der subjektiven Verzerrung stark abschwächt und gleichfalls umfassendste statistische Daten, unter Zuhilfenahme des maschinellen Lernens, zum untersuchten Tumorphänotyp generiert.
3. **Zelldetektion:** Nach Definition der ROI in dem Präparat erfolgte bei stärkerer Vergrößerung die Segmentierung der Zellkerne aus dem DAPI-Kanal (siehe **Abbildung 72**), wobei durch die Anpassung der zu detektierenden Intensitätsschwelle und definierter Zellkernparameter das Ergebnis der Segmentierung wesentlich verbessert werden kann. Wie in dem aufgeführten Beispiel erkennbar wird, handelt es sich bei dieser Form der Segmentierung um ein sehr exaktes Verfahren, weshalb die vorgenommenen Einstellungen zur Zelldetektion in dieser Form für alle histologischen Präparate der Serie identisch vorgenommen wurden (siehe **Abbildung 73** und

Abbildung 74). Nach Durchführung der Zelldetektion kann eine Heatmap erstellt werden, in der jede einzelne Zelle farbkodiert einer gewünschten Messfunktion zugeordnet werden kann. Die Mess-Funktion *Nucleus/Cell area ratio* (14) ermöglicht beispielsweise eine annähernd gute Identifikation von Tumorzellen, da diese über einen größeren, polymorphen Kern verfügen. Zumal dieses vergrößerte Zellkern/ Zellgrößen-Verhältnis aber auch für einige andere Zelltypen neben Tumorzellen gilt, können zur exakteren Identifikation noch weitere Parameter (*Calculate Features*) herangezogen werden, deren Kombination es letztlich ermöglicht eine gute Übersicht über die Tumorzellen des Gewebes in einer Heatmap (siehe **Abbildung 75**) zu bekommen. Zur exakten Identifikation der Tumorzellen wurde zudem die charakteristische Eigenschaft der Melanomzellen, sich in Form sogenannter Tumorzellnester anzuordnen herangezogen.

4. **Klassifikation der Zellen in Tumor und Stroma mithilfe des maschinellen Lernens:** Das einzelzellbasierte Vorgehen ermöglichte nun die systematische Subklassifikation der Zellen: Zunächst erfolgte dabei auf Grundlage von Untersucher-definierten Beispielen und QuPath's Algorithmus des maschinellen Lernens, die Klassifikation der Zellen in „Tumor“ und „Stroma“: Hierbei wurden mithilfe eines Zeichen-Tools solche ROIs in dem whole slide Präparat eingezeichnet, welche jene Zellen bzw. Zellverbände umfassten, die entweder Tumor- oder Stromazellen darstellten. Diese manuelle Zuordnung der Zellen ist die Basis für die anschließend folgende computergesteuerte Zuweisung aller Zellen des Präparates zu den oben definierten Klassen. Durch wiederholte Korrektur der maschinell zunächst fehlerhaft klassifizierten Zellen konnte in allen Präparaten eine optimale Trennung von Tumor und Stroma nach dem Prinzip der „random trees“ erreicht werden (siehe **Abbildung 76** und **Abbildung 77**).
5. **Klassifikation der Zellen in Subklassen zur detaillierten statistischen Analyse:** Die zu untersuchenden Zellen wurden schließlich in Subklassen eingeteilt, die es ermöglichen sollten, definierte Merkmale innerhalb der einzelnen Klassen zu unterscheiden. Dazu wurden nun die bereits maschinell klassifizierten Zellen (Tumor vs. Stroma) durch den Untersucher nach der Intensität ihrer Färbung in den verschiedenen Fluoreszenzkanälen erneut subklassifiziert (sogenanntes Schwellenwertprinzip). Zunächst sollten dabei alle CD8⁺ CTL in dem Präparat identifiziert werden, indem alle diejenigen Zellen, die im gelb-Kanal (Cy3) eine festgelegte Schwelle der Färbeintensität überschritten hatten, als CD8⁺ klassifiziert wurden (siehe **Abbildung 78**). Anschließend wurden die Zellen der Klasse „Tumor“ anhand ihrer Färbeintensität im grün-Kanal (FITC) weiter unterteilt in „hypoxische“ und „normoxische“ Zellen (siehe **Abbildung 79**). Die hypoxischen bzw. normoxischen Zellen wurden wiederum anhand der Färbeintensität im rot-Kanal (Cy5) in CD73⁺ oder CD73⁻ Zellen unterteilt, sodass sich anschließend alle Tumorzellen in vier Subpopulationen unterteilten (siehe **Abbildung 80**). Schließlich erfolgte nach dem gleichen Muster auch eine Subklassifikation der Stromazellen in CD73⁺ und CD73⁻ Stromazellen (siehe **Abbildung 81**). Die Methode des Schwellenwert-Prinzips, bei dem diejenigen Zellen, deren Färbung in dem zugehörigen Kanal eine bestimmte Intensitätsschwelle erreicht hat, einer definierten Population zugeordnet werden (z.B. wurden GLUT-1 positive Zellen, welche im

„grün“ respektive FITC-Kanal die Intensität 4.500 überschritten hatten, im Verlauf als „hypoxische“ Tumorzellen klassifiziert) zeigte dabei über alle Zellklassifikationen hinweg konstant gute Resultate (siehe **Abbildung 82**). Je nach Färbemuster des Antikörpers konnten hierbei verschiedene Zellregionen zur Detektion der Färbeintensität gewählt werden. Da die von uns in den Serien verwendeten Antikörper membrangebundene Expressionsmuster aufweisen, wurden die Optionen „Cytoplasm“ oder „Cell“ gewählt.

6. **Extraktion der statistischen Daten:** Nachdem alle zu analysierenden Zellreihen klassifiziert waren, wurde das Präparat erneut durchgemustert und die vorgenommene Klassifikation auf die biologische Sinnhaftigkeit hin kritisch überprüft. Mithilfe des sogenannten Distanzskripts des QuPath Autors Dr Peter Bankhead (14), wurde nun die Distanz einer gewünschten Zellpopulation zu den anderen bereits klassifizierten Zellpopulationen errechnet: Um die besondere Bedeutung der CD8⁺ CTL für das Ansprechen auf eine Immuntherapie mit IPI, sowie die Hypothese einer hypoxischen Inhibition CD8⁺ CTL weiter untersuchen zu können, sollte in unserem Fall die Distanztransformation anhand der Population der CD8⁺ CTL ausgeführt werden. Im Anschluss konnte in QuPath eine sogenannte Heatmap erstellt werden, die farblich die Distanzen der CTL zu den umliegenden Strukturen darstellt (siehe **Abbildung 83**) und damit einen ersten Eindruck zu deren Infiltrationsmuster im Tumorgewebe i.S. eines Immune-Profiling ermöglicht.

Mithilfe des beschriebenen Vorgehens erhielt man für jedes ausgewertete Tumor-Präparat eine Reihe von statistischen Rohdaten: Diese beinhalteten zum einen eine Angabe der absoluten Häufigkeiten der einzelnen klassifizierten Zellklassen (Abrufbar unter dem Menüpunkt „Measure“>“Show annotation measurements“), zum anderen eine Auflistung der Zellkoordinaten inklusive des Abstands CD8⁺ CTL zu der jeweils nächstgelegenen Zelle (abrufbar unter „Measure“>“Show detection measurements“). Im Folgenden wurden diese quantitativen Daten zur absoluten Häufigkeit der einzelnen Zellsubklassen jedes einzelnen Präparates in eine Excel Tabelle zur späteren Analyse in SPSS übertragen. Um die aus QuPath gewonnenen Erkenntnisse zur Interaktion der einzelnen Zellpopulation miteinander ebenso einer detaillierten statistischen Analyse unterziehen zu können, wurden die Rohdaten der Zellkoordinaten von QuPath in ImageJ exportiert, um dort die spatiale Analyse zur Interaktion der einzelnen Zellpopulationen mittels des Plugins MosaicSuite vornehmen zu können. Die durch das Distanzskript errechneten Distanzen CD8⁺ CTL zu der jeweils nächstgelegenen Zelle wurden schließlich in Tableau exportiert.

7. **Bestimmung des Infiltrationsmusters CD8⁺ CTL:** Aufgrund der bereits durch Hegde *et. al.* (23) beschriebenen Beobachtung, dass auch das Infiltrationsmuster von Immunzellen eine wesentliche Bedeutung für das Ansprechen auf eine Immuntherapie im malignen Melanom hat, sollte zuletzt noch eine visuelle Bestimmung des Tumorphänotyps nach dessen Infiltrationsmuster erfolgen, wobei hier eine Unterscheidung in die drei Klassen „1=immunologische Wüste“, „2=ausgeschlossenes Infiltrat“ oder „3=vorbestehende Immunität“ vorgenommen wurde. Diese Resultate wurden schließlich gemeinsam mit den bereits extrahierten quantitativen Daten für die spätere Analyse in Tableau und SPSS in eine zusammengefügte Tabelle inkludiert.

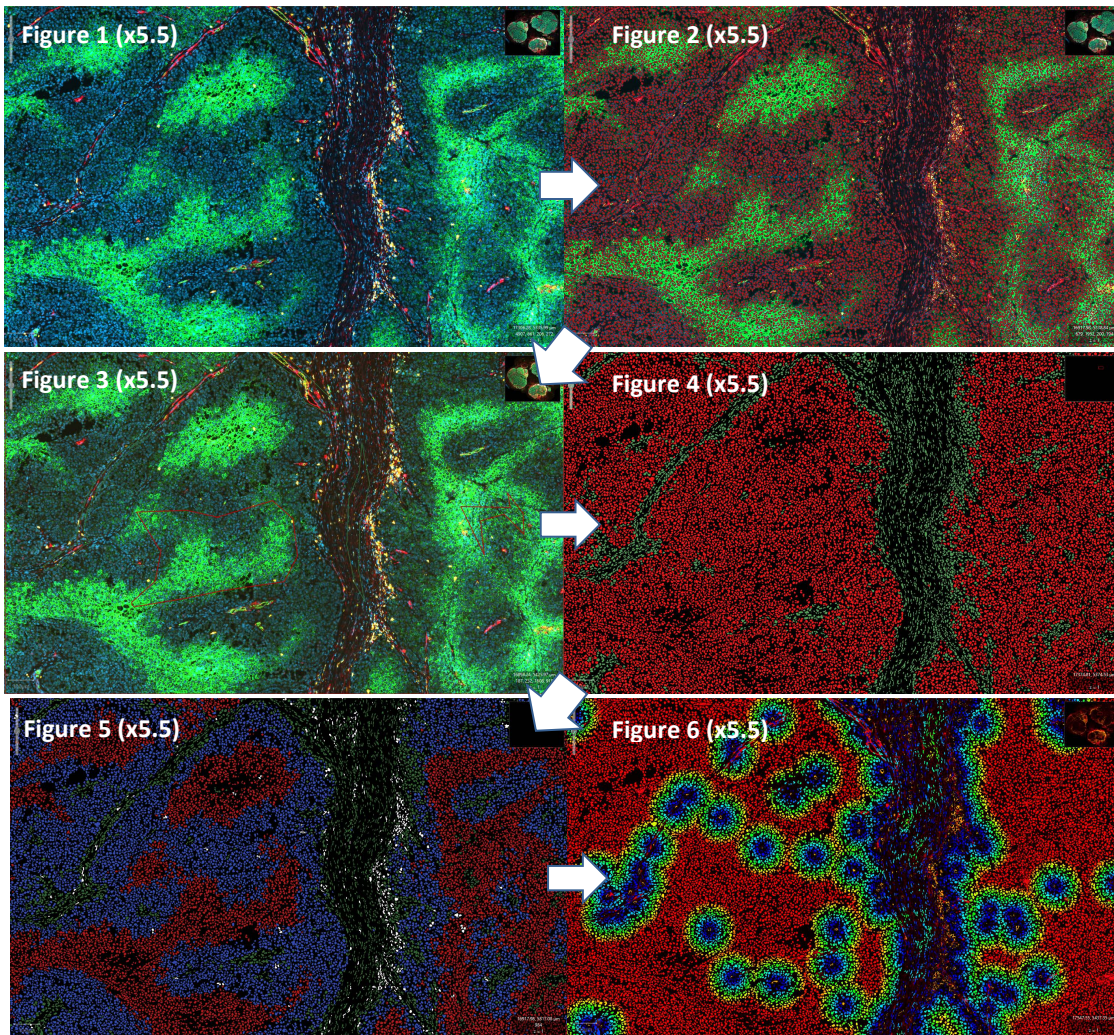


Abbildung 16: Zusammenfassendes Schema zum Vorgehen bei der Zellklassifikation innerhalb eines Tumorpräparates anhand der einzelzellbasierten Segmentierung. Gezeigt ist in Figure 1 ein x5.5-fach vergrößerter Ausschnitt einer Lymphknoten (LK)-Metastase (IF-108 V74) mit Färbungen für die Zellkerne (DAPI, blau), GLUT-1 (grün), CD73 (rot) und CD8 (gelb). In Figure 2 ist das Ergebnis der einzelzellbasierten Segmentierung gezeigt, wobei auf der Basis des DAPI Kanals sämtliche Zellkerne detektiert wurden. Diese einzelzellbasierte Segmentierung ermöglichte im nächsten Schritt die systematische Subklassifikation der Zellen. Zunächst wurden hierzu, wie in Figure 3 gezeigt, die Zellen mithilfe von QuPath's Algorithmus zum maschinellen Lernen und Untersucher-definierter Beispiele in Tumor (rote Umrandung) bzw. Stroma (grüne Umrandung) klassifiziert. Das Ergebnis dieser Zellklassifikation zeigt Figure 4. In einem zweiten Schritt erfolgte die weitere Zell-Subklassifikation nach definierten Intensitätsschwellen in dem jeweiligen Fluoreszenzkanal: So konnten $CD8^+$ CTL anhand der Intensität im Cy3-Kanal, hypoxische respektive normoxische Tumorzellen anhand der Intensitäten im FITC-Kanal und $CD73^+$ bzw. $CD73^-$ Tumor- und Stromazellen anhand der Intensitäten im Cy5-Kanal klassifiziert werden. Das vorläufige Resultat jener Subklassifikation zeigt Figure 5 mit einer Unterscheidung in $CD8^+$ CTL (weiß), in hypoxische (rot) und normoxische (blau) Tumorzellen, sowie in stromale Zellen (grün). Eine detaillierte Abhandlung des hier gezeigten Vorgehens inklusive der Unterscheidung nach der CD73-Positivität findet sich im Anhang in Form eines ergänzenden Bildatlas (siehe **Abbildung 71** bis **Abbildung 83**). In Figure 6 werden schließlich nach Ausführung des Distanzskriptes, im Sinne einer Distanztransformation, die Distanzbereiche um $CD8^+$ CTL in Form einer Heatmap gezeigt, sodass bereits eine visuelle Identifikation des Infiltrationsmusters $CD8^+$ CTL vorgenommen werden kann. In diesem Tumorpräparat zeigt sich bspw. eine hohe Infiltrationsdichte innerhalb des Stromas, wohingegen im Tumor selbst nur vereinzelt $CD8^+$ CTL gefunden werden können (große Distanzen sind in rot dargestellt).

2.3. Statistische Datenanalyse

Nach der einzelzellbasierten Analyse in QuPath und dem Extrahieren der Datenpakete wurden zunächst die quantitativen Daten zu den Zellanteilen der Zellsubpopulationen in tabellarischer Form zusammengefasst, um diese Daten sodann für die Untersuchungsserie mit den klinischen Daten des Patientenkollektivs zusammenzuführen. Unter Verwendung von Kaplan-Meier-Analysen konnten so schließlich Aussagen zur Abhängigkeit der Überlebenszeit von den erfassten Zellanteilen getroffen werden. Ergänzt wurde dieses Vorgehen durch eine – mithilfe der Zellkoordinaten durchgeführte – spatiale Interaktionsanalyse in MosaicSuite und eine Distanzanalyse in Tableau:

2.3.1. Zusammenführen der quantitativen Daten der erfassten Zellsubpopulationen in Excel

Im Anschluss an die Auswertung der Untersuchungsserie in QuPath wurde der generierte Datensatz zu den Häufigkeiten der klassifizierten Zellpopulationen extrahiert und in Excel bearbeitet. Da dieser Datensatz ausschließlich die Absolutzahlen (siehe **Abbildung 17**) zu den in QuPath klassifizierten Zellsubpopulationen wiedergibt, war es nötig, aus diesen Angaben zur absoluten Zellzahl die zugehörigen relativen Zellanteile (in Prozent der Gesamtzellzahl) zu berechnen (siehe **Abbildung 18**).

Name	Class	ROI	Centroid X	Centroid Y	Num Immune cells	Num Stroma:CD73+	Num Stroma:CD73-	Num Tum:hyvox:CD73+	Num Tum:hyvox:CD73-	Num Tum:normox:CD73+	Num Tum:normox:CD73-	Area μm^2	Perimeter μm	Max length μm	Gesamtzellzahl
Stroma	Stroma	Polygon	17213.2	5969.3	12	20	88	0	0	0	2	16647.4	1355.1	607.3	24764
Tumor	Tumor	Polygon	18791.2	5985.3	0	0	0	3	123	0	6	15884.2	973.02	267.87	
Stroma	Stroma	Polygon	17575.9	5541.2	1	39	45	0	0	0	2	12067.2	NaN	509.79	
Stroma	Stroma	Polygon	19009.9	6108.3	0	6	11	0	4	0	0	1990.1	241.9	111.7	
PathAnnotationObject	Rectangle		17980.7	6001.8	491	620	3378	21	8068	1	10100	2917682.6	7035.4	NaN	
Stroma	Stroma	Polygon	18264	5990.7	3	5	96	0	0	0	0	22926.8	NaN	611.8	
Tumor	Tumor	Polygon	17246	5770.5	0	0	0	0	0	0	21	2612.7	213.83	87.92	
Stroma	Stroma	Polygon	17411.9	6154.4	0	2	7	0	0	0	0	1214.6	140.74	53.71	
Tumor	Tumor	Polygon	17108.5	5615	0	0	0	0	1	0	48	7229.8	353.9	146.07	
Tumor	Tumor	Polygon	17723.4	6117.2	5	0	0	1	921	1	501	176918.8	1946.3	711.44	
Stroma	Stroma	Polygon	18067.4	5476	5	45	25	0	0	0	0	16049.3	731.26	341.12	
Tumor	Tumor	Polygon	17129.5	6488.7	0	0	1	0	0	0	35	3845.7	318.58	141.51	
					517	737	3651	25	9117	2	10715				

Abbildung 17: Aus der QuPath-Auswertung in Excel importierter Rohdatensatz mit den absoluten Häufigkeiten der klassifizierten Zellpopulationen. Mithilfe der einzelzellbasierten Auswertung in QuPath wurden die Rohdaten zu den absoluten Häufigkeiten der klassifizierten Zellsubpopulationen erhoben, in Excel importiert und dort weiter analysiert. Die Rohdaten geben sowohl die in dem gesamten als ROI definierten Tumorausschnitt erfassten Zellhäufigkeiten (Zeile „PathAnnotationObject“, rot), wie auch die Zellzahlen in den mithilfe des Drawing Tools eingezeichneten Subregionen zur Klassifikation des Präparates in Tumor und Stroma an. Addiert man die absoluten Zellhäufigkeiten aller aufgelisteten Regionen, erhält man schließlich die Gesamtzellzahl des Tumorpräparates (grün). Für die Berechnung der absoluten Zellzahl der jeweiligen Zellsubpopulationen werden deren absolute Häufigkeiten über alle Regionen hinweg addiert (schwarz).

	Immune cells	Stroma:CD73+	Stroma:CD73-	Tum:hyvox:CD73+	Tum:hyvox:CD73-	Tum:normox:CD73+	Tum:normox:CD73-	Stroma: all	Tum:hyvox all	Tum:normox all	Gesamtzellzahl
Absolutzahlen	517	737	3.651	25	9.117	2	10.715	4388	9.142	10.717	24764
Prozentzahlen	2.08770796	2.97609433	14.74317558	0.100952996	36.81553869	0.00807624	43.26845421	17.7192699	36.91649168	43.27653045	

Abbildung 18: Beispielhafte Darstellung der in Excel berechneten absoluten und relativen Zellhäufigkeiten aus dem erfassten Tumorausschnitt. Hier sind die in Abbildung 17 berechneten absoluten Zellzahlen der jeweiligen Zellpopulationen in dem gesamten Tumorpräparat mit den zugehörigen relativen Häufigkeiten dargestellt. Die relativen Häufigkeiten wurden dabei im Verhältnis zur Gesamtzellzahl des gezeigten Tumorausschnitts (24.764 Zellen) angegeben. Diese quantitativen Daten zur relativen Zellhäufigkeit stellen die Grundlage für die spätere Auswertung in SPSS dar.

Die Relativzahlen wurden gemeinsam mit den Angaben zum Infiltrationsmuster innerhalb des jeweiligen Tumors für alle Präparate tabellarisch aufgelistet und anschließend mit den klinischen Daten des anonymisierten Patientenkollektivs aus der retrospektiven Kohortenstudie verknüpft, sodass diese Daten schließlich für Überlebenszeit-Analysen in SPSS genutzt werden konnten.

Für die Auswertung in SPSS wurde daher entschieden, dass nur diejenigen Präparate in die Analyse mit einfließen, welche die höchste Gesamtzellzahl aufweisen, sodass schließlich eine Tabelle für n=35 Patienten und N_{Pat}=35 Präparate extrahiert wurde (siehe **Tabelle 10**). Dies sollte mögliche Beeinflussungen des späteren Ergebnisses in SPSS verhindern, da diejenigen Präparate mit der größten Zellzahl potenziell am genauesten und mit der höchsten Repräsentativität die tatsächlichen Verhältnisse innerhalb des TME des Patienten widerspiegeln. Eine gleichwertige Behandlung von Präparaten mit einer extrem hohen Gesamtzellzahl (ca. 2.000.000) und Präparaten mit einer geringen Gesamtzellzahl (<100.000) würde hingegen nicht nur zu einer relativ stärkeren Gewichtung der „kleinen Präparate“ führen, sondern auch die biologische Realität möglicherweise verzerrt darstellen, da mit abnehmender Zellzahl eines Präparates die Erkenntnisse aus dem individuellen biologische Phänotyp eines Tumors mit einer höheren Wahrscheinlichkeit ein zufälliges Ereignis darstellen und damit stärker fehlerbehaftet sind. Bei sehr kleinen Präparaten bestünde – so die Überlegung – immer die Gefahr einer einseitigen Verzerrung des Befundes, da hier nur ein Ausschnitt der biologischen Wirklichkeit innerhalb des Tumors wiedergegeben wird und damit Scheinkorrelationen entstehen können, die nicht die gesamte tumorarchitektonische Heterogenität widerspiegeln.

No.	Histo	Lokalisation	% CD8+ Immunkzellen	% Stroma: CD73+	% Stroma: CD73-	% Tum: hypox: C D73+	% Tum: hypox: C CD73-	% Tum: normox : CD73+	% Tum: normox: CD73-	% Stroma gesamt	% Tum: hypox	% Tum: normox	% Tum: CD73+	Ipilimumab vor oder nach Bestrahlung	Beobachtungs- zeitraum bis Ereignis 1 oder 2	=verstorben 2=lebend oder aus der Beobachtung gefallen	Gesamtzellzahl	CD8 Infiltrations muster
1	IF-108 V74	Haut	3	10	4	3	48	1	32	14	51	32	4	vor	2	1	1804467	2
2	IF-109 V81	LK	3	4	14	2	53	0	24	18	55	24	2	vor	2	1	744263	1
3	IF-134 VII57	LK	5	8	22	2	32	1	30	30	34	31	3	nach	28	1	1256184	2
4	IF-135 VII60	LK	5	16	11	5	33	3	27	27	38	31	7	nach	12	1	1582666	2
5	IF-110 V86	Hirnmastase	1	24	25	16	18	3	13	49	34	15	19	nach	11	1	154485	2
6	IF-106 V64	LK	37	20	10	6	25	0	2	30	31	2	7	nach	50	1	607862	3
7	IF-109 V78	Haut	7	24	40	5	14	2	8	65	19	10	6	vor	24	2	184422	2
8	IF-110 V85	Hirnmastase	1	16	19	2	33	0	30	35	35	30	2	nach	5	1	587108	1
9	IF-106 V63	Lungenmetastase	4	32	11	13	18	8	14	43	31	22	21	vor	38	2	400851	3
10	IF-108 V73	LK	18	34	22	9	7	3	6	56	17	9	13	nach	38	1	982806	3
11	IF-107 V69	LK	2	21	11	11	33	5	17	32	44	22	16	vor	3	1	908437	2
12	IF-109 V80	LK	3	24	20	19	14	9	11	43	33	20	28	vor	10	1	989188	1
13	IF-105 V61	Rectum	3	8	2	3	26	2	56	11	29	58	4	vor	1	1	2159274	1
14	IF-108 V75	Ohr	8	17	3	8	40	3	21	20	48	24	11	nach	6	1	148043	2
15	IF-108 V76	LK	14	34	5	5	37	1	5	39	42	5	6	nach	11	1	1505879	3
16	IF-138 VII89	Haut	9	28	17	6	14	2	25	44	20	27	7	nach	53	2	361791	2
17	IF-106 V62	Myocard	12	8	3	0	30	0	47	11	30	47	0	nach	73	2	1004090	3
18	IF-138 VII87	LK	2	7	9	1	66	0	15	16	67	15	1	nach	5	1	450895	2
19	IF-136 VII67	LK	1	7	10	2	52	0	28	18	54	28	2	nach	3	1	1359408	2
20	IF-135 VII59	Haut	1	7	2	19	63	2	6	8	82	8	22	nach	2	1	164630	2
21	IF-134 VII50	Haut	11	30	10	11	18	11	9	40	29	20	21	vor	9	1	257282	2
22	IF-134 VII55	Lungenmetastase	8	12	10	15	39	5	11	22	54	16	21	vor	2	1	51852	2
23	IF-134 VII51	Haut	3	14	7	10	44	3	19	20	55	22	14	nach	10	1	350201	2
24	IF-138 VII80	Haut	0	37	15	15	32	0	1	53	47	1	15	vor	2	1	8224	1
25	IF-137 VII79	Rectum	6	8	15	4	54	1	13	23	57	14	4	vor	6	1	1848768	2
26	IF-136 VII68	LK	11	19	11	34	21	2	2	29	55	5	35	vor	2	1	537568	2
27	IF-136 VII69	Haut	4	46	29	6	11	2	3	75	17	4	8	vor	1	1	330199	1
28	IF-137 VII76	Haut	3	12	7	4	56	0	12	19	60	12	72	vor	10	1	1319428	2
29	IF-134 VII53	Haut	13	20	8	3	36	1	19	28	39	20	4	vor	10	1	1375165	2
30	IF-137 VII77	Magen	3	18	19	13	43	2	3	37	55	6	15	vor	0	1	52155	1
31	IF-138 VII93	LK	9	6	7	34	20	13	9	13	53	23	47	nach	3	1	1786540	3
32	IF-137 VII78	Haut	3	20	11	5	50	0	12	31	55	12	5	vor	3	1	584752	2
33	IF-141 VII103	LK	7	12	21	46	3	11	0	33	49	11	56	nach	12	1	1682170	2
34	IF-141 VII105	Leber	14	33	13	0	5	0	34	46	5	34	0	nach	57	2	21497	3
35	IF-138 VII88	Gaumenschleimhaut	3	25	21	3	36	3	10	46	39	12	5	vor	1	1	160465	2

Anmerkungen: ¹ 12.83% Nekrose
grün= Präparat mit der höchsten Zellzahl des jeweiligen Patienten

Tabelle 10: Auflistung der gerundeten quantitativen Daten zur relativen Häufigkeit der Zellpopulationen und den zugehörigen klinischen Daten des gesamten Patientenkollektivs mit ausschließlich denjenigen Tumorpräparaten, welche die höchste Gesamtzellzahl aufweisen (nach dem Prinzip ein Patient: ein Präparat). Grün unterlegt sind dabei nach wie vor diejenigen Präparate, die für den jeweiligen Patienten in die Überlebenszeitdatenanalyse in SPSS aufgenommen wurden. Lila dargestellt sind demgegenüber diejenigen Präparate zerebraler Metastasen, die nach dem Prinzip ein Patient: ein Präparat, in die Analyse einbezogen werden.

2.3.2. Spatiale Analyse der Zellinteraktion in MosaicSuite

Mosaic ist ein Software-Plugin der open-source Plattform ImageJ zur Analyse und Quantifizierung von Zellverteilungen und deren Interaktion zueinander (193). Da ImageJ im Gegensatz zu QuPath keine whole-slide Analyse von Tumorpräparaten größer als 150.000 Zellen unterstützt, wurde in dieser Arbeit MosaicSuite lediglich für die Interaktionsanalyse der verschiedenen Zellsubpopulationen auf mikroregionärer Ebene verwendet. Dies bietet gleichzeitig den Vorteil einer systematischen Analyse vieler interessierender Ausschnitte innerhalb eines Tumorpräparates und ermöglicht die Generierung einer Übersicht der Zellverteilung und die Darstellung der Signifikanz der gezeigten Interaktionen, sodass schließlich die Wertigkeit von GLUT-1 und CD73 als Surrogatmarker der Tumorphoxie, respektive der ADO-Synthese statistisch ermittelt, als auch die Hypothese einer hypoxischen bzw. Adenosin-vermittelten Inhibition CD8⁺ CTL beurteilt werden kann. Hierzu wurden die Zellkoordinaten der einzelnen klassifizierten Zellpopulationen (X und Y Koordinaten) in der ausgewählten QuPath-ROI (siehe **Abbildung 84**) in ImageJ und folgend in die Interaktionsanalyse von Mosaic, mithilfe des in QuPath angelegten Shortcutbefehls „Extensions“>“Send image to ImageJ“, transferiert. Dieses Vorgehen wurde durch die Kooperation der AG PD Dr. Mayer und der MosaicGroup um Prof Sbalzarini etabliert und ermöglicht mithilfe eines von der Gruppe Sbalzarini entworfenen Skripts die Auflistung der individuellen Daten und der Zellkoordinaten jeder einzelnen Zelle in Mosaic. Nach der jeweils vorzunehmender Interaktionsanalyse wurden sodann die Zellkoordinaten der interessierenden Zellklassen in Mosaic hochgeladen, wobei die Koordinaten der zu untersuchenden Zellen (hier z.B. CD73⁺ Stromazellen) mit der definierten Referenzklasse Y (hier: CD8⁺ CTL) verglichen wurden (siehe **Abbildung 19** und **Abbildung 20**) (194).

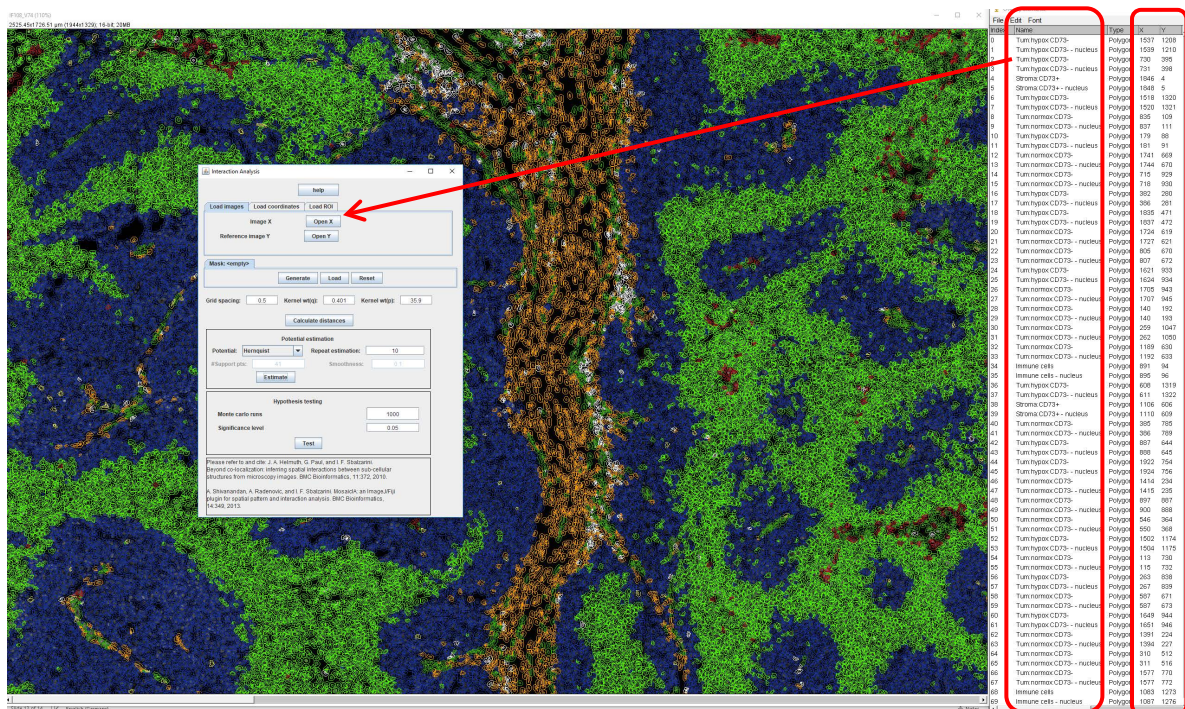


Abbildung 19: Zur Interaktionsanalyse in MosaicSuite importierte ROI aus QuPath. Mithilfe des Shortcuts "Send Region to ImageJ" wird die in QuPath eingezeichnete ROI mit sämtlichen klassifizierten Zellen und deren Zellkoordinaten in ImageJ importiert. Diese Zellkoordinaten können nun analog zu dem Vorgehen mit Hochladen der Zellkoordinaten im .csv Format in der Interaktionsanalyse in MosaicSuite geöffnet und folgend analysiert werden.

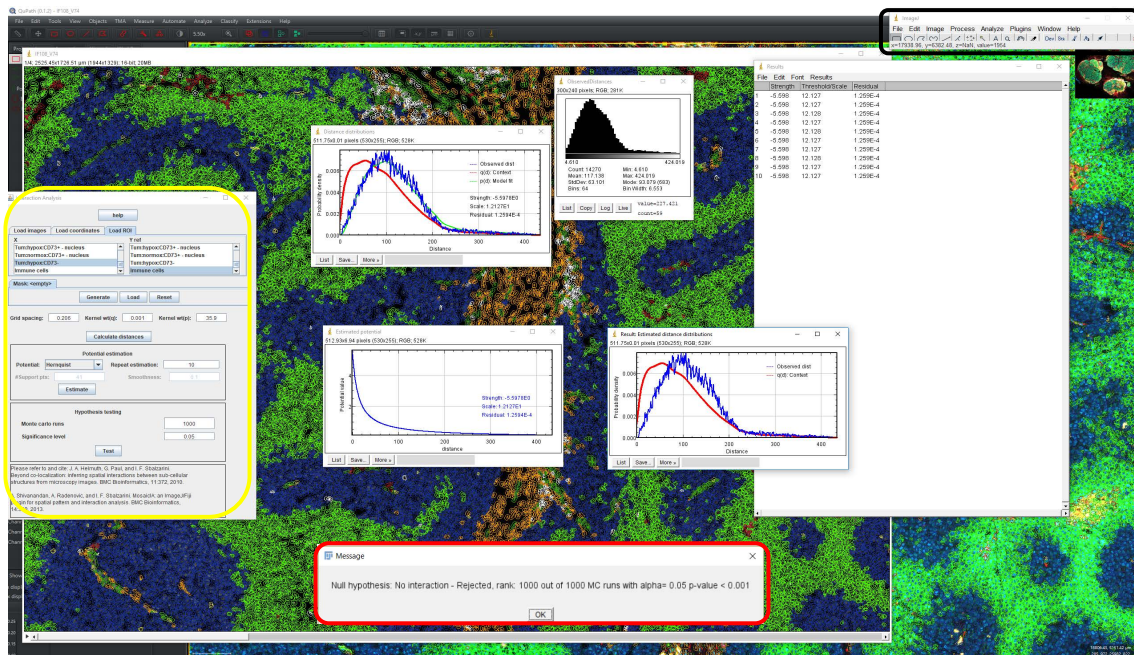


Abbildung 20: Ausführen der Interaktionsanalyse von hypoxischen CD73⁺ Zellen vs. CD8⁺ Immunzellen in MosaicSuite mit zugehörigen Resultaten. Die im Hintergrund des Screenshots noch sichtbare ROI aus QuPath wurde zunächst an ImageJ (in schwarz eingekreiste Menüleiste am oberen rechten Rand) gesendet und dort als Übersichtsfärbung mit den klassifizierten Zellen dargestellt. Die individuellen Zellkoordinaten werden sodann in der Interaktionsanalyse von Mosaic (siehe gelb eingekreisten Bereich) geöffnet und dort mit den Funktionen „Calculate Distances“, sowie „Estimate“ analysiert, bevor abschließend die Zellinteraktion in einem Hypothesen-Test auf seine Signifikanz < 0.05 überprüft wurde (rot eingezeichnet).

Nach Hochladen der Zellkoordinaten erfolgte die „Distanzkalkulation“, welche die Verteilung der untersuchten Zellpopulation in Abhängigkeit der Distanz der Referenzklasse als Histogramm und als Kurvenmodell (siehe **Abbildung 21** und **Abbildung 22**) berechnet. Das Histogramm zeigt dabei die Häufigkeitsverteilung der zu untersuchenden Zellpopulation (hier: Stromazellen bzw. hypoxische Tumorzellen) in Abhängigkeit der Distanz zu CD8⁺ CTL. Die blaue Kurve entspricht der Wahrscheinlichkeit mit der sich die untersuchte Zellpopulation in einer definierten Distanz zu diesen CD8⁺ CTL aufhält. Deren Verlauf kann näherungsweise aus dem Histogramm abgelesen werden. Demgegenüber entspricht die rote Kurve der „Kontextfunktion“, die einer mathematisch errechneten, präparatspezifischen zufälligen Verteilung von Zellen entspricht und somit Grundlage zur späteren Beurteilung der Signifikanz einer Interaktion zweier Zellpopulationen ist. Durch diese Graphiken kann das Interaktionsmuster der zu untersuchenden Zellpopulationen also auch visuell verifiziert werden.

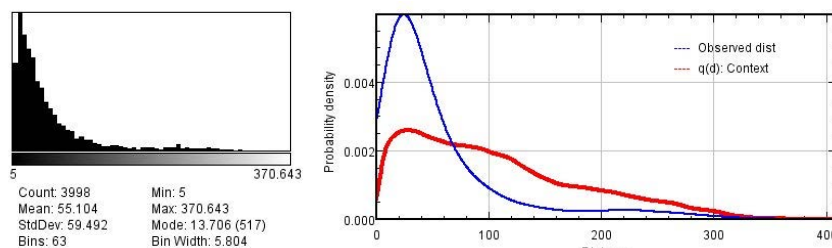


Abbildung 21: Darstellung des Histogramms (links) und des Kurvenmodells zur Interaktion von Stromazellen und CD8⁺ CTL aus dem in **Abbildung 32 gezeigten Bildausschnitt.** Die linke Abbildung zeigt das Histogramm mit der Distanzverteilung der Stromazellen (CD73⁺ und CD73⁻ Zellen im Stroma) zu CD8⁺ Immunzellen, den zugehörigen Minimal- und Maximalwerten, sowie der mittleren Distanz der Stromazellen zu den Immunzellen (55,1 μ m). Rechts ist die zugehörige Wahrscheinlichkeitsverteilung der Stromazellen in Abhängigkeit der Distanz zu den Immunzellen gezeigt. Die blaue Kurve gibt dabei die im Histogramm erfassten Distanzen wider, wohingegen die rote Kurve eine Zufallsverteilung beschreibt.

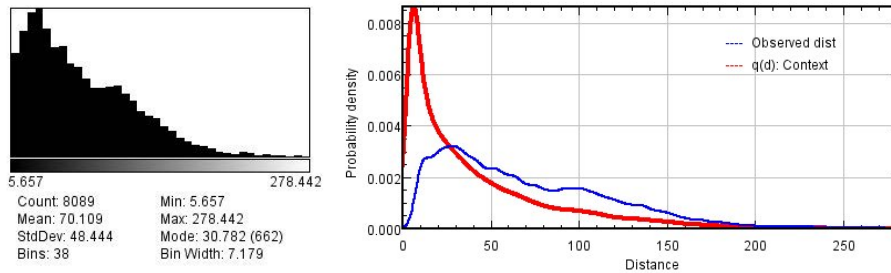


Abbildung 22: Darstellung des Histogramms (links) und des Kurvenmodells (rechts) zur Interaktion von hypoxischen Tumorzellen und CD8⁺ Immunzellen. Auch hier ist links das Histogramm und rechts die Wahrscheinlichkeitsverteilung der hypoxischen Tumorzellen in Abhängigkeit der Distanz zu den Immunzellen gezeigt, welche auf der Basis der Distanzkalkulation erstellt wurden. Beim Vergleich der beiden Muster wird deutlich, dass die Immunzellen absolut betrachtet eine größere Distanz zu hypoxische Tumorzellen (mittlerer Abstand zu Immunzellen: 70,1µm) als zu Stromazellen aufweisen. Dies spiegelt sich sowohl in absoluten Zahlen (Histogramm), als auch in der nach rechts verschobenen Distanzkurve wider.

Um die Signifikanz der oben beobachteten Interaktion quantitativ festzuhalten, wird die sogenannte „Estimate Potential“ Funktion ausgeführt. Damit deren Berechnung korrekt erfolgt, wird zuvor der im Rahmen der ersten Distanzkalkulation vorgeschlagene Kernel $w_t(p)$ -Wert in Mosaic übernommen, da dieser eine bessere Annäherung an den optimalen Kernel $w_t(p)$ zur Generierung valider Daten bildet (195) als der voreingestellte Kernel $w_t(p)$ -Wert. Nun erfolgt die Schätzung des Potentials (hier wurde das Potential nach Hernquist verwendet), wobei zwei Graphiken generiert werden: Die erste Graphik beinhaltet die Kurve zur Distanzverteilung, welche zusätzlich zu der Kurve der beobachteten Distanzen (blau) und der Context-Funktion (rot), nun eine dritte, grüne Kurve, das sogenannte Model-fit für das Hernquist Potential und die sogenannte Interaktionsstärke („Strength“) aufzeigt. Die zweite Graphik demgegenüber stellt das Potential der Zellinteraktion mit der zugehörigen Kurve dar (siehe **Abbildung 23** und **Abbildung 24**). Dieses Potential beschreibt die Stärke der Interaktion zwischen den Zellpopulationen: Ist die Stärke der Interaktion gleich null, bedeutet dies, dass die Zellpopulationen weitestgehend unabhängig voneinander sind und keine Interaktion zeigen. Aufgrund von zufälligen Überlappungen in den Daten kann die Interaktionsstärke in manchen Fällen aber auch etwas größer als Null sein, obwohl keine Interaktion vorliegt (193). Die aus der dritten Graphik generierte Kurvenverteilung soll Grundlage für die später im Ergebnisteil gemachten Aussagen und Schlussfolgerungen sein, da sie gewissermaßen die Informationen zur Richtung und Stärke der Interaktion komprimiert darstellt.

An dieser Stelle soll daher beschrieben werden, wie jene Graphik zu interpretieren ist: Die rote Kurve stellt die mathematisch errechnete Zufallsverteilung dar. Die die blaue Kurve stellt die beobachtete Distanzverteilung auf Grundlage des Histogramms und die grüne Kurve (Model-Fit) eine mathematisch berechnete Näherung für die Zellverteilung in dem Histogramm – die im Idealfall möglichst mit der blauen Kurve übereinstimmt – dar. Umso weiter die rote Kurve von der grünen respektive der blauen Kurve abweicht, umso wahrscheinlicher basiert die Interaktion zwischen den zwei Zellpopulationen auf einer echten Interaktion und ist nicht durch Zufall entstanden. Diesen Sachverhalt spiegelt auch die Größe „Strength“ (Stärke der Interaktion) wieder, wobei eine negative Interaktionsstärke eine negative Korrelation (i.S. einer Zellabstoßung) und eine positive Interaktionsstärke eine positive Korrelation (i.S. eines Zellclusterings) anzeigt.

Dabei ermöglichte die Kooperation mit der MosaicGroup gleichfalls diejenigen Interaktionen in der näheren Umgebung, dem sogenannten Hard-Core, wie auch auf größere Distanzen, in die Berechnung der Stärke des Potentials miteinzubeziehen (194). Gerade das in der methodischen Arbeit von Gonciarz *et. al.* vorgestellte Konzept einer negativen Interaktionsstärke bei gleichzeitig bestehenden short-range-repulsion (d.h. einer negativen Korrelation in der näheren Umgebung) und einer wide-range-interaction (d.h. einer positiven Korrelation mit zunehmendem Abstand der Zellen) lässt dabei die Erfassung zahlreicher spatialer Interaktion, wie in unserem Fall einer hypoxischen Inhibition CD8⁺ CTL in größeren Tumorauschnitten, durch MosaicSuite zu (194).

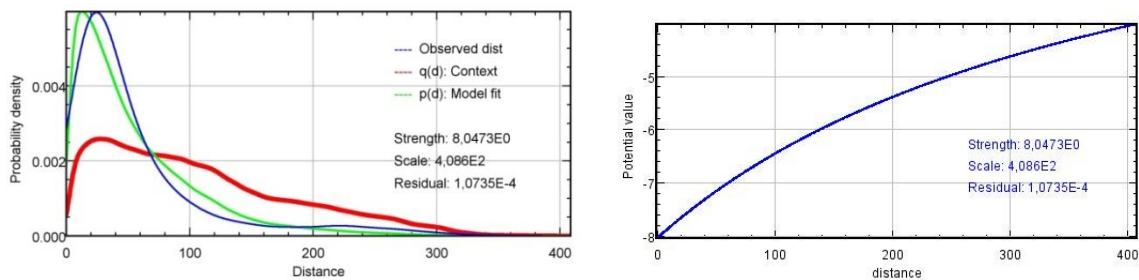


Abbildung 23: Darstellung des geschätzten Potentials (rechts) und der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Stromazellen in Abhängigkeit der Distanz zu CD8⁺ Immunzellen (links). Es zeigt sich in der linken Graphik, dass das Model-fit eine gute Näherung für die im Histogramm errechnete Verteilung der Stromazellen in Abhängigkeit der Immunzellendistanz ergibt. Außerdem lässt sich aus der Graphik schlussfolgern, dass Stromazellen und Immunzellen signifikant positiv miteinander korreliert sind, d.h. dass sie eine starke Interaktion in der Nähe zeigen (Strength: 8.0×10^0). Die hier beobachtete positive Interaktion ist auch nach Ausführen des Hypothesen-Tests als signifikant zu erachten.

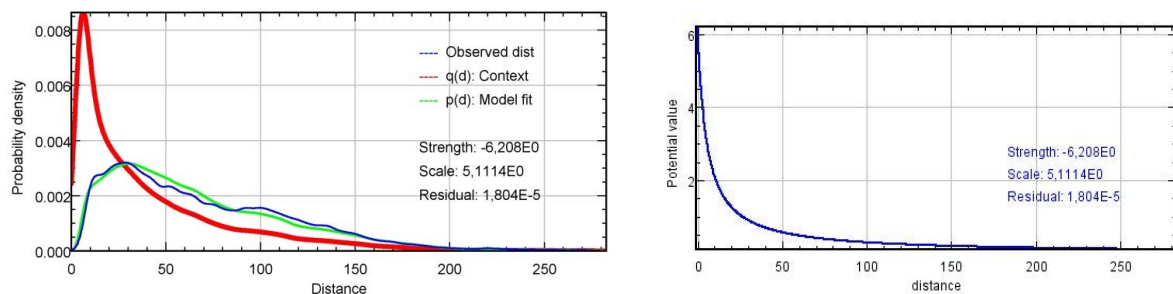


Abbildung 24: Darstellung des geschätzten Potentials (rechts) und der Wahrscheinlichkeitsverteilung der hypoxischen Tumorzellen in Abhängigkeit der Distanz zu CD8⁺ Immunzellen (links). Hier zeigt sich in der linken Graphik ebenfalls eine signifikante Interaktion hypoxischer Tumorzellen und Immunzellen. Diese sind allerdings negativ miteinander korreliert (Strength: -6.21×10^0), i.S. einer Abstoßung beider Zellpopulationen in dem untersuchten mikroregionären Ausschnitt. Die Interaktionsstärke hat daher ein negatives Vorzeichen. Ebenso ist der Kurvenverlauf des geschätzten Potentials invers zu dem oben gezeigten Verlauf bei der Interaktion von Stromazellen mit den Immunzellen.

Zur weiteren Validierung der Daten wird schließlich ein Hypothesentest durchgeführt, der anhand der bereits visuell erfassten Interaktion die statistische Signifikanz überprüft (193). Der Hypothesentest wird an 1000 (K) Monte Carlo Proben vollzogen, deren Punkteverteilungen gleichbedeutend sind mit der Nullhypothese „keine Interaktion“. Die zuvor beobachtete Zellverteilung wird nun gegen diese K zufälligen Proben verglichen: Die Nullhypothese „keine Interaktion“ wird auf dem Signifikanzlevel α verworfen, wenn die Stärke der Interaktion in der beobachteten Zellverteilung höher eingestuft wird als $[(1-\alpha)K]$ (193).

2.3.3. Visualisierung der Resultate aus der whole-slide Distanzanalyse in Tableau 2018.3

Im Gegensatz zu Mosaic ist das Statistikprogramm Tableau auf die Bewältigung größerer Datenmengen mit bis zu 2 Millionen Zellen ausgelegt, wodurch eine globale Distanzanalyse für jedes der ausgewerteten whole-slide Tumorpräparate erstellt werden konnte, in der die Distanz der untersuchten Zellsubpopulation (z.B. Stromazellen, hypoxische oder normoxische Tumorzellen) zu der ihr am nächsten liegenden Immunzelle (CD8⁺ CTL) visualisiert wurde. In den Boxplots sind dabei der Median der Distanzen, das erste und dritte Quartil, die Interquartilsabstände, die oberen und unteren Whisker und die Einzelpunktwerte angegeben. Zur Generierung der Boxplots wurden die aus QuPath extrahierten Datenpakete im Text (txt.) Format in Tableau eingefügt und mit den zugehörigen Funktionen die gewünschten Grafiken erstellt (**Abbildung 25** und **Abbildung 26**).

Nach dem gleichen Prinzip wurden für jedes ausgewertete Präparat Balkendiagramme erstellt, die die Distanzen der Zellklassen zu der ihr nächstgelegenen CD8⁺ Immunzelle als Median, sowie als Mittelwert abbilden (siehe **Abbildung 26**). Die Darstellung der Distanzverhältnisse CD8⁺ CTL in dem whole-slide Präparat mithilfe von Tableau stellt damit gewissermaßen eine Ergänzung des zellulären Zusammenspiels für die Ebene des globalen Tumorpräparates dar, während die Interaktionsanalyse in Mosaic dieses Zusammenspiel auf mikroregionärer Ebene beschreibt und damit detaillierte Einblicke in potentielle pathophysiologische Interaktionen bietet.

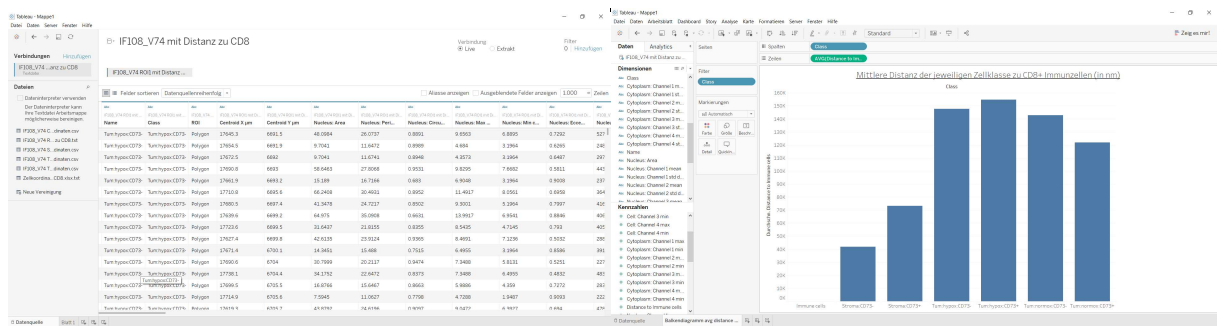


Abbildung 25: Vorgehen bei der Distanzanalyse und dem Erstellen von Balkendiagrammen in Tableau. Die mithilfe des Distanzskripts in QuPath generierten Daten zur Distanz der klassifizierten Zellpopulationen zu CD8⁺ CTL wurden hier als Datenquelle im .txt Format in Tableau zur anschließenden Analyse geöffnet (links). Hierbei wurden jeweils die mittleren bzw. medianen Distanzen der klassifizierten Zellpopulationen zur nächsten CD8⁺ CTL untersucht, indem die gewünschten Parameter (Class auf der X-Achse und die mittleren Distanzen auf der Y-Achse) mittels Drag and Drop in das Feld Spalten bzw. Zeilen übertragen wurden.

Neben der statistischen Distanzanalyse der einzelnen Tumorpräparate, mit deren Hilfe u.a. die Hypothese einer hypoxischen Inhibition CD8⁺ CTL näher untersucht werden konnte, wurde Tableau ebenso zur Darstellung auffälliger Befunde aus den deskriptiven Statistiken des untersuchten Patientenkollektivs verwendet. Insbesondere sollte hierdurch die immunologische Besonderheit der ZNS-Präparate im Vergleich mit nicht-ZNS-Präparaten verdeutlicht, sowie die Rolle der verschiedenen Infiltrationsmuster CD8⁺ Zellen dargelegt werden, sodass schließlich eine nähere Beurteilung der Fragestellungen zur Abhängigkeit der Resultate von der untersuchten Gewebeart, als auch der Relevanz des CD8 Infiltrationsmusters als Prädiktor für ein Therapieansprechen im malignen Melanom erfolgen konnte.

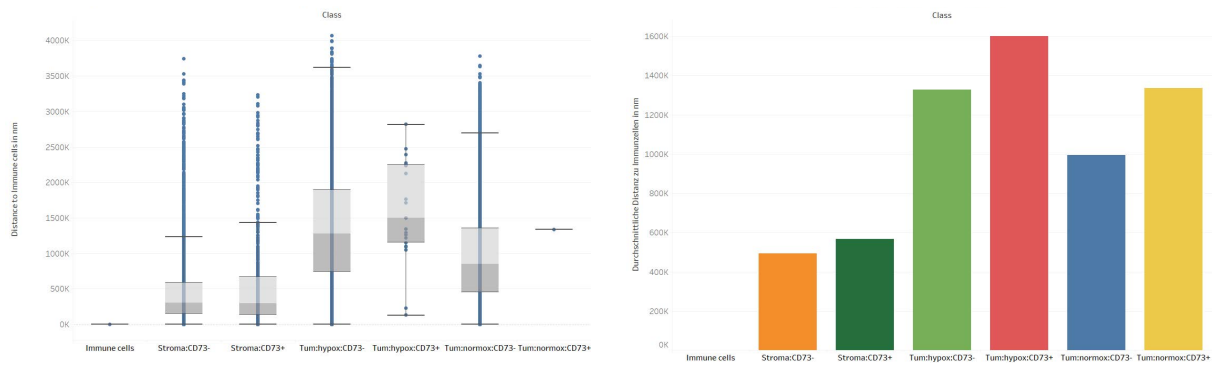


Abbildung 26: Boxplots (links) und Balkendiagramm (rechts) zur Darstellung der Verteilung klassifizierter Zellsubpopulationen („Class“) in Abhängigkeit ihrer Distanz zur nächstgelegenen CD8⁺ Zelle (in 0.1 nm). Gezeigt ist hier die Auswertung des Zellausschnitts von IF-108 V74. Dabei ist die Klasse der Immunzellen als Negativkontrolle mitaufgenommen worden, da Immunzellen definitionsgemäß eine Distanz von 0 zu sich selbst haben müssen. Man erkennt, dass die Stromazellen im Mittel die kleinste Distanz zu den Immunzellen aufweisen (ca. 40µm). Hypoxische Tumorzellen hingegen zeigen die größte Distanz zu den Immunzellen (ca. 130µm). Die normoxischen Tumorzellen reihen sich tendenziell bei den Distanzen zu den Immunzellen zwischen den Stromazellen und den hypoxischen Tumorzellen (ca. 80µm) ein. Für die Balkendiagramme wurde jeweils die durchschnittliche Distanz (Mittelwert) oder der Median der Zellklassen zu der ihr nächstgelegenen CD8⁺ CTL verwendet

2.3.4. Statistische Analyse der klinischen Daten in SPSS 23v5

Die statistische Auswertung in SPSS 23 v5 (IBM, Armonk, NY, USA) erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der JGU Mainz. Analysiert wurden die in QuPath erhobenen quantitativen Daten der einzelnen Tumorpräparate, sowie die klinischen Daten des untersuchten Patientenkollektivs aus der retrospektiven Kohortenstudie. Diese klinischen Daten umfassten sowohl die Lokalisation der histologischen Präparate, die zeitliche Gabe von IPI vor oder nach der Radiotherapie, den Beobachtungsstatus des Patienten, sowie der Überlebenszeit seit Beginn der ersten Bestrahlung von Hirnmetastasen. Die Daten wurden im Folgenden anonymisiert den ausgewerteten IF-Präparaten zugeordnet, sodass für jeden Patienten der zugehörige Tumor mit den erfassten intratumoralen Parametern tabellarisch einzusehen war (siehe **Tabelle 10**). Diese intratumoralen Parameter umfassen alle durch die Surrogatmarker erfassten Zellpopulationen, die als relative Zellhäufigkeiten in der Tabelle abgebildet wurden. Die Auswertung in SPSS wurde in 3 Gruppen vorgenommen, die sich alle aus der Grundgesamtheit der n=35 Patienten mit N_{ges}=70 Präparate rekrutiert haben: Zum einen die Gruppe aus n=35 Patienten mit N₁=35 Präparaten, welche ebenso N=2 ZNS-Metastasen miteinschließt (siehe **Tabelle 10**). Zum anderen eine Gruppe für alle Patienten ausschließlich der ZNS-Metastasen (n₂=33 Patienten mit N₂=33 Präparaten, siehe **Tabelle 19**), und eine Gruppe von Patienten mit lediglich ZNS-Metastasen (n₃=5 Patienten mit N₃=6 Präparaten siehe **Tabelle 20**). Durch die getrennte Analyse der Gruppen nach der Lokalisation der Melanommetastasen sollten die tumorimmunologischen Unterschiede zwischen ZNS und nicht-ZNS-Metastasen verdeutlicht werden, die bereits in der visuellen Analyse beobachtet werden konnten. Zur beschreibenden Analyse wurden in SPSS zunächst deskriptive Statistiken der untersuchten Gruppen erstellt, sodass für die quantitativen Variablen sowohl Lagemaße (Mittelwert, Median, Quartile, Minimum und Maximum), als auch Streumaße (Standardabweichung) berechnet werden konnten (siehe **Abbildung 27**, **Abbildung 85** und **Abbildung 86**).

		Statistiken												
		% CD8+ Immunzellen	% Stroma: CD73+	% Stroma: CD73-	% Tum: hypox: CD73+	% Tum: hypox: CD73-	% Tum: normox: CD73+	% Tum: normox: CD73-	% Stroma gesamt	% Tum: hypox	% Tum: normox	% Tum: CD73+	Überlebenszeit	Gesamtzellzahl
N	Gültig	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
	Fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mittelwert	6,77	18,89	13,26	9,71	32,11	2,83	16,40	32,11	41,80	19,20	14,37	14,43	792096,14
	Standardfehler des Mittelwertes	1,172	1,781	1,407	1,756	2,838	,588	2,211	2,697	2,730	2,115	2,764	3,181	107834,272
	Median	4,00	18,00	11,00	6,00	33,00	2,00	13,00	30,00	42,00	20,00	7,00	6,00	587108,00
	Standardabweichung	6,933	10,535	8,322	10,391	16,791	3,485	13,079	15,957	16,151	12,515	16,349	18,822	637956,157
	Schiefe	2,670	,617	1,090	2,006	,154	1,678	1,173	,684	-,032	1,009	2,047	1,772	,530
	Standardfehler der Schiefe	,398	,398	,398	,398	,398	,398	,398	,398	,398	,398	,398	,398	,398
	Minimum	0	4	2	0	3	0	6	5	1	0	0	0	6224
	Maximum	37	46	40	46	96	13	56	75	82	58	72	73	2159274
	Perzentile 25	3,00	9,00	7,00	3,00	16,00	,00	6,00	19,00	31,00	10,00	4,00	2,00	164422,00
	50	4,00	18,00	11,00	6,00	33,00	2,00	13,00	30,00	42,00	20,00	7,00	6,00	587108,00
	75	9,00	25,00	19,00	13,00	44,00	3,00	25,00	43,00	55,00	27,00	21,00	12,00	1358408,00

Abbildung 27: Deskriptive Statistiken aus SPSS zum untersuchten Patientenkollektiv der $n_1=35$. Erfasst wurden sowohl Mittelwert, Median, Standardabweichung, Schiefe der Verteilung, Minimum, Maximum und Perzentilen der in QuPath ermittelten quantitativen Daten der klassifizierten Zellpopulationen, sowie die klinischen Daten des Patientenkollektivs. Es zeigt sich, dass der Anteil $CD8^+$ CTL und $CD73^+$ Tumorzellen eine hohe Standardabweichung aufweisen, was sich zugleich in einer starken Verteilungsschiefe widerspiegelt. Gründe für diese vergleichsweise große Schiefe sind bei $CD8^+$ CTL die starken Unterschiede zwischen ZNS und nicht-ZNS-Präparaten und bei $CD73^+$ Tumorzellen die Unterschiede zwischen jenen Präparaten, mit einer starken intratumoralen CD73 Expression verglichen mit einer äußerst spärlicher bzw. fehlenden CD73 Expression in anderen Tumoren. In erster Näherung kann somit von keiner Normalverteilung dieser Variablen ausgegangen werden

Die Zusammenhänge zwischen den erfassten Variablen in den Tumorpräparaten wurden mithilfe von Streudiagrammen dargestellt und in Korrelationsanalysen nach Pearson bzw. Spearman weiter untersucht, sodass ermittelt werden konnte, inwieweit das Ausmaß der intratumoralen Hypoxie bzw. der intratumoralen CD73 Expression mit dem Ausmaß der Infiltration durch $CD8^+$ CTL korreliert ist. Anschließend erfolgte die Analyse der Überlebenszeitdaten in Abhängigkeit der in den multiplex-IF-Färbungen erfassten quantitativen Daten. Diese Analyse wurde nach der Kaplan-Meier-Methode für alle drei Patientengruppen durchgeführt, wobei die ermittelten Signifikanzniveaus mithilfe von Log-Rank-Statistiken verglichen wurden. Der Cut-Off-Wert zur Dichotomisierung der relativen Zellanteile der jeweils betrachteten Zellpopulation wurde hierbei anhand des Medians (siehe **Abbildung 28**) und mithilfe der Interpretation einer Grenzwertoptimierungskurve (engl. receiver operating characteristic, kurz: ROC-Kurve) (siehe **Abbildung 29**) festgelegt, sodass durch den Trennwert eine möglichst hohe Sensitivität und eine geringe falsch positive Rate erzielt werden kann. Die ermittelten Kaplan-Meier-Kurven (siehe **Abbildung 30**) zum OS in Abhängigkeit des jeweils interessierenden intratumoralen Parameters ermöglichen sodann Schlussfolgerungen zur medianen Überlebenszeit, d.h. derjenigen Zeit, zu der noch 50 % der Patient ereignisfrei sind, sowie zum prädiktiven Wert der untersuchten Marker für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie. Damit kann die eingangs aufgestellte Hypothese eines besseren Ansprechens von Patienten mit einer starken CD8 Infiltration, einem geringen Anteil hypoxischer Tumorzellen und einer geringen CD73 Expression im Tumor überprüft, als auch die Nebenfragestellungen des prognostischen Wertes des CD8 Infiltrationsmusters im malignen Melanom hinreichend beantwortet werden.

Zusammenfassung der Fallverarbeitung				
% CD8+ Immunzellen (Median)	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
low	18	17	1	5,6%
high	17	13	4	23,5%
Gesamt	35	30	5	14,3%

Abbildung 28: Ergebnis der visuellen Gruppierung der Immunzellen. Das Ausmaß der Infiltration $CD8^+$ CTL in den Tumor wurde bei der visuellen Gruppierung zwei Gruppen zugeordnet: Eine Gruppe umfasste alle Patienten mit einem Immunzellanteil unter dem Median und die andere Gruppe alle Patienten mit einem Anteil über dem Median. Dazu sind die Absolut-Zahlen angegeben (linke Spalte). Patienten, die im Verlauf des Beobachtungszeitraums verloren gingen bzw. sich nicht mehr gemeldet haben, werden im Allgemeinen zensiert, d.h. ihre Überlebenszeit wird nur bis zum letzten erfolgten Kontakt mit dem Patienten angegeben.

Koordinaten der Kurve
Variable(n) für Testergebnis: % CD8+ Immunzellen

Positiv, wenn größer oder gleich	Sensitivität	1 - Spezifität
-1,00	1,000	1,000
,50	1,000	,944
1,50	,938	,778
2,50	,938	,667
3,50	,750	,389
4,50	,688	,333
5,50	,563	,333
6,50	,563	,278
7,50	,500	,222
8,50	,500	,111
10,00	,438	,056
11,50	,375	,000
12,50	,313	,000
13,50	,250	,000
16,00	,125	,000
27,50	,063	,000
38,00	,000	,000

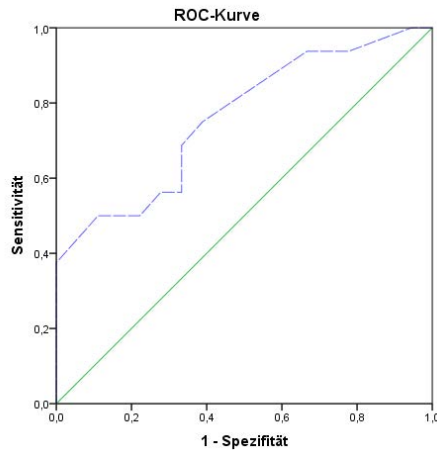


Abbildung 29: ROC-Kurve (rechts) mit den zugehörigen Punktwerten der Kurve für den Anteil CD8⁺ CTL in den whole-slide Tumopräparaten des untersuchten Patientenkollektivs (links). Zur Ermittlung des optimalen Cut-off-Wertes für die Dichotomisierung der Patientengruppen in den Kaplan-Meier-Analysen wurde eine ROC-Kurve erstellt, die die Sensitivität in Abhängigkeit der falsch positiv Rate (=1-Spezifität) für die Variable %CD8⁺ Immunzellen mithilfe einer ROC-Kurve (blau) und der zugehörigen diagonalen Bezugslinie (grün) darstellt. Der optimale Cut-off-Wert sollte eine möglichst hohe Sensitivität bei geringer Rate falsch positiver Resultate besitzen, sodass sich die Kurve mit zunehmender Bewegung in Richtung des linken oberen Rands dem optimalen Cut-off-Wert annähert. In diesem Fall liegt der optimale Cut-off-Wert bei etwa 3.50 %, da hier die höchste Sensitivität (0.889) bei einer gleichzeitig geringen falsch positiven Rate (0.313) vorliegt. Es kann gleichfalls gezeigt werden, dass auch der ermittelte Median (4.00 %) des Anteils CD8⁺ Immunzellen noch einen vergleichsweise guten Cut-off Wert darstellt.

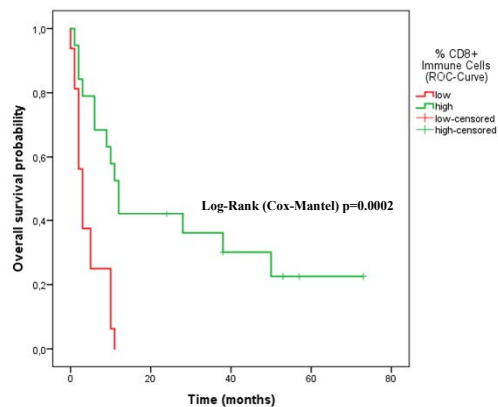
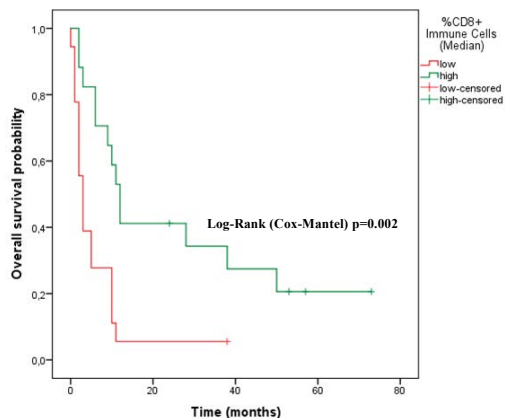


Abbildung 30: Kaplan-Meier Analysen zur Überlebenszeit des untersuchten Patientenkollektivs in Abhängigkeit der Höhe des Immunzell-Anteils (CD8⁺) in der jeweiligen Patientengruppe. Auf der X-Achse ist die Gesamtüberlebenszeit (in Monaten) und auf der Y-Achse der Anteil der Patienten ohne Ereignis angegeben. Die senkrechten Striche in den Graphen entsprechen sogenannten zensierten Patienten, d.h. Patienten mit einem ab diesem Zeitpunkt unbekanntem Status. Auf der linken Seite sind die Kaplan-Meier-Kurven für die Trennung nach dem Median der CD8⁺ Infiltration (4,00 %) gezeigt, wohingegen auf der rechten Seite die Trennung nach dem in der ROC-Kurve ermittelten Cut-off-Wert (3,50 %) vorgenommen wurde. Der Verlauf der grünen Kurve spiegelt diejenigen Patienten wider, deren Tumorauswertung einen Anteil CD8⁺ CTL über dem Median (>4.00 %) ergab, wohingegen in der roten Kurve diejenigen Patienten vertreten sind, deren Immunzellanteil in den ausgewerteten Tumoren unter dem Median (<4.00 %) lag. Man erkennt, dass die Patienten mit einem hohen Anteil CD8⁺ Zellen in ihren Tumoren nicht nur bedeutend länger überlebt haben, sondern auch, dass die mediane Überlebenszeit, also diejenige Zeit in der 50 % der Patienten noch leben, signifikant größer ist als bei der Vergleichspopulation. Ebenso wird deutlich, dass mithilfe des in der ROC-Kurve ermittelten Cut-off-Wertes eine exaktere Trennung der beiden Gruppen vorgenommen wurde, sodass der p-Wert hier bei p=0.0002 liegt.

Um schließlich von der in dieser Studie untersuchten Stichprobe repräsentative Schlussfolgerungen für die Grundgesamtheit vornehmen zu können, wurden die Daten im Folgenden mithilfe der Log-Rank-Statistiken, d.h. auf der Grundlage des statistischen Schätzens und statistischen Testens, ausgewertet. Hierbei muss beachtet werden, dass aufgrund der geringen Fallzahl des hier untersuchten Patientenkollektivs, auch statistisch signifikante Resultate keinesfalls als repräsentativ für die Allgemeinbevölkerung anzusehen sind, sondern vielmehr Trends abbilden, die im Rahmen umfangreicherer Studien für die Grundgesamtheit bestätigt werden sollten.

Beim Schätzen möchte man aus erhobenen Stichprobenwerten der Kaplan-Meier-Diagramme den unbekanntem wahren Wert in der Grundgesamtheit ableiten: Hierzu wurden die mittleren und medianen Überlebenszeiten der jeweiligen Gruppen, wie auch das 95 %-Konfidenzintervall (95 % KI) (siehe **Abbildung 31**) für die ausgeführte Analyse aufgeführt, um mithilfe des statistischen Tests den jeweiligen Signifikanzwert (p-Wert) zu ermitteln. Grundlage des statistischen Testens ist der Vergleich zweier Hypothesen (der Nullhypothese H_0 und der Alternativhypothese H_1), die mit den Ergebnissen des statistischen Schätzens vorgenommen werden können.

Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit									
% CD8+ Immunzellen (Median)	Mittelwert*				Median				
	Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall		
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze	
low	6,056	2,004	2,128	9,983	3,000	689	1,649	4,351	
high	27,284	6,598	14,352	40,217	12,000	1,353	9,349	14,651	
Gesamt	17,249	4,067	9,277	25,221	6,000	2,300	1,492	10,508	

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	9,342	1	,002

Abbildung 31: Darstellung der mittleren (links oben) und medianen (rechts oben) Überlebenszeiten mit den zugehörigen 95 % Konfidenzintervallen für die Trennung des Patientenkollektivs nach dem Median. Es zeigt sich, dass die Gruppe mit dem höheren intratumoralen Immunzellanteil nicht nur wesentlich längere Überlebenszeiten aufweist (mediane Überlebenszeit: 12.0 Monate vs. 3.0 Monate), sondern parallel auch keine Überschneidung der Konfidenzintervalle beobachtet werden kann, was auf einen statistisch starken Zusammenhang hindeutet. Dies bestätigt sich mit Blick auf den p-Wert (Bild unten) des durchgeführten Log-Rank-Tests, der eine Signifikanz von 0.002 ausgibt. Die gezeigten Zusammenhänge sind dabei als statistisch signifikant zu erachten, weil das Signifikanzlevel unter 0,05 liegt.

Damit das Ergebnis als statistisch signifikant zu betrachten ist, wurde der Fehler erster Art (α -Fehler) auf maximal 0,05 festgelegt, was gleichbedeutend mit einem Signifikanzniveau $<0,05$ ist. Als statistisch signifikant gelten im Folgenden daher Ergebnisse mit einem p-Wert $<0,05$, womit die Nullhypothese, die besagt, dass es keinen Zusammenhang zwischen den beobachteten Überlebenszeiten der Patienten und der Höhe des untersuchten intratumoralen Parameters gibt, verworfen werden kann. Folglich kann mit 95%iger Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass es sich bei dem in den Kaplan-Meier-Kurven gezeigten Resultat, um einen statistisch signifikanten Zusammenhang handelt bzw. die Alternativhypothese, die besagt, dass es einen Zusammenhang zwischen der Überlebenszeit und der Höhe des beobachteten Parameters gibt, angenommen werden.

Die Kaplan-Meier-Analysen zur Überlebenszeit der untersuchten Kollektive wurden dabei in Abhängigkeit des Ausmaßes der Tumorphoxie, des Anteils CD8⁺ CTL in den Präparaten, dem CD8⁺ Infiltrationsmuster, wie auch der Anteil der intratumoralen CD73-Expression vorgenommen, um den prädiktiven Wert dieser Parameter statistisch zu quantifizieren.

III. Ergebnisse

1. Visuelle Analyse der tumorimmunologischen Architektur des Melanoms

1.1. GLUT-1 als endogener Surrogat-Marker der Hypoxie im malignen Melanom

Zunächst sollte geprüft werden, ob der transmembranäre Glukosetransporter (GLUT)-1 als endogener Marker der Tumorphypoxie im Melanom eingesetzt werden kann. Dabei zeigte sich in der visuellen Analyse der multiplex-IF-Färbungen eine weitverbreitete und starke Anfärbung von GLUT-1 im Tumor. Demgegenüber konnte eine CD73-Expression vorwiegend im Stroma und insbesondere auf dort befindlichen Endothelzellen beobachtet werden, wohingegen sich eine schwache oder gar fehlende CD73 Expression im Tumor zeigte. Gleichzeitig hatte die visuelle Analyse eine äußerst variable Infiltration von CD8⁺ CTL in Melanomzellaggregate gezeigt, wohingegen im peritumoralen Stroma in der Mehrzahl der Fälle eine Clusterbildung CD8⁺ CTL gefunden werden konnte.

Da die GLUT-1 Expression insgesamt eine sehr heterogene Verteilung im Tumor mit einer abgeschwächten Anfärbung in unmittelbarer Nähe von CD73⁺ Blutgefäßen (siehe **Abbildung 32**) und einer stärkeren Expression mit zunehmendem Abstand zu CD73⁺ Gefäßen, entsprechend eines O₂ - Diffusionsgradienten von Bereichen hoher O₂-Konzentration hin zu schlechter oxygenierten Gewebereichen aufwies, erscheint es biologisch plausibel, dass GLUT-1 im malignen Melanom einen endogenen Marker der Tumorphypoxie darstellen könnte.

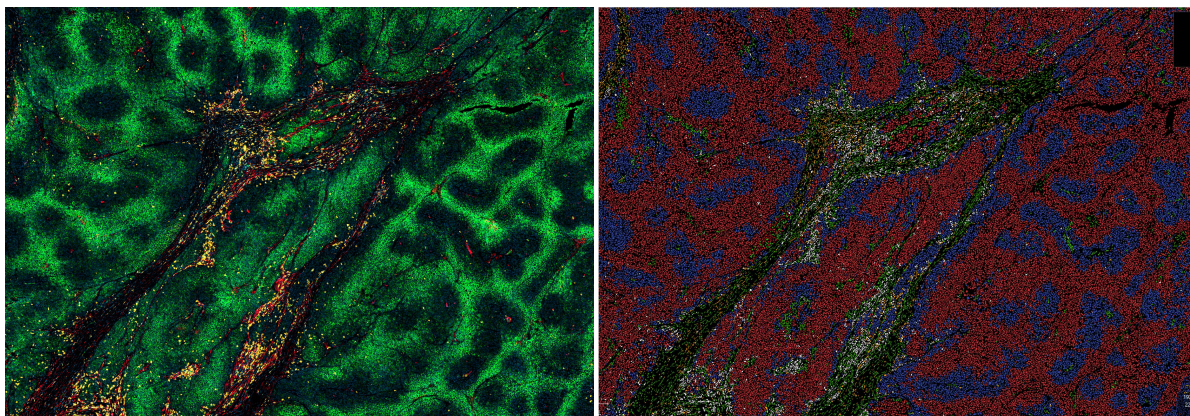


Abbildung 32: Ausschnitt aus einer Lymphknotenmetastase des malignen Melanoms aus IF-108 V74 (x2.5) mit zugehöriger einzelzellbasierter Auswertung in QuPath (rechts). Es kann eine starke GLUT-1 Expression (FITC, grün) in diffusionslimitierten Arealen, welche einen großen Abstand zu CD73⁺ (Cy5, rot) Tumormikrogefäßen aufweisen, gezeigt werden. In dieser Melanomprobe konnte nahezu keine Expression von CD73 auf Melanomzellen beobachtet werden. CD8⁺ CTL sind vorwiegend in stromalen und perivaskulären Bereichen zu finden (Cy3, gelb). Es wird eine spärliche Infiltration des Tumors durch CD8⁺ Zellen gefunden. Auf Basis der einzelzellbasierten Segmentierung wurde der links gezeigte Ausschnitt in QuPath ausgewertet. Es werden folgende klassifizierte Zellen gezeigt: Stroma:CD73⁺ (grün), Stroma:CD73⁻ (orange), CD8⁺ CTL (weiß), Tumorzellen mit starker GLUT-1 Expression (rot), Tumorzellen mit schwacher GLUT-1 Expression (blau)

Dieses heterogene Expressionsmuster von GLUT-1 wurde insbesondere bei extrazerebralen Manifestationen des Melanoms festgestellt, und konnte dort bis auf wenige Ausnahmen ubiquitär beobachtet werden (siehe **Abbildung 33**). Aber auch in zerebralen Metastasen des malignen Melanoms konnte eine heterogene GLUT-1 Expression, entsprechend eines hypoxischen Gradienten um zerebrale Gefäße, beobachtet werden (siehe **Abbildung 34**). Zwar zeigte sich dort insgesamt eine etwas stärkere GLUT-1 Expression, diese könnte allerdings auf die physiologische vermehrte GLUT-1

Expression zur Deckung des zerebralen Energiebedarfs zurückgeführt werden, sodass dort die Heterogenität der GLUT-1 Expression in prinzipiell in gleicher Weise gegeben ist. Andere mögliche Gründe einer unspezifischen Expression von GLUT-1 sind beispielsweise aktive Glukose-abhängige Signalwege oder eine genetisch determinierte Expression, die in manchen Geweben beobachtet wird. Insgesamt konnte nach der visuellen Beurteilung der Präparate, GLUT-1 dennoch als ein hinreichend guter Surrogatmarker der Tumorhypoxie befunden werden.

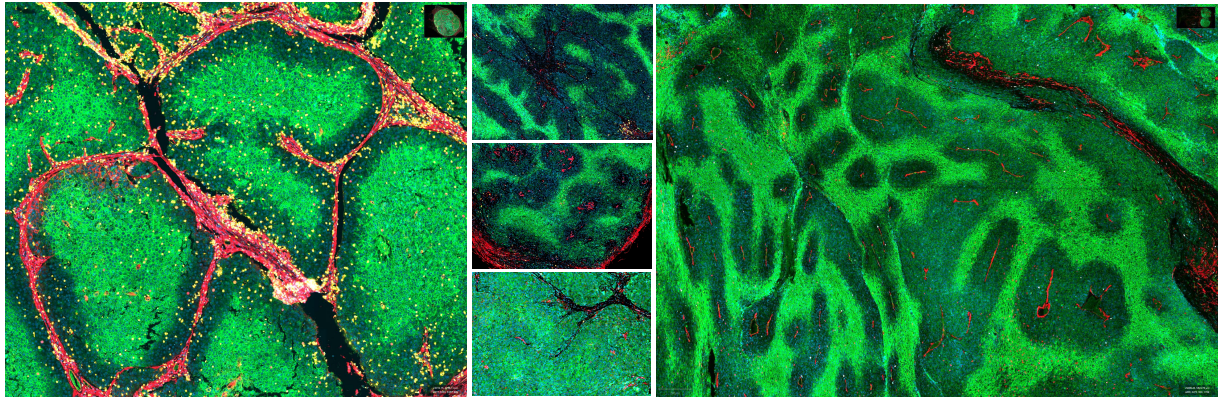


Abbildung 33: IF-Färbungen des malignen Melanoms aus unterschiedlicher extrazerebraler Lokalisation. Im Fokus der Darstellung steht der hier vorhandene Gradient GLUT-1 positiver Zellen (grün) um gefäßreiche CD73 positive Areale (rot). Dabei werden links 4 Präparate unterschiedlicher Lokalisation gezeigt, welche allesamt eine deutliche Heterogenität der GLUT-1 Expression aufweisen. Besonders eindrucksvoll ist die GLUT-1 Expression, entsprechend eines hypoxischen Gradienten um CD73-positive Gefäße, dabei sicherlich in der rechts gezeigten Färbung einer LK-Metastase aus IF-136 VII67, in der sich um die längs geschnittenen Gefäße sogenannte hypoxische „tumor cords“ zeigen. CD8 positive CTL sind in den Präparaten gelb dargestellt.

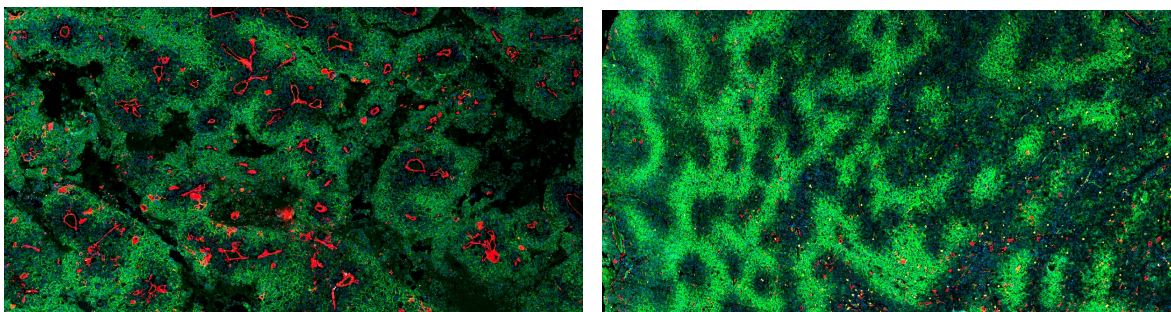


Abbildung 34: Immunfluoreszenzfärbungen zerebraler Metastasen des malignen Melanoms. Gezeigt ist der auch in zerebralen Metastasen vorhandene Gradient GLUT-1 positiver Zellen (grün) um gefäßreiche CD73 positive Areale (rot). Auch wenn sich die GLUT-1 Expression insgesamt als etwas prominenter darstellt, ist die Heterogenität der GLUT-1 Expression auch hier prinzipiell in gleicher Weise gegeben.

Zur statistischen Überprüfung dieser subjektiven Beobachtungen wurden folgend die Ergebnisse der einzelzellbasierten Analyse der Gewebeschnitte zusammengefasst und mittels mikroregionärer spatialer Interaktionsanalysen in MosaicSuite beurteilt. Zur Evaluation der visuellen Befunde auf der Ebene des whole-slide Präparates wurde eine Distanzanalyse in Tableau durchgeführt: Hierbei konnte über alle nicht-ZNS-Präparate ein weitestgehend einheitlicher Befund mit einer Zunahme der GLUT-1 Expression mit steigender Entfernung zu stromalen, CD73⁺ Gefäßen beobachtet werden (siehe **Abbildung 35** bis **Abbildung 37**). Dieser Befund ist konsistent zur pathophysiologischen Annahme eines O₂ Konzentrationsgradienten um stromale Gefäße, sodass GLUT-1 im Folgenden als ein ausreichend guter Marker der Tumorhypoxie befunden und Zellen mit einer starken GLUT-1 Expression als hypoxische Zellen bezeichnet wurden.

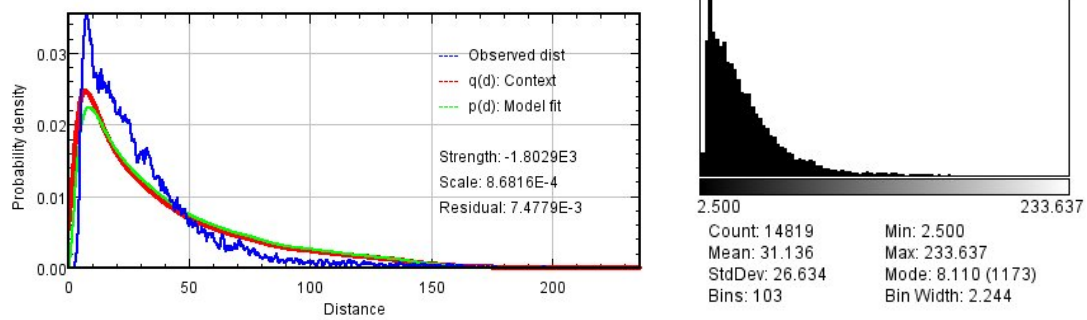


Abbildung 35: Spatiale Analyse der Zellinteraktion von stromalen CD73⁺ Zellen mit normoxischen Tumorzellen in MosaicSuite. Es zeigt sich, dass in dem Ausschnitt aus IF-108 V74 normoxische Tumorzellen und stromale Zellen eine schwache negative Korrelation i.S. einer Abstoßung aufweisen. Diese ist durch die Überschneidung der Context-Kurve und des Model fit aber als nicht signifikant zu bezeichnen. Normoxische Tumorzellen befinden sich im Mittel in einem Distanzbereich von 31.1 μm zu stromalen Zellen

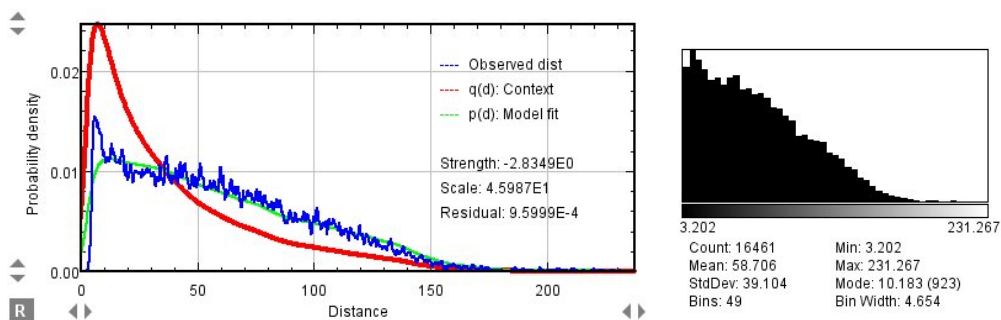


Abbildung 36: Spatiale Analyse der Zellinteraktion von stromalen CD73⁺ Zellen mit hypoxischen Tumorzellen in MosaicSuite. Im Gegensatz zu normoxischen Tumorzellen befinden sich hypoxische Tumorzellen in dem Tumorausschnitt aus IF-108 V74 im Mittel in etwa 58 μm Entfernung zu stromalen Zellen, was sich gleichfalls in einer stärker negativen und deutlich signifikanten Korrelation niederschlägt. Dieser Befund, der sich über zahlreiche Präparate hinweg bestätigt, zeigt, dass der Abstand zu CD73⁺ Gefäßen mit zunehmender GLUT-1 Expression zunimmt, was die Annahme eines durch GLUT-1 dargestellten Gradienten um stromale Gefäße hinreichend gut belegt.

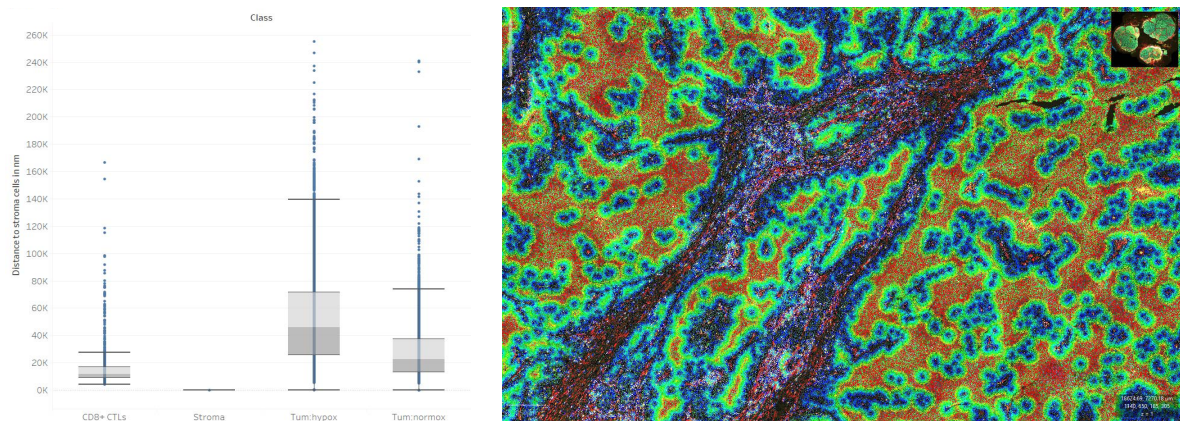


Abbildung 37: Boxplots zur Distanzanalyse für stromale CD73⁺ Gefäße in Tableau (links), sowie die zugehörige Heatmap für den analysierten Tumorausschnitt aus QuPath (rechts). Die Boxplots spiegeln die Distanzverteilung der jeweiligen Zellpopulationen zu CD73⁺ Stromazellen und somit zu den Gefäßen für das gesamte whole-slide Präparat von IF-108 V74 wider. Dabei wird deutlich, dass mit zunehmendem Hypoxiegrad der Abstand zu den Gefäßen wächst. So zeigen hypoxische Tumorzellen die größten Distanzen (ca. 48 μm) zu Stromazellen, während normoxische Tumorzellen geringere Distanzen zu den Gefäßen aufweisen (ca. 22 μm) und CD8⁺ CTL das oben bereits beschriebene Clustering mit Stromazellen, i.S. einer sehr geringen Distanz zu Gefäßen, aufweisen (ca. 10 μm). Diese statistischen Erkenntnisse werden mithilfe der rechts gezeigten Heatmap, welche eine Distanztransformation zu CD73⁺ Stromazellen aus dem in Abbildung 32 gezeigten IF-Präparat optisch darstellt, weiter verdeutlicht. So befinden sich insbesondere hypoxische Tumorzellareale im größten Abstand zu den CD73⁺ Stromazellen, was in jener Heatmap als roter Bereich dargestellt ist.

Bei der Suche nach endogenen Hypoxiemarkern wurde neben GLUT-1 auch CA IX, die sich bereits in zahlreichen Tumoren als hinreichend guter Hypoxiemarker bewährt hatte (196, 197) und Na⁺ K⁺ ATPase gefärbt und auf deren Tauglichkeit zur Abbildung der Tumorphoxie hin analysiert: Es konnte allerdings beobachtet werden, dass CA-IX ein äußerst unspezifisches Färbemuster mit einer vorwiegend nukleären Expression aufweist (siehe **Abbildung 87**). Dieses biologisch nicht plausible Färberesultat, ist im Wesentlichen auf die fehlende oder minimalste Expression des Markers in dem Gewebe zurückzuführen, was sodann durch die hochverstärkte Immunhistochemie zur Darstellung des beobachteten Artefakts führt. Dies bestätigt die Vermutung, dass CA-IX im malignen Melanom keine ausreichend starke Expression aufweist, als dass eine mögliche Aktivität detektiert werden kann, zumal Karboanhydrasen physiologischerweise ausschließlich membrangebunden exprimiert werden. Das fehlende Vorkommen von CA IX im Melanom bedeutet aber keinesfalls, dass dieses Enzym bei dieser Tumorentität keine Rolle spielt, sondern lässt vielmehr vermuten, dass hier andere Isoformen der Karboanhydrasen, wie CA XIV (siehe www.proteinatlas.org) aufgrund der neuroektodermalen Abstammung der Melanozyten, eine bedeutendere Rolle spielen könnten (163).

Die visuelle Analyse der IF-Färbungen mit Na⁺K⁺ATPase zeigte verglichen mit GLUT-1 ebenso nur wenig eindruckliche Resultate hinsichtlich der Abbildung des intratumoralen Oxygenierungsstatus (siehe **Abbildung 38**). So konnte eine weitestgehend ubiquitäre intratumorale Expression ohne eine vermehrte perivaskuläre Expression beobachtet werden, was der pathophysiologischen Annahme einer vermehrten Expression von Na⁺K⁺ATPase unter Normoxie entgegensteht. Aufgrund dieser Befunde, die sich in den spatialen Analyseergebnissen zudem als nicht signifikant herausgestellt hatten, wurde Na⁺ K⁺ ATPase als nicht hinreichend guter inverser Hypoxiemarker im Melanom befunden, zumal sich keine zuverlässige und mit der Genauigkeit von GLUT-1 vergleichbare Abbildung des Gewebe-Oxygenierungsstatus zeigte. Demgegenüber konnte eine verstärkte Expression auf Melanomzellen beobachtet werden, weshalb in Erwägung gezogen wurde, ob Na⁺K⁺ATPase im malignen Melanom die Detektion von Tumorzellarealen wesentlich erleichtern könnte. Inwiefern die Hochregulation der Na⁺K⁺ ATPase auf Melanomzellen allerdings auf einen vermehrten Tumor-Metabolismus zurückgeführt werden kann oder als ein intrinsisches Merkmal von Melanomzellen anzusehen ist, kann auf der Basis der hier durchgeführten Experimente nicht beantwortet werden.

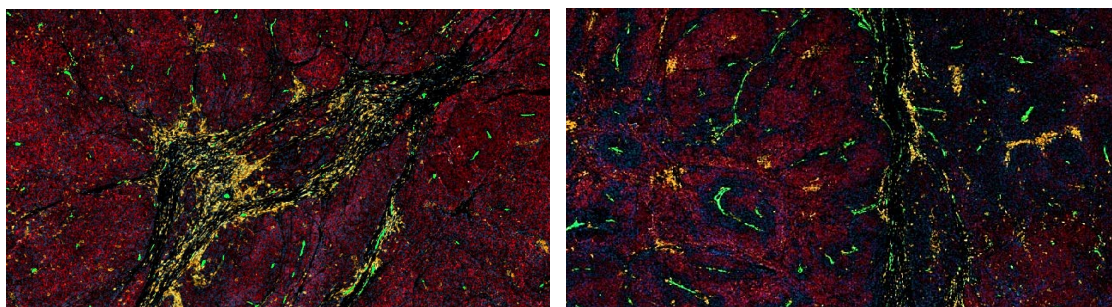


Abbildung 38: Ausschnitte (x2.5) aus multiplex-IF-Färbungen von Melanompräparaten für die Marker CD34 (grün), Na⁺K⁺ATPase (rot) und CD45⁺ Leukozyten (gelb). In den hier gezeigten Ausschnitten ist im Gegensatz zur Expression von GLUT-1 kein perivaskulärer Gradient für die Na⁺K⁺ATPase erkennbar. Dies steht der pathophysiologischen Annahme einer vermehrten perivaskulären Expression entgegen. Es kann allerdings, neben dem bekannten Clustering von Immunzellen (hier: CD45⁺) in stromalen und perivaskulären Bereichen, ebenfalls eine verstärkte Na⁺K⁺ATPase Expression auf Tumorzellen beobachtet werden.

1.2. CD73 als möglicher Surrogatmarker des Adenosinstoffwechsels im Melanom

In dem untersuchten Patientenkollektiv stellte sich bei der visuellen Analyse heraus, dass die CD73-Expression entgegen bisheriger Beobachtungen aus in-vitro Experimenten, vornehmlich im Stroma lokalisiert war. Demgegenüber zeigte sich im Tumor nur eine spärliche CD73-Expression. In einigen wenigen Tumoren konnte jedoch eine starke intratumorale Expression gezeigt werden. Diese intratumorale CD73-Expression stellte sich interessanterweise oft als überlappend mit der Expression des Hypoxiemarkers GLUT-1 heraus (siehe **Abbildung 39**, sowie **Abbildung 88** und **Abbildung 89**), was hinweisend auf eine mögliche Relevanz des pathophysiologischen Mechanismus einer Hochregulation von CD73 unter Hypoxie durch die Bindung von HIF-1 α an NT5E (Ekto-5'-Nukleotidase) im malignen Melanom sein könnte. Aufgrund der geringen Fallzahl der hier untersuchten Patienten sollte allerdings explizit nur von einem Trend gesprochen werden, zumal der Befund einer sich intratumoral überschneidenden CD73-Expression unter GLUT-1 nur in einem Teil aller untersuchten Tumorpräparate (23.3 %) beobachtet werden konnte (siehe **Tabelle 21**).

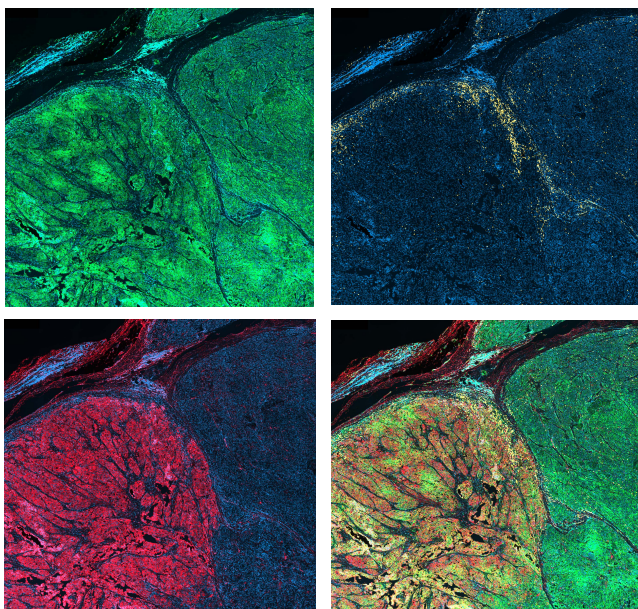


Abbildung 39: Immunfluoreszenzfärbungen aus IF-109 V77 zur sich überschneidenden intratumoralen Expression der Marker CD73 und GLUT-1: Gezeigt sind die Expressionsmuster von GLUT-1 (grün, links oben), CD8 (gelb, rechts oben), CD73 (rot, links unten) und die komplette 4-Kanal-IF-Färbung (rechts unten). Es kann eine starke GLUT-1 Expression in den Tumorzellaggregaten beobachtet werden, wobei das Muster der GLUT-1 Färbung gleichzeitig die typische heterogene Anfärbung mit einer Zonierung um stromale Gefäße aufweist. Die CD73 Expression beschränkt sich in diesem Präparat aber keinesfalls ausschließlich auf das Stroma, sondern zeigt vielmehr auch eine starke Expression in einem Tumorzellaggregat am linken Rand des gezeigten Ausschnitts. Auffällig ist weiterhin, dass sich die im Stroma befindlichen CD8⁺ CTL um jenes Tumorzellaggregat herum anordnen, es aber nur zu einer geringen Infiltration in jenen Tumor-Bereich kommt. Demgegenüber kann visuell eine etwas stärkere Infiltration CD8⁺ CTL in das benachbarte hypoxische, CD73 negative Tumorgewebe beobachtet werden. Es wurde somit vermutet, dass es hier zu einer hypoxischen und Adenosin-vermittelten Inhibition der CD8⁺ Immunzellen gekommen sein könnte.

Bei der visuellen Analyse der Untersuchungsserie zeigt sich insgesamt eine große Variabilität der intratumoralen CD73 Expression, die von einem nahezu vollständigen Fehlen (siehe **Abbildung 32** mit einem relativen Anteil CD73⁺ Melanomzellen von ca. 3 %), über eine schwache Expression (mit einem relativen Anteil CD73⁺ Melanomzellen von ca. 15 %), bis hin zu einer massiven Expression auf Melanomzellen (siehe **Abbildung 89** mit einem relativen CD73⁺ Melanomzellanteil von 53 %) reicht.

Nicht zuletzt diese Beobachtungen haben schließlich zu der Annahme geführt, dass die intratumorale Expression von CD73 keinesfalls einen ausreichend stabilen Parameter zur Abbildung des extrazellulären Adenosinmetabolismus darstellt, sondern vielmehr durch weitere Markerenzyme des Adenosinstoffwechsels wie CD39 oder ENT-1 ergänzt werden sollte, um ein vollständiges Bild der ADO-Konzentration im Tumor zeichnen zu können.

Nichtsdestotrotz ist der Befund einer intratumoral überlappenden Expression von CD73 und GLUT-1 insofern erwähnenswert, weil in den beschriebenen Fällen eine weitestgehende Evasion von CD8⁺ CTL aus jenen Tumorbereichen gezeigt wurde (siehe **Abbildung 39**) – ein Zusammenhang, der mittels spatialer Interaktionsanalysen auf mikroregionärer Ebene später detailliert beschrieben werden soll.

Demgegenüber konnte beobachtet werden, dass CD73 eine starke und über alle untersuchten Präparate hinweg vorhandene Expression auf Endothelzellen von Blutgefäßen aufweist, womit CD73 einen potentiell guten Marker zur Darstellung von Blutgefäßen im malignen Melanom darstellt. Dieser bislang noch nicht vorbeschriebene Befund sollte sodann durch spatiale Analysen der Zellinteraktion zwischen stromalen CD73⁺ Zellen und CD8⁺ CTL überprüft werden, zumal sich in der visuellen Analyse bereits ein deutliches perivaskuläres Clustering CD8⁺ CTL – die sich physiologischerweise insbesondere in der Nähe von Blutgefäßen aufhalten, um von dort in variablem Ausmaß in den Tumor zu infiltrieren oder weiter im Gefäßsystem zu zirkulieren – gezeigt hatte. In der spatialen Analyse konnte eine starke Interaktion zwischen den mutmaßlichen Blutgefäßen, d.h. den CD73⁺ Stroma-Zellen und CD8⁺ CTL (siehe **Abbildung 40**) nachgewiesen werden, was die Hypothese einer gefäßgebundenen Expression von CD73 im malignen Melanom hinreichend bestätigte. Auch konnte im direkten Vergleich mit den ebenfalls durchgeführten Färbungen für CD34 (siehe **Abbildung 90**), einen bereits in Studien zu Kopf-Hals und Uterustumoren (197) etablierten, stabilen Blutgefäßmarker, ein ähnliches endothelial gebundenes Fluoreszenzmuster beobachtet werden, was die Annahme einer gefäßgebundenen-Expression von CD73 weiter unterstreicht. Da zudem in einigen Präparaten eine starke Expression von CD34 auf Melanomzellen beobachtet werden konnte, wurde für das maligne Melanom CD73 als vermeintlich weniger störanfälliger Marker zur Abbildung vaskulärer Strukturen befunden.

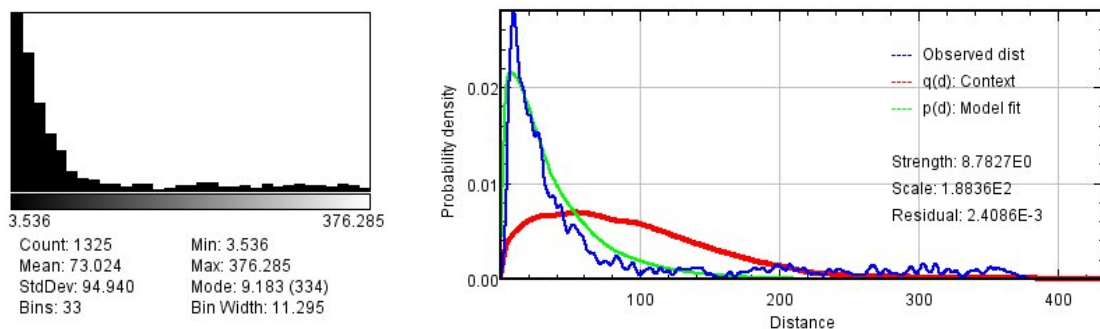


Abbildung 40: Darstellung der Ergebnisse aus der spatialen Analyse zur Zellinteraktion von CD8⁺ CTL und CD73⁺ Zellen in MosaicSuite. Es kann eine deutlich positive und signifikante Korrelation zwischen beiden Zellpopulationen (Kurvendiagramm rechts) mit einer geringen medianen Distanz zwischen CD8⁺ CTL und CD73⁺ Zellen i.S. eines Clusterings beobachtet werden (Histogramm links). Da CD8⁺ CTL im Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats ein stromales und perivaskuläres Clustering aufweisen, unterstreicht dieser Befund die Beobachtung, dass CD73 eine vornehmlich gefäßgebundene Expression im malignen Melanom aufweist.

1.3. Darstellung der anti-Tumor Immunantwort durch CD8 positive Lymphozyten

Im Rahmen der visuellen Analyse der Präparate wurde insbesondere das Verteilungsmuster CD8⁺ CTL innerhalb des Präparates, als auch deren Interaktion mit den anderen Zelltypen im TME näher unter die Lupe genommen. Hierbei konnte beobachtet werden, dass sich CD8⁺ CTL vornehmlich in Gefäßnähe aufhalten, um sodann in jeweils unterschiedlichem Ausmaß in den Tumor zu infiltrieren. Anhand des Ausmaßes und des Musters der Infiltration CD8⁺ CTL in den Tumor konnte jedes Präparat zu einem der drei distinkten Phänotypen der Tumorummunität zugeordnet werden:

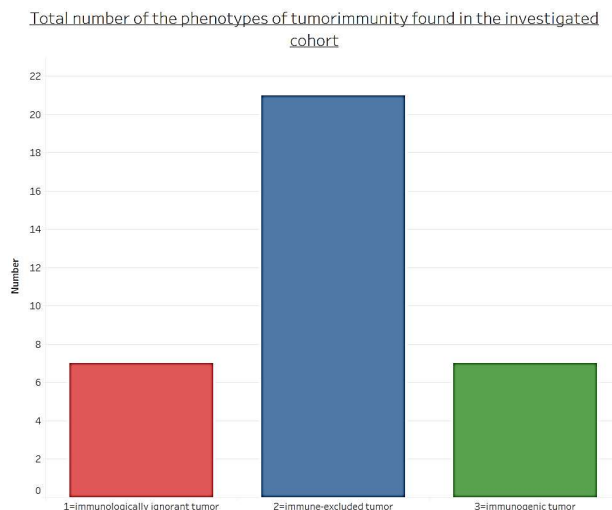


Abbildung 41: Balkendiagramm zur Gesamtzahl der im untersuchten Patientenkollektiv festgestellten Phänotypen der Tumorummunität: Der Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats kann mit (n=21) in der Mehrzahl der Tumorpräparate festgestellt werden, wohingegen die Phänotypen des immunogenen Tumors und des immunologisch anergen Tumors mit jeweils 20.0 % (n=7) im untersuchten Patientenkollektiv wesentlich seltener beobachtet werden konnten.

- (1) Der Großteil der Präparate (ca. 60 %, siehe **Abbildung 41**) zeigte ein Infiltrationsmuster vom Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats (IET), in dem zwar eine relative große Anzahl CD8⁺ CTL gefunden werden konnte. CD8⁺ CTL befanden sich vornehmlich in stromalen und perivaskulären Arealen, infiltrierten den Tumor selbst aber nur sehr spärlich (siehe **Abbildung 42**). Auffällig war bei diesem Infiltrationsmuster ferner, dass die CD8⁺ CTL gerade diejenigen Tumorareale mit einer starken GLUT-1 Expression größtenteils vermieden und damit eine abnehmende CD8⁺-Infiltration mit zunehmendem Grad der Tumorphoxie i.S. einer hypoxischen Inhibition, beobachtet werden konnte.
- (2) In einem kleineren Teil der Tumorpräparate (20.0 %) wiederum fanden sich kaum CD8⁺ CTL im gesamten whole slide Tumor. Die wenigen dort vorhandenen Immunzellen wurden zudem weitestgehend im Stroma detektiert und zeigten im Tumor keine erkennbare Bevorzugung distinkter Bereiche. Gleichzeitig konnte in jenen Präparaten auch ein größerer Anteil hypoxischer Tumorzellen insgesamt festgestellt werden. Dieses Infiltrationsmuster kann eindeutig dem immunologisch anergen Tumor bzw. dem Phänotyp der „immunologischen Wüste“ (IIT) zugeordnet werden, da sich hier eine äußerst geringe Infiltrationsdichte CD8⁺ CTL mit einer weitestgehend fehlenden Infiltration in den Tumor beobachten lässt.

(3) Als dritter Phänotyp konnte der sogenannte immunogene Tumor bzw. der Phänotyp des inflammatorischen Tumors (IT) abgegrenzt werden, der als zentrales Charakteristikum eine ubiquitäre starke Infiltration $CD8^+$ CTL in den Tumor, i.S. einer vorbestehenden Immunität, zeigt. Die Tumor-infiltrierenden Lymphozyten verteilen sich hierbei relativ gleichmäßig über den gesamten Tumor und zeigen somit weder eine signifikante Vermeidung hypoxischer und/oder $CD73^+$ Tumorzellareale, noch eine Bevorzugung perivaskulärer bzw. stromaler Bereiche.

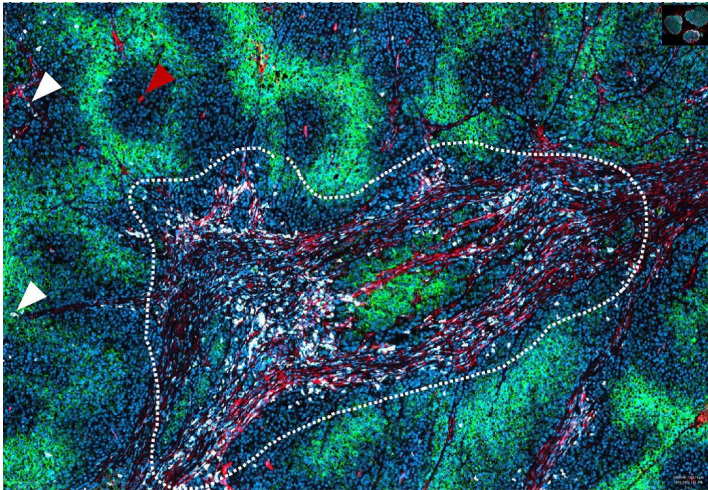


Abbildung 42: Ausschnittsvergrößerung (6.7x) eines Areals innerhalb einer Lymphknotenmetastase, welches die dichte Infiltration $CD8^+$ CTL zeigt. Im Zentrum dieses Ausschnitts zeigt sich das mit weiß eingegrenzte Tumorstroma, das eine dichte Infiltration zytotoxischer Lymphozyten (in weiß) beschreibt. Aufgrund der starken Ähnlichkeit auf morphologischer Ebene kann ein Großteil des $CD73$ Signals in diesem Ausschnitt Blutgefäßen zugeordnet werden. Die extrastromale Infiltration $CD8$ positiver T-Zellen ist in diesem Gewebeschnitt äußerst spärlich vorhanden: Die wenigen außerhalb des Stromas befindlichen T-Zellen wurden hier mit weißen Pfeilen markiert und zeigen sich auch dort im Wesentlichen gefäßgebunden (roter Pfeil).

Weiterhin stellte sich in der visuellen Analyse aller Tumorpräparate im Hinblick auf das Vorkommen $CD8^+$ CTL heraus, dass zerebrale Metastasen des malignen Melanoms insgesamt eine sehr viel geringere Infiltrationsdichte $CD8^+$ CTL im Vergleich zu Metastasen peripherer Lokalisation aufwiesen (siehe **Abbildung 43** links). In der vergleichenden Analyse für das Ausmaß der Infiltrationsdichte von $CD8^+$ CTL zwischen diesen beiden Patientengruppen, welche anhand der Lokalisation der Tumorpräparate dichotomisiert wurden, bestätigte sich dieser visuelle Befund sodann auch statistisch (Mittelwert des Anteils $CD8^+$ CTL 7,12 % vs. 1,17 %; Median: 5,00 % vs. 1,00 %, siehe auch **Abbildung 43** rechts mit den quantitativen Daten aus **Tabelle 18**). Da es sich bei den Korrelationsanalysen um den Vergleich einer nominalskalierten (Tumorlokalisierung: ZNS- vs. nicht-ZNS-Metastasen) mit einer intervallskalierten Variable (Anteil der untersuchten Zellpopulationen in den jeweiligen Tumorpräparaten) handelte, wurde hier der Eta-Korrelationskoeffizient berechnet und für die Signifikanztestung auf eine univariate Varianzanalyse zurückgegriffen. In den durchgeführten Korrelationsanalysen beschränkte sich der starke und signifikante Einfluss der Tumorlokalisierung auf den Anteil $CD8^+$ CTL (Eta-Korrelationskoeffizient r : 0,712, bei einer Signifikanz von $p=0,041$, vergleiche: Korrelationskoeffizient nach Pearson: 0,329; $p=0,041$) und konnte nicht für die anderen erfassten Biomarker, allen voran den Anteil hypoxischer Tumorzellen oder $CD73$ positiver Tumorzellen, beobachtet werden.

Nichtsdestotrotz konnte auch in den Hirnmetastasen der Phänotyp der Tumormunität anhand des Infiltrationsmusters CD8⁺ Zellen ebenso eindeutig zugeordnet werden, wie in Metastasen peripherer Lokalisation, auch wenn das jeweilige Infiltrat in den Tumor wesentlich geringer ausgeprägt war als bei nicht-ZNS-Metastasen.

Aufgrund des Befundes einer Abhängigkeit der quantitativen Anzahl CD8⁺ CTL von der Tumorlokalisation, wurde für die weitere Auswertung in SPSS, eine Unterscheidung in drei verschiedene Patientengruppen (siehe **Tabelle 10**, **Tabelle 19** und **Tabelle 20**) je nach Tumorlokalisation vorgenommen, um mögliche Zusammenhänge der klinischen Daten mit dem Ausmaß der CD8 Infiltration nicht zu übersehen.

Daneben zeigte sich im Rahmen der Einzelfärbungen aber auch, dass neben der Bestimmung der Infiltrationsdichte CD8⁺ CTL, welche sicherlich die Schlüsselrolle bei der Exekution der anti-Tumor Immunantwort einnehmen, die Erfassung weiterer Immunzellpopulationen und deren Aktivierungsgrad zu einer umfassenden Abbildung der Immunantwort beitragen können. So haben Färbungen mit CD45 (siehe **Abbildung 91**), einem Pan-Leukozyten-Marker, aufzeigen können, dass neben CD8⁺ CTL zahlreiche weitere Zellen (z.B. auch CD56⁺ NK-Zellen) an der anti-Tumor Immunantwort beteiligt sind. Für ein umfassendes Verständnis der Tumormunologie gilt es also nicht zuletzt deren Rolle i.S. eines Immune-Profilings weiter zu entschlüsseln sowie deren Aktivitätszustand zu erfassen, da beispielsweise Färbungen mit Granzym B bereits vermuten ließen, dass sich keinesfalls alle intratumoralen Lymphozyten in einem Zustand der Zytotoxizität befinden, sondern vielmehr durch den Einfluss inhibitorischer Immunzellpopulationen (z.B. T_{reg}) in einen Zustand der Anergie fallen können (siehe **Abbildung 92**).

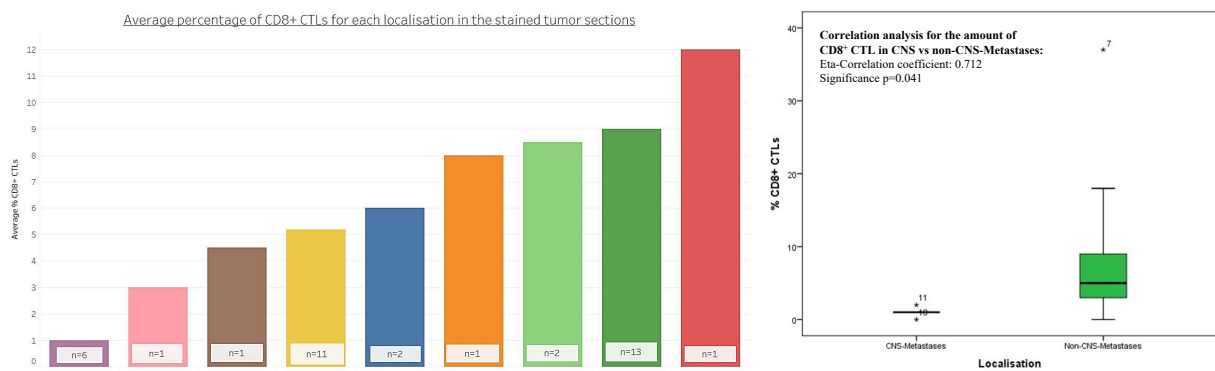


Abbildung 43: Balkendiagramm zum Anteil der mittleren Immunzellinfiltration in Abhängigkeit der jeweiligen Tumorlokalisation (links), sowie vergleichende Analyse anhand zweier Boxplots zur CD8 Infiltration in Melanompräparaten aus ZNS vs. non-ZNS-Lokalisation mit zugehöriger Korrelationsanalyse (rechts). Es kann gezeigt werden, dass der Anteil der Infiltration von CD8⁺ CTL in Tumorpräparaten aus nicht-ZNS-Lokalisationen wesentlich höher ist, als in Melanom-Metastasen aus dem ZNS (n=6). Eine besonders starke Infiltrationsdichte CD8⁺ CTL kann demnach im Myokard (n=1), Lymphknoten (n=13), Ohr (n=1) und dem Gastrointestinaltrakt (n=2) gefunden werden. Der in dem rechten Diagramm gezeigte direkte Vergleich zwischen dem Anteil der CD8⁺ Immunzellinfiltration in nicht-ZNS-Metastasen des malignen Melanoms und Hirnmetastasen des malignen Melanoms legt hierbei einen statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Infiltration CD8⁺ CTL in nicht-ZNS-Metastasen und ZNS-Metastasen dar (mittlerer CD8⁺ Anteil =7.1 % vs. 1.2 %). Dieser starke Zusammenhang ist dabei potentiell auf das immunologische Privileg des ZNS zurückzuführen

2. Nachweis Hypoxie-vermittelter Mechanismen der Immunsuppression im malignen Melanom mittels spatialer Interaktionsanalysen

Nachdem die in der visuellen Analyse gemachten Beobachtungen eingehend beschrieben wurden, soll nun erläutert werden, inwiefern es durch die Tumorhypoxie bzw. durch die intratumorale ADO-Akkumulation infolge einer vermehrten CD73 Expression zur Evasion der Immunzellen innerhalb des TME kommt. Hierzu werden sowohl die mikroregionäre spatiale Analyse zur Zellinteraktion in MosaicSuite, wie auch die aus der Distanztransformation generierten quantitativen Daten zu den Distanzen CD8⁺ CTL, welche in Tableau visualisiert wurden, eingesetzt.

2.1. Hypoxische Inhibition CD8 positiver Immunzellen

Bei der visuellen Analyse der Färbungen zeigte sich eindeutig, dass die CD8⁺ CTL im Melanom im Wesentlichen gefäßgebunden auftreten und in Bereichen starker GLUT-1 Expression eine schwächere Infiltration zeigen, was die These einer hypoxischen Inhibition von CD8⁺ T-Zellen zumindest wahrscheinlich erscheinen lässt (siehe **Abbildung 42**). Zur Objektivierung und statistischen Darstellung der gemachten Beobachtungen wurde eine spatiale Interaktionsanalyse der Tumorpräparate auf mikroregionärer Ebene in MosaicSuite, sowie eine whole-slide Distanzanalyse in Tableau 2018.3 vorgenommen. Hierbei ergaben sich für die drei unterschiedlichen Phänotypen der Tumorimmunität jeweils charakteristische Resultate:

So konnte die hypoxische Inhibition der CD8⁺ CTL am deutlichsten in Präparaten vom Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats beobachtet werden. Hier zeigten die Resultate der Distanzanalyse in der überwiegenden Mehrzahl der Tumorpräparate das charakteristische Bild einer mit zunehmendem Ausmaß der intratumoralen Hypoxie wachsenden Entfernung der betrachteten Zellpopulation zu CD8⁺ CTL. In der hier beispielhaft aufgeführten, aber als repräsentativ für die Tumoren vom Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats anzusehenden Distanzanalyse kann der Nachweis erbracht werden, dass stromale Zellen die geringsten (25-35µm) und hypoxische Tumorzellen die größten Distanzen zu CD8⁺ CTL (100-110 µm) aufweisen, wohingegen normoxische Tumorzellen eine Position zwischen den beiden Polen einnehmen (70-100µm) (siehe **Abbildung 44**). Dieser Befund bestätigte sich in der mikroregionären Interaktionsanalyse in MosaicSuite: So wurde für die Interaktion stromaler CD73⁺ Zellen mit CD8⁺ CTL eine signifikante, positive Korrelation bei gleichzeitig geringen medianen Distanzen (Median: 73µm) festgestellt, wohingegen für die Interaktion der CTL mit normoxischen (Median: 90µm) und hypoxischen Tumorzellen (Median: 117µm) signifikant negative Korrelationen, bei steigenden Distanzen mit zunehmendem Ausmaß der intratumoralen Hypoxie gefunden werden konnten (siehe **Abbildung 44**).

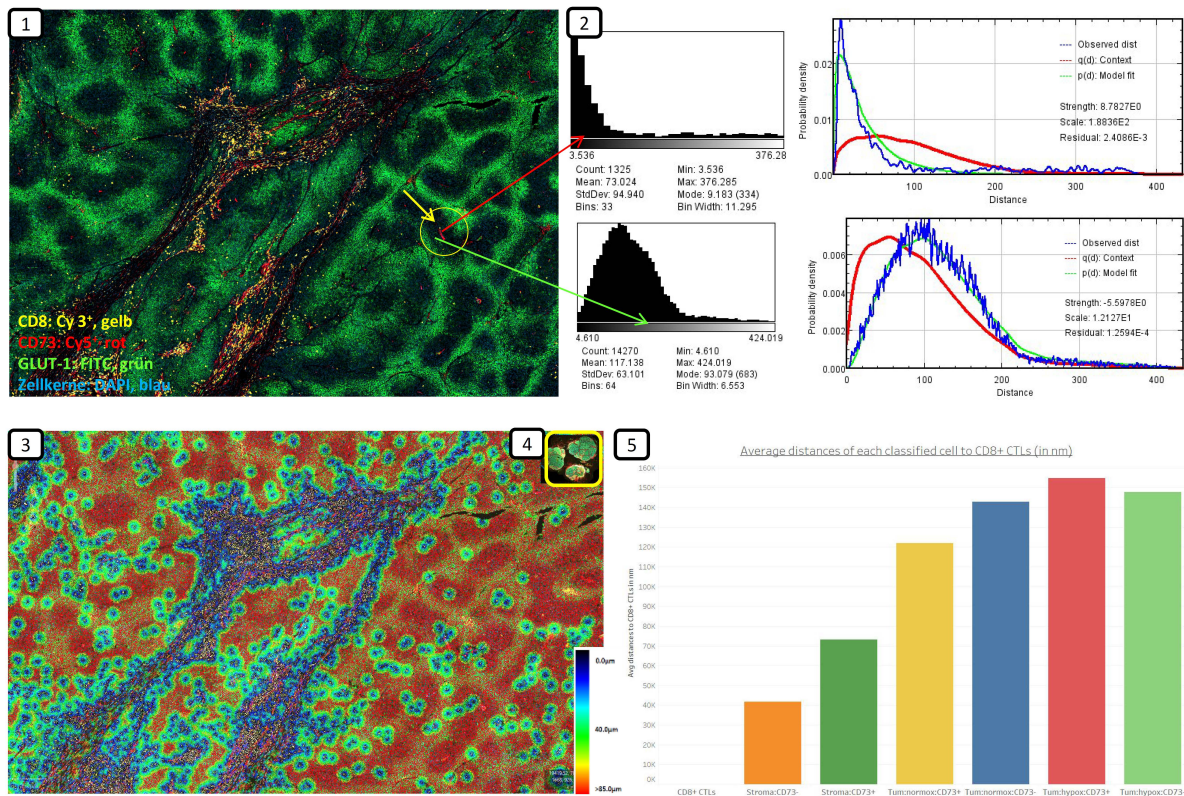


Abbildung 44: Statistische Distanzanalyse für den Tumorphänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats: Analysiert wurde der Tumor IF-108 V74, wobei die Nummerierung der Abbildungen die chronologische Abfolge des methodischen Vorgehens widerspiegelt. Zunächst wurde im Rahmen der mikroregionären spatialen Analyse zur Zellinteraktion der gezeigte Ausschnitt des Tumors ausgewählt und anhand der einzelzellbasierten Segmentierung eine Klassifizierung der Zellen in die Zellklassen Stroma, normoxische Tumorzellen und hypoxische Tumorzellen vorgenommen. Es wurden sodann die spatialen Informationen jeder einzelnen in dem Ausschnitt klassifizierten Zelle in Mosaic extrahiert. Dort wurde die spatiale Interaktionsanalyse (2) durchgeführt, wobei als Referenzpopulation die CD8⁺ CTL (hier ist beispielhaft ein singulärer CD8⁺ Lymphozyt gelb markiert) gewählt wurden. Deren spatiale Lokalisation wurde gegen diejenige der CD73⁺ Stromazellen (roter Pfeil) bzw. gegen diejenige Lokalisation hypoxischer GLUT-1^{stark} exprimierender Tumorzellen (grüner Pfeil) verglichen, sodass Histogramme für die Dichte der CD73⁺ Stromazellen bzw. der hypoxischen Tumorzellen in Abhängigkeit der Distanz zu CD8⁺ CTL erstellt wurden. Gleichzeitig wurde auf der Basis dieser spatialen Analyse eine Reihe quantitativer Daten generiert, wobei sich deutliche Unterschiede in der medianen Distanz CD8⁺ CTL zu CD73⁺ Stromazellen (Median: 73µm) und zu hypoxischen Tumorzellen (Median: 117µm) offenbarten. Auf der Basis dieser Berechnungen konnte ein Kurvenmodell erstellt werden, was im Falle des Distanzvergleichs CD73⁺ Stromazellen vs. CD8⁺ CTL eine signifikante und positive Korrelation i.S. eines Clusterings beschreibt, wohingegen für den Distanzvergleich hypoxischer Tumorzellen vs. CD8⁺ CTL eine signifikant negative Korrelation i.S. einer deutlichen hypoxischen Inhibition gezeigt ist. Gleichzeitig deutet die Rechtsverschiebung der Distanzverteilungskurve auf eine deutlich größere Distanz hypoxischer Zellen zu CTL im Vergleich zu Stromazellen hin. Diese Befunde sind als ein Hinweis für eine wirksame hypoxische Inhibition der CD8⁺ CTL auf mikroregionärer Ebene zu werten. Es folgte mithilfe des Distanzskripts eine Distanztransformation (3), wodurch für das gesamte Präparat die kürzeste Distanz jedes CD8⁺ CTL zur jeweils nächstliegenden Zelle berechnet wurde (4). Die Resultate der whole-slide Analyse konnten in Tableau (5) mittels Balkendiagrammen visualisiert werden, wobei hier die mittlere Distanz jeder klassifizierten Zelle zum nächstem CD8⁺ CTL gezeigt ist. Es wird dabei deutlich, dass mit abnehmendem Oxygenierungsgrad der Zellklasse die Distanz zu den CD8⁺ CTL zunimmt (Stroma: 42-73µm < normoxische Tumorzellen: 120-140 µm < hypoxische Tumorzellen: 148-158µm). Gerade die geringe Distanz CD8⁺ CTL zu stromalen Zellen i.S. eines perivaskulären Clusterings konnte gemeinsam mit der deutlichen hypoxischen Inhibition CD8⁺ CTL als ein zentrales Charakteristikum für Tumoren vom Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats identifiziert werden.

In Tumorpräparaten vom Phänotyp der immunologischen Wüste konnte ebenso eine deutliche Vermeidung hypoxischer Areale durch CD8⁺ CTL beobachtet werden. Allerdings war dieser Befund einer hypoxischen Inhibition nicht so ausgeprägt wie für den Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats.

So konnte in der Distanzanalyse in Tableau zwar eine deutliche Distanzabnahme zu CD8⁺ CTL mit Zunahme des Oxygenierungsgrades beobachtet werden (Distanz von Stromalen Zellen zu CD8⁺ CTL ca. 120µm vs. Entfernungen von 190µm zu hypoxischen Tumorzellen; siehe **Abbildung 45**, *Unterpunkt 5: Balkendiagramm*), die mikroregionären Interaktionsanalysen in Mosaic verdeutlichten aber, dass diese Ergebnisse weniger signifikant sind als noch für den Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats. Hier kann zum einen eine massive Zunahme der medianen Distanzen insgesamt z.T. in Bereichen von 270-300µm zum nächsten CD8⁺ Lymphozyten beobachtet werden (siehe **Abbildung 45**, *Unterpunkt 2: Histogramme*). Zum anderen stellt sich die negative Korrelation zwischen CD8⁺ CTL und hypoxischen GLUT-1^{stark} Tumorzellen als nunmehr wenig signifikant heraus. Als mögliche Gründe für die schwächeren Korrelationen kann zum einen die Beobachtung einer insgesamt geringen Infiltrationsdichte der Immunzellen in dem Tumor, als auch die stark ausgeprägte Hypoxie über den ganzen Tumor angeführt werden. Nichtsdestotrotz kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass auch im Phänotyp der immunologischen Wüste der Befund einer hypoxischen Inhibition von CD8⁺ CTL – wenn auch in weniger prägnanter Form als im Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats – gefunden werden kann, zumal für die Interaktion zwischen hypoxischen Tumorzellen und CD8⁺ CTL eine negative Korrelation für den Großteil der Präparate jenes Tumorphänotyps gezeigt werden konnte. Gleichzeitig offenbaren die statistischen Daten den Befund, einer massiven Zunahme der Distanzen aller Zellpopulationen zu CD8⁺ CTL in Präparaten des immunologisch anergen Tumors (mediane Distanzen zwischen 120-300µm), was die geringe Immunogenität des Tumors, sowie das dort stark wirksame immunsuppressiven Milieu innerhalb des Tumors unterstreicht.

Demgegenüber kann der Befund einer Hypoxie-vermittelten Inhibition CD8⁺ CTL für Tumoren vom Phänotyp des immunogenen Tumors nicht zweifelsfrei bestätigt werden, da hier vielmehr eine starke Infiltration CD8⁺ CTL über den ganzen Tumor ohne ein präferentielles Clustering in distinkten Bereichen gefunden wurde. Auch zeigte sich im Vergleich zu Tumoren vom nicht-inflammatorischen Phänotyp weder visuell noch statistisch eine stark ausgeprägte und global vorhandene Evasion von CD8⁺ CTL aus hypoxischen Tumorarealen: Die Distanzanalyse in Tableau konnte vielmehr zeigen, dass sich die Distanzen der klassifizierten Zellpopulationen zu CD8⁺ CTL nur geringfügig unterscheiden. Gleichzeitig sind die sehr geringen Entfernungen von nur 10-20µm zum nächsten CD8⁺ CTL, welche für alle Zellpopulationen beobachtet wurden, als ein Indiz für die starke vorbestehende Immunität des Tumors zu werten (siehe **Abbildung 46**). Noch deutlicher wird dieser Zusammenhang in der mikroregionären Interaktionsanalyse von MosaicSuite (siehe **Abbildung 46**), in der gezeigt werden kann, dass sowohl für Stromale, normoxische, als auch hypoxische Zellen lediglich eine schwach-negative oder gar positive Korrelation mit CD8⁺ CTL besteht, was die Annahme einer weitestgehend ubiquitären Infiltration von CD8⁺ CTL in den Tumor weiter stützt und zu der Annahme führt, dass die hypoxische Inhibition der CD8⁺ Immunzellen im Phänotyp des immunogenen Tumors nur eingeschränkt wirksam ist. Die Beobachtung einer insgesamt weniger stark ausgeprägten Tumorphypoxie in Präparaten vom Phänotyp des immunogenen Tumors ist hier als möglicher Mediator in Betracht zu ziehen.

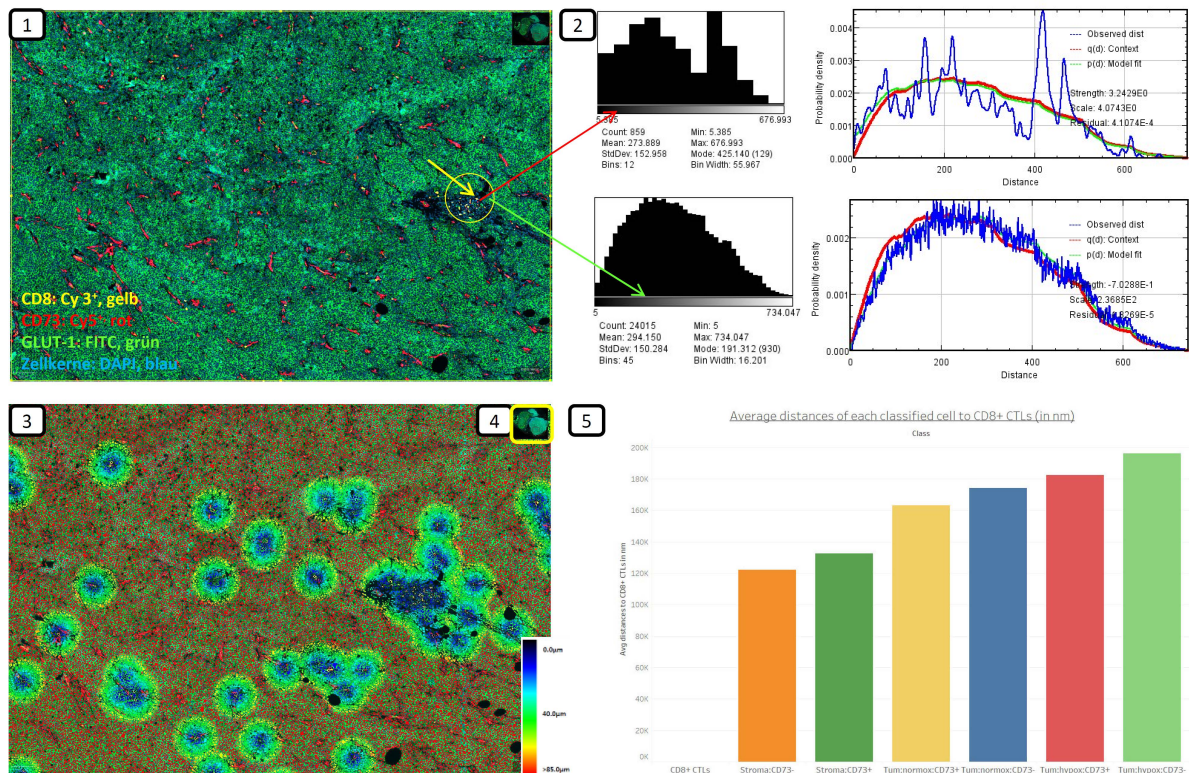


Abbildung 45: Statistische Distanzanalyse für den Tumorphänotyp des immunologisch anergen Tumors (IIT): Analysiert wurde der Tumor IF-109 V81, wobei die Nummerierung der Abbildungen die chronologische Abfolge des methodischen Vorgehens widerspiegelt. In dem Tumorausschnitt kann eine äußerst geringe Dichte $CD8^+$ CTL bei gleichzeitig relativ starker Ausprägung der Tumorphypoxie visuell erfasst werden. Zunächst wurde nun im Rahmen der mikroregionären spatialen Analyse der gezeigte repräsentative Ausschnitt des Tumors ausgewählt und mithilfe der einzelzellbasierten Segmentierung eine Klassifizierung der Zellen in die gegebenen Zellklassen Stroma, normoxische Tumorzellen und hypoxische Tumorzellen vorgenommen. Es wurden sodann die spatialen Informationen jeder einzelnen in dem Ausschnitt klassifizierten Zelle in Mosaic extrahiert. Dort wurde anschließend die Interaktionsanalyse (2) durchgeführt, wobei als Referenzpopulation die $CD8^+$ CTL (hier wurde ein singulärer $CD8^+$ Lymphozyt gelb markiert) gewählt wurden. Deren spatiale Lokalisation wurde schließlich gegen diejenige der $CD73^+$ Stromazellen (roter Pfeil) bzw. gegen diejenige Lokalisation hypoxischer $GLUT-1^{stark}$ exprimierender Tumorzellen (grüner Pfeil) verglichen, sodass Histogramme für die Dichte der $CD73^+$ Stromazellen bzw. der hypoxischen Tumorzellen in Abhängigkeit der Distanz zu $CD8^+$ CTL erstellt wurden. Gleichzeitig wurde auf der Basis dieser spatialen Interaktionsanalyse eine Reihe quantitativer Daten generiert, wobei sich im Vergleich zum Tumorphänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats (IET) für alle Zellpopulationen eine deutliche Zunahme der medianen Distanzen zu $CD8^+$ CTL mit 270-300 μ m offenbarte. Demgegenüber konnte eine größere mediane Distanz hypoxischer Tumorzellen zu $CD8^+$ CTL (mediane Distanz: 295 μ m) im Vergleich zu Stromazellen (273 μ m) gefunden werden. Diese Distanz war aber relativ gesehen weniger prägnant, als noch im Phänotyp des IET. Die geringeren relativen Unterschiede spiegeln sich sodann in dem Kurvenmodell wider, das im Falle des Distanzvergleichs $CD73^+$ Stromazellen vs. $CD8^+$ CTL eine positive Korrelation i.S. eines Clusterings beschreibt. Diese Korrelation ist allerdings als weniger signifikant zu bewerten. Ebenso wurde für den Distanzvergleich hypoxischer Tumorzellen vs. $CD8^+$ CTL eine weniger starke negative Korrelation i.S. einer schwächer wirksamen hypoxischen Inhibition gezeigt. Demnach kann auch für den Phänotyp des immunologisch anergen Tumors eine hypoxische Inhibition der $CD8^+$ CTL auf mikroregionärer Ebene beobachtet werden, welche allerdings weniger stark ausfällt als noch im Phänotyp des IET. Es folgte mithilfe des Distanzskripts eine Distanztransformation (3), deren Resultate als whole-slide Distanzanalyse sodann in Tableau (5) in Form von Balkendiagrammen visualisiert werden konnten. Für den IIT wird deutlich, dass im Vergleich zum IET die mittleren Distanzen der jeweiligen Zellklassen zu $CD8^+$ CTL deutlich zugenommen haben. Es konnte allerdings parallel hierzu eine mit abnehmendem Oxygenierungsgrad der beobachteten Zellpopulationen zunehmende Distanz zu den $CD8^+$ CTL (Stroma: 120-130 μ m < normoxische Tumorzellen: 160-178 μ m < hypoxische Tumorzellen: 182-198 μ m) gezeigt werden. Wie schon für den Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats konnte also in immunologisch anergen Tumoren ebenso eine relative hypoxische Inhibition $CD8^+$ CTL gezeigt werden, auch wenn diese insgesamt als weniger deutlich zu werten ist. Demgegenüber kann aufgrund der großen Distanzen zwischen $CD8^+$ CTL und stromalen Zellen kein deutliches perivaskuläres Clustering der Immunzellen mehr gezeigt werden.

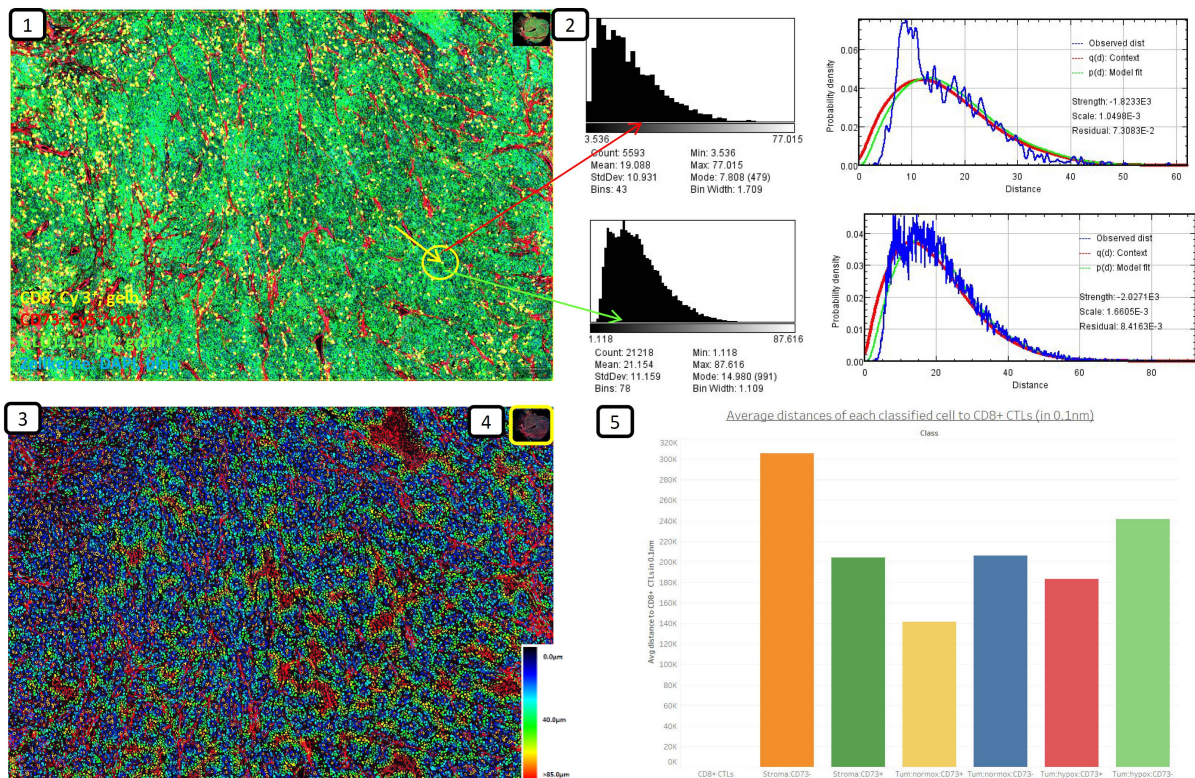


Abbildung 46: Statistische Distanzanalyse für den Tumorphänotyp des immunogenen Tumors (IT): Analysiert wurde der Tumor IF-109 V76. Zunächst wurde im Rahmen der mikroregionären spatialen Analyse der gezeigte repräsentative Ausschnitt des Tumors ausgewählt und mithilfe der einzelzellbasierten Segmentierung eine Klassifizierung der Zellen in die gegebenen Zellklassen vorgenommen. Es wurden sodann die spatialen Informationen jeder einzelnen in dem Ausschnitt klassifizierten Zelle in Mosaic extrahiert. Dort wurde die Interaktionsanalyse (2) durchgeführt, wobei als Referenzpopulation die $CD8^+$ CTL (hier wurde ein singulärer $CD8^+$ Lymphozyt gelb markiert) gewählt wurden. In diesem Präparat kann eine massive CTL-Infiltration in alle Tumorbereiche, als zentrales Charakteristikum jenes Tumorphänotyps, beobachtet werden. Deren spatiale Lokalisation wurde schließlich gegen diejenige der $CD73^+$ Stromazellen (roter Pfeil) bzw. gegen diejenige Lokalisation hypoxischer $GLUT-1^{stark}$ Tumorzellen (grüner Pfeil) verglichen, sodass Histogramme für die Dichte der $CD73^+$ Stromazellen bzw. der hypoxischen Tumorzellen in Abhängigkeit der Distanz zu $CD8^+$ CTL erstellt wurden. Gleichzeitig wurden im Rahmen dieser spatialen Interaktionsanalyse quantitative Daten generiert, wobei sich im Vergleich zum Tumorphänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats (IET) für alle Zellpopulationen deutlich kleinere mediane Distanzen zu $CD8^+$ CTL mit 19-21µm offenbarten. Diese äußerst geringen Abstände zu $CD8^+$ CTL waren dabei ebenso für hypoxische Tumorzellen (mediane Distanz: 21,1µm) zu beobachten, die ähnlich kleine Distanzen aufwiesen wie stromale Zellen (mediane Distanzen: 19,0µm). Diese Beobachtung einer weitestgehend identischen Distanz für stromale Zellen, normoxische Tumorzellen und hypoxische Tumorzellen ist ein signifikanter und bemerkenswerter Unterschied zu den nicht-inflammatorischen Tumoren. In dem Kurvenmodell bestätigt sich sodann, dass hier weder ein echtes Clustering $CD73^+$ Stromazellen mit $CD8^+$ CTL, noch eine statistisch signifikante hypoxische Inhibition $CD8^+$ CTL gefunden werden kann, auch wenn für beide eine schwache negative Korrelation berechnet wurde. Der Phänotyp des immunogenen Tumors zeichnet sich demnach auf mikroregionärer Ebene durch eine schwache hypoxische Inhibition $CD8^+$ CTL, bei gleichzeitig minimalsten Distanzen der $CD8^+$ CTL zu allen klassifizierten Zellpopulationen aus. Die Distanztransformation (3), deren Resultate als whole-slide Distanzanalyse sodann in Tableau (5) in Form von Balkendiagrammen visualisiert werden konnten, zeigte für den immunogenen Tumor sodann, dass sich auch die mittleren Distanzen der $CD8^+$ CTL zu allen beobachteten Zellpopulationen in Bereichen zwischen 14-30µm aufhalten, wobei hier keine Hypoxie-abhängige Zunahme der Distanzen wie im Falle der nicht-inflammatorischen Tumoren beobachtet werden kann. Vielmehr kann lediglich eine zunehmende Distanz $CD8^+$ CTL von normoxischen Tumorzellen (mittlere Distanz: 14-20µm) zu hypoxischen Tumorzellen (mittlere Distanz: 18-24µm) beobachtet werden, weshalb die Wirksamkeit einer – wenn auch schwachen – hypoxischen Inhibition hier dennoch nicht ganz ausgeschlossen werden sollte. Demgegenüber kann im Vergleich zum IET kein ähnlich dominantes Clustering $CD8^+$ CTL in perivaskulären Arealen nachgewiesen werden. Zusammenfassend stellt sich der immunogene Tumor demnach als ein Phänotyp dar, der sich durch äußerst geringe Distanzen aller Zellklassen zu $CD8^+$ CTL, ohne ein präferentielles Immunzellclustering, bei einer gleichzeitig gering wirksamen hypoxischen Inhibition $CD8^+$ CTL, auszeichnet.

Es lassen sich nunmehr zwei abschließende Befunde festhalten: Erstens findet sich ein charakteristischer Befund zur mikroregionären spatialen Zellinteraktion und Distanzverteilung in jedem der drei Phänotypen der Tumormunität. Dieser Befund verdeutlicht, dass die Interaktionen einzelner Zellen im TME wesentlich zur Malignität des Tumorphänotyps beitragen und eine separate Analyse einzelner Tumorauschnitte einen zusätzlichen Informationsgewinn bei der Charakterisierung des Tumormunitätsstatus des Melanoms bietet. Zweitens konnte in der überwiegenden Mehrzahl der Tumorpräparate beobachtet werden, dass die Distanzen der unterschiedlichen Zellpopulationen zu CD8⁺ CTL mit abnehmendem Oxygenierungsgrad der Tumorzellen signifikant zunehmen. Zwar variiert das Muster der Distanzverteilung CD8⁺ CTL zu den anderen Zellpopulationen je nach Tumorphänotyp, wobei die größte Heterogenität sicherlich für den inflammatorischen Phänotyp beobachtet werden konnte, allerdings bleibt der Mechanismus der hypoxischen Inhibition dennoch ein stabil beobachtbares Merkmal in der überwiegenden Mehrzahl der Tumorpräparate.

Dieser auf mikroregionärer Ebene, respektive auf der Ebene des whole-slide Tumorpräparates, erhobene statistische Befund wurde auf globaler Ebene für das gesamte untersuchte Patientenkollektiv mittels Streudiagrammen verdeutlicht und mithilfe von Korrelationsanalysen nach Pearson auf die statistische Signifikanz hin getestet: Hierzu wurde jeweils aus den quantitativen Daten des untersuchten Patientenkollektivs (n=35) der Anteil CD8⁺ CTL im whole-slide Präparat mit dem Ausmaß der dort vorhandenen Tumorphoxie korreliert. Es wurde hierbei der lineare Korrelationskoeffizient nach Pearson verwendet, da beide Variablen einer Intervallskalierung unterliegen und eine annähernde bivariate Normalverteilung der Werte nach dem zentralen Grenzwertsatz, der bei n>30 angewendet werden darf, zeigen.

Auf dieser globalen Ebene zeigte sich für das gesamte Kollektiv (n=35) sowohl im Streudiagramm, als auch in der Korrelationsanalyse (**Abbildung 47**) eine statistisch signifikante (p=0.025) negative Korrelation (linearer Korrelationskoeffizient nach Pearson: -0.378; Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho: -0.422, p=0.012), die verdeutlicht, dass mit zunehmender Ausprägung der Tumorphoxie der Anteil CD8⁺ CTL im Tumor abnimmt. Dieser Zusammenhang blieb auch nach Ausschluss eines in der deskriptiven Analyse erfassten Extremwertes (siehe **Abbildung 48**) bestehen. Noch deutlicher wurde dieser Zusammenhang bei ausschließlicher Betrachtung desjenigen Patientenkollektivs unter Ausschluss der ZNS-Metastasen (p=0.017). Zwar ist die Korrelation auch teilweise begünstigt durch den Vergleich zweier Populationen auf Grundlage von deren relativen Zellzahlen, dennoch verdeutlicht die Korrelationsanalyse hinreichend gut, dass die Tumorphoxie einen bedeutenden und potentiell kausalen Einflussfaktor für die Inhibition einer effektiven antitumoralen Immunantwort in dem untersuchten Patientenkollektiv darstellt.

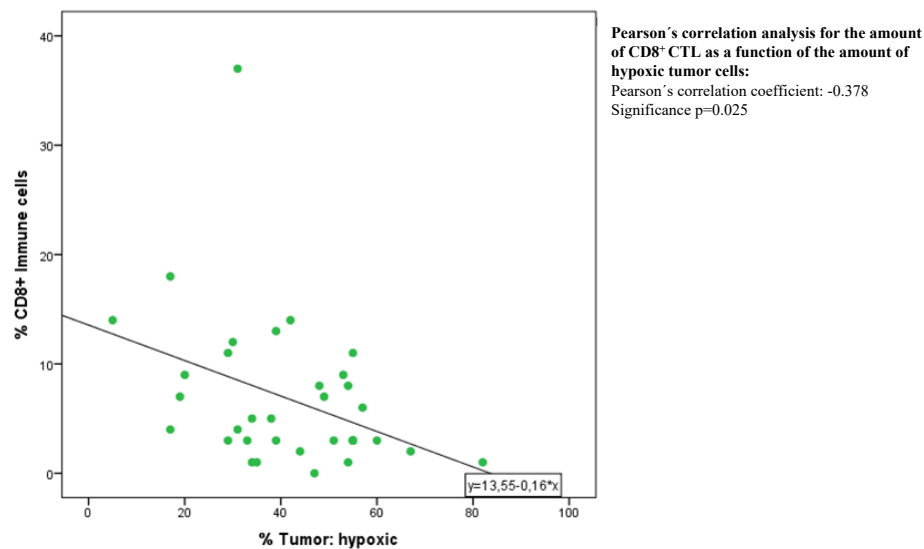


Abbildung 47: Streudiagramm mit zugehöriger Trendkurve zum prozentualen Anteil CD8⁺ CTL in Abhängigkeit des Ausmaßes der Tumorhypoxie über das Gesamtkollektiv (n= 35), sowie eine Darstellung der Resultate aus der linearen Korrelationsanalyse nach Pearson: Die einzelnen Punkte geben für jeden der n=35 Patienten den prozentualen Anteil CD8⁺ CTL und hypoxischer Tumorzellen im whole-slide Präparat an. Die sodann erstellte Korrelationsgerade, die durch die mathematische Funktion $y=13.55-0.16*x$ beschrieben wird, verdeutlicht die negative Korrelation des Anteils CD8⁺ CTL vom Ausmaß der Tumorhypoxie. Es konnte somit gezeigt werden, dass nicht nur in den einzelnen Tumorpräparaten eine Abhängigkeit der Immunzellinfiltration vom Ausmaß des Oxygenierungsgrades besteht, sondern auch bei Betrachtung des gesamten Patientenkollektivs. Dieser Zusammenhang konnte mithilfe einer parametrischen Korrelationsanalyse bestätigt werden, die eine auf dem Niveau von 0.05 signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß der Immunzellinfiltration und der Tumorhypoxie fand. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson von $r:-0.378$ belegt, dass mit zunehmendem Anteil hypoxischer Tumorzellen das Ausmaß der Immunzellinfiltration abnimmt.

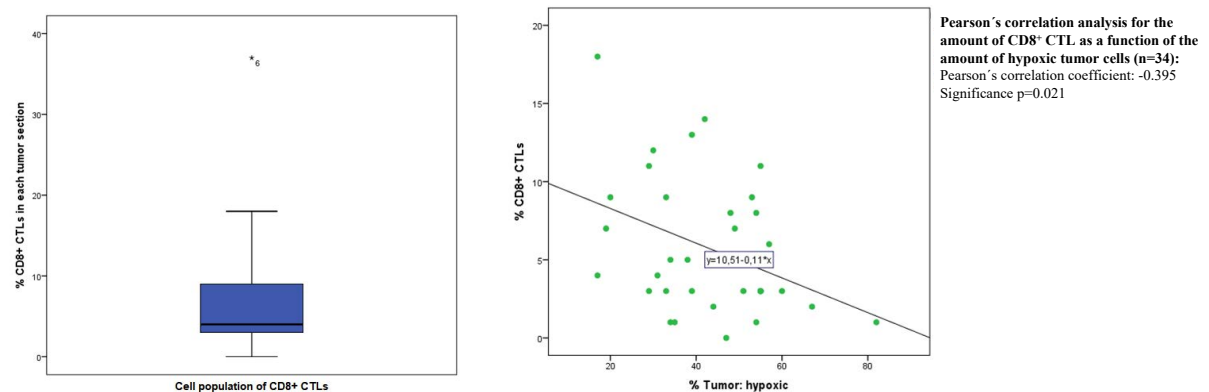


Abbildung 48: Boxplot zu den im untersuchten Patientenkollektiv erfassten quantitativen Daten des Anteils CD8⁺ CTL (links), sowie Korrelationsanalyse zur Abhängigkeit des Anteils CD8⁺ CTL vom Ausmaß der Tumorhypoxie (rechts). Mithilfe des Boxplots konnte gezeigt werden, dass unter den Daten zum Anteil CD8⁺ CTL ein singulärer Extremwert vorhanden ist (37 %). Da sich unter den Daten zum Anteil hypoxischer Tumorzellen keine Extremwerte fanden, wurde lediglich dieser Extremwert von der folgenden Korrelationsanalyse ausgeschlossen (n=34). In dieser Korrelationsanalyse nach Pearson zeigte sich übereinstimmend mit dem oben genannten (o.g.) Befund, eine nun noch „signifikantere“ negative Korrelation zwischen dem Ausmaß der Tumorhypoxie und dem Anteil der CD8⁺ Infiltration, wohingegen in der Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho ($r=-0.395$, $p=0.021$) ein etwas schwächerer Zusammenhang beobachtet werden konnte.

2.2. Adenosin-vermittelte Inhibition CD8 positiver Immunzellen

Um die bisherigen Beobachtungen aus in-vitro Experimenten zur immunsuppressiven Funktion extrazellulären Adenosins weiter untersuchen zu können, wurden ebenso spatiale mikroregionäre Interaktionsanalysen und whole slide-Distanzanalysen von CD73⁺ Tumorzellen zu CD8⁺ CTL durchgeführt. Da in dem untersuchten Patientenkollektiv nur in ca. 23 % der Fälle eine überlappende intratumorale Expression von CD73 und GLUT-1^{stark} beobachtet werden konnte, sollte der Zusammenhang einer Adenosin-vermittelten Inhibition CD8⁺ CTL zunächst nur in diesem Teilkollektiv beurteilt werden (siehe **Abbildung 39**, **Abbildung 49**). In mikroregionären spatialen Analysen der Zellinteraktion in Mosaic wurde hierbei beobachtet, dass es zu einer massiven Distanzzunahme zu CD8⁺ CTL kam, sobald die Tumorzellen sowohl eine starke GLUT-1 Expression zeigten, als auch CD73 positiv waren (mediane Distanz stromaler Zellen zu CD8⁺ CTL: 36.6µm vs. mediane Distanz zu hypoxischen Tumorzellen zu CD8⁺ CTL: 65µm vs. mediane Distanz CD73⁺ hypoxischer Tumorzellen zu CD8⁺ CTL: 127 µm siehe **Abbildung 49**). Der Vergleich mit normoxischen CD73⁺ Tumorbereichen (mediane Distanz: 88 µm) lässt ferner vermuten, dass die Tumorhypoxie hierbei zwar der Immunevasion wesentlich Vorschub leistet, aber nicht zuletzt die starke CD73-Expression das Gleichgewicht in jenen Tumorpräparaten hin zu einem Ausschluss des Immunzellinfiltrats verschieben könnte, zumal bei CD73 negativen GLUT-1^{stark} Tumorzellen vergleichbare Distanzen zu CD8⁺ CTL beobachtet werden können. In den mikroregionären Interaktionsanalysen konnte also bereits in jenem Patientenkollektiv eine deutliche hypoxisch-induzierte und Adenosin-vermittelte Inhibition CD8⁺ CTL bestätigt werden. Die Resultate der whole-slide Distanzanalysen in Tableau (siehe **Abbildung 49**) haben diese Ergebnisse der mikroregionären Analyse insofern bestätigen können, als dass auch hier größere mittlere Distanzen hypoxischer Tumorzellen zu CD8⁺ CTL unter gleichzeitiger Expression von CD73 (mittlere Distanz CD73⁺ hypoxischer Tumorzellen: 180µm vs. 160µm für CD73⁻ hypoxische Tumorzellen) festgestellt werden konnten. Für den Vergleich von normoxischen Tumorzellen zu CD8⁺ CTL konnte diese Distanzzunahme unter gleichzeitiger CD73-Expression nicht gezeigt werden. Hierbei sollte allerdings berücksichtigt werden, dass normoxische Tumorzellen insbesondere am Rand des Tumors und nicht in dessen Kern gefunden werden können und damit unter tumorarchitektonischen Gesichtspunkten eine größere Nähe zu CD8⁺ CTL besteht.

Insgesamt zeigte sich aber, eine große Variabilität in der intratumoralen CD73-Expression und dass der Phänotyp einer „Mit-Expression“ von CD73 unter GLUT-1^{stark}-Expression entsprechend nicht stabil über das gesamte Patientenkollektiv beobachtet werden konnte (eine solche „Mit-Expression“ zeigte sich nur in ca. 23 % der Fälle). Vielmehr konnte in der Mehrheit der Tumorpräparate keine oder nur eine sehr geringe intratumorale CD73 Expression festgestellt werden (siehe **Tabelle 21**), was sich durch eine vergleichsweise starke Standardabweichung im prozentualen Anteil CD73⁺ Tumorzellen widerspiegelt (siehe **Abbildung 27**). Diese Beobachtungen zur variablen Mit-Expression von CD73 unter Hypoxie decken sich mit den Resultaten aus Korrelationsanalysen nach Pearson, welche bei der globalen Auswertung über das gesamte Patientenkollektiv keine signifikanten Korrelationen, weder

zwischen dem Gesamtanteil CD73⁺ Tumorzellen und dem Anteil CD8⁺ CTL (p=0.690 bei einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von -0.070), noch dem Anteil CD73⁺ hypoxischer Tumorzellen und dem Anteil CD8⁺ CTL (p=0.946 bei einem Korrelationskoeffizienten von -0.012) finden konnten (siehe **Abbildung 50** und **51**). Der Befund konnte auch für das Patientenkollektiv unter Ausschluss der ZNS-Metastasen beobachtet werden und wird durch die zufällige Verteilung der Punkte im Streudiagramm weiter verdeutlicht.

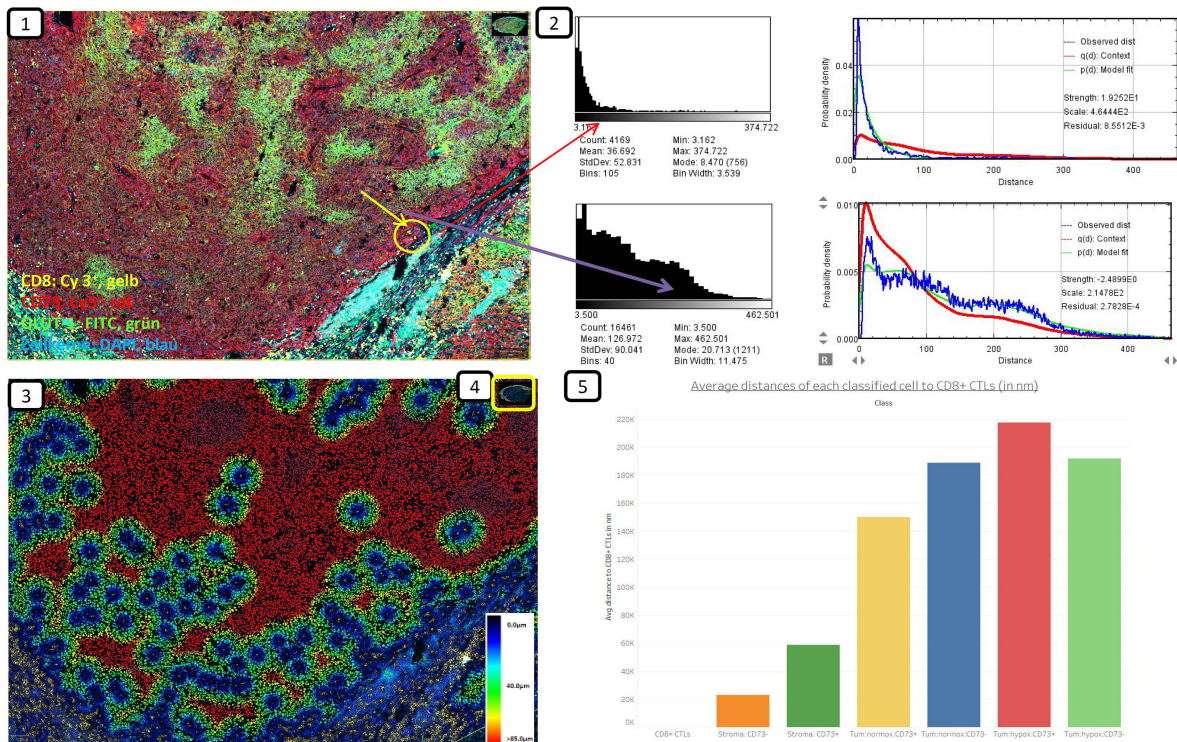


Abbildung 49: Beispielhafte statistische Distanzanalyse für einen Tumor mit vorhandener überlappender Expression von GLUT-1 und CD73 im Tumorphänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats: Analysiert wurde der Tumor IF-141 VIII03. In diesem beispielhaften Ausschnitt des Tumorpräparates kann eine überlappende Expression von CD73 und GLUT-1 festgestellt werden, wobei CD73 sowohl in normoxischen, wie auch hypoxischen Tumorarealen gleichermaßen stark exprimiert wird. Es zeigt sich weiterhin der für Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats charakteristische Befund einer Distanzzunahme von CD8⁺ CTL mit abnehmendem Oxygenierungsgrad der betrachteten Zellen. In der spatialen Interaktionsanalyse auf mikroregionärer Ebene zeigt sich ebenso die charakteristische signifikante, positive Korrelation CD8⁺ CTL mit stromalen Zellen i.S. eines perivaskulären Clusterings, mit geringen medianen Distanzen von 36µm zwischen beiden Zellpopulationen. Gleichfalls kann die für jenen Phänotyp charakteristische stark-ausgeprägte hypoxische Inhibition CD8⁺ CTL mit deutlich größeren medianen Distanzen (ca. 127µm) zwischen hypoxischen Tumorzellen und CD8⁺ CTL gezeigt werden. Auffällig ist hierbei, dass gerade CD73⁺ hypoxische Tumorzellen eine noch weitaus stärkere negative Korrelation mit CD8⁺ CTL, verglichen mit CD73⁻ hypoxischen Tumorzellen (mediane Distanz: ca. 66µm), aufweisen. Damit weisen die mikroregionären Interaktionsanalysen auf eine möglicherweise wirksame Hypoxie-induzierte und ADO-getriggerte Immunsuppression hin. Dieser Befund bestätigte sich nach Ausführen der Distanztransformation auch in dem whole-slide Tumorpräparat: So ergab die Distanzanalyse eine Zunahme der Distanzen zu CD8⁺ CTL mit abnehmendem Oxygenierungsgrad der betrachteten Zellpopulationen (mittlere Distanzen Stromazellen: ca. 20µm vs. mittlere Distanzen normoxischer, respektive hypoxischer Tumorzellen: 150-190µm). Zugleich kann eine weitere Zunahme der Distanzen zu CD8⁺ CTL durch eine in hypoxischen Arealen vorhandene Expression von CD73 beobachtet werden (mittlere Distanz von 220µm für CD73⁺, hypoxische Tumorzellen zu CD8⁺ CTL vs. 190µm für CD73⁻, hypoxische Tumorzellen). Ob diese Distanzzunahme allerdings tatsächlich auf die dort vorhandene CD73-Expression ursächlich zurückzuführen ist, kann gerade mit Blick auf die fehlende Distanzzunahme bei CD73-Expression in normoxischen Tumorzellarealen infrage gestellt werden. So kommt es lediglich zu einer starken Immunevasion aus dem Tumorkern, wohingegen unter weitestgehend normoxischen Bedingungen in der Tumorperipherie auch bei einer starken Expression von CD73 weiterhin eine mäßige Infiltration durch CD8⁺ CTL beobachtet werden kann. Nichtsdestotrotz bestätigen die gezeigten Befunde die charakteristischen spatialen Eigenschaften innerhalb des Tumorphänotyps vom ausgeschlossenen Infiltrat.

Die Resultate der Korrelationsanalysen für CD73⁺ Tumorzellen zeigen die Relevanz spatialer Interaktionsanalysen auf mikroregionärer Ebene innerhalb des TME auf: So kann ob des geringen Vorkommens einer intratumoralen „Mit-Expression“ von CD73 unter Hypoxie über das gesamte Patientenkollektiv betrachtet zwar keine Korrelation festgestellt werden. In der spatialen Interaktionsanalyse derjenigen Areale, die diese überlappende Expression aufweisen, zeigt sich aber eine deutliche und signifikante negative Korrelation CD73⁺ Tumorzellen mit CD8⁺ CTL, i.S. einer Immunzellevasion aus diesen Bereichen. Es wurden daher ebenso Korrelationsanalysen für dieses Patientenkollektiv angestrebt, in dem in der visuellen Analyse eine „Mit-Expression“ von CD73 unter Hypoxie gefunden werden konnte (siehe **Tabelle 11**). In diesem Kollektiv war zudem in der Mehrzahl der Präparate ein außergewöhnlich hoher Anteil CD73 positiver Tumorzellen vorhanden.

Das zugehörige Streudiagramm zeigt einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Anteil CD8⁺ CTL und CD73⁺ Tumorzellen (siehe **Abbildung 52**). Allerdings wurde keine statistisch signifikante Korrelation gefunden (aufgrund des Nichtzutreffens des zentralen Grenzwertsatzes $n < 30$, wurde neben der Korrelationsanalyse nach Pearson mit $r = -0.523$ und $p = 0.149$; ebenso die Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho mit $r = 0.017$ und $p = 0.966$ durchgeführt). Dies kann auf die geringe Fallzahl der Subkohorte ($n = 9$), sowie den Umstand, dass die Mit-Expression oft nur in kleinen Bereichen des Tumors beobachtet werden kann, zurückgeführt werden. Zusammenfassend konnte somit lediglich in einer Subpopulation mit einer überlappenden Expression der Marker CD73 und GLUT-1^{stark} des untersuchten Patientenkollektivs der Mechanismus einer Adenosin-getriggerten Inhibition CD8⁺ CTL beobachtet werden. Dieser Befund ist ob der starken Heterogenität innerhalb des Kollektivs aber vielmehr als kumulierter Einzelbefund denn als charakteristisches Merkmal zu werten. Um die visuell und in der spatialen Interaktionsanalyse gezeigten Befunde statistisch belegen und damit einen signifikanten Einfluss von ADO für die *in-vivo*-Inhibition einer anti-Tumor Immunantwort darlegen zu können, wird es daher in zukünftigen Studien zum einen nötig sein, ein größeres Patientenkollektiv zu untersuchen und gleichfalls weitere ADO-Marker, allen voran CD39, mit zu erfassen.

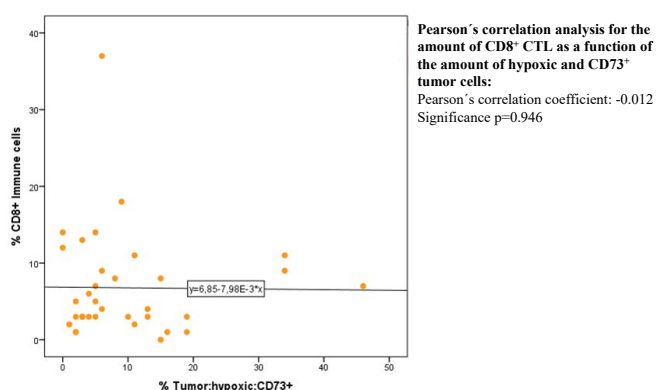
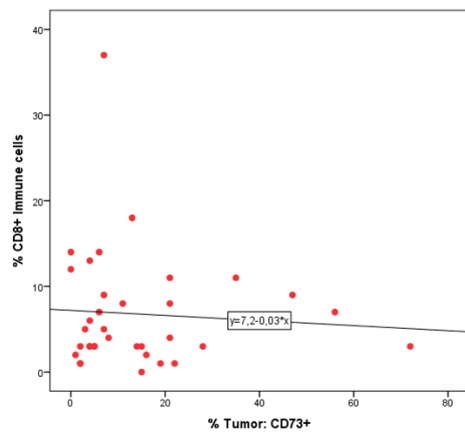


Abbildung 50: Streudiagramm zum Anteil CD8⁺ CTL in Abhängigkeit des Ausmaßes der CD73⁺ Tumorhypoxie über das gesamte Patientenkollektiv (n=35): Die einzelnen Punkte geben für die n=35 Patienten den prozentualen Anteil CD8⁺ CTL, sowie den Anteil CD73⁺ und hypoxischer Tumorzellen im whole-slide Präparat an. Die Korrelationsgerade, verdeutlicht, dass es sich bei diesem Zusammenhang um keine signifikante Korrelation des prozentualen Anteils der CD8⁺ CTL vom Ausmaß der CD73⁺ Tumorhypoxie handelt. Dies bestätigt die Korrelationsanalyse nach Pearson, die eine nicht signifikante (Korrelationskoeffizient $r = -0.012$) Korrelation zwischen dem Ausmaß der Infiltration CD8⁺ CTL und dem der Tumorhypoxie zeigt.



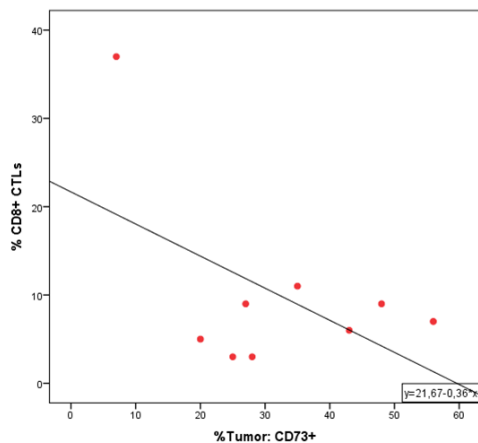
Pearson's correlation analysis for the amount of CD8⁺ CTL as a function of the amount of CD73⁺ tumor cells:
 Pearson's correlation coefficient: -0.070
 Significance p=0.690

Abbildung 51: Streudiagramm zum prozentualen Anteil CD8⁺ CTL in Abhängigkeit des Ausmaßes des CD73⁺ Tumors über das gesamte Patientenkollektiv (n=35): Die einzelnen Punkte geben für die n=35 Patienten den prozentualen CD8⁺ CTL Anteil, sowie den Anteil CD73⁺ Tumors im whole-slide Präparat an. Die erstellte Korrelationsgerade, verdeutlicht, dass es sich bei diesem Zusammenhang um keine signifikante Korrelation handelt, wobei durch die mathematische Funktion eine leicht negative Korrelation beschrieben wird. Wiederum kann in der Korrelationsanalyse nach Pearson, wie auch nach Spearman, keine signifikante Korrelation (p=0.690) zwischen dem Ausmaß der Immunzellinfiltration und der Tumorchypoxie gezeigt werden.

No.	Histo	Lokalisation	% CD8+ Immunzellen	% Stroma: CD73+	% Stroma: CD73-	% Tum:hypox: CD73+	% Tum:hypox: CD73-	% Tum:normox: CD73+	% Tum: normox: CD73-	% Stroma gesamt	% Tum: hypox	% Tum: normox	% Tum: CD73+	Iplimumab vor oder nach Bestrahlung	Beobachtungszeit raum bis Ereignis 1 oder 2	1=dead 2= lebend oder aus der Beobachtung gefallen	Gesamtzellzahl	CD8 Infiltrations muster
3	IF-134 VIIIS8	LK	3	11	2	20	45	4	14	13	65	19	25	nach	28	1	1029994	2
4	IF-138 VII90	Haut	5	6	8	14	47	6	15	14	60	21	20	nach	12	1	483441	2
6	IF-106 VS4	LK	37	20	10	6	25	0	2	30	31	2	7	nach	50	1	607862	3
6	IF-135 VII64	GIT	5	5	26	2	48	1	13	31	50	13	3	nach	50	1	556330	3
6	IF-135 VII66	LK.1	21	4	32	1	30	0	12	37	30	12	1	nach	50	1	458785	2
10	IF-109 V77	LK	9	9	4	16	24	11	28	13	40	39	27	nach	38	1	946070	2
12	IF-109 V80	LK	3	24	20	19	14	9	11	43	33	20	28	vor	10	1	989188	1
12	IF-136 VII72	Haut	5	15	16	0	58	0	6	31	58	6	0	vor	10	1	243175	2
19	IF-138 VII91	Haut	6	11	9	32	27	11	4	20	59	15	43	nach	3	1	374361	3
26	IF-136 VII88	LK	11	19	11	33	21	2	2	29	55	5	35	vor	2	1	537588	2
31	IF-138 VII82	LK	9	23	10	36	18	3	0	33	54	3	39	nach	3	1	632671	2
31	IF-138 VII83	LK	14	7	5	36	34	2	3	12	70	5	37	nach	3	1	537079	3
31	IF-138 VII92	LK	15	8	8	38	22	5	3	16	61	8	43	nach	3	1	1180144	2
31	IF-138 VII93	LK	9	6	7	34	20	13	9	13	53	23	48	nach	3	1	1786540	3
31	IF-138 VII94	LK	12	6	11	36	27	4	3	17	63	7	40	nach	3	1	671598	3
33	IF-141 VII103	LK	7	12	21	46	3	11	0	33	49	11	56	vor	2	1	1682170	2

grün: Präparate mit der höchsten Gesamtzellzahl des jeweiligen Patienten

Tabelle 11: Tabellarische Auflistung derjenigen Patienten mit zugehörigen Histo-Präparaten, welche eine sich intratumoral überschneidende Expression der Marker GLUT-1 und CD73 zeigen. In dem untersuchten Patientenkollektiv (n=35, bei N=70) wurde in n=9 Patienten und N=16 Histo-Präparaten eine intratumorale „Mit-Expression“ von CD73 unter Hypoxie beobachtet. Jene Patienten wurden hier als separate Gruppe tabellarisch mit den zugehörigen quantitativen und klinischen Daten aufgelistet.



Pearson's correlation analysis for the amount of CD8⁺ CTL as a function of the amount of CD73⁺ tumor cells (n=9):
 Pearson's correlation coefficient: -0.523
 Significance p=0.149

Abbildung 52: Streudiagramm zum prozentualen Anteil CD8⁺ CTL in Abhängigkeit des Ausmaßes des CD73⁺ Tumors über das Patientenkollektiv mit einer überlappenden intratumoralen Expression von GLUT-1 und CD73 (n=9): Die einzelnen Punkte geben für die n=9 Patienten den prozentualen CD8⁺ CTL Anteil und den Anteil CD73⁺ Tumors im whole-slide Präparat an. Die erstellte Korrelationsgerade zeigt, dass hierbei eine Korrelation des prozentualen Anteils der CD8⁺ CTL vom Ausmaß CD73⁺ Tumors vorliegt, wobei durch die mathematische Funktion eine deutlich negative Korrelation beschrieben wird. Zwar zeigt sich in der Korrelationsanalyse nach Pearson, wie auch nach Spearman, eine nicht signifikante Korrelation (p=0.149), der Korrelationskoeffizient nach Pearson von -0.523 verdeutlicht indes, dass es in dem untersuchten Patientenkollektiv potentiell eine stark negative Korrelation zwischen CD73⁺ Tumorzellen und CD8⁺ CTL gibt, die aufgrund einer zu geringen Stichprobe als nicht signifikant bezeichnet werden muss.

3. Wertigkeit der untersuchten Marker als prädiktive Faktoren für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie beim malignen Melanom

Zur Beurteilung der klinischen Bedeutung und Eignung der untersuchten Biomarker als prädiktive Faktoren für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie beim zerebral metastasierten malignen Melanom werden die erfassten quantitativen Daten mittels Kaplan-Meier-Analysen ausgewertet und damit die eingangs aufgestellte Hypothese überprüft. Die zur Dichotomisierung verwendeten Cut-off-Werte wurden dabei mithilfe von ROC-Kurven, als auch durch den Median ermittelt.

3.1. Das Ausmaß der Tumor-Hypoxie als prädiktiver Faktor für das Therapienansprechen auf eine Radioimmuntherapie beim zerebral metastasierten malignen Melanom

In Kaplan-Meier-Analysen für das gesamte Patientenkollektiv (n=35) zeigte sich, dass Patienten mit schlechter oxygenierte Tumoren, i.S. eines großen Anteils GLUT-1^{stark} positiver Tumorzellen, ein signifikant kürzeres medianes Überleben aufweisen, als diejenigen Patienten mit besser oxygenierten Tumoren (siehe **Abbildung 54**). Die Dichotomisierung der beiden Gruppen wurde hierbei sowohl anhand des Medians (Median: 42.0 %; hierunter mediane Überlebenszeit 11 vs. 3 Monate, p=0.0004, siehe **Abbildung 93**), der zuvor mithilfe deskriptiver Statistiken in SPSS erfasst wurde (siehe **Abbildung 27**), als auch nach einem mithilfe von ROC-Kurven (siehe **Abbildung 53**) ermittelten Cut-off-Wertes vorgenommen (Cut-off-Wert: 32.0 %, hierunter mediane Überlebenszeit 50 vs. 5 Monate, p=0.0005). Es konnte so gezeigt werden, dass der hier beobachtete Zusammenhang eines schlechteren Outcomes, bei einem größeren Anteil hypoxischer Tumorzellen, nicht durch Zufall zustande gekommen ist, auch wenn ob des geringen Umfangs des untersuchten Patientenkollektivs an dieser Stelle lediglich von einem Trend gesprochen werden sollte.

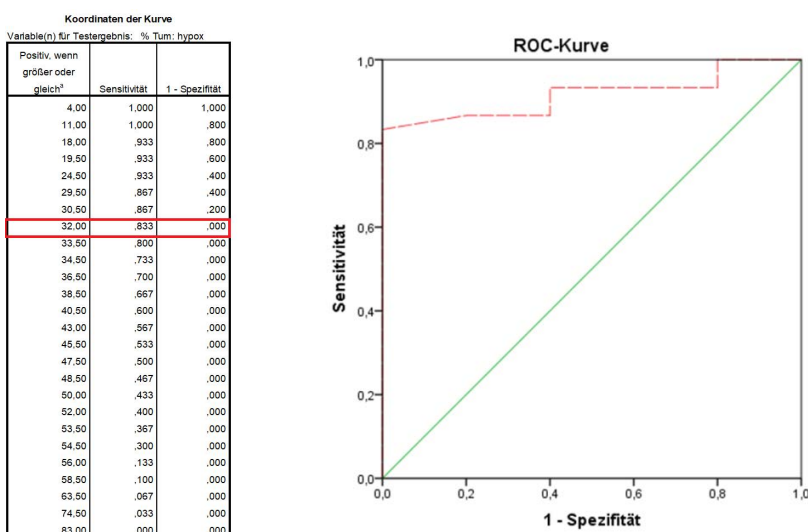


Abbildung 53: ROC-Kurve (rechts) mit zugehörigen Koordinaten der Kurve für den Anteil hypoxischer Tumorzellen in den whole-slide Tumorpräparaten des untersuchten Patientenkollektivs (links). Zur Ermittlung des optimalen Cut-off-Wertes für die Dichotomisierung der Patientengruppen wurde eine ROC-Kurve erstellt, die die Sensitivität in Abhängigkeit der falsch positiven Rate (=1-Spezifität) für die Variable „Anteil hypoxischer Tumorzellen“ (%Tum: hypoxic) mithilfe einer ROC-Kurve (rot) und der zugehörigen diagonalen Bezugslinie (grün) darstellt. Der optimale Cut-off-Wert besitzt eine möglichst hohe Sensitivität bei geringer Rate falsch positiver Resultate. In diesem Fall liegt der optimale Cut-off-Wert bei etwa 32.00 %, da hier die höchste Sensitivität (0.833) bei einer gleichzeitig geringen falsch positiven Rate (0.000) vorliegt.

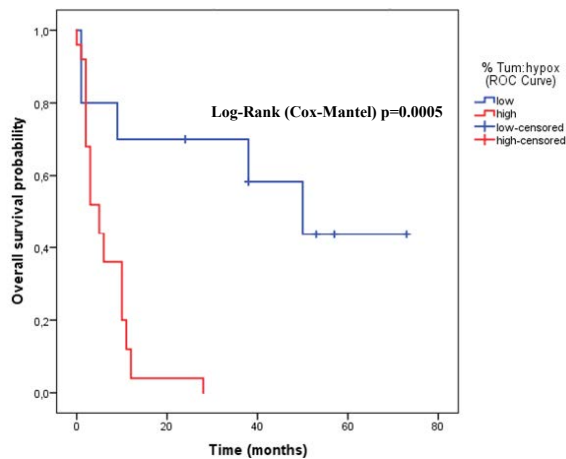


Abbildung 54: Kaplan-Meier-Analyse zur Überlebenszeit des untersuchten Patientenkollektivs (n=35) in Abhängigkeit der jeweiligen Ausprägung der Tumorhypoxie. Die Dichotomisierung erfolgte anhand des in den ROC-Kurven ermittelten Cut-off-Wertes (=32.00 %). Die Überlebensfunktionen des Patientenkollektivs unterscheiden ein Patientenkollektiv, das einen Anteil der Tumorhypoxie <32.00 % (blau) und einen Anteil der Tumorhypoxie >32.00 % (rot) aufweist. Es kann ein signifikant längeres medianes Überleben für Patienten mit besser oxygenierten Tumoren beobachtet werden (50 vs. 5 Monate). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist wesentlich größer als bei Trennung der Gruppen nach dem Median. Der in Log-Rank-Statistiken ermittelte p-Wert liegt bei $p=0.0005$, womit der gezeigte Zusammenhang statistisch signifikant ist.

Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass der Zusammenhang zwischen dem Oxygenierungsgrad des Tumors und der Überlebenszeit bei Betrachtung desjenigen Patientenkollektivs unter Ausschluss der Patienten mit Präparaten aus ZNS-Lokalisation (n=33, 12 vs. 3 Monate, $p=0.001$) geringfügig stärker wurde. Dies deutet darauf hin, dass in ZNS-Metastasen der Tumorhypoxie zwar nach wie vor eine prognostisch wichtige Rolle zukommt, dieser Zusammenhang allerdings – wie sich in der Analyse des Patientenkollektivs mit Tumoren von ausschließlich zentralnervöser Lokalisation (n=6, $p=0,025$) zeigt – nicht von gleicher statistischer Stärke ist, wie für Tumoren außerhalb des ZNS. Der geringe Umfang des Patientenkollektivs mit Tumorpräparaten aus ZNS-Lokalisation erlaubt hier allerdings keine sichere Aussage, ob der intratumorale Oxygenierungsstatus in Melanompräparaten aus ZNS-Lokalisation einen gleichermaßen geeigneten prädiktiven Faktor für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie darstellt, wie dies für Präparate peripherer Lokalisation gezeigt werden konnte.

Weiterhin wurde untersucht, welchen Beitrag die Tumorhypoxie unter Ausschaltung des CD73 positiven Tumoranteils zur Ausprägung des malignen Phänotyps beiträgt, zumal die CD73-Expression im Tumor neben der Hypoxie als bedeutender Einflussfaktor zur Inhibition der antitumoralen Immunantwort identifiziert wurde und ergo als möglicher Konfounder ausgeschaltet werden sollte. In dieser Analyse zeigte sich, dass Patienten mit besser oxygenierten, CD73-negativen Tumoren eine längere mediane Überlebenszeit aufweisen. Es besteht somit ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der CD73 negativen Tumorhypoxie und dem Überleben sowohl über alle Patienten (n=35, 11 vs. 3, $p=0.002$, siehe **Abbildung 94**), als auch demjenigen Kollektiv unter Ausschluss der ZNS-Metastasen (n=33, 12 vs. 3, $p=0.002$). Als Cut-off-Wert wurde hierbei der Median gewählt. Die Ausprägung jenes Zusammenhangs stellt sich allerdings etwas schwächer, verglichen mit dem Einfluss des gesamten hypoxischen Tumoranteils, dar. Dies ist Grund zur Annahme, dass die CD73-Expression ebenso einen Beitrag zur Ausprägung des malignen Tumorphänotyps leistet. Diese Überlegung soll daher im Folgenden näher betrachtet werden.

3.2. Die intratumorale CD73 Expression als möglicher prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie beim zerebral metastasierten malignen Melanom

Neben dem Ausmaß der GLUT-1 Expression als Surrogatmarker der Tumorphypoxie wurde auch die intratumorale CD73 Expression als Surrogatmarker der intratumoralen ADO-Akkumulation auf ihre Eignung als prädiktiver Faktor für das Therapieansprechen im malignen Melanom hin untersucht.

Zur Analyse des Einflusses der intratumoralen CD73-Expression erfolgte zunächst eine Dichotomisierung des untersuchten Patientenkollektivs nach dem medianen Anteil CD73 positiven Tumors. Anhand dieser Dichotomisierung konnte in Kaplan-Meier-Analysen ein längeres Überleben mit abnehmendem Anteil der CD73 Positivität im Tumor und damit einer potentiell geringeren extrazellulären Adenosin-Synthese (n=35, 10 vs. 3 Monate, p=0.158) für das gesamte Patientenkollektiv nachgewiesen werden. Indes ist dieser Zusammenhang nicht als signifikant zu werten, da er über dem zuvor festgelegten Signifikanzniveau $\alpha > 0.05$ liegt (siehe **Abbildung 55**). Ein ähnliches Resultat zeigte sich für das Patientenkollektiv unter Ausschluss der ZNS-Metastasen (n=33 10 vs. 3, p=0,129), wobei der Zusammenhang hier noch vermeintlich stärker, allerdings nach wie vor als nicht signifikant zu werten ist. Auch bei Analyse des CD73⁺ hypoxischen Tumoranteils zeigte sich weder für das gesamte Patientenkollektiv, noch für das Kollektiv unter Ausschluss der Präparate aus ZNS-Lokalisation ein signifikantes Resultat (n=35, 6 vs. 6 Monate, p=0.288, siehe **Abbildung 95**). Das Ausmaß der intratumoralen CD73 Expression konnte somit für das gesamte Patientenkollektiv betrachtet, keine signifikante Korrelation mit dem Überleben erbringen und ist daher nicht als ein stabiler Prädiktor für ein Therapieansprechen im metastasierten malignen Melanom anzusehen.

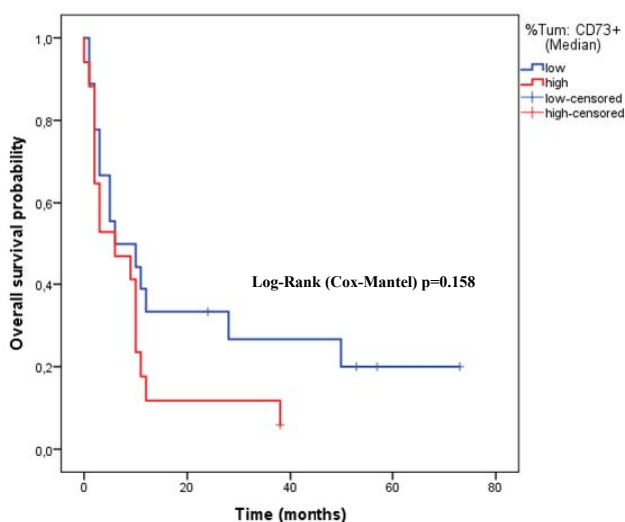


Abbildung 55: Kaplan-Meier-Analyse zur Überlebenszeit des gesamten Patientenkollektivs in Abhängigkeit des Anteils CD73 positiver Tumors. Das Kollektiv wurde nach dem in der deskriptiven Statistik bestimmten medianen Anteil CD73⁺ Tumorzellen (=7.00 %) dichotomisiert. Die Überlebensfunktionen des Patientenkollektivs unterscheiden ein Patientenkollektiv, das in den jeweiligen Tumorpräparaten einen Anteil CD73⁺ Tumorzellen <7.00 % (blau) und einen Anteil CD73⁺ Tumorzellen >7.00 % (rot) aufweist. Es kann ein längeres medianes Überleben für Patienten mit einem geringeren Anteil CD73⁺ Tumorzellen beobachtet werden (10 vs. 3 Monate, 95 % KI-Intervall: 1.9-18.1 Monate vs. 0.0-8.2 Monate). Mithilfe der Log-Rank-Statistik wurde zudem ein p-Wert von 0.158 ermittelt, womit der gezeigte Zusammenhang als nicht signifikant auf dem Niveau von $\alpha < 0.05$ anzusehen ist.

Um dennoch einen möglichen Beitrag der CD73 Expression bei der Ausbildung eines „maligneren“ Tumorphänotyps erfassen zu können, wurde anschließend untersucht, inwiefern die intratumorale CD73 Expression in denjenigen Tumorpräparaten (n=9, N=16; siehe **Tabelle 11**) mit einer vermehrten intratumoralen CD73 Expression bzw. einer visuell identifizierten Mit-Expression von CD73 unter Hypoxie als ein prädiktiver Faktor für ein Therapieansprechen fungieren kann: Hierbei zeigte sich, dass sowohl das Ausmaß der intratumoralen CD73 Expression, als auch der Anteil CD73⁺ hypoxischer Tumorzellen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben in jenem Patientenkollektiv besitzen (mediane Überlebenszeit 28 vs. 3 Monate; p=0.001, siehe **Abbildung 56**). So wurde mit zunehmendem Ausmaß der intratumoralen CD73 Expression eine signifikante Abnahme der Überlebenszeit beobachtet, weshalb die Möglichkeit einer CD73-vermittelten malignen Progression im metastasierten malignen Melanom – zumindest in jener Subpopulation – erwogen werden kann.

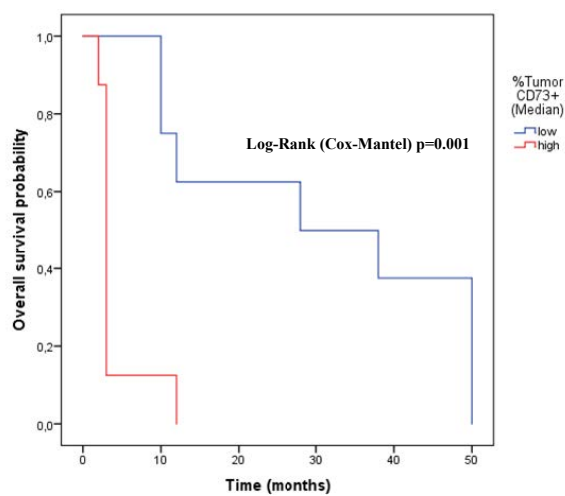


Abbildung 56: Kaplan-Meier-Überlebenskurven zur Überlebenszeit des Patientenkollektivs, in dem eine überlappende intratumorale Expression von GLUT-1 und CD73 gefunden wurde, in Abhängigkeit des Anteils CD73 positiver Tumors. Die untersuchte Subpopulation wurde nach dem in der deskriptiven Statistik bestimmten medianen Anteil CD73⁺ Tumorzellen (=31.50 %) dichotomisiert. Die Überlebensfunktionen des Patientenkollektivs unterscheiden ein Patientenkollektiv, das einen Anteil CD73⁺ Tumorzellen <31.50 % (blau) und einen Anteil CD73⁺ Tumorzellen >31.50 % (rot) aufweist. Hier zeigt sich bereits, dass die untersuchte Kohorte einen deutlichen höheren Anteil CD73 positiver Tumorzellen im vgl. zum Gesamtkollektiv aufweist. Es kann ein signifikant längeres medianes Überleben für Patienten mit einem – relativ gesehen - geringeren Anteil CD73⁺ Tumorzellen beobachtet werden (28 vs. 3 Monate). In der Log-Rank-Statistik wurde zudem ein p-Wert von 0.001 ermittelt, womit der gezeigte Zusammenhang als signifikant auf dem Niveau von $\alpha < 0.05$ anzusehen ist. Aufgrund der geringen Stichprobe sollten die hier gezeigten Beobachtungen allerdings mit besonderer Vorsicht interpretiert werden.

Zusammenfassend wurde für die gesamte Patientenkohorte betrachtet also kein signifikanter Einfluss des Anteils CD73 positiver Tumorzellen auf das klinische Outcome festgestellt. Jedoch wurde für Patienten, die bereits eine starke Expression von CD73 im Tumor zeigten, eine Verlängerung des Überlebens mit abnehmendem Anteil der CD73 Positivität im Tumor beobachtet. Zumal sich der dargelegte Befund lediglich in einer Subpopulation der Patienten als statistisch signifikant herausgestellt hatte, kann mit den hier erhobenen Daten demnach keine konsistente Aussage zur *in-vivo* Relevanz extrazellulären Adenosins für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie im metastasierten malignen Melanom vorgenommen werden.

3.3. Bedeutung der intratumoralen Infiltration CD8 positiver Lymphozyten als Prädiktor für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie beim zerebral metastasierten Melanom

Bei der Analyse des Einflusses CD8⁺ CTL auf das klinische Outcome konnte festgestellt werden, dass Tumoren mit einer starken Infiltration durch CD8⁺ CTL ein besseres Therapiensprechen zeigten und sich folglich die Gesamtüberlebenszeit der Patienten signifikant verlängerte (n=35, 3 vs. 12 Monate). Die Dichotomisierung erfolgte hierbei anhand des in der ROC-Kurve ermittelten optimalen Cut-off-Wertes (siehe **Abbildung 29**), zumal dieser ein statistisch „stärkeres“ Ergebnis (p=0.0002 siehe **Abbildung 57**) im Vergleich zu einer Trennung nach dem Median (p=0.002 siehe **Abbildung 96**) erbrachte. Ein gleichartiger statistischer Zusammenhang konnte auch für das Patientenkollektiv unter Ausschluss der ZNS-Metastasen (n=33, 3 vs. 11 Monate, p=0.013) beobachtet werden.

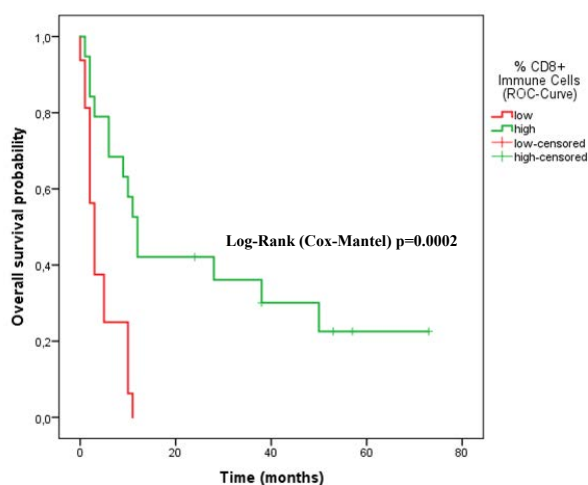


Abbildung 57: Kaplan-Meier-Analyse zur Überlebenszeit des untersuchten Patientenkollektivs (n=35) in Abhängigkeit des Ausmaßes der CD8⁺ Immunezellinfiltration. Das Kollektiv wurde nach dem in der ROC-Kurve bestimmten, optimalen Cut-off-Wert des CD8⁺ Immunezellanteils (=3.50 %) dichotomisiert. Die Überlebensfunktionen des Patientenkollektivs unterscheiden eine Gruppe von Tumorpräparaten, mit einem Anteil CD8⁺ CTL <3.50 % (rot) und einen Anteil CD8⁺ CTL >3.50 % (grün). Es kann ein signifikant längeres medianes Überleben für Patienten mit einer stärkeren Infiltration durch CD8⁺ CTL beobachtet werden (12 vs. 3 Monate, 95 % KI-Intervall: 9.2 – 14.8 Monate vs. 1.7-4.3 Monate). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist somit etwas größer als bei Trennung der Gruppen nach dem Median. Der ermittelte p-Wert liegt deutlich unter dem Signifikanzniveau von p<0.05, womit der gezeigte Zusammenhang statistisch signifikant ist.

Es ist an dieser Stelle anzumerken, dass das Ausmaß der CD8 Infiltration keinesfalls über alle Lokalisationen der Resektions-Tumorpräparate des malignen Melanoms als stabiler prädiktiver Faktor zu betrachten ist. So konnte im Rahmen dieser Studie bereits gezeigt werden, dass in Tumorpräparaten aus ZNS-Lokalisation eine signifikant geringere Infiltrationsdichte CD8⁺ CTL im Vergleich mit Metastasen aus nicht-ZNS-Lokalisation gefunden werden kann, sodass die Zahl CD8⁺ CTL im Tumor keinesfalls über alle Gewebelokalisationen als stabiler prädiktiver Faktor zu werten ist. In Kaplan-Meier-Analysen zur Abhängigkeit der Überlebenszeit vom Ausmaß der CD8-Infiltration zeigte sich sodann für das Patientenkollektiv, welches ausschließlich Tumorpräparate aus ZNS-Lokalisation miteingeschlossen hatte, kein signifikanter Zusammenhang (n=6, p=0.377). Auch wenn hier aufgrund der geringen Anzahl von ZNS-Proben sicherlich auch insgesamt von keiner repräsentativen Analyse gesprochen werden kann, sollte nicht zuletzt dieser Befund Hinweis auf die differente Tumorummunologie in zentralnervösen Absiedlungen des malignen Melanoms sein.

Um schließlich einen über alle Gewebelokalisationen stabilen prädiktiven Parameter zu identifizieren, wurde der Phänotyp der Tumorimmunität, der anhand des Infiltrationsmusters CD8⁺ CTL ermittelt wurde, untersucht und in die Klassen „immunologische Wüste“ (1), „vom Tumor ausgeschlossenes Infiltrat“ (2) und „immunogener Tumor“ (3) eingeteilt. Bei der Auswertung zeigte sich, dass dieses Infiltrationsmuster einen über alle Patienten und Tumorlokalisationen stabilen und starken prädiktiven Faktor für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie darstellt (siehe **Abbildung 58 links**), wobei über alle Patientenkollektive eine Verlängerung der Überlebenszeit mit zunehmender Tendenz des Tumorphänotyps hin zu einem immunogenen Tumor gefunden werden konnte (n=35, 2 vs. 6 vs. 50 Monate, p=0.0003; n=33, 1 vs. 6 vs. 50 Monate, p=0.0003; n=6, 5 vs. 11 vs. 28 Monate, p=0.074). Es stellte sich in Korrelationsanalysen ferner eine signifikante Korrelation (p=0.0001; Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho: 0.632, vgl. Pearson's r: 0.602) zwischen dem Ausmaß der Immunzellinfiltration und dem Phänotyp der Tumorimmunität auf globaler Ebene heraus, wobei die höchsten Zellzahlen CD8⁺ CTL im Phänotyp des immunogenen Tumors gefunden werden konnten (siehe **Abbildung 58 rechts**). Da es sich bei den Korrelationsanalysen um einen Vergleich einer ordinalskalierten mit einer intervallskalierten Variable handelt, wurde die Analyse nach Spearman-Rho durchgeführt. Dies verdeutlicht, dass die Effektivität der antitumoralen Immunantwort, sowohl auf einer ausreichenden CD8-Infiltration in den Tumor und auch der Infiltrationsdichte der aktiven CD8⁺ CTL basiert. Das Immune-Profiling und insbesondere die Darstellung CD8⁺ CTL im Tumor ist damit von zentraler Wichtigkeit als prognostischer Parameter und auch als prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie im metastasierten Stadium des malignen Melanoms.

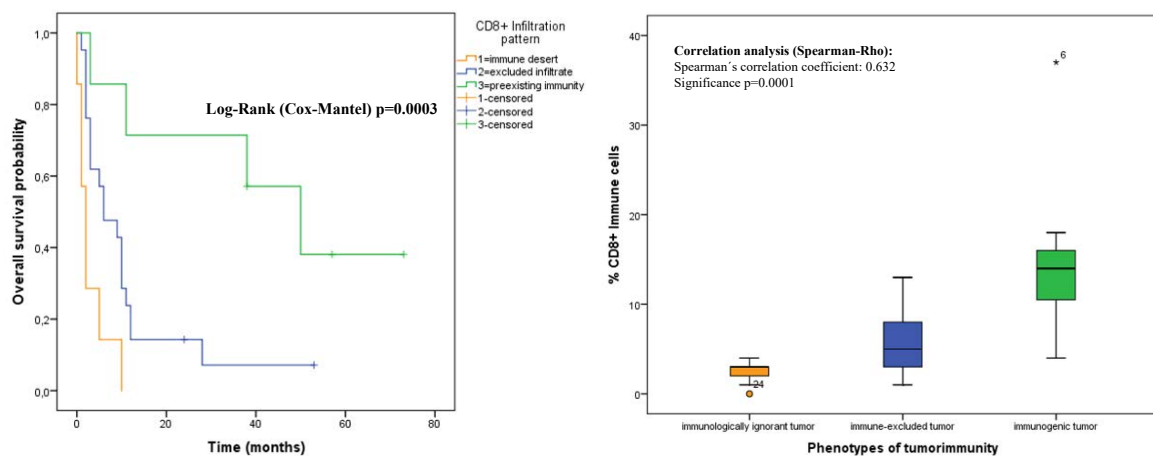


Abbildung 58: Kaplan-Meier-Analyse zur Überlebenszeit des gesamten Patientenkollektivs in Abhängigkeit des Phänotyps der Tumorimmunität (links). Darstellung des Anteils CD8⁺ CTL in den Tumorpräparaten in Abhängigkeit des dort beschriebenen Phänotyps der Tumorimmunität für das gesamte Patientenkollektiv (n=35) mithilfe von Boxplots (rechts). Das Kollektiv wurde nach dem in der visuellen Analyse bestimmten Phänotyp der Tumorimmunität eingeteilt, wobei je nach Infiltrationsmuster der CD8⁺ CTL drei Phänotypen unterschieden werden konnten: 1=immunologische Wüste; 2=ausgeschlossenes Infiltrat; 3=vorbestehende Immunität. Die Überlebensfunktionen des Patientenkollektivs unterscheiden diejenigen Patienten vom Phänotyp eins (orange), zwei (blau) und drei (grün). Es kann ein signifikant längeres medianes OS für diejenigen Patienten mit Tendenz zum Phänotyp der vorbestehenden Immunität beobachtet werden (2 vs. 6 vs. 50 Monate, 95 % KI-Intervall: 0.8-3.2 Monate vs. 0.2-12.0 Monate vs. 25.4-74.6 Monate). Es kann ferner eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß der CD8⁺ Infiltration und deren Infiltrationsmuster (Korrelationskoeffizient nach Spearman: 0.632, p=0.0001) gezeigt werden. Der Phänotyp des immunogenen Tumors ist demnach durch eine höhere Infiltrationsdichte CD8⁺ CTL gekennzeichnet als der immunologisch anergische Tumor, in dem lediglich geringe Zellzahlen CD8⁺ CTL beobachtet werden kann.

3.4. Relevanz der Therapieabfolge einer Radioimmuntherapie für das klinische Outcome von Patienten mit zerebral metastasiertem Melanom

Die Immuntherapie mit IPI ist ein wirksamer Ansatz bei der Behandlung von Patienten mit metastasiertem Melanom. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ergänzend zu der von Schmidberger *et. al.* publizierten retrospektiven Kohortenstudie (36), aus der sich das hier untersuchte Patientenkollektiv rekrutiert hatte, dargelegt werden, inwiefern eine Kombination von Radio- und Immuntherapie mit IPI im Stadium der zerebralen Metastasierung wirksam ist und inwiefern die sequentielle Anwendung des Therapieregimes das klinische Outcome beeinflusst. Hierbei konnte im vorliegend untersuchten Patientenkollektiv (n=35), das eine Therapie mit IPI plus RTx erhalten hatte, ein medianes Gesamtüberleben von 6.0 Monaten beobachtet werden, wobei nach einem Zeitraum von 36 Monaten, sechs Langzeitüberlebende identifiziert werden konnten. Verglichen mit historischen Kontrollen, die lediglich eine Bestrahlung der zerebralen Metastasen erhalten hatten, ist gerade die Dokumentation solcher Langzeitüberlebender als außergewöhnlicher Befund zu werten, da dies unter alleiniger Behandlung des metastasierten Melanoms mit RTx bisher nicht beobachtet wurde (36). Um die Bedeutung der Therapiesequenz auf das klinische Outcome zu untersuchen, wurde ferner eine Analyse der Überlebenszeitdaten nach Dichotomisierung des Patientenkollektivs in zwei Gruppen, die IPI entweder vor (n=19) oder nach der RTx (n=16) erhalten hatten, vorgenommen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Patienten, die IPI nach dem Radiotherapieregime erhielten, ein signifikant längeres medianes Überleben aufwiesen (siehe **Abbildung 59**) als solche die IPI vor der RTx bekommen hatten (für n=35, 11 vs. 3 Monate, p=0.01 und für n=33, 12 vs. 3 Monate, p=0.01).

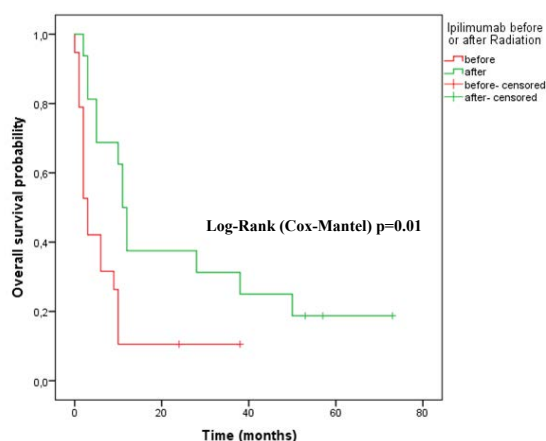


Abbildung 59: Kaplan-Meier-Analyse zur Überlebenszeit des Patientenkollektivs in Abhängigkeit des angewandten Therapiealgorithmus der Radioimmuntherapie. Das Kollektiv wurde anhand des angewandten Therapieregimes dichotomisiert, sodass Patienten, die IPI vor der Bestrahlung erhielten (rot), denjenigen Patienten gegenübergestellt wurden, welche IPI nach RTx (grün) erhielten. Es kann ein signifikant längeres medianes Überleben für diejenigen Patienten, welche IPI nach RTx (95 % KI: 9.040-12.960 Monate) im Vergleich zu solchen Patienten die IPI vor der RTx erhalten hatten (95 % KI: 1.795- 4.205 Monate), beobachtet werden (11 vs. 3 Monate, 95 % KI-Intervall: 9.0-13.0 Monate vs. 1.8-4.2 Monate), da der mithilfe von Log-Rank-Statistiken ermittelte p-Wert von 0.01 unter dem zuvor definierten Signifikanzniveau von 0.05 liegt.

Dies ist gleichzeitig als starkes Indiz für die Wirksamkeit der pathophysiologischen Annahme einer Radiotherapie-induzierten verbesserten Antigenität der Tumorzellen zu werten und verdeutlicht, dass die Strahlentherapie einen bedeutenden Beitrag zur Wiederherstellung einer effektiven anti-Tumor Immunantwort leistet und zu einer verbesserten Wirksamkeit der Immuntherapie beiträgt.

IV. Diskussion

Der Durchbruch für die Immuntherapie in der Behandlung onkologischer Erkrankungen begann mit der Einführung des anti-CLTA-4 Antikörpers Ipilimumab als Zweitlinientherapie für das metastasierte Melanom im Jahr 2011 (57). Zahlreiche Studien konnten in der Folge ein gutes Ansprechen, wie auch ein deutlich verbessertes klinisches Outcome von IPI im Vergleich zur Standardtherapie mit der gp100-Vakzine für Patienten mit metastasiertem Melanom beobachten, wobei in einigen Patienten gar eine außergewöhnlich hohe Wirksamkeit mit teilweise jahrelangen Remissionsphasen gezeigt wurde (36, 50). Die 2016 zugelassene Kombinationstherapie von IPI mit dem PD-1-Inhibitor Nivolumab stellte sich in aktuelleren Studien gar als noch erfolgreicher bzgl. der klinischen Wirksamkeit heraus (198, 199). Nichtsdestotrotz konnte ein anhaltendes Ansprechen nur für einen Teil der Patienten beobachtet werden, wohingegen viele Patienten weiterhin entweder eine intrinsische Resistenz auf jene Immuntherapeutika zeigten oder aber diese im Verlauf der Therapie entwickelten (57). Darüber hinaus wurde ein Großteil jener Studien unter Ausschluss derjenigen Patienten mit aktiven Hirnmetastasen des malignen Melanoms durchgeführt (50), wodurch gerade diese Patientengruppe bisher kaum von den therapeutischen Fortschritten profitieren konnte. Dies ist vor dem Hintergrund der ohnehin limitierten Therapieoptionen im Stadium der zerebralen Metastasierung des malignen Melanoms als besonders fatal zu erachten, zumal jene Patientengruppe eine äußerst schlechte Prognose mit einem medianen OS von 4-5 Monaten aufweist (200). Auch wenn einige zuletzt veröffentlichte Studien nun ebenso für dieses Patientenkollektiv eine gute Wirksamkeit der Immuntherapeutika zeigen konnten (199, 201), nimmt die Strahlentherapie nach wie vor eine wichtige Rolle als wirksame Therapieoption in der Behandlung aktiver Hirnmetastasen ein.

Lange Zeit wurden die Effekte der Strahlentherapie insbesondere auf die Induktion des Zelltodes von Tumorzellen innerhalb des Bestrahlungsfeldes zurückgeführt (202). Mit dem Aufkommen der Immuntherapie rückte zunehmend die Freisetzung von TAA im Rahmen der radiogen-induzierten Apoptose von Tumorzellen in den Fokus der Aufmerksamkeit. Diese fördert die Tumorzellerkennung durch Stimulierung von APZ, eine vermehrte MHC-I-Expression auf der Zelloberfläche, wie auch die Freisetzung inflammatorischer Chemokine, die in Summe die Rekrutierung und zytotoxische Aktivität $CD8^+$ CTL unterstützen (6, 43, 202). Es ist in der wissenschaftlichen Forschung daher weitestgehend anerkannt, dass eine Strahlentherapie durch Auslösung des ICD nicht nur wesentliche Veränderungen im TME induziert, sondern gleichfalls die Erkennung von Tumorzellantigenen durch das Immunsystem und damit die Überwindung der tumorvermittelten Inhibition einer effektiven Immunantwort befördert (siehe **Abbildung 60**) (202). Übereinstimmend mit dieser Beobachtung konnte ein Fallbericht aus dem Jahr 2012 zeigen, dass ein Patient mit metastasiertem Melanom nach Bestrahlung einer lokalen paraspinalen Läsion signifikant besser auf eine Immuntherapie mit IPI angesprochen hatte und sich im Verlauf auch Metastasen außerhalb des Bestrahlungsfeldes als klinisch regredient erwiesen (202, 203). Diese pro-immunogenen Effekte einer Tumorbestrahlung, sind aktuell Gegenstand zahlreicher Forschungsvorhaben, zumal sie das pathophysiologische Substrat eines verbesserten Ansprechens auf eine Kombination von Radio- und Immuntherapie bilden (43).

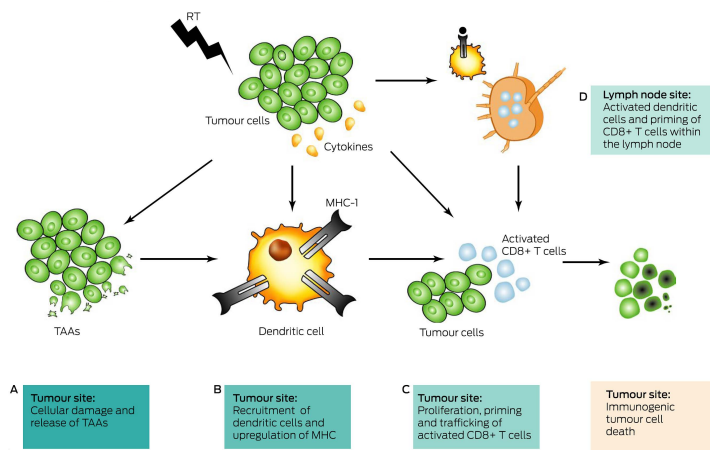


Abbildung 60: Effekte der Strahlentherapie auf das Tumormikromilieu. Durch die Bestrahlung solider Tumoren werden zahlreiche Veränderungen im TME angestoßen, die hier in einer schematischen Übersicht dargestellt sind: Diese umfassen zum einen den im Tumor ausgelösten Zellschaden und damit einhergehend die Freisetzung von TAA. In Folge der erhöhten Antigenität der Tumorzellen kommt es zur Rekrutierung von DZ und der Hochregulation von MHC-I Proteinen, was wiederum eine verbesserte Immunantwort mit einer Proliferation, dem Priming und Anlocken von aktivierten $CD8^+$ CTL auslöst und schließlich den ICD der Tumorzellen einleitet. Diese anti-Tumor Immunantwort wird weiter gefördert durch die Zirkulation aktivierter DZ in die umliegenden Lymphknoten und die damit einhergehende Aktivierung weiterer $CD8^+$ CTL (202).

Dass es durch diesen kombinierten Behandlungsansatz zu einer signifikanten Verbesserung des klinischen Outcomes kommt, konnten unter anderem retrospektive Untersuchungen von Knisely *et. al.* (58) in einer Kohorte von 77 Patienten nachweisen. Hierbei konnte in einem Kollektiv unter Einschluss aktiver Hirnmetastasen gezeigt werden, dass die zusätzliche Gabe von IPI (medianes OS: 21.3 Monate) einen deutlichen Überlebensvorteil im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung (STX) erbringt (medianes OS 4.9 Monate; $p=0.044$). Entgegen der pathophysiologischen Annahme einer Sensibilisierung der Immuntherapie durch die vorherige Bestrahlung, wurde in der Studie von Knisely *et. al.* allerdings kein signifikanter Einfluss der Therapiesequenz, d.h. für die Gabe von IPI vor oder nach Radiotherapie, auf das klinische Outcome festgestellt. Demgegenüber konnte eine prospektive Studie von Silk *et. al.* (13) nachweisen, dass nicht nur die zusätzliche Gabe von IPI zu einer signifikanten Verlängerung des Gesamtüberlebens (18.3 Monate vs. 5.3 Monate) führte, sondern das Gesamtüberleben auch wesentlich länger war, wenn IPI nicht vor, sondern im Anschluss an die Radiotherapie gegeben wurde (18.4 Monate vs. 8.1 Monate). Die sequentielle Kombination von IPI vor oder nach der Radiotherapie wurde hierbei in einem Kollektiv von 70 Patienten untersucht, wobei die Bestrahlung entweder als WBRT oder als SRS vorgenommen wurde. Dies bestätigt weitestgehend die im Rahmen der hier behandelten retrospektiven Studie erhobenen Befunde (36) eines verbesserten klinischen Ansprechens der Immuntherapie durch eine zuvor durchgeführte Radiotherapie (11 vs. 3 Monate, $p=0.041$). Die vorgestellte Arbeit prononciert darüber hinaus die Bedeutung der Interaktion einer Strahlen- mit der Immuntherapie, da IPI jeweils innerhalb eines sehr kurzen Zeitabstandes von maximal zwei Monaten vor oder nach Radiotherapie gegeben wurde. Gerade unter Berücksichtigung der damit einhergehenden und zu Beginn erläuterten pathophysiologischen Interaktionen der beiden Therapiemodalitäten erscheint diese Studie daher besonders interessant. Nichtsdestotrotz sollte bei der Bewertung der Studie gleichzeitig kritisch hinterfragt werden, inwiefern durch deren retrospektive Anlage ein potentieller Selektionsbias gefördert und damit eine vermeintliche kausale Verknüpfung

des klinischen Outcomes durch die Therapiesequenz suggeriert würde: So könnte das schlechtere Ansprechen derjenigen Patienten, welche eine Bestrahlung der Hirnmetastasen nach Einleitung der Immuntherapie erhalten hatten, auch auf die Notwendigkeit der Bestrahlung durch einen Tumorprogress zurückgeführt werden, womit dieses Patientenkollektiv möglicherweise bereits initial eine höhere Therapieresistenz infolge eines malignen Tumorphänotyps aufgewiesen haben könnte, als dasjenige Kollektiv, das eine Bestrahlung vor der Gabe von IPI erhalten hatte. Dass die pathophysiologischen Mechanismen der kombinierten Radioimmuntherapie vermutlich weitaus komplexer sind als hier angenommen und neben den immunologischen Effekten der RTx auch durch die intrinsischen Merkmale der verschiedenen Checkpoint-Inhibitoren determiniert werden, zeigen nicht zuletzt Untersuchungen im murinen Tumormodell, die ein verbessertes Ansprechen von PD-L1 Inhibitoren bei vorheriger Bestrahlung beobachteten, wohingegen das Ansprechen von CTLA-4-Inhibitoren durch eine nachfolgende Bestrahlung verbessert wurde (43).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit dennoch demonstriert werden, dass die Sequenz einer Bestrahlung gefolgt von einer IPI-Gabe, der Gabe von IPI vor der Bestrahlung in der Behandlung eines Patientenkollektivs mit aktiven Hirnmetastasen des Melanoms signifikant überlegen ist. Damit wird die Hypothese eines verbesserten Ansprechens von IPI durch eine vorherige Radiotherapie gestützt und die klinische Bedeutung eines solchen Kombinationsregimes betont. Gerade die außerordentliche Beobachtung, dass in jener Therapiegruppe sechs Langzeitüberlebende mit einer Beobachtungszeit von mehr als 36 Monaten identifiziert werden konnten, unterstreicht die therapeutische Wirksamkeit jenes Therapieregimes. Sollte sich der Befund der Behandlungsabfolge als möglicher prognostischer Faktor in der Kombinationsbehandlung aus Strahlen- und Immuntherapie im malignen Melanom im Rahmen weiterer Studien bestätigen, wird es nicht zuletzt nötig sein, diese Erkenntnisse in prospektiv angelegten Studien näher zu evaluieren (36).

Sowohl der klinische Erfolg der Immuntherapeutika, gerade im Rahmen von Kombinationsstrategien, wie auch die Tatsache, dass nach wie vor zahlreiche Patienten durch bislang unbekannte Resistenzmechanismen kein dauerhaftes Ansprechen auf eine Immuntherapie zeigen, führt unweigerlich die Notwendigkeit der Identifikation prädiktiver Faktoren vor Augen, welche ein Ansprechen auf jene Kombinationstherapien zuverlässig anzeigen können (57). Es wurde angenommen, dass die Identifikation solcher prädiktiver Biomarker nicht zuletzt eine optimierte Selektion der Patienten ermöglichen könnte, was im Hinblick auf die Vermeidung von potentiell schweren unerwünschten Nebenwirkungen – welche vermehrt unter Kombinationstherapien mit Immuntherapeutika auftreten – erstrebenswert erscheint (57, 204). Darüber hinaus ist es aufgrund der großen Zahl unterschiedlicher Therapie-Kombinationen denkbar, dass jene Biomarker ebenso eine bessere Stratifizierung der Patienten hin zu einer individuell angepassten Kombination, im Sinne einer personalisierten Tumorthherapie, zulassen könnten. Jedoch gibt es bislang – selbst für die Monotherapie mit IPI – weder anerkannte prädiktive Biomarker, die ein Therapieansprechen zuverlässig anzeigen könnten noch die entsprechenden, in der klinischen Routine anwendbaren Methoden zur Identifikation jener Biomarker (57).

1. Kartierung der Tumorheterogenität mithilfe der digitalisierten Bildanalyse aus whole-slide multiplex-Immunfluoreszenz-Präparaten

Im Folgenden soll daher zunächst das hier vorgestellte methodische Vorgehen zur digitalisierten whole-slide Bildanalyse von multiplex-IF-Färbungen im Kontext der aktuellen wissenschaftlichen Debatte und dessen Bedeutung für die Identifikation möglicher Biomarker im klinischen Setting diskutiert werden, bevor die klinische Relevanz der Erfassung spatialer Interaktionen mithilfe ebenjener Analysemethoden, sowie methodische Schwächen des Verfahrens erläutert werden.

1.1. Einordnung des methodischen Vorgehens in den wissenschaftlichen Kontext

Solide Tumoren sind enorm komplexe Gebilde, die sich durch eine starke Heterogenität, sowohl auf der Ebene der Tumorarchitektur, wie auch auf der Ebene klonaler und zellulärer Veränderungen auszeichnen und daher, wie oben gezeigt, nicht nur eine große Herausforderung für das therapeutische Herangehen, sondern auch für diagnostische Methoden darstellen. Die Verbesserung diagnostischer Methoden zur Darstellung von soliden Tumoren trägt daher entscheidend zu einer Verbesserung des klinischen Outcomes der Patienten bei, indem diese über die Identifikation von tumorspezifischen Resistenzmechanismen eine exaktere Stratifizierung von Patienten für ein Therapieansprechen auf eine Radioimmuntherapie anhand von potentiellen resistenzanzeigenden Prädiktoren ermöglichen kann. Die hier vorgestellte Arbeit zielte unter anderem auf die Etablierung eines methodisch stichhaltigen Konzepts zur Analyse solider Tumoren, welches potentielle Resistenzmechanismen zuverlässig abbilden kann und anhand derer eine objektive Quantifizierung solcher als relevant identifizierter Biomarker innerhalb des TME nachvollzogen werden kann.

Zahlreiche Studien haben dabei in den vergangenen Jahren zeigen können, dass die multiplex Immunhistochemie, wie auch die Mehrkanal-Immunfluoreszenz geeignete Methoden zur Identifikation von prognostischen und prädiktiven Biomarkern sein können (144, 183, 205). Gerade die Anwendung multiparametrisch-ausgeführter IF-Färbungen ermöglicht durch die simultane Darstellung zahlreicher Biomarker in einer einzelnen Gewebeprobe nicht nur eine genauere Phänotypisierung der einzelnen Zelltypen, ganz im Sinne der multiparametrischen FACS-Analyse, sondern zugleich die exakte Darstellung der histologischen Lokalisation der Tumor- und Immunzellen innerhalb des Tumors und damit eine Analyse der spatialen Interaktionen unterschiedlichster Zellen auf mikroregionärer Ebene im TME, wie auch auf der Ebene des whole-slide Tumorpräparates (181, 205). Dies verleiht ihr einen enormen Vorteil gegenüber der konventionellen IHC, die aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur multiparametrischen Färbung keine exakte Phänotypisierung der Immun- wie auch der Tumorzellen ermöglicht, und macht sie zu einem wertvollen Tool bei der Suche nach effektiven prognostischen und prädiktiven Biomarkern in soliden Tumoren.

Die in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus gerückte Möglichkeit ganze multiplex IF-Tumorpräparate in Form von hochauflösenden digitalen whole-slide Scans zu visualisieren und mithilfe automatisierter Bildanalysetechniken auszuwerten wird hierbei als revolutionärer Schritt für

die Diagnostik von Biomarkern in soliden Tumoren, als auch für die ganze klinische Pathologie angesehen, da hierdurch tiefe Einblicke in die Tumorbiologie und das Zusammenspiel verschiedener Zellpopulationen im TME gewährt werden (14). Zeitgleich mit dem Aufkommen dieser sogenannten digitalen Pathologie (206) entstand die Notwendigkeit die hierdurch generierte Fülle an Informationen zum TME einer qualitativ hochwertigen, reproduzierbaren, objektiven und reliablen Analyse mithilfe starker und zuverlässiger Software-Tools zuzuführen (207). So wurden in den letzten Jahren zahlreiche Programme zur Bildanalyse entwickelt (u.a. ImageJ, CellProfiler oder Icy), die die Auswertung digitalisierter Tumorpräparate ermöglichen sollten (208). Dabei konnten Studien von Lopes *et. al.* bereits früh zeigen, dass die Methode der automatisierten digitalen Bildauswertung ähnlich exakte Ergebnisse im Hinblick auf die Quantifizierung bestimmter Biomarker in einem Tumor hervorbringt, wie die konventionelle, durch den Untersucher vollzogene visuelle Analyse der Präparate (143). Es wurde weiterhin festgestellt, dass die digitalisierte Bildanalyse ebenso die Möglichkeit bietet, komplexe morphologische Informationen, welche dem menschlichen Untersucher oft verborgen bleiben, mathematisch aber objektivierbar sind, besser zugänglich zu machen (149).

Zumal in dieser Arbeit mit whole-slide Präparaten, gerade solche Präparate mit einer enormen Informationsfülle, analysiert werden sollten, wurde für die Auswertung das digitale open-source Bildanalyseprogramm QuPath etabliert. Dies ist eine neue Methode zur whole-slide Analyse von Tumorpräparaten, welche den Aufbau individueller Arbeitsabläufe, den Einsatz von ausgedehnten Skript-Funktionen, den Austausch mit bereits existierenden Programmen wie ImageJ, sowie die Auswertung komplexer Gewebe auch auf der Ebene spatialer Interaktionen ermöglicht und damit den Anforderungen der digitalen Pathologie weitestgehend gerecht wird (14). Dabei unterstützt QuPath ebenso die quantitative Auswertung von multiparametrischen IF-Präparaten, sodass eine effektive Darstellung umfangreichster Informationen zur Expressionsstärke der Biomarker, deren Ko-Lokalisation, wie auch der örtlichen Expressionsverteilung vorgenommen werden konnte, welche durch die Korrelation mit klinischen Parametern den methodischen Schlüssel zur Identifikation neuer Prädiktoren eines verbesserten Therapieansprechens bildet (149).

Ein wesentlicher Vorteil dieser neuen Methode gegenüber anderen Bildanalyse Programmen liegt einerseits in der verbesserten Identifikation des Tumors im whole-slide Präparat, aber insbesondere in einem hierarchischen Objekt-basierten Modell zur Datengewinnung (14): So erscheint das Vorgehen der automatisierten einzelzellbasierten Segmentierung mit anschließender Klassifikation des Tumors in einzelne Zellpopulationen- und subpopulationen vor dem Hintergrund der enormen Heterogenität innerhalb des TME dahingehend sinnvoll, da hierdurch sowohl einzelne Zellklassen durch die parallele Erfassung multipler Biomarker phänotypisch charakterisiert und identifiziert, als auch die Interaktionen der einzelnen Zellpopulationen miteinander besser verstanden und damit der gesamte Tumorphänotyp detailliert beschrieben und in Form einer quantitativen Karte verschiedener Zellpopulationen dargestellt werden kann. Die automatisierte Zelldetektion auf Basis des einzelzellbasierten Segmentierungsalgorithmus ist zudem eine vermeintlich objektivere und reliablere

Methode zur Identifikation einzelner Zellen, als die konventionelle visuelle Auswertung, was nicht zuletzt Studien zur Interrater-Reliabilität bestätigen konnten (143).

Es konnte in dieser Arbeit weiterhin gezeigt werden, dass die selektive Klassifikation einzelner Zellpopulationen mithilfe des hier verwendeten maschinellen Lern-Algorithmus eine exakte und weitestgehend objektive Methode darstellt: Dieser wurde interaktiv anhand von Parametern wie der Intensität und dem Anteil der zellulären bzw. zytoplasmatischen Färbung, der Zellmorphologie und der Lokalisation innerhalb der Tumorarchitektur trainiert, und lieferte sodann zuverlässige Resultate in Bezug zur Klassifikation von Zellen anhand der Expression multipler Biomarker (14), sodass die Kartierung des Tumormikromilieus massiv erleichtert wurde. Mithilfe der hier etablierten Methode konnte somit eine genaue phänotypische Charakterisierung der Zellen innerhalb des TME, wie auch deren spatiale Informationen umfassend beschrieben werden. Gerade zur Charakterisierung des Immun-Kontexts i.S. eines Immune-Profilings, spielt bekanntermaßen die exakte phänotypische Identifikation der einzelnen Zellpopulationen eine tragende Rolle, zumal deren relativer Anteil und Aktivitätsstatus innerhalb des Tumors als bedeutende Prädiktoren für das Ansprechen auf eine Immuntherapie angesehen werden (57). Eine objektive und im klinischen Alltag implementierbare Methode, wie die hier gezeigte, kann somit zu einer Verbesserung der bisherigen pathologischen Diagnostik beitragen, indem diese um präzisere und den Arbeitsablauf beschleunigende Werkzeuge der Analyse ergänzt wird, sodass mögliche Resistenzmechanismen besser identifiziert und somit eine genauere Stratifizierung der Patienten für eine Immuntherapie, im Sinne einer personalisierten Tumortherapie, ermöglicht werden können.

1.2. Die digitalisierte Bildanalyse in QuPath zur Erfassung spatialer Interaktionen

Die im Rahmen der Analyse in QuPath generierten quantitativen Daten können zwar Einblick in die globalen tumorimmunologischen Eigenschaften, den Anteil der jeweiligen Zellpopulationen und die Biomarkerexpressionen innerhalb des Tumors bieten und damit zahlreiche klinische Zusammenhänge mit den erfassten Biomarkern aufzeigen. Das Kartographieren der spatialen und morphologischen Interaktionsmuster zwischen den verschiedenen klassifizierten Zellpopulationen auf mikroregionärer Ebene und der anschließende Austausch dieser spatialen Informationen mit Analyseprogrammen wie ImageJ und MosaicSuite, um diese Zusammenhänge im Detail zu untersuchen, tragen allerdings nochmals wesentlich zu einem besseren Verständnis der enormen Heterogenitäten im TME bei: So haben bereits Untersuchungen aus den 1990er Jahren feststellen können, dass neben einer starken quantitativen Infiltration $CD8^+$ CTL in den Tumor, auch das Infiltrationsmuster der $CD8^+$ CTL entscheidenden Einfluss auf die weitere Prognose im malignen Melanom ausübt (23, 182). Untersuchungen von Bindea *et. al.* konnten nun zeigen, dass die Heterogenität der Immunzellinfiltration in verschiedenen Bereichen des Tumors eine große Bedeutung für das klinische Outcome hat und damit eine separate Analyse der spatialen Zellinteraktionen über verschiedene Bereichen des Tumors ein wichtiges Werkzeug bei der Analyse des Immunkontexts von Tumoren darstellen kann (181, 209). Durch die Hinzunahme einer zusätzlichen zeitlichen Komponente können

darüber hinaus auch klinisch wertvolle Informationen zur spatialen Dynamik der Immunzellen erfasst werden (181). Hier konnte gezeigt werden, dass die spatialen Beziehungen der Immunzellen untereinander – vor, während und nach einer Immuntherapie – ein signifikantes prognostisches Potential aufweisen (149). Aufgrund der Relevanz einer exakten Beurteilung der Immunzellinfiltration für ein umfassendes Immune-Profilung, wurden in der vorliegenden Studie neben quantitativen whole-slide Analysen auch separate mikroregionäre spatiale Interaktionsanalysen kleinerer Ausschnitte des whole-slide Präparates in MosaicSuite erstellt. Hierdurch sollte nicht zuletzt der intratumoralen Heterogenität des Tumors Rechnung getragen werden, da das Infiltrationsmuster und das Interaktionsmuster der Immunzellen in Abhängigkeit von deren Lokalisation innerhalb des Tumors, wie auch im Verlauf der Zeit, entscheidenden Veränderungen unterworfen ist.

Darüber hinaus bietet die digitalisierte Bildanalyse die Möglichkeit, die spatialen Beziehungen innerhalb des TME mithilfe von spatialen Distanzmessungen zu quantifizieren. So haben u.a. Feichtenbeiner *et. al.* (210) zeigen können, dass die Distanzen zwischen verschiedenen Immunzell-Populationen eine signifikante Assoziation zum klinischen Outcome besitzen, was durch die Resultate der hier durchgeführten Studie gerade für die Interaktionen zwischen hypoxischen Tumorzellen und CD8⁺ CTL eindrucksvoll bestätigt werden kann.

Zuletzt bietet das automatisierte Vorgehen bei der Gewinnung der quantitativen Daten zur spatialen Analyse den Vorteil, dass auch solche Bereiche des Tumors enthüllt werden können, welche in der visuellen Analyse aufgrund einer geringen oder auch massiven Immunzellinfiltration möglicherweise keine Interaktionsmuster zwischen Tumor- und Immunzellen erkennen ließen, aber dennoch klinische Bedeutung besitzen (181). So konnten Kruger und Kollegen zeigen, dass auch in solchen Tumoren mit einer spärlichen Immunzellinfiltration teilweise starke Interaktionen zwischen den Immun- und Tumorzellen im Sinne eines inflammatorischen Tumormikromilieus existieren, welche mithilfe sogenannter Clustering-Strategien im Rahmen der automatisierten Bildanalyse zuverlässig erfasst werden konnten (211). Dieser Befund konnte gleichfalls im Rahmen unserer Studie erhoben werden.

Insgesamt ermöglicht die digitalisierte Bildanalyse durch die zusätzliche Erfassung dieser spatialen Interaktionen neue und umfassende Einblicke in das TME. Im Rahmen dieser Studie wurde so die Untersuchung der pathophysiologischen Hypothese einer Hypoxie-vermittelten und Adenosin-getriebenen Inhibition der anti-Tumor-Immunantwort ermöglicht.

Trotz der beschriebenen Vorteile der mikroregionären spatialen Interaktionsanalyse, erscheinen für die Zukunft – aufgrund der relativen Begrenzung von Mosaic auf Mikroregionen von ca. 70.000 Zellen – Plattformen zur spatialen Interaktionsanalyse ganzer whole-slide Tumorpräparate, wie sie bspw. bereits in R etabliert wurden sinnvoller, zumal diese nicht nur eine umfassendste und exakte Quantifizierung der spatialen Interaktionen, sondern sogleich eine gezieltere Analyse größerer Gewebeverbände ermöglichen (212). Nichtsdestotrotz vermag die mikroregionäre Betrachtung der spatialen Interaktionen gerade dann besonders wertvolle Zusammenhänge aufzeigen, wenn es zu einer starken Variabilität in dem Vorkommen des zu untersuchenden pathophysiologische Zusammenhangs innerhalb des Tumors, bspw. aufgrund von dominanteren resistenzvermittelten Effekten, kommt.

1.3. Methodische Schwächen der einzelzellbasierten quantitativen Analyse

Obgleich sich die vorgestellte Methode der 4-Farben-IF-Färbungen mit der anschließenden einzelzellbasierten digitalen Bildanalyse als ein zuverlässiges und innovatives Vorgehen zur Auswertung solider Tumoren herausgestellt hatte, ist sie dennoch mit einigen Schwächen behaftet: So ist eine ausreichende Qualität der IF-Färbungen bereits unabdingbare Voraussetzung für die Qualität der Auswertungsmethodik. Mithilfe der einzelzellbasierten Segmentierung auf Grundlage der Kernfärbung im DAPI Kanal können die einzelnen Zellen innerhalb des Tumors zwar bereits mit hoher Genauigkeit erfasst werden, ebenso wie eine Unterscheidung in klar definierte Zellpopulationen, wie in Tumor und Stroma, mithilfe des maschinellen Lernens bereits präzise und weitgehend objektiv möglich ist. Allerdings enthalten die vorgestellten Analysen gerade bei der Subklassifikation der Zellpopulationen anhand des Schwellenwertprinzips weiterhin eine subjektive Komponente. Die Auswertung erfolgte deshalb in Einzelschritten in vorgegebener Reihenfolge im Sinne einer „standard operating procedure“ (SOP). Die Reproduzierbarkeit wurde durch Re-Analyse zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewährleistet. Hierbei wurde angenommen, dass durch die Komplexität und Größe der Präparate ein „Wiedererkennen“ unwahrscheinlich ist. Die Ergebnisse zeigten eine geringe Variabilität von lediglich 1-5 %, mithin eine gute Reproduzierbarkeit.

Der Umfang der Untersuchungen und die resultierende Datenmenge spiegeln die große inter- und intratumorale Heterogenität der Gewebeproben wider. Dies machte eine Reduktion der Daten auf diejenigen Tumorpräparate erforderlich, welche die individuellen Eigenschaften mit der vermeintlich höchsten Repräsentativität beschreiben. Dieser Prozess stellt eine der wesentlichen Herausforderungen im Umgang mit Tumorgewebe als Datenquelle dar. Bislang existieren hierfür nur rudimentäre Strategien, weil die hier diskutierten Methoden neu sind. Wenn bislang bspw. in Proteom-Analysen von Gewebeextrakten mittels Western Blotting die Expression eines Proteins analysiert wurde, so war das Reporting der Ergebnisse trivial, weil es nur einen Wert gab. Bei der einzelzellbasierten Analyse des identischen Proteins stellen sich viele Fragen: „In welchem Zelltyp? Wo im Tumor? In der Nähe von Blutgefäßen? In der Nähe von Immunzellen? Mit gleichmäßigem Muster? In Form von „hot spots?““. Die Etablierung von Strategien zur sinnvollen und zuverlässigen Komprimierung dieser Daten wird daher in Zukunft von entscheidender Bedeutung sein, zumal gezeigt werden konnte, dass die Heterogenität der Tumorimmunstruktur gleichermaßen durch den Zeitpunkt der Probenentnahme (vor, während oder nach Beginn der Therapie) und die untersuchte Gewebeart determiniert wird (213).

Weiterhin wurde bei der Auswertung deutlich, dass für eine exakte Identifikation der Melanomzellen neben deren pathologischen Charakteristika (z.B. Kernpolymorphie, Atypie, Bildung von Tumorzellnestern), die Verwendung einer eigenen immunhistochemischen Markerkombination wünschenswert gewesen wäre. Solche Marker existieren für das Melanom (z.B. Melan-A, S100 β). In Zweifelsfällen wären so einzelne Zellen mit höherer Sicherheit einem bestimmten Histotyp (Tumor vs. Stroma) zuzuordnen gewesen, was eine wesentliche Bedingung für das Gelingen der Zellklassifikation auf Basis des maschinellen Lernens ist. Dies zeigt, dass höher multiplexierende Färbetechniken gerade im Hinblick auf eine exakte Beschreibung des TME in Zukunft nützlich sein werden:

So sind NK-Zellen neben den CD8⁺ CTL wesentlich an der Exekution einer effektiven anti-Tumor-Antwort beteiligt, wobei die alleinige Identifikation dieser Zellpopulation noch keine Rückschlüsse beispielsweise zu deren aktuellen Aktivitätszustand zulässt, der durch Marker wie Granzym B, Perforin, CD80/86, PD-L1 oder CTLA-4 ergänzt werden könnte. So haben Untersuchungen von Berghoff *et. al.* (214) die Bedeutung der Expression von PD-L1 auf Tumor- und Immunzellen für die Infiltration und Aktivität von CD8⁺ CTL weiter verdeutlichen können. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung konnten weitere Studien eine starke prognostische Relevanz einer erhöhten PD-L1 Expression bzw. einer vermehrten PD-1/PD-L1 Interaktion mit dem klinischen Outcome nachweisen (205, 214, 215). Es wurde weiterhin gezeigt, dass auch CD4⁺ T-Helferzellen einen signifikanten Einfluss auf das Ansprechen auf eine Immuntherapie mit CTLA-4 Inhibitoren im malignen Melanom haben (216), was deren Bedeutung in der Interaktion mit CD8⁺ CTL offenlegt. Aber auch die simultane Abbildung solcher Immunzellpopulationen, welche für die Inhibition der antitumoralen Immunantwort und damit die Immunevasion des malignen Melanoms verantwortlich sind, allen voran seien hier FoxP3⁺ T_{reg}, MDSC und M2-Makrophagen genannt, könnte wesentliche Einblicke in die Interaktion dieser inhibitorischen Immunzellpopulationen mit CD8⁺ CTL liefern und damit deren Bedeutung im malignen Melanom genauer darlegen. Hier haben bereits zahlreiche Untersuchungen (12, 96, 121, 122) die negative prognostische Bedeutung FoxP3⁺ T_{reg} für das Therapieansprechen im malignen Melanom aufzeigen können, wobei allerdings deren *in-vivo*-Bedeutung und insbesondere deren Adenosin-vermittelte-Inhibition CD8⁺ CTL noch weitestgehend unklar bleibt. Die Komplexität des Adenosinmetabolismus mit den beiden Schlüsselenzymen CD39 und CD73 erfordert deshalb auch dahingehend eine ausreichende Berücksichtigung, als dass die simultane Darstellung der beiden Tandemenzyme zu einer ganzheitlichen Erfassung der ADO-Synthese im Tumor beitragen kann. Im Hinblick auf eine umfassende Darstellung der Adenosin-vermittelten-immunsuppressiven Mechanismen erscheint es daher zukünftig unabdingbar, entweder solche multiplex IF-Färbungen durchzuführen, die eine umfassende Anzahl potentieller Surrogat-Marker abbilden können oder aber ein Zusammenführen seriell gewonnener Histologiepräparate desgleichen Tumors zu ermöglichen, welche wiederum in Summe ebenfalls eine hohe Anzahl verschiedener Biomarker erfassen können. Zwar unterliegen Fluoreszenz-basierte Verfahren, aufgrund der breiten Absorption und der Emissionsspektren der Fluorochrome, der Limitation eine begrenzte Anzahl ca. sieben verschiedener Antigene simultan detektieren zu können, allerdings konnten bereits einige multiplex-Strategien diese Hürde durch ein zyklisches Verfahren aus Antikörper-Färbung, Detektion und anschließendem Bleaching der Fluorochrome zumindest teilweise überwinden (145, 217). Gerade vor diesem Hintergrund kann die von Bodenmiller *et. al.* beschriebene Methodik mit der Abbildung von 32 und bis zu 100 Antigenen in subzellulärer Auflösung als revolutionäre Entwicklung auf dem Gebiet der Multiplex-Abbildung solider Tumoren angesehen werden (218). Diese Methode stellt dabei eine Kombination immunhistochemischer und immunzytochemischer Verfahren dar, die durch eine anschließend durchgeführte hochauflösender Laserablation mit der CyTOF-Massenzytometrie die simultane Darstellung dieser großen Zahl verschiedener Biomarker ermöglicht (218).

Eine weitere Möglichkeit zur exakteren Darstellung der tumorarchitektonischen und immunologischen Verhältnisse innerhalb des TME bietet das Zusammenführen immunhistochemischer Färbungen von seriell gewonnenen Tumorschnitten (auch als multiparametrische Immunhistochemie in registrierten Serienschnitten, kurz MIRSS bezeichnet) i.S. einer dreidimensionalen Abbildung der Tumorarchitektur und dessen individueller zellulärer Zusammensetzung (7, 219). Hierbei ermöglichen Programme wie Image-Pro Premier 3D (Media Cybernetics, Rockville) dreidimensionale Rekonstruktionen der seriell geschnittenen zweidimensionalen whole-slide Präparate (220). Natürlich sollte an dieser Stelle hinterfragt werden, ob die Fusion seriell gewonnener histologischer Präparate nicht mit einem Informationsverlust durch die fehlende Detektion von Zellen in verschiedenen histologischen Schnittebenen des Präparates einhergeht, wodurch deren Bedeutung in einer 3D Rekonstruktion damit tendenziell schwächer abgebildet würde.

Insgesamt kann die hier vorgestellte Methode trotz ihrer Limitation bei der simultanen Darstellung multipler Biomarker und der whole-slide Analyse spatialer Zellinteraktionen als eine neuartige und bisherige Verfahren ergänzende Entwicklung für die Auswertung solider Tumoren im Rahmen der digitalen Pathologie angesehen werden. Diese ermöglicht nicht zuletzt durch das Vorgehen zur spatialen Analyse der Zellinteraktionen auf mikroregionärer Ebene detaillierte Einblicke in die tumorimmunologischen Verhältnisse i.S. eines Immune-Profilings, wie auch in deren Zusammenspiel mit dem Tumormetabolismus und anderen potentiellen resistenzvermittelnden Faktoren.

2. Nachweis hypoxisch-vermittelter Mechanismen zur Inhibition einer anti-Tumor Immunantwort im Tumormikromilieu des malignen Melanoms

In zahlreichen präklinischen und klinischen Studien werden derzeit Mechanismen untersucht, die es Tumoren ermöglichen, der Überwachung und der effektiven anti-Tumor-Antwort des Immunsystems zu entgehen. Als ein entscheidender Faktor für die im TME stattfindenden Anpassungsvorgänge in Richtung einer Immunevasion und Immunresistenz von malignen Tumoren wird hierbei die Tumorphypoxie angesehen (221). Diese trägt nicht nur zur Plastizität des Tumorgewebes bei, sondern ist gleichwohl eine wesentliche Ursache für die Entwicklung von Resistenzen gegen medikamentöse wie interventionelle Behandlungsstrategien, allen voran die Strahlen- und Immuntherapien (213). Als pathophysiologisch bedeutsamer Mechanismus für die Resistenz des Tumors gegen die Immuntherapie wurde hierbei die Hypoxie-vermittelte und Adenosin-getriebene Inhibition der anti-Tumor-Immunantwort postuliert (125): So konnten Brooks und Kollegen bereits für Kopf-Hals-Tumoren mithilfe spatialer Analysen zeigen, dass die Ausprägung der Tumorphypoxie in bestimmten Tumorebenen invers mit der Infiltration durch $CD3^+$ Lymphozyten korreliert ist (185). Darüber hinaus wurde in einer weiteren Studie gezeigt, dass sowohl die Infiltration, als auch die Effektorfunktionen der für eine effektive antitumorale Immunantwort wesentlichen $CD8^+$ CTL in hypoxischem und adenosin-reichem Gewebe des TME gehemmt wird (125). Im Rahmen unserer Studie sollte jener Zusammenhang durch die spatiale mikroregionäre spatiale Analyse der Zellinteraktionen untersucht und durch Distanzanalysen auf Ebene des whole-slide Tumors weiter quantifiziert werden. Dabei

wurde gezeigt, dass das Ausmaß der hypoxischen-Inhibition der CD8⁺ CTL variabel ist und sich je nach immunologischem Phänotyp des Tumors und je nach betrachteter Mikroregion unterschiedlich präsentiert: So zeigte sich im Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats, wie auch in immunologisch naiven Tumoren, ein äußerst starker Einfluss der Tumorphoxie auf die Inhibition CD8⁺ CTL (i.S. stark negativer Interaktionsstärken in der spatialen Analyse), wohingegen in Tumoren einer vorbestehenden Immunität die hypoxisch-vermittelte Inhibition CD8⁺ CTL eher schwach ausgeprägt war. Ein möglicher Grund ist das Fehlen einer sich überschneidenden Expression der Marker GLUT-1 und CD73 im Phänotyp des immunogenen Tumors. Damit kommt es in jenem Phänotyp potentiell in geringerem Umfang zu einer ADO-vermittelten Inhibition von CD8⁺ CTL und folglich zu einer Disinhibition der antitumoralen Immunantwort. In diese Richtung deutet bspw. die ausgeprägte antitumorale Immunaktivität in CD73-defizienten Mäusen, die von Stagg *et al.* (222) beobachtet wurde. Daneben sollte die geringe Anzahl von Fällen mit jenem Phänotyp (n=6) als ein möglicher Grund für die vermeintlich schwächere hypoxische Inhibition CD8⁺ CTL angeführt werden, weil diese eine größere Anfälligkeit für eine statistische Beeinflussung durch Extremwerte bewirkt. Nicht zuletzt kann aber auch die Größe der mikroregionären Betrachtungsebene, wie auch die Variabilität in der Ausprägung der Tumorphoxie in den unterschiedlichen immunologischen Tumorphänotypen und die damit einhergehende individuell unterschiedliche Ausprägung der metabolischen Umprogrammierung des Tumors als ursächlich für das unterschiedliche Ausmaß der Inhibition einer adäquaten Immunantwort erachtet werden. So wurde bspw. in immunologisch anergen Tumoren ein sehr hoher Anteil hypoxischer Tumorzellen beobachtet, wohingegen in Tumoren vom inflammatorischen Phänotyp eine sehr geringe Ausprägung der Tumorphoxie gefunden wurde. Dies erschwert in erster Konsequenz den direkten Vergleich der Stärke der hypoxisch-vermittelten Inhibition, da das unterschiedliche Ausmaß der Tumorphoxie über dessen Auswirkungen für die maligne Progression gleichfalls zu einer starken Veränderung des Immunkontexts insgesamt führen kann. Hier konnten bereits Joyce *et al.* (71) zeigen, dass es zu einer unterschiedlich starken Evasion von Immunzellen in Abhängigkeit der Stärke und Lokalisation der Tumorphoxie innerhalb des Tumors kommt, wobei gerade Hypoxieareale im Kern des Tumors eine besonders starke Immunevasion zur Folge hatten, wohingegen am Rand des Tumors trotz der dort vorherrschenden hypoxischen Bedingungen eine vermehrte Immunzellinfiltration beobachtet werden konnte (223). Es ist daher naheliegend, dass nicht nur das Vorhandensein der Hypoxie selbst für die Immunevasion verantwortlich ist, sondern diese vielmehr über eine Vielzahl unterschiedlichster Mediatoren ihr immunsuppressives Potential ausübt. Aber auch auf globaler Ebene konnte in einer Studie von Singer *et al.* bereits der Befund einer hypoxischen Inhibition CD8⁺ CTL für ein Patientenkollektiv mit Nierenzellkarzinomen beobachtet werden. Hier wurde anhand spatialer Analysen und mittels Korrelationsanalysen eine signifikante negative Korrelation zwischen dem Ausmaß der GLUT-1 Expression im Tumor und der Infiltration CD8⁺ CTL gezeigt (224). Dieser Befund konnte in der hier durchgeführten Korrelationsanalyse (Pearson's r: -0.38, p=0.025) erstmals auf mikroregionärer, wie auf globaler Ebene, für das maligne Melanom gezeigt werden.

Aktuelle Studien, welche die Relevanz von CD73 für die Inhibition einer CD8⁺ CTL-vermittelten Immunantwort *in-vivo* untersuchen, zeigen demgegenüber divergierende Resultate. Zwar gibt es einige Hinweise für die Bedeutung von CD73-produziertem Adenosin für die Inhibition einer effektiven Immunantwort *in-vitro* (140, 172), diese Beobachtungen konnten bislang allerdings nur unregelmäßig durch *in-vivo*-Versuche bestätigt werden (225). Spatiale Analysen zur Interaktion CD8⁺ CTL und CD73 positiver Tumorzellen sollten daher neue Einblicke in jene Zusammenhänge *in-vivo* liefern.

Im Rahmen unserer Studie konnte eine große Variabilität in der intra – und intertumoralen CD73 Expression beobachtet werden. Weiterhin konnte keine stabile Ko-Lokalisation von GLUT-1^{stark} und CD73 gezeigt werden. In Anbetracht dieser indirekten Hinweise einer fehlenden stabilen hypoxischen Hochregulation von CD73, erscheint die pathophysiologische Annahme einer HIF-1 α -vermittelten Induktion von NT5E (CD73) für unser Patientenkollektiv zumindest fragwürdig. Bemerkenswert war ferner, dass gerade Präparate mit dem Phänotyp des exkludierten Infiltrats häufiger Areale mit einer Ko-Lokalisation beider Marker aufwiesen. Es kann daher gemutmaßt werden, dass in diesem Phänotyp die Hypoxie-induzierte ADO-Akkumulation ein potentiell wirkungsvoller Mediator eines Immunescape im malignen Melanom sein könnte. Dabei führte eine starke CD73 Expression in hypoxischem Tumorgewebe zur signifikanten Vergrößerung der Distanzen zwischen TIL und Tumorzellen, was für die Wirksamkeit der hypoxisch-vermittelten und ADO-getriebenen Inhibition der CD8⁺ CTL spricht. Dieser Befund ist konsistent mit den bereits von Ohta *et. al.* gemachten Beobachtungen einer über den A_{2A}-Rezeptor vermittelten Inhibition CD8⁺ CTL in adenosinreichem Gewebe (96, 98, 112). Die spatiale mikroregionäre Analyse zum Interaktionsmuster der Immunzellpopulation und der Population CD73⁺ Zellen kann darüber hinaus aufzeigen, dass es sich um eine nicht zufällige Exklusion der CTL aus jenen CD73 positiven Tumorbereichen handelt. Gleichzeitig muss aber auch in Betracht gezogen werden, dass der Befund eines hypoxischen und adenosinreichen Tumors nur in einer Teilmenge (n=9) des untersuchten Patientenkollektivs beobachtet werden konnte und das dort gefundene Ausmaß der Inhibition der CD8⁺ CTL äußerst variabel war. Es ist weiterhin fraglich, ob die in der spatialen Analyse gefundene Inhibition der CD8⁺ CTL nicht doch hauptsächlich durch die Tumorphypoxie vermittelt wird und die ADO-Akkumulation vielmehr ein übergeordnetes Epiphänomen oder gar einen Konfounder im Rahmen der Hypoxie-vermittelten malignen Progression darstellt. Dies könnte erklären, warum im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorgestellten präklinischen Studien, in unseren Korrelationsanalysen für das gesamte Kollektiv keine signifikanten Resultate zwischen dem Ausmaß der CD73 Expression im Tumor und dem Ausmaß der CD8 Infiltration, sondern lediglich in einer Subpopulation mit einer starken intratumoralen CD73 - und GLUT-1 Expression Tendenzen einer Evasion CD8⁺ CTL (r: -0.523, p=0.149), gefunden wurden. Diese inkonsistenten Befunde betonen die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen, die die Bedeutung der Hypoxie-vermittelten ADO-Akkumulation für die Inhibition einer effektiven Immunantwort *in-vivo* erfassen. Die kombinierte Darstellung der als Surrogats für die ADO-Konzentration identifizierten Marker CD39 und CD73, wie auch die Abbildung des ADO-Einflusses über den A_{2A}-Rezeptor, könnten hier ein vermeintlich genaueres Assessment des ADO-Metabolismus offerieren.

Der Befund einer hypoxisch-vermittelten Inhibition der anti-Tumor-Immunantwort in Abhängigkeit des Phänotyps der Tumormunität im malignen Melanom ist nach unserem derzeitigen Kenntnisstand allerdings noch nicht in der wissenschaftlichen Forschung vorbeschrieben. Insbesondere unterstützt dieser Befund die pathophysiologische Hypothese einer Hypoxie-vermittelten Inhibition CD8⁺ CTL *in vivo*. So scheint der Einsatz von therapeutischen Maßnahmen zur Inhibition der hypoxisch-vermittelten Veränderungen im TME, wie der Einsatz der respiratorischen Hyperoxie, besonders sinnvoll für Patienten mit dem Phänotyp des IET, da hier die Mechanismen der hypoxisch-vermittelten Inhibition einer effektiven anti-Tumor Immunantwort besonders stark wirksam sind und so trotz einer hinreichenden Infiltration von CD8⁺ CTL in den Tumor keine adäquate Immunantwort zustande kommen kann (225). Diese bereits in präklinischen Studien getesteten Therapeutika könnten jene Effekte abschwächen und zur Wiederherstellung einer effektiven anti-Tumor Immunantwort und einem besseren Ansprechen einer Radioimmuntherapie beitragen (125). Hingegen erscheint die Anwendung für Patienten vom Phänotyp des IIT fragwürdig, da hier mit dem Fehlen einer suffizienten T-Zell-Infiltration die Grundvoraussetzung einer adäquaten Immunantwort nicht gegeben ist (225).

3. Klinische Relevanz prädiktiver Biomarker für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie beim zerebral metastasierten malignen Melanom

Die Immuntherapie mit IPI hatte sich als effektive therapeutische Option für Patienten im metastasierten Stadium des malignen Melanoms erwiesen, da diese die Wiederherstellung einer effektiven anti-Tumor Immunantwort wesentlich unterstützt und damit zu einer signifikanten Verbesserung im klinischen Ansprechen, der Induktion einer Remission, wie auch der medianen Überlebenszeit führte (50). Allerdings wurde gleichfalls beobachtet, dass es oft nur in einer Teilmenge der Patienten – welche in der Literatur zwischen 20-40 % angegeben wird – zu einem anhaltenden Therapieansprechen und damit langfristigen klinischen Remissionen kam (24). Zwar kann durch die Kombination der Strahlentherapie mit verschiedenen Immuntherapeutika das Ansprechen der Therapie nochmals verbessert werden. Nichtsdestotrotz hat das Aufkommen der Immuntherapien die Notwendigkeit geschaffen ein weiteres Verständnis der Tumormunität zu erlangen, um ein mögliches Ansprechen besser voraussagen zu können und diejenige Teilmenge zu identifizieren, welche den größten Nutzen von einer solchen Therapie hat (24). Da aktuelle Studienresultate Hinweise dafür erbrachten, dass ein immunologisch aktives TME ein bedeutender Prädiktor für ein Ansprechen der Radioimmuntherapie sein könnte, sollte für diese Arbeit mit CD8 zuvorderst ein Marker für die zytotoxische Aktivität der anti-Tumor-Immunantwort untersucht werden (148, 226). Darüber hinaus wurden die Tumorphoxie und die Akkumulation von ADO als pathophysiologisch relevante negative Einflussfaktoren der Tumormunität identifiziert, weshalb hiernach die klinische Relevanz des Hypoxiemarkers GLUT-1 und des Adenosin-synthetisierenden Enzyms CD73 für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie diskutiert und gleichzeitig kritisch hinterfragt werden soll, inwiefern diese Erkenntnisse zu einem besseren Verständnis der Tumormunologie beitragen.

3.1. CD8 positive zytotoxische Lymphozyten als Prädiktoren eines Ansprechens auf eine Radioimmuntherapie beim zerebral metastasierten malignen Melanom

CD8⁺ CTL spielen eine wichtige Rolle zum Verständnis der Tumorummunität, da sie nicht nur einen Beitrag bei der Ausführung einer effektiven anti-Tumor Immunantwort leisten, sondern ebenso die Bestimmung des Phänotyps der Tumor-Immunität erleichtern (23): Zahlreiche Studien haben in der Vergangenheit zeigen können, dass die Infiltrationsdichte CD8⁺ CTL in den Tumor, welche anhand des sogenannten ImmunoScores beurteilt wurde, einen prädiktiven Faktor für ein Ansprechen auf eine Immuntherapie mit IPI darstellt (227, 228). Diese Überlegungen wurden durch die Arbeiten von Ji *et. al.* (226) durch die Beobachtung erweitert, dass die Immuntherapie mit IPI besonders effektiv in Tumoren mit hoher PD-L1 Positivität, hoher Infiltrationsdichte CD8⁺ CTL oder einer starken IFN- γ Präsenz in T-Zellen ist. Dieser immunogene Tumorphänotyp wird auf dem Kontinuum der Tumor-Immunität auch als inflammatorischer Tumor charakterisiert, da hier bereits vor Beginn einer Immuntherapie eine starke antitumorale Immunantwort vorhanden und damit die Sensitivität für das Ansprechen auf eine solche Therapie wesentlich erhöht ist (siehe **Abbildung 61**) (23).

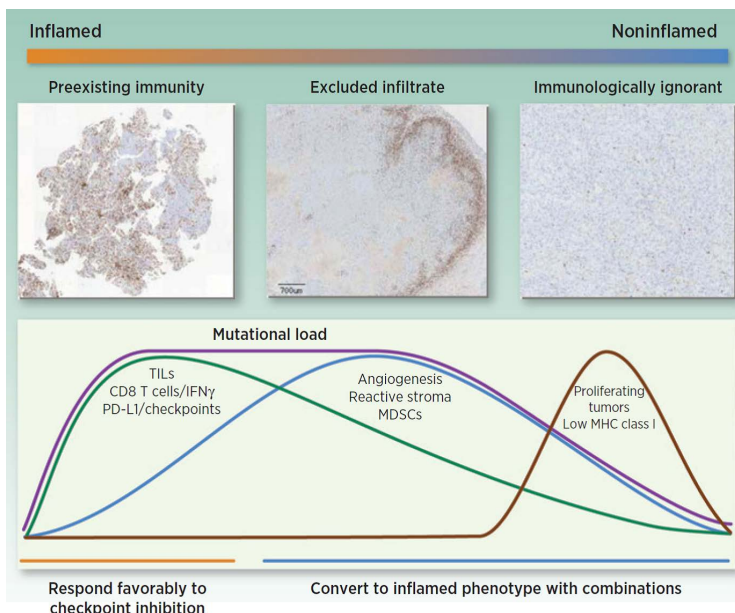


Abbildung 61: Das Kontinuum der Tumorummunität. Gezeigt sind die drei Phänotypen der Tumorummunität, welche mithilfe von IHC-Färbungen für CD8⁺ CTL zuverlässig charakterisiert werden können. So zeigen Tumoren mit einer vorbestehenden Immunität eine dichte Infiltration CD8⁺ Immunzellen, eine gesteigerte IFN- γ Synthese und eine starke Expression von Immun-Checkpoints wie PD-L1, sowie eine hohe genetische Mutationslast und damit eine hohe Antigenität. Demgegenüber zeigt sich beim Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats ein starker Einfluss immunsuppressiver intratumoraler Zellen, die eine Infiltration von CD8⁺ CTL in den Tumor verhindern. Zuletzt lässt sich der Phänotyp der immunologischen Wüste (hier: immunologisch ignoranter Tumor) durch eine sehr geringe Infiltration CD8⁺ CTL, sowie eine hohe genetische Stabilität beschreiben, was gleichzeitig als Charakteristikum nicht-entzündlicher Tumoren gewertet werden kann (23).

Demgegenüber sind Tumoren von Patienten mit einem geringen oder fehlenden Ansprechen auf die Immuntherapie durch einen nicht-immunogenen Tumor charakterisiert: Hierbei wird der Phänotyp des immunologisch-anergen Tumors, der durch eine sehr geringe Zahl CD8⁺ CTL und eine nicht-funktionale Immunantwort selbst nach erfolgter Immuntherapie charakterisiert ist, von dem Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats unterschieden, bei dem die Immuntherapie zwar zu einer erhöhten

Anzahl funktioneller CD8⁺ CTL führt, diese aber – aufgrund wirksamer Mechanismen der Immunevasion – nach wie vor eine Unfähigkeit zur effektiven Tumordinfiltration zeigen (23, 229).

Diese wissenschaftlichen Beobachtungen konnten für das im Rahmen dieser Studie untersuchte Patientenkollektiv weithin bestätigt werden. So zeigen die Resultate der Kaplan-Meier-Analysen einen signifikanten Zusammenhang zwischen den verschiedenen Phänotypen der Tumormunität und der medianen Überlebenszeit (medianes OS: 2 vs. 6 vs. 50 Monate). Gerade in dem Patiententeilkollektiv mit Tumoren vom inflammatorischen Phänotyp wurde ein deutliches Ansprechen auf die Radioimmuntherapie mit z.T. jahrelangen Remissionsphasen beobachtet. Demgegenüber wies das Patientenkollektiv mit Tumoren vom nicht-entzündlichen Typ ein signifikant schlechteres Ansprechen auf, was sich in wesentlich kürzeren Remissionsphasen äußerte (medianes OS: 5 vs. 50 Monate).

An dieser Stelle sollte aber nicht unerwähnt bleiben, dass gerade der Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats keinesfalls eine uniforme Ausprägung des Infiltrationsmusters darstellt, sondern sich vielmehr eine große interindividuelle Variabilität in der Ausprägung dieses Tumorphänotyps offenbart, welche sich auch in einem variablen klinischen Outcome widerspiegelt. Dies ist gerade deshalb von Bedeutung, weil jener Phänotyp mit Abstand am häufigsten in dem untersuchten Patientenkollektiv beobachtet werden konnte (n=21/35) und daher einer näheren Charakterisierung bedarf. So konnten in einigen Patienten mit Tumoren vom Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats ebenso lange Remissionsphasen beobachtet werden, wie in Patienten mit inflammatorischen Tumoren, wobei sich gerade dort besonders hohe CD8⁺ CTL-Zahlen im Tumor-umgebenden Stroma gezeigt hatten. Dieser Befund ist übereinstimmend mit Beobachtungen von Harder *et. al.*, die ein verbessertes medianes Überleben in solchen Patienten zeigen konnten, die eine verstärkte Infiltration CD8⁺ CTL am Tumorrand, bei gleichzeitig geringer Infiltrationsdichte im Tumorkern aufgewiesen hatten (57).

Ebenso wurde beobachtet, dass sich das immunologische Gleichgewicht innerhalb des Tumors gleichfalls in Richtung des Phänotyps des anergen Tumors verschieben kann, wobei hier zwar weiterhin das Infiltrationsmuster vom ausgeschlossenen Typ deutlich erkennbar ist, allerdings die Gesamtzahl der CD8⁺ CTL, bei gleichzeitig kürzerer Überlebenszeit, wesentlich geringer ausfällt und damit die Induktion weiterer immunsuppressiver Mechanismen angenommen werden kann. Aufgrund dieser Beobachtungen kann weiterhin davon ausgegangen werden, dass das Ausmaß der T-Zell-Infiltration in den Tumor den limitierenden Schritt für das Ansprechen der Immuntherapie in Tumoren vom Phänotyp des ausgeschlossenen Infiltrats darstellt (24). Bestätigt wird diese Annahme durch eine Vielzahl von Studien zum Ausmaß der CD8⁺ CTL Infiltration als prognostischer Parameter für das klinische Outcome bei Patienten mit metastasiertem malignem Melanom peripherer Lokalisation (184, 230): So konnten die Untersuchungen von Wong *et. al.* zeigen, dass Patienten mit einem partiellen oder kompletten Ansprechen auf die Immuntherapie eine signifikant höhere CD8⁺ Zellzahl (p<0.0001) aufwiesen (231), was den prädiktiven Wert der CTL Infiltration vor Therapiebeginn für das Ansprechen auf eine Immuntherapie betont. Dies macht das Ausmaß der CTL-Infiltration gleichermaßen zu einem bedeutenden Biomarker für die individuelle Prognose des Patienten. Diese Erkenntnisse unterstreichen, dass das Konzept der Tumormunität keinesfalls als starre

Charakterisierung in drei verschiedene Phänotypen zu verstehen ist, sondern vielmehr ein Kontinuum darstellt, in dem die Heterogenität der individuellen Tumorimmunologie ausreichende Berücksichtigung erfährt. Die drei im Rahmen des sogenannten Immune-Editings sequentiell aufeinanderfolgenden Phasen der anti-Tumor Immunantwort beschreiben dabei sinnbildhaft die temporalen Alterationen des Tumormunitätsstatus (232): So wurde postuliert, dass es bei einigen Patienten initial, aufgrund der hohen Mutationslast des malignen Melanoms, zum Erkennen der TAA im Rahmen einer funktionierenden Immunüberwachung und einer damit einhergehenden Aktivierung der durch CD8⁺ CTL gesteuerten zytotoxischen Immunantwort zur Elimination der Melanomzellen kommt (232). Es folgt eine unterschiedlich lang anhaltende Gleichgewichtsphase, in der eine Balance zwischen Tumorzellproliferation und der Tumorelimination durch das adaptive Immunsystem beobachtet werden kann, indes bereits diejenigen Anpassungs-, - und Selektionsvorgänge innerhalb des TME vorangetrieben werden, die ein umfassendes Immune-Editing bedingen (232). Durch jene Anpassungsvorgänge, die es dem malignen Melanom ermöglichen zahlreiche Resistenzmechanismen für eine effektive Immunantwort zu etablieren, entzieht sich das maligne Melanom einer effektiven Immunantwort und es kommt zur funktionellen Erschöpfung von CD8⁺ CTL, die durch die initiale Hyperaktivierung eine massive Hoch-Regulation von Immun-Checkpoints wie CLTA-4, i.S. eines negativen Feedbacks, erfahren haben (233).

Die Identifikation von Prädiktoren eines Therapieansprechens für Patientenkollektive mit aktiven ZNS-Metastasen des malignen Melanoms ist als besonders kritisch zu betrachten, da gerade für dieses Patientenkollektiv bisher kaum prognostische Faktoren, neben klinischen Daten wie dem Alter und dem Karnofsky-Index des Patienten (234), bekannt sind. Im Rahmen dieser Studie war es deshalb von besonderem Interesse die CD8⁺ Infiltration in Metastasen aus ZNS-Lokalisation zu beurteilen. Allerdings konnte hier keine signifikante Korrelation zwischen der CD8-Infiltrationsdichte in der ZNS-Metastase und dem klinischen Outcome gezeigt werden, obwohl sich der Phänotyp der Tumormunität nach wie vor als ein stabiler prognostischer Faktor erwiesen hatte. Eine Studie von Harter *et. al.* (235) konnte diesen Zusammenhang in einem wesentlich größeren Kollektiv von Hirnmetastasen (n=252) unterschiedlicher Primärtumoren bestätigen: Hier wurden zwar, konsistent mit den im Rahmen dieser Studie gemachten Beobachtungen, die drei typischen phänotypischen Muster der CD8 Infiltration gefunden, wobei sich das maligne Melanom als besonders immunogener Tumor mit einer Tendenz zur diffusen Infiltration CD8⁺ CTL in die ZNS-Metastasen, herausstellte. Allerdings haben Harter *et. al.* keine signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß der CD8⁺ Infiltration und dem klinischen Outcome feststellen können. Diese Korrelation konnte bislang allein durch Berghoff *et. al.* (214) in der 2012 vorgestellten Studie zu einem Patientenkollektiv mit lediglich zentralnervösen Melanommetastasen demonstriert werden. Interessanterweise konnte in beiden Studien beobachtet werden, dass gerade kleine ZNS-Metastasen eine starke Infiltration CD8⁺ CTL bei gleichzeitig starker Expression von PD-1 und PD-L1 zeigen, was darauf hinweist, dass in kleinen Metastasen zwar eine lymphozytäre Immunreaktion aktiv zu sein scheint, diese aber funktionell durch Mechanismen der Immuninhibition und das immunologische Privileg des ZNS beeinträchtigt ist.

Demgegenüber konnte in dem hier untersuchten Patientenkollektiv über alle ZNS-Metastasen hinweg eine sehr geringe Infiltrationsdichte CD8⁺ CTL, unabhängig von der Größe der Metastase, beobachtet werden. Als ein möglicher Grund für die insgesamt geringe Infiltration CD8⁺ CTL kann der geringe Stichprobenumfang von n=6 Präparaten von Metastasen aus ZNS-Lokalisation erwogen werden, der keinesfalls umfassende Schlussfolgerungen zulassen sollte. Die Infiltrationsdichte in Metastasen peripherer Lokalisation weist zudem auf die immunologisch privilegierte Lage des ZNS mit der Blut-Hirn-Schranke als Barriere für die Infiltration CD8⁺ CTL als mögliche Einflussvariable hin.

Umso erstaunlicher ist der Befund, dass sich der Phänotyp der Tumormunität als ein relativ stabiles Merkmal über alle Tumorpräparate desgleichen Patienten herausstellte, obwohl die Tumor-Resektate sowohl in Zeit und Ort der Entnahme zum Teil erheblich variierten. Trotz der großen Heterogenität im Immunkontext des malignen Melanoms, welcher wiederum abhängig ist von dem Manifestationsort, wie auch dem zeitlichen Verlauf des Tumors, kann der Tumormunitätsstatus also als ein relativ stabiles Merkmal des individuellen Tumors erachtet werden. Dieser ist dabei nicht nur abhängig von den intrinsischen Charakteristika des Tumors, sondern auch den individuellen Eigenschaften des Hosts, was man sich durch die Verwendung prädiktiver Faktoren zunutze machen kann. Lediglich für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (NSLC), welches wie das Melanom als stark immunogener Tumor gilt, existieren bislang Daten, welche diesen Zusammenhang ebenfalls untersucht haben und unsere Beobachtungen zur örtlichen und zeitlichen Stabilität des Immunprofils nunmehr bestätigen konnten. Diese IHC-Untersuchungen aus Primär,- bzw. metastatischen Läsionen konnten sodann in Frequenz und Intensität der PD-L1 Expression ein gleichartiges Immunprofil-Muster feststellen (236). Zuletzt zeigen die Resultate unserer Analysen, dass neben dem Infiltrationsmuster die Gesamtzahl CD8⁺ CTL einen signifikanten Einfluss auf das Therapieansprechen und den weiteren klinischen Verlauf hat, i.S. eines besseren klinischen Outcomes mit einer steigenden Gesamtzahl CD8⁺ CTL im Tumor (12 vs. 3 Monate, p=0.002). Diese Resultate sind konsistent mit den Beobachtungen von Tumeh *et. al.*, die für Melanom-Patienten unter Therapie mit Pembrolizumab beobachtet haben, dass Tumoren mit einer hohen CD8⁺ CTL-Dichte ein besseres Therapieansprechen zeigten, als solche mit einer geringen CD8⁺ Dichte in vor Therapiebeginn durchgeführten Biopsien (23, 66). Für eine exakte Evaluation des Ansprechens auf die Immuntherapie mit IPI wäre es daher wünschenswert gewesen, nicht nur solche Präparate, die vor Therapiebeginn entnommen wurden in die Analyse aufzunehmen, sondern ebenso die durch die Immuntherapie-bewirkten Veränderungen im TME post-therapeutischer Biopsien, ähnlich dem Vorgehen vergangener Studien von Hamid *et. al.* (66, 237) zu erfassen.

Nichtsdestotrotz haben unsere Befunde gezeigt, dass sowohl das CD8-Infiltrationsmuster und damit der Phänotyp der Tumormunität, wie auch die Gesamtzahl CD8⁺ CTL in Tumorpräparaten eine Rolle für die Prädiktion des klinischen Ansprechens auf eine Radioimmuntherapie im malignen Melanom spielen. Spatale Analysen ermöglichen hier einen differenzierten Einblick in die Tumormunstruktur innerhalb des TME, die weitere prognostische Informationen bereithalten können. Nichtsdestoweniger muss bei der Beurteilung der Gesamtzahl CD8⁺ CTL in zentralnervösen Metastasen das immunologische Privileg des ZNS in besonderer Form berücksichtigt werden.

3.2. Bedeutung von GLUT-1 als endogener Hypoxiemarker und prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie beim zerebral metastasierten Melanom

Die Rolle des HIF-1 α Zielgens GLUT-1 als endogener Marker der Tumorphypoxie wurde in der Vergangenheit bereits in verschiedenen Tumorentitäten untersucht: Hierbei konnten u.a. Airley *et. al.* (238) eine schwache Korrelation des polarographisch gemessenen Oxygenierungsstatus mit der GLUT-1 Expression für das Zervixkarzinom finden. Demgegenüber stehen bspw. Untersuchungen von Mayer *et. al.* (74), die keine Korrelation zwischen dem pO₂ und der GLUT-1 Expression feststellen konnten. Möglicherweise ist die Korrelation der lokalen Expression von Hypoxiemarkern mit dem über die Länge eines Messkanals von 2 cm gemitteltem pO₂ aber grundsätzlich problematisch, zumal Mittelwerte kleine, aber stark hypoxische Areale innerhalb des Tumors nicht abbilden können. Demgegenüber steht ein Muster der Expression von GLUT-1, das einen eindeutigen Bezug der Intensität der Markerexpression zur Distanz vom nächstgelegenen Tumorgefäß zeigt. Dieses Muster wurde gleichermaßen in den Studien von Airley *et al.*, Mayer *et al.*, wie in der vorliegenden Arbeit gefunden. Es erscheint daher möglich, dass der über eine Reihe von Tumoren gemessene absolute pO₂ im Gewebe nicht mit der mittleren Intensität der Expression eines Markers wie GLUT-1 korreliert ist, die Expression im individuellen Fall aber mikroregionär sehr wohl von Unterschieden in der Oxygenierung ausgelöst wird. In der Tat lässt das hier einheitlich gefundene Muster einer deutlichen Zonierung der GLUT-1 Expression mit zunehmendem Abstand vom gefäßführenden Tumorstroma kaum eine andere Schlussfolgerung zu. Dieses GLUT-1-Expressionsmuster erscheint vor dem Hintergrund einer Hypoxie-induzierten Hochregulation pathophysiologisch plausibel und kann als ein indirekter Hinweis für die Eignung von GLUT-1 als endogener Hypoxiemarker gewertet werden, zumal ein ähnlicher Befund von Mihic *et. al.* (167) für Melanome im fortgeschrittenen Stadium gefunden werden konnte.

Gleichzeitig wurde in Kaplan-Meier-Analysen für unser Patientenkollektiv eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der GLUT-1 Expression in Melanom-Präparaten und dem OS beobachtet. Dieser Befund führte in Verbindung mit den Resultaten vergangener Studien zu der Annahme, dass GLUT-1 *in-vivo* weniger als einfacher Biosensor des absoluten Sauerstoffpartialdrucks erachtet werden kann, sondern vielmehr einen klinisch bedeutsamen Marker der hypoxisch-vermittelten malignen Progression darstellen könnte, der letztlich sowohl für ein Therapieansprechen, wie auch die individuelle Prognose des Patienten von Relevanz ist (221, 239). Zahlreiche Studien konnten hierbei für verschiedene solide Tumoren demonstrieren, dass eine starke Ausprägung der Tumorphypoxie mit einer geringeren Überlebenszeit, wie auch einer kürzeren Rezidiv-freien-Überlebenszeit einhergeht (73, 240, 241). So wurde sowohl für Kopf-Hals-Tumoren (242), Brust, - (243) Ovarial, - (244), Magen, - (245) und Kolorektalkarzinome (246), als auch für NSLC (247) ein kürzeres OS bei vermehrter Expression des Hypoxie-Markers GLUT-1 im Tumor festgestellt (73).

Demgegenüber erbrachten immunhistochemische Studien zur GLUT-1 Expression im malignen Melanom bisweilen inkonklusive oder widersprüchliche Befunde: So wurde von einer weitestgehend fehlender GLUT-1-Expression auf Melanomzellen (168), als auch von einer gleichzeitig starken

Expression auf benignen Nävi berichtet (169). Zwar können diese Befunde ebenso auf den geringen Umfang der Untersuchungen, verschiedene GLUT-1 Antikörper und unterschiedliche Cut-Off-Werte der Positivität zurückgeführt werden, es kann aber ebenso der einzigartige Stoffwechsel von Melanozyten im vgl. zu epithelialen Neoplasien als mögliche Ursache erwogen werden (170, 248). Nicht zuletzt die umfangreichen Studien von Dura *et. al.* (400 Fälle) und von Koch *et. al.* (266 Fälle) haben schließlich den Nachweis einer vermehrten GLUT-1 Expression im Melanom im Vergleich zu benignen Nävi erbringen und gleichzeitig Hinweise für eine Korrelation der GLUT-1 Expression mit einer schlechteren Prognose und einer Tendenz zur Metastasierung finden können (165, 167, 170, 249). Diese Befunde suggerieren damit, dass die GLUT-1 Expression auch im malignen Melanom als ein möglicher Surrogatmarker der Hypoxie-getriebenen malignen Progression erachtet werden kann.

Diese Resultate können in der hier vorgestellten Studie in einem Patientenkollektiv mit zerebralen Metastasen, für das sowohl Primärtumoren, wie auch Resektionspräparate von Metastasen des malignen Melanoms untersucht wurden, nun bestätigt werden: So wurde in Übereinstimmung mit den genannten Studien eine starke und heterogene GLUT-1 Expression (Median: 42.0 %) in den Melanompräparaten beobachtet. Zudem konnte ein signifikant kürzeres OS bei Patienten mit einer starken Ausprägung der Tumorphoxie (3 vs. 11 Monate) beobachtet werden, wohingegen Patienten mit besser oxygenierten Tumoren über alle Gewebearten, d.h. auch in Metastasen zentralnervöser Lokalisation, ein deutlich besseres klinisches Outcome zeigten, was GLUT-1 zu einem zuverlässigen und stabilen prädiktiven Faktor für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie macht. Die prädiktive Wertigkeit und die Sensitivität der Tumorphoxie werden weiter gesteigert durch die Beobachtung, dass bereits geringe Veränderungen des Ausmaßes der Hypoxie einen großen Einfluss auf das OS haben. Gründe für den bedeutenden Einfluss der Tumorphoxie erscheinen unter pathophysiologischen Gesichtspunkten vielfältig, zumal die Tumorphoxie zahlreiche Anpassungsvorgänge anstößt, welche das zelluläre wie auch das Zytokin-Gleichgewicht im Tumor in Richtung eines pro-tumoralen Mikromilieus verschieben kann (185): Allen voran erwähnt sei hierbei die Anreicherung von Metaboliten wie Laktat und CO₂, welche angetrieben durch die Induktion der LDH und der CA-IX zu einer Ansäuerung des TME führen. Wie in-vitro Studien der Roszik Gruppe (221) gezeigt haben, hemmt der niedrige pH-Wert durch die Hochregulation von CTLA-4 die zytotoxische Aktivität CD8⁺ CTL und verhindert ein wirksames Ansprechen auf eine Immuntherapie.

An dieser Stelle darf nicht unerwähnt bleiben, dass die Tumorphoxie nicht nur über die Ausbildung eines immuninhibierenden TME das Ansprechen auf eine Immuntherapie verringert und das klinische Outcome bedeutend verschlechtert, sondern eine Reihe metabolischer, immunologischer, wie auch genetischer Veränderungen durch die Hypoxie im TME angestoßen werden, die allesamt zu einem maligneren Phänotyp beitragen. Obwohl die Tumorphoxie also einen prognostischen Marker darstellt, ist sie ob der antagonistisch-pleiotropen Effekte im Tumor dennoch ein relativ unspezifisches therapeutisches Target, weshalb bisherige Studien die eine Reduktion der Tumorphoxie bspw. mithilfe einer hyperbaren Sauerstofftherapie (125) zum Ziel hatten, entweder mit zahlreichen Nebenwirkungen behaftet waren oder aber begrenzte Erfolge *in-vivo* zeigten (250).

Neue therapeutische Ansätze basieren daher auf einer Inhibition spezifischer Hypoxie-induzierter Enzyme bzw. Rezeptoren – wie beispielsweise Enzyme des Adenosinmetabolismus (A_{2A}-Rezeptor-Antagonisten) oder CA-IX – wie auch dem Einsatz ausschließlich unter Hypoxie-aktivierter Prodrugs, die die systemischen Nebenwirkungen signifikant abschwächen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Tumorphoxie bzw. der Hypoxie-induzierten Enzyme nicht nur das Wiederherstellen der T-Zell-Infiltration (251) in den Tumor ermöglicht, sondern das Ansprechen auf eine Immuntherapie und damit das klinische Outcome von Patienten insgesamt verbessern kann (250). Zusammenfassend konnte die vorgestellte Studie demnach Hinweise dafür erbringen, dass gerade im metastasierten Stadium des malignen Melanoms die Expression von GLUT-1 einen wertvollen Surrogatmarker der Tumorphoxie und insbesondere der malignen Progression darstellt. Die histologische Bestimmung des Ausmaßes der Tumorphoxie anhand der GLUT-1 Expression sollte also keinesfalls als akademischer Informationsgewinn betrachtet werden, da sie einen Beitrag zu einer besseren Auswahl derjenigen Patienten liefert, die von einer kombinierten Radioimmuntherapie profitieren können und somit eine verbesserte Versorgung von Patienten im metastasierten Stadium des malignen Melanoms ermöglicht. Dies zeigen Untersuchungen von Afzal *et al.* (252), welche in einer retrospektiven Studie beobachten konnten, dass Patienten im metastasierten Stadium des malignen Melanoms unter einer Therapie mit IPI durch die Hinzunahme von Metformin ein besseres Ansprechen zeigten, als dasjenige Kollektiv ohne die zusätzliche Gabe von Metformin. Als mutmaßlicher Grund für das stärkere Ansprechen der Immuntherapie wurde von den Autoren die durch die Metformin-Gabe induzierte Reduktion der Tumorphoxie angenommen.

3.3. *In-vivo*-Relevanz CD73-generierten extrazellulären Adenosins für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie beim zerebral metastasierten malignen Melanom

Die extrazelluläre Akkumulation von Adenosin konnte im Rahmen von in-vitro-Experimenten als ein zentraler Mechanismus bei der Schaffung eines immunsuppressiven TME identifiziert werden (96). Diese Akkumulation von ADO wird unter anderem durch die Hypoxie-abhängige Induktion der Adenosin-generierenden Tandemenzyme CD39 und CD73 angestoßen. So konnte bereits gezeigt werden, dass sich die CD73 Expression gerade in Metastasen des malignen Melanoms nicht nur auf endotheliale und stromale Zellen beschränkte, sondern ebenso auf 40 % der Tumorzellen und zahlreichen Immunzellen eine vermehrte Expression festzustellen war (172).

Diese Beobachtungen können durch die im Rahmen dieser Studie festgehaltenen Befunde einer starken endothelialen und stromalen Expression von CD73, bei gleichzeitig variabler Expression von CD73 auf Tumor- und Immunzellen, nur eingeschränkt bestätigt werden. So haben wir insgesamt eine geringere intratumorale CD73 Expression (ca. 23 %) als in Vergleichsstudien feststellen können, wobei diese häufig eine überlappende Expression mit dem Hypoxiemarker GLUT-1 aufwies. Interessanterweise zeigte sich, in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Monteiro *et al.* (172), dass selbst in Tumoren desgleichen Patienten die Expression von CD73 keinesfalls stabil ist, sondern vielmehr einer dynamischen Regulation im Verlauf der Zeit, der genauen Lokalisation innerhalb des

whole-slide Tumors und der Therapie unterliegt. Darüber hinaus wirft die Beobachtung einer unregelmäßigen Hochregulation von CD73 unter einer vermehrten GLUT-1-Expression die Frage auf, inwieweit es für das maligne Melanom *in-vivo* tatsächlich zu Hypoxie-vermittelten Induktion des ADO-synthetisierenden Enzyms CD73 kommt.

Mögliche Gründe einer unregelmäßigen Hypoxie-induzierten Hochregulation von CD73 sind dabei sowohl in der Heterogenität des Tumors selbst begründet, allerdings sollte ebenso die Möglichkeit in Erwägung gezogen werden, dass neben der Tumorphypoxie weitere Mediatoren nötig sein könnten, um eine vermehrte Expression von CD73 und damit eine ADO-Akkumulation zu induzieren. So lassen präliminäre Beobachtungen zur Expression des Adenosin-Transporters ENT-1 im malignen Melanom bereits erahnen (siehe **Abbildung 62**), dass nicht nur die Tumorphypoxie eine extrazelluläre Akkumulation von Adenosin fördert, sondern umliegende normoxische Tumorzellbereiche ebenso umfänglich am Adenosinstoffwechsel beteiligt sind und der Adenosinstoffwechsel insgesamt damit in ein weitaus komplexeres regulatorisches Netzwerk integriert zu sein scheint. Daneben sollte in Betracht gezogen werden, dass die GLUT-1 Expression keine völlig exakte quantitative Abbildung des Oxygenierungsstatus ermöglicht und Aussagen über eine exakte örtliche Zuordnung einer Hypoxie-induzierten Hochregulation von CD73 deshalb nur eingeschränkt möglich sind.

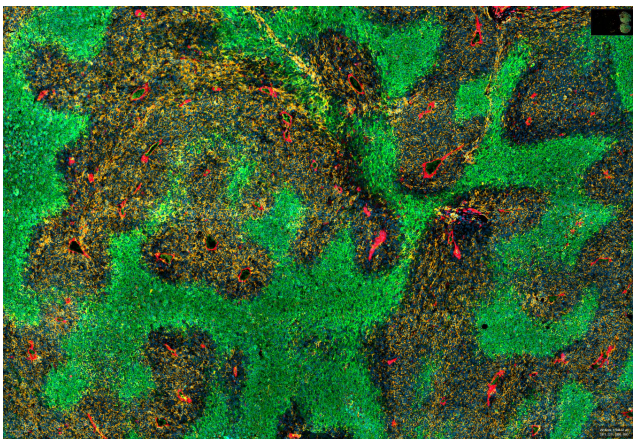


Abbildung 62: Ausschnitt (x2.5) aus einer multiplex-IF-Färbung einer LK-Metastase des malignen Melanoms. Dargestellt sind die Marker GLUT-1 (grün), CD39 (rot) und ENT-1 (gelb). Es findet sich eine heterogene Expression von GLUT-1 im Tumor mit einer zunehmenden Expressionsstärke bei zunehmendem Abstand von CD39⁺ Gefäßen. Dieser Befund bestätigt die im Rahmen der Untersuchungsserie gemachten Beobachtung von GLUT-1 als ausreichend gutem Hypoxiemarker, da CD39 und CD73 als Tandemenzyme gleichermaßen eine endotheliale Expression aufweisen. ENT-1 demgegenüber zeigt eine unter Hypoxie abnehmende Expression. Diese Beobachtung ist insofern besonders erwähnenswert, da sie der bisherigen pathophysiologischen Hypothese einer vornehmlich Hypoxie-vermittelten ADO-Akkumulation entgegensteht.

Aufgrund des immuninhibitorischen ADO-Effekts ist es wenig verwunderlich, dass in zahlreichen Studien eine starke CD73 Expression mit einer signifikant größeren Tumordicke, einem positiven Lymphknotenstatus (172), sowie einem schlechteren klinischen Outcome assoziiert waren (253). So haben Beobachtungen von Loi *et. al.* zeigen können, dass die Überexpression von CD73 in triple-negativen Mammakarzinomen zu einer vermehrten Resistenz gegen Chemotherapien wie auch einer schlechteren Prognose führte (140). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine hohe Aktivität von löslichem CD73 im Blut mit einem signifikant schlechteren Überleben und einem schlechteren

Ansprechen auf eine Immuntherapie mit dem PD-1 Inhibitor Nivolumab im Melanom verbunden ist (253). Gleichzeitig ist eine vermehrte Expression von CD73 in Tumorzellen oft mit einer Veränderung des Tumorphänotyps in Richtung einer wesentlich aggressiveren und invasiveren Variante verbunden. Obwohl die Relevanz von CD73 für die Inhibition einer Immunantwort wissenschaftlich weitestgehend anerkannt ist, gibt es bezüglich der *in-vivo* Bedeutung von CD73 für das klinische Outcome im Melanom noch keinen Konsens, da manche Studien keinen signifikanten Einfluss von CD73 auf das OS finden konnten (161, 172, 254).

Auch in der vorliegenden Studie konnte auf mikroregionärer Ebene der Effekt einer Immunevasion CD8⁺ CTL unter einer stark ausgeprägten Tumorphoxie und einer intratumoralen CD73-Expression beobachtet und statistisch belegt werden. Allerdings zeigte sich in den Kaplan-Meier-Analysen keine über das gesamte Patientenkollektiv stabil beobachtbare signifikante Korrelation zwischen dem Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie und der anteiligen Stärke der CD73 Expression im Tumor (medianes OS 10 vs. 3 Monate p=0.158). Vielmehr stellt sich durch den Vergleich der Kaplan-Meier-Analysen zwischen dem Anteil CD73⁺ Tumors und hypoxischem CD73 positivem Tumor die Frage, ob der Effekt von CD73 auf das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie womöglich nur durch die gleichzeitig Anwesenheit der Tumorphoxie vermittelt wird und CD73 in der durchgeführten Untersuchung lediglich einen Konfounder darstellt. Die Frage ist gerade vor dem pathophysiologischen Hintergrund einer Hypoxie-unabhängigen Induktion von CD73, wie sie durch Kordaß *et. al.* im Rahmen des β -Catenin Signalweges gezeigt werden konnte, evident (103).

Die *in-vivo*-Relevanz von CD73 als prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie kann also nach wie vor nicht einwandfrei geklärt werden, auch wenn durch Analyse derjenigen Subpopulation mit einer anteilmäßig starken intratumoralen CD73 Expression tendenziell ein statistisch relevanter Einfluss (28 vs. 3 Monate, p=0.001) von CD73 für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie festgestellt werden konnte, insofern als dass Patienten mit einer hohen intratumoralen Expression von CD73 ein schlechteres Therapieansprechen gezeigt hatten. Gründe für den variablen Einfluss der CD73 Expression für das therapeutische Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie im malignen Melanom sind vielfältig: So spielt bspw. das Ekto-Enzym CD39 ebenso eine wesentliche Rolle für die ADO-vermittelte Inhibition der anti-Tumor Immunantwort, sodass nur die gleichzeitige Beurteilung beider Tandemenzyme ausreichend genaue Rückschlüsse zum extrazellulären Adenosinmetabolismus erlauben können. Weiterhin tragen neben der ADO-vermittelten Inhibition natürlich auch weitere immunologische Mechanismen, wie der Einfluss von T_{reg}, M2-Makrophagen, MDSC und die Architektur des Tumorstromas zur Immunevasion des Tumors bei. In Erwägung gezogen muss weiterhin der starke Einfluss der inter-, - wie auch intratumoralen Heterogenität, welche gerade *in-vivo* das Assessment von Biomarkern erschwert.

Die Frage nach der *in-vivo*-Relevanz von CD73 für das klinische Outcome erlangt vor dem Hintergrund einer Hoch-Regulation von CD73 in Patienten, welche kein Ansprechen auf eine Immuntherapie zeigen, eine besondere Bedeutung (172). So würde der Nachweis von CD73 als echte unabhängige Variable für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie eine Auswahl der Patienten

für eine Immuntherapie nach individueller CD73 Expression in deren Tumoren ermöglichen. Gleichzeitig könnten so auch diejenigen Patienten mit einer hohen CD73 Expression einer Kombinationstherapie, bestehend aus einer Antikörper-abhängigen Blockade von CD73 und einer Immuntherapie zugeführt werden, welche die Erfolgswahrscheinlichkeit eines Ansprechens wesentlich erhöhen kann. So konnten vorklinische Studien bereits mehrfach zeigen, dass die Blockade adenosin-abhängiger Stoffwechselwege wie der Enzyme CD73, CD39 oder auch des A_{2A}-Rezeptors nicht nur eine verbesserte Tumorkontrolle bewirken, sondern auch die Infiltration CD8⁺ CTL in den Tumor und damit die Wahrscheinlichkeit für das Ansprechen auf eine Immuntherapie erhöhen (112, 255). Gerade die Beobachtung von Iannone *et. al.*, dass eine Blockade von CD73 im Melanommodell die Effektivität einer anti-CTLA-4-Therapie erheblich steigert, ist daher erwähnenswert (256). Obwohl in der untersuchten Studie Hinweise für die *in-vivo*-Relevanz von CD73 als vermittelndes Enzym zur Inhibition einer anti-Tumor-Immunantwort auf mikroregionärer Ebene gefunden werden konnten, erlauben die Befunde der Log-Rank-Statistik und der whole-slide Distanzanalyse keine signifikanten Rückschlüsse auf dessen Eignung als prädiktiven Faktor für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie im metastasierten malignen Melanom. Vor dem Hintergrund der aufkommenden Bedeutung antikörperbasierter und in den Adenosinmetabolismus eingreifender Therapien erscheint die Bestimmung der Expressionsstärke und des spatialen Expressionsmusters von CD73 im malignen Melanom dennoch als äußerst sinnvoll.

Insbesondere die Beobachtung, dass CD73 neben seiner Expression auf Tumorzellen, im Rahmen unserer Untersuchungen ebenso eine starke endotheliale Expression gezeigt hatte, stellt insofern einen überraschenden Befund dar, als dass dies bislang noch nicht für das maligne Melanom vorbeschrieben wurde. Demgegenüber ist für den weithin verwendeten Gefäßmarker CD34 eine starke Hintergrund-Expression auf Melanomzellen vorbeschrieben (257), welche ebenso im Rahmen unserer Färbungen gezeigt wurde und so die Anwendbarkeit von CD34 im Melanom einschränkt. Ein möglicher Grund für eine Expression von CD34, wie auch von CD73 auf Melanomzellen könnte das sogenannte vaskuläre Mimikry darstellen, das im Rahmen einer malignen Progression des Melanoms vermehrt auftritt und mit einer Expression von endothelialen und mesenchymalen Stammzell-Markern auf Melanomzellen einhergeht (258). Die Beobachtung einer endothelialen Expression von CD73 erscheint aber auch dahingehend erwähnenswert, als dass Studien von Ohta *et. al.* zeigen konnten, dass die endotheliale Expression von CD73 über die A_{2A}-Rezeptor vermittelte Wirkung von ADO eine vermehrte VEGF-Sekretion induzieren kann, welche im weiteren Verlauf zu der charakteristischen Tumervaskularisation beiträgt und damit der malignen Progression Vorschub leistet (96).

Unsere Studie hilft daher nicht nur bei der *in-situ*-Charakterisierung der Expression von CD73 im malignen Melanom, sondern stellt gleichsam die Verbindung zu klinischen Parametern, wie dem Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie dar, die im Rahmen weiterer groß angelegter Studien im Detail untersucht werden sollen. Insbesondere konnte für die CD73 Expression auf Melanomzellen eine starke inter- und intraindividuelle Variabilität gefunden werden, wohingegen im gefäßführenden Stroma eine starke Endothelzell-assoziierte Expression beobachtet werden konnte.

V. Zusammenfassung

Die anti-Tumor Immunantwort im malignen Melanom ist insgesamt durch eine deutliche interindividuelle Variabilität gekennzeichnet. Dabei kommt besonders dem Zusammenspiel metabolischer und immunologischer Veränderungen im Tumormikromilieu in den letzten Jahren eine zunehmende Bedeutung zu. In der aktuellen wissenschaftlichen Literatur wurde gezeigt, dass hypoxische Tumorareale durch die Generierung immunsuppressiven Adenosins via 5'-Ecktonukleotidase (CD73) mit dazu beitragen, dass es zu einer Inhibition einer antitumoralen Immunantwort kommt. Demgegenüber kann eine Strahlentherapie durch die Induktion des immunogenen Zelltodes einen wichtigen Beitrag zur Förderung der anti-Tumor Immunantwort leisten, die weiter gefördert wird durch die therapeutische Gabe sogenannter Checkpoint-Inhibitoren.

Da gerade CD8⁺ zytotoxische Lymphozyten eine bedeutende Rolle als Effektorzellen im Rahmen dieser Immunantwort spielen, wurde die Überlegung angestellt, dass Melanome mit einer hohen Anzahl CD8 positiver T-Zellen, einem geringen Anteil hypoxischer Tumorzellen und einer geringen CD73 Expression im Tumor ein besseres Ansprechen auf eine Immuntherapie mit IPI und damit ein besseres klinisches Outcome – selbst in einem weit fortgeschrittenen Erkrankungsstadium – zeigen. Hierzu sollte zunächst überprüft werden, ob GLUT-1 und CD73 ausreichend gute Surrogatmarker zur Darstellung der Tumorphoxie respektive der Adenosin-Synthese im malignen Melanom darstellen. Weiterhin sollte der prädiktive Wert des Immunzellinfiltrationsmusters für das Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie untersucht und in spatialen Analysen die *in-vivo*-Relevanz der hypoxischen, sowie der Adenosin-vermittelten Inhibition von CD8⁺ CTL im malignen Melanom überprüft und im Kontext der aktuellen wissenschaftlichen Forschung bewertet werden.

Hierzu wurden initiale Tumorpräparate (N=73) unterschiedlichster Lokalisation aus einer Kohorte von 35 Patienten (n=35) mit zerebral metastasiertem malignen Melanom, die eine Immuntherapie mit IPI in Kombination mit einem definierten Radiotherapie-Regime erhielten, in 4-Farben-IF-Färbungen mit den Markern CD8, CD73 und GLUT-1 untersucht. Nachfolgend wurden diese IF-Färbungen mithilfe des neu etablierten einzelzellbasierten Segmentierungsverfahrens in QuPath ausgewertet, die daraus erhobenen quantitativen Daten mit den klinischen Daten des Patientenkollektivs korreliert und schließlich in Log-Rank-Statistiken auf deren Signifikanz hin getestet. Übereinstimmend mit unserer Hypothese wurde für Patienten mit besser oxygenierten Tumoren ein signifikant besseres Ansprechen auf eine Radioimmuntherapie und damit ein besseres klinisches Outcome beobachtet. Weiterhin konnte, konsistent mit den Ergebnissen der derzeitigen wissenschaftlichen Forschung, ein signifikant längeres medianes Überleben für diejenigen Patienten gefunden werden, deren Tumorpräparate eine starke Infiltration durch CD8⁺ CTL aufwiesen. Interessanterweise wurde dieser Zusammenhang bei Ausschluss derjenigen Patienten mit Tumorpräparaten aus ZNS-Lokalisation stärker, was darauf hindeutet, dass aufgrund des immunologischen Privilegs des ZNS die alleinige Bestimmung der Anzahl CD8⁺ CTL in Präparaten aus dem ZNS keinen zuverlässigen prädiktiven Faktor darstellen könnte. Aufgrund des geringen Umfangs der Tumor-Präparate aus ZNS-Lokalisation (n=6) sollte dieser Befund allerdings durch weitere Studien näher untersucht werden. Darüber hinaus konnte

dargestellt werden, dass die Bestimmung des Phänotyps der Tumorimmunität ein bedeutender Faktor bei der Einschätzung des individuellen Ansprechens einer Radioimmuntherapie sein kann, da gerade Patienten mit einer vorbestehenden Immunität ein signifikant besseres Ansprechen bei z.T. jahrelangen Remissionsphasen zeigten. Entgegen derzeitigen Erkenntnissen konnte im untersuchten Patientenkollektiv allerdings kein signifikanter oder klinisch relevanter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der intratumoralen CD73 Expression und dem klinischen Outcome beobachtet werden, was zum einen die Komplexität des Zusammenspiels von ADO-Metabolismus und der Tumorimmunität widerspiegelt, gleichzeitig aber auch belegt, dass für eine umfassende Beurteilung des ADO-Metabolismus zukünftige Methoden die simultane Darstellung Biomarker des ADO-Stoffwechsels anstreben sollten, wobei gerade CD39, ENT-1 und der A_{2A}-Rezeptor als kritisch befunden wurden. Weiterhin konnte mithilfe der spatialen Analysen zur Zellinteraktion im TME gezeigt werden, dass GLUT-1 einen guten Surrogatmarker der Tumorphoxie darstellt und die Hypoxie-vermittelte Inhibition CD8⁺ CTL ein umfassend präsenes Phänomen im malignen Melanom darstellt und somit auch *in-vivo* eine zentrale Rolle bei der Immunevasion spielt.

Überraschenderweise konnte auf mikroregionärer Ebene zugleich eine Variabilität in der Stärke jener hypoxischen Inhibition über die verschiedenen Phänotypen der Tumorimmunität beobachtet werden, was die Relevanz weiterer Mediatoren für die Ausprägung der Inhibition einer Tumorimmunantwort unterstreicht, die im Rahmen zukünftiger Studien näher zu charakterisieren sind. Demgegenüber bleibt die Bedeutung der ADO-vermittelten Inhibition der anti-Tumor-Immunantwort *in-vivo* ungeklärt. Zwar konnte in Tumoren mit einer sich stark überschneidenden Expression von GLUT-1 und CD73 eine deutliche Immunevasion beobachtet werden. Dieses Phänomen beschränkte sich allerdings auf ca. ein Viertel aller Patienten, sodass hier nicht von einem klinisch signifikanten Zusammenhang gesprochen werden sollte, zumal Korrelationsanalysen keine signifikante globale Korrelation zwischen dem Ausmaß der intratumoralen CD73 Expression und CD8⁺ CTL ausmachen konnten. Nichtsdestotrotz konnten die Untersuchungen zur CD73-Expression zeigen, dass CD73 nur in Kombination mit CD39 als ein ausreichend guter Surrogatmarker für den ADO-Metabolismus erachtet werden kann, im malignen Melanom allerdings gleichwohl einen potentiellen Gefäßmarker darstellen könnte. Zusammenfassend kann die hier vorgestellte Studie durch die Anwendung eines bisher nicht vorgeschriebenen methodischen Vorgehens zur detaillierten, objektiven und digitalisierten Analyse von whole slide Tumorpräparaten einen bedeutenden Beitrag zur weiteren Verbesserung der Diagnostik im Rahmen der personalisierten Tumormedizin leisten, zumal mit der Identifikation von GLUT-1 als Surrogatmarker der Hypoxie im malignen Melanom gleichzeitig ein klinisch bedeutender und sensitiver prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine kombinierte Radio- und Immuntherapie beim zerebral metastasierten Melanom gefunden wurde. Aufgrund der geringen Fallzahl des untersuchten Patientenkollektivs und der beschriebenen Limitationen der hier verwendeten Methodik wird allerdings eine weitere Evaluation der hier gezeigten Befunde mithilfe zusätzlicher Studien nötig sein, um abschließende Schlussfolgerungen für die klinische Praxis ziehen zu können.

VI. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: DARSTELLUNG DER "HALLMARKS OF CANCER"	- 4 -
ABBILDUNG 2: AUFBAU UND ZELLEN DES TUMORMIKROMILIEUS.	- 5 -
ABBILDUNG 3: HISTOLOGISCHE PRÄPARATE EINES HE-GEFÄRBTEN MALIGNEN MELANOMS.	- 13 -
ABBILDUNG 4: IMMUNMODULATORISCHE EFFEKTE DER RADIOTHERAPIE.	- 18 -
ABBILDUNG 5: ÜBERSICHT DES CGAS-STING-SIGNALWEGES.....	- 19 -
ABBILDUNG 6: MECHANISMEN DER IMMUNSTIMULATION UND IMMUNSUPPRESSION DURCH DIE STRAHLENTHERAPIE.....	- 20 -
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PHÄNOTYPEN DER TUMORIMMUNITÄT.	- 24 -
ABBILDUNG 8: EINFLUSSFAKTOREN DES TUMOR-IMMUNSTATUS.	- 25 -
ABBILDUNG 9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN DER TUMORVASKULARISATION UND DEM TME.	- 28 -
ABBILDUNG 10: VEREINFACHTE DARSTELLUNG ZUR ENTSTEHUNG DER INTRATUMORALEN MANGELSITUATION	- 31 -
ABBILDUNG 11: MECHANISMEN DER T-ZELL-REGULATION UND DER ADENOSIN-VERMITTELTER INHIBITION .-	- 36 -
ABBILDUNG 12: ABBILDUNG DER STRAHLENINDUZIERTE FOLGEREAKTION IN DER DNA UNTER NORMOXISCHEN BZW. UNTER HYPOXISCHEN BEDINGUNGEN.	- 38 -
ABBILDUNG 13: DARSTELLUNG DER TUMORFÖRDERNDEN EFFEKTE DES HYPOXIE-ADENOSIN-SIGNALWEGES UND POTENTIELLE THERAPEUTISCHE ZIELE.	- 40 -
ABBILDUNG 14: ÜBERSICHT ZUM METHODISCHEN VORGEHEN IN DER HIER VORGESTELLTEN ARBEIT.....	- 55 -
ABBILDUNG 15: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VORGEHENS BEI DER MULTIPARAMETRISCHEN IF	- 57 -
ABBILDUNG 16: ZUSAMMENFASSENDES SCHEMA ZUM VORGEHEN BEI DER ZELLKlassifikation INNERHALB EINES TUMORPRÄPARATES ANHAND DER EINZELZELLBASIERTE SEGMENTIERUNG.	- 63 -
ABBILDUNG 17: AUS DER QUPATH-AUSWERTUNG IN EXCEL IMPORTIERTER ROHDATENSATZ MIT DEN ABSOLUTEN HÄUFIGKEITEN DER KLASSIFIZIERTEN ZELLPopulationen.....	- 64 -
ABBILDUNG 18: BEISPIELHAFTE DARSTELLUNG DER IN EXCEL BERECHNETEN ABSOLUTEN UND RELATIVEN ZELHÄUFIGKEITEN AUS DEM ERFASSTEN TUMORAUSSCHNITT.	- 64 -
ABBILDUNG 19: ZUR INTERAKTIONSANALYSE IN MOSAICSUITE IMPORTIERTE ROI AUS QUPATH.	- 67 -
ABBILDUNG 20: AUSFÜHREN DER INTERAKTIONSANALYSE VON HYPOXISCHEN CD73 ⁻ ZELLEN VS. CD8 ⁺ IMMUNZELLEN IN MOSAICSUITE MIT ZUGEHÖRIGEN RESULTATEN.	- 68 -
ABBILDUNG 21: DARSTELLUNG DES HISTOGRAMMS UND DES KURVENMODELLS ZUR INTERAKTION VON STROMAZELLEN UND CD8 ⁺ CTL.....	- 68 -
ABBILDUNG 22: DARSTELLUNG DES HISTOGRAMMS UND DES KURVENMODELLS ZUR INTERAKTION VON HYPOXISCHEN TUMORZELLEN UND CD8 ⁺ IMMUNZELLEN.	- 69 -
ABBILDUNG 23: DARSTELLUNG DES GESCHÄTZTEN POTENTIALS UND DER WAHRSCHEINLICHKEITSVERTEILUNG DER STROMAZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT DER DISTANZ ZU CD8 ⁺ IMMUNZELLEN.....	- 70 -
ABBILDUNG 24: DARSTELLUNG DES GESCHÄTZTEN POTENTIALS UND DER WAHRSCHEINLICHKEITSVERTEILUNG DER HYPOXISCHEN TUMORZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT DER DISTANZ ZU CD8 ⁺ IMMUNZELLEN.	- 70 -
ABBILDUNG 25: VORGEHEN BEI DER DISTANZANALYSE UND DEM ERSTELLEN VON BALKENDIAGRAMMEN IN TABLEAU.....	- 71 -

ABBILDUNG 26: BOXPLOTS UND BALKENDIAGRAMM ZUR DARSTELLUNG DER VERTEILUNG KLASSIFIZIERTEN ZELLSUBPOPULATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT IHRER DISTANZ ZUR NÄCHSTGELEGENEN CD8 ⁺ ZELLE.	- 72 -
ABBILDUNG 27: DESKRIPTIVE STATISTIKEN AUS SPSS ZUM UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIV.	- 73 -
ABBILDUNG 28: ERGEBNIS DER VISUELLEN GRUPPIERUNG DER IMMUNZELLEN.	- 73 -
ABBILDUNG 29: ROC-KURVE MIT DEN ZUGEHÖRIGEN PUNKTWERTEN DER KURVE FÜR DEN ANTEIL CD8 ⁺ CTL IN DEN WHOLE-SLIDE TUMORPRÄPARATEN DES UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIVS.	- 74 -
ABBILDUNG 30: KAPLAN-MEIER ANALYSEN ZUR ÜBERLEBENSZEIT DES UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIVS IN ABHÄNGIGKEIT DER HÖHE DES IMMUNZELL-ANTEILS IN DER JEWEILIGEN PATIENTENGRUPPE.	- 74 -
ABBILDUNG 31: DARSTELLUNG DER MITTLEREN UND MEDIANEN ÜBERLEBENSZEITEN MIT DEN ZUGEHÖRIGEN 95 % KONFIDENZINTERVALLEN FÜR DIE TRENNUUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS NACH DEM MEDIAN. ...	- 75 -
ABBILDUNG 32: AUSSCHNITT AUS EINER LYMPHKNOTENMETASTASE DES MALIGNEN MELANOMS AUS IF-108 V74 (x2.5) MIT ZUGEHÖRIGER EINZELZELLBASIERTER AUSWERTUNG IN QUPATH.	- 76 -
ABBILDUNG 33: IF-FÄRBUNGEN DES MALIGNEN MELANOMS AUS UNTERSCHIEDLICHER EXTRAZEREBRALER LOKALISATION.	- 77 -
ABBILDUNG 34: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN ZEREBRALER METASTASEN DES MALIGNEN MELANOMS. ...	- 77 -
ABBILDUNG 35: SPATIALE ANALYSE DER ZELLINTERAKTION VON STROMALEN CD73 ⁺ ZELLEN MIT NORMOXISCHEN TUMORZELLEN IN MOSAICSUITE.	- 78 -
ABBILDUNG 36: SPATIALE ANALYSE DER ZELLINTERAKTION VON STROMALEN CD73 ⁺ ZELLEN MIT HYPOXISCHEN TUMORZELLEN IN MOSAICSUITE.	- 78 -
ABBILDUNG 37: BOXPLOTS ZUR DISTANZANALYSE FÜR STROMALE CD73 ⁺ GEFÄßE IN TABLEAU, SOWIE DIE ZUGEHÖRIGE HEATMAP FÜR DEN ANALYSIERTEN TUMORAUSSCHNITT AUS QUPATH.	- 78 -
ABBILDUNG 38: AUSSCHNITTE (x2.5) AUS MULTIPLEX-IF-FÄRBUNGEN VON MELANOMPRÄPARATEN FÜR DIE MARKER CD34 (GRÜN), Na ⁺ K ⁺ ATPASE (ROT) UND CD45 ⁺ LEUKOZYTEN (GELB).	- 79 -
ABBILDUNG 39: IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN AUS IF-109 V77 ZUR SICH ÜBERSCHNEIDENDEN INTRATUMORALEN EXPRESSION DER MARKER CD73 UND GLUT-1.	- 80 -
ABBILDUNG 40: DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE AUS DER SPATIALEN ANALYSE ZUR ZELLINTERAKTION VON CD8 ⁺ CTL UND CD73 ⁺ ZELLEN IN MOSAICSUITE.	- 81 -
ABBILDUNG 41: BALKENDIAGRAMM ZUR GESAMTZAHL DER IM UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIV FESTGESTELLTEN PHÄNOTYPEN DER TUMORIMMUNITÄT.	- 82 -
ABBILDUNG 42: AUSSCHNITTSVERGRÖßERUNG (6.7x) EINES AREALS INNERHALB EINER LYMPHKNOTENMETASTASE, WELCHES DIE DICHTHE INFILTRATION CD8 ⁺ CTL ZEIGT.	- 83 -
ABBILDUNG 43: BALKENDIAGRAMM ZUM ANTEIL DER MITTLEREN IMMUNZELLINFILTRATION IN ABHÄNGIGKEIT DER JEWEILIGEN TUMORLOKALISATION, SOWIE VERGLEICHENDE ANALYSE ANHAND ZWEIER BOXPLOTS ZUR CD8 INFILTRATION IN MELANOMPRÄPARATEN AUS ZNS VS. NON-ZNS-LOKALISATION MIT ZUGEHÖRIGER KORRELATIONSANALYSE.	- 84 -
ABBILDUNG 44: DISTANZANALYSE FÜR DEN TUMORPHÄNOTYP DES AUSGESCHLOSSENEN INFILTRATS.	- 86 -
ABBILDUNG 45: DISTANZANALYSE FÜR DEN TUMORPHÄNOTYP DES IMMUNOLOGISCH ANERGEN TUMORS:.....	- 88 -
ABBILDUNG 46: DISTANZANALYSE FÜR DEN TUMORPHÄNOTYP DES IMMUNOGENEN TUMORS.	- 89 -
ABBILDUNG 47: STREUDIAGRAMM MIT ZUGEHÖRIGER TRENDKURVE ZUM PROZENTUALEN ANTEIL CD8 ⁺ CTL IN ABHÄNGIGKEIT DES AUSMAßES DER TUMORHYPOXIE ÜBER DAS GESAMTKOLLEKTIV, SOWIE EINE DARSTELLUNG DER RESULTATE AUS DER LINEAREN KORRELATIONSANALYSE NACH PEARSON.	- 91 -
ABBILDUNG 48: BOXPLOT ZU DEN IM UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIV ERFASSTEN QUANTITATIVEN DATEN DES ANTEILS CD8 ⁺ CTL, SOWIE KORRELATIONSANALYSE ZUR ABHÄNGIGKEIT DES ANTEILS CD8 ⁺ CTL VOM AUSMAß DER TUMORHYPOXIE.	- 91 -

ABBILDUNG 49: BEISPIELHAFTE STATISTISCHE DISTANZANALYSE FÜR EINEN TUMOR MIT VORHANDENER ÜBERLAPPENDER EXPRESSION VON GLUT-1 UND CD73 IM TUMORPHÄNOTYP DES AUSGESCHLOSSENEN INFILTRATS.....	- 93 -
ABBILDUNG 50: STREUDIAGRAMM ZUM ANTEIL CD8 ⁺ CTL IN ABHÄNGIGKEIT DES AUSMAßES DER CD73 ⁺ TUMORHYPOXIE ÜBER DAS GESAMTE PATIENTENKOLLEKTIV	- 94 -
ABBILDUNG 51: STREUDIAGRAMM ZUM PROZENTUALEN ANTEIL CD8 ⁺ CTL IN ABHÄNGIGKEIT DES AUSMAßES DES CD73 ⁺ TUMORS ÜBER DAS GESAMTE PATIENTENKOLLEKTIV	- 95 -
ABBILDUNG 52: STREUDIAGRAMM ZUM PROZENTUALEN ANTEIL CD8 ⁺ CTL IN ABHÄNGIGKEIT DES AUSMAßES DES CD73 ⁺ TUMORS ÜBER DAS PATIENTENKOLLEKTIV MIT EINER ÜBERLAPPENDEN INTRATUMORALEN EXPRESSION VON GLUT-1 UND CD73	- 95 -
ABBILDUNG 53: ROC-KURVE MIT ZUGEHÖRIGEN KOORDINATEN DER KURVE FÜR DEN ANTEIL HYPOXISCHER TUMORZELLEN IN DEN WHOLE-SLIDE TUMORPRÄPARATEN DES UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIVS	- 96 -
ABBILDUNG 54: KAPLAN-MEIER-ANALYSE ZUR ÜBERLEBENSZEIT DES UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIVS IN ABHÄNGIGKEIT DER JEWEILIGEN AUSPRÄGUNG DER TUMORHYPOXIE.....	- 97 -
ABBILDUNG 55: KAPLAN-MEIER-ANALYSE ZUR ÜBERLEBENSZEIT DES GESAMTEN PATIENTENKOLLEKTIVS IN ABHÄNGIGKEIT DES ANTEILS CD73 POSITIVEN TUMORS.....	- 98 -
ABBILDUNG 56: KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSKURVEN ZUR ÜBERLEBENSZEIT DES PATIENTENKOLLEKTIVS, IN DEM EINE ÜBERLAPPENDE INTRATUMORALE EXPRESSION VON GLUT-1 UND CD73 GEFUNDEN WURDE, IN ABHÄNGIGKEIT DES ANTEILS CD73 POSITIVEN TUMORS.....	- 99 -
ABBILDUNG 57: KAPLAN-MEIER-ANALYSE ZUR ÜBERLEBENSZEIT DES UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIVS IN ABHÄNGIGKEIT DES AUSMAßES DER CD8 ⁺ IMMUNZELLINFILTRATION.	- 100 -
ABBILDUNG 58: KAPLAN-MEIER-ANALYSE ZUR ÜBERLEBENSZEIT DES GESAMTEN PATIENTENKOLLEKTIVS IN ABHÄNGIGKEIT PHÄNOTYPS DER TUMORIMMUNITÄT. DARSTELLUNG DES ANTEILS CD8 ⁺ CTL IN DEN TUMORPRÄPARATEN IN ABHÄNGIGKEIT DES DORT BESCHRIEBENEN PHÄNOTYPS DER TUMORIMMUNITÄT FÜR DAS GESAMTE PATIENTENKOLLEKTIV MITHILFE VON BOXPLOTS.	- 101 -
ABBILDUNG 59: KAPLAN-MEIER-ANALYSE ZUR ÜBERLEBENSZEIT DES PATIENTENKOLLEKTIVS IN ABHÄNGIGKEIT DES ANGEWANDTEN THERAPIEALGORITHMUS DER RADIOIMMUNTHERAPIE.....	- 102 -
ABBILDUNG 60: EFFEKTE DER STRAHLENTHERAPIE AUF DAS TUMORMIKROMILIEU.	- 104 -
ABBILDUNG 61: DAS KONTINUUM DER TUMORIMMUNITÄT.....	- 116 -
ABBILDUNG 62: AUSSCHNITT (X2.5) AUS EINER MULTIPLEX-IF-FÄRBUNG EINER LK-METASTASE DES MALIGNEN MELANOMS.	- 123 -
ABBILDUNG 63: ALTERSSTANDARDISIERTE INZIDENZ UND MORTALITÄT, SOWIE ABSOLUTE ZAHLEN DER NEUERKRANKUNGS- UND STERBEFÄLLE NACH GESCHLECHT IN DEUTSCHLAND VON 1999-2012.....	- 145 -
ABBILDUNG 64: DER PROZENTUALE ANTEIL AUSGEWÄHLTER TUMORLOKALISATIONEN AN ALLEN KREBSNEUERKRANKUNGEN IN DEUTSCHLAND IM JAHR 2012.....	- 145 -
ABBILDUNG 65: ALTERSSTANDARDISIERTE NEUERKRANKUNGS- UND STERBERATEN IM INTERNATIONALEN VERGLEICH JE 100.000 EINWOHNER.	- 146 -
ABBILDUNG 66: ALTERSSPEZIFISCHE ERKRANKUNGSRATEN DES MELANOMS NACH GESCHLECHT	- 146 -
ABBILDUNG 67: VERTEILUNG DER T-STADIEN BEI MELANOM-ERSTDIAGNOSE NACH GESCHLECHT.	- 147 -
ABBILDUNG 68: GEGENÜBERSTELLUNG DER KLASSIFIKATIONEN DER TUMORDICKE NACH BRESLOW (IN MM) UND DES INVASIONSLEVELS NACH CLARK (LEVEL I-IV).....	- 147 -
ABBILDUNG 69: FOLGEN DES STRAHLENINDUZIERTEN ZELLTODES.....	- 148 -
ABBILDUNG 70: DARSTELLUNG DES ZYLINDERMODELLS ZUR SAUERSTOFFDIFFUSION NACH KROGH	- 149 -

ABBILDUNG 71: ÜBERBLICK EINER LYMPHKNOTENMETASTASE EINES MELANOMS, 4-KANAL-IF	- 149 -
ABBILDUNG 72: AUS ABBILDUNG 71 VERGRÖßERTER AUSSCHNITT (5.5X).....	- 150 -
ABBILDUNG 73: BEISPIEL DER EINZELZELLBASIERTEN SEGMENTIERUNG.	- 150 -
ABBILDUNG 74: BEISPIEL DER EINZELZELLBASIERTEN SEGMENTIERUNG DES GEZEIGTEN AUSSCHNITTS	- 151 -
ABBILDUNG 75: DARSTELLUNG DER HEATMAP FÜR DAS VERHÄLTNISS VON ZELLKERN ZUR GESAMTFLÄCHE DER ZELLE	- 151 -
ABBILDUNG 76: BEISPIEL DER ANWENDUNG DES MASCHINELLEN LERNENS FÜR DIE ZELLKlassIFIKATION IN TUMOR – UND STROMAZELLEN.	- 152 -
ABBILDUNG 77: DARSTELLUNG DER KLASsIFIKATION IN TUMORZELLEN (ROT) UND STROMAZELLEN (GRÜN) MIT HILFE DES MASCHINELLEN LERNENS.	- 152 -
ABBILDUNG 78: ANSCHLIEßEND VORGENOMMENE KLASsIFIKATION DER IMMUNZELLEN (WEIß) NACH DEM SCHWELLENWERTPRINZIP.	- 153 -
ABBILDUNG 79: ANSCHLIEßEND VORGENOMMENE UNTERSCHIEDUNG HYPOXISCHER (ROT) UND NORMOXISCHER (BLAU) TUMORZELLEN.	- 153 -
ABBILDUNG 80: SUBKLASsIFIKATION DER HYPOXISCHEN UND NORMOXISCHEN TUMORZELLEN	- 154 -
ABBILDUNG 81: ABBILDUNG ALLER ZELLKLASSEN DER AUSGEWÄHLTEN ROI.....	- 154 -
ABBILDUNG 82: ERGEBNIS DER VOLLSTÄNDIGEN ZELLKlassIFIKATION MIT DARUNTER GELEGTER DARSTELLUNG DER IF-KANÄLE.	- 155 -
ABBILDUNG 83: RESULTATE DER DISTANZTRANSFORMATION FÜR CD8 ⁺ CTL IN FORM EINER HEATMAP.....	- 155 -
ABBILDUNG 84: AUSSCHNITT AUS DEM GENERIERTEN DATENSATZ ZU DER DEFINIERTEN ROI.....	- 156 -
ABBILDUNG 85: DESKRIPTIVE STATISTIKEN AUS SPSS ZUM UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIV EXKLUSIVE DER ZNS-METASTASEN.	- 156 -
ABBILDUNG 86: DESKRIPTIVE STATISTIKEN AUS SPSS ZUM PATIENTENKOLLEKTIV, UNTER AUSSCHLIEßLICHER BETRACHTUNG VON PATIENTEN MIT MELANOMPRÄPARATEN AUS ZNS-LOKALISATION.	- 156 -
ABBILDUNG 87: AUSSCHNITT AUS EINER MULTIPLEX-IF-FÄRBUNG EINER LK-METASTASE MIT CA IX (GRÜN), CD8 (GELB) UND CD73 (ROT).	- 157 -
ABBILDUNG 88: IMMUNFLUOREsZENZFÄRBUNGEN AUS IF-134 VII58.....	- 157 -
ABBILDUNG 89: IMMUNFLUOREsZENZFÄRBUNGEN AUS IF-141 VIII03.....	- 158 -
ABBILDUNG 90: GEGENÜBERSTELLUNG DER IMMUNFLUOREsZENZFÄRBUNGEN AUS DER UNTERSUCHUNGSSERIE UND DER NEBENSERIE FÜR DIE MÖGLICHEN GEFÄßMARKER CD73 UND CD34	- 158 -
ABBILDUNG 91: VERGLEICHENDE ANALYSE DER IF-FÄRBUNGEN FÜR CD8 UND CD45 AUS DEN IF-PRÄPARATEN IF-114 V96 BZW. IF-108 V74	- 159 -
ABBILDUNG 92: VERGLEICHENDE ANALYSE ZWEIER PROBEFÄRBUNGEN FÜR VERSCHIEDENE IMMUNZELLPOPULATIONEN.....	- 159 -
ABBILDUNG 93: KAPLAN-MEIER-ANALYSE ZUR ÜBERLEBENSZEIT DES UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIVS IN ABHÄNGIGKEIT DER JEWELIGEN AUSPRÄGUNG DER TUMORHYPOXIE.....	- 160 -
ABBILDUNG 94: KAPLAN-MEIER-ANALYSE ZUR ÜBERLEBENSZEIT DES UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIVS IN ABHÄNGIGKEIT DER JEWELIGEN AUSPRÄGUNG DER TUMORHYPOXIE.....	- 160 -
ABBILDUNG 95: KAPLAN-MEIER-ANALYSE ZUR ÜBERLEBENSZEIT DES GESAMTEN PATIENTENKOLLEKTIVS IN ABHÄNGIGKEIT DES ANTEILS CD73 ⁺ HYPOXISCHER TUMORZELLEN.	- 161 -
ABBILDUNG 96: KAPLAN-MEIER-ANALYSE ZUR ÜBERLEBENSZEIT DES GESAMTEN PATIENTENKOLLEKTIVS IN ABHÄNGIGKEIT DES AUSMAßES DER CD8 ⁺ IMMUNZELLINFILTRATION IN DEN TUMOR.	- 161 -

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: GERÄTE UND GEBRAUCHSWAREN, DIE IM RAHMEN DER IF-FÄRBUNGEN VERWENDET WURDEN...	- 50 -
TABELLE 2: MEDIEN UND CHEMIKALIEN FÜR DIE MULTIPLEX-IMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNGEN.	- 51 -
TABELLE 3: PUFFERLÖSUNGEN ZUM WASCHEN DER PRÄPARATE.	- 51 -
TABELLE 4: VERWENDETE PUFFER ZUR ANTIGENDEMASKIERUNG.	- 51 -
TABELLE 5: REAGENZIEN FÜR DIE MIHC FÄRBUNGEN.....	- 51 -
TABELLE 6: FÜR DIE FÄRBUNGEN VERWENDETE ANTIKÖRPER.	- 52 -
TABELLE 7: IN DEN FÄRBUNGEN VERWENDETE FLUOROCHROME.....	- 52 -
TABELLE 8: DURCHGEFÜHRTE MULTIPLEX-IF-FÄRBUNGEN MIT ZUGEHÖRIGEN ANTIGENEN UND FLUOROCHROMEN.	- 59 -
TABELLE 9: AUFLISTUNG ALLER AUSGEWERTETEN TUMORPRÄPARATE DER UNTERSUCHUNGSSERIE MIT DEN BERECHNETEN QUANTITATIVEN DATEN (RELATIVE HÄUFIGKEITEN DER EINZELNEN ZELLKLASSEN UND GESAMTZELLZAHLEN DES PRÄPARATES), DEN ZUGEHÖRIGEN KLINISCHEN DATEN UND DEM INFILTRATIONSMUSTER CD8 ⁺ CTL.	- 65 -
TABELLE 10: AUFLISTUNG DER GERUNDETEN QUANTITATIVEN DATEN ZUR RELATIVEN HÄUFIGKEIT DER ZELLPOPULATIONEN UND DEN ZUGEHÖRIGEN KLINISCHEN DATEN DES GESAMTEN PATIENTENKOLLEKTIVS MIT AUSSCHLIEßLICH DENJENIGEN TUMORPRÄPARATEN, WELCHE DIE HÖCHSTE GESAMTZELLZAHL AUFWEISEN.....	- 66 -
TABELLE 11: TABELLARISCHE AUFLISTUNG DERJENIGEN PATIENTEN MIT ZUGEHÖRIGEN HISTO-PRÄPARATEN, WELCHE EINE SICH INTRATUMORAL ÜBERSCHNEIDENDE EXPRESSION DER MARKER GLUT-1 UND CD73 ZEIGEN.....	- 95 -
TABELLE 12: KLASSIFIKATION DES AJCC-STADIUMS DES MALIGNEN MELANOMS	- 162 -
TABELLE 13: STADIENANGEPASSTES DIAGNOSTISCHES VORGEHEN BEIM MALIGNEN MELANOM	- 163 -
TABELLE 14: 5- JAHRES ÜBERLEBENSRATE BEIM MALIGNEN MELANOM IN ABHÄNGIGKEIT DES TUMORSTADIUMS	- 163 -
TABELLE 15: KLINISCHE DATEN DES IN DER RETROSPEKTIVEN KOHORTENSTUDIE UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIVS	- 164 -
TABELLE 16: TABELLARISCHE AUFLISTUNG ALLER IM RAHMEN DER ARBEIT DURCHGEFÜHRTEN MULTIPLEX-IF- FÄRBUNGEN MIT ZUGEHÖRIGEN HISTO-PRÄPARATEN, SOWIE DEN KLINISCHEN DATEN AUS DEM UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIV.	- 165 -
TABELLE 17: ANTIKÖRPER, IMMUNHISTOCHEMISCHE TECHNIK UND RESULTIERENDE FÄRBEMUSTER.	- 166 -
TABELLE 18: AUFLISTUNG DER GERUNDETEN QUANTITATIVEN DATEN MIT DEN ZUGEHÖRIGEN KLINISCHEN DATEN DES GESAMTEN PATIENTENKOLLEKTIVS MIT DENJENIGEN TUMORPRÄPARATEN, WELCHE DIE HÖCHSTE GESAMTZELLZAHL AUFWEISEN.....	- 167 -
TABELLE 19: AUFLISTUNG DER GERUNDETEN QUANTITATIVEN DATEN MIT DEN ZUGEHÖRIGEN KLINISCHEN DATEN DESJENIGEN PATIENTENKOLLEKTIVS EXKLUSIVE ALLER TUMORPRÄPARATE AUS ZNS- LOKALISATIONEN	- 167 -
TABELLE 20: AUFLISTUNG DER GERUNDETEN QUANTITATIVEN DATEN UND ZUGEHÖRIGEN KLINISCHEN DATEN DESJENIGEN PATIENTENKOLLEKTIVS AUSSCHLIEßLICH DERJENIGEN TUMORPRÄPARATE, WELCHE AUS ZNS- LOKALISATIONEN ENTNOMMEN WURDEN.....	- 168 -
TABELLE 21: DARSTELLUNG DER IF-FÄRBUNGEN DER MELANOM SERIE UNTER HERVORHEBEN DERJENIGEN PRÄPARATE MIT EINER ÜBERLAPPENDEN INTRATUMORALEN EXPRESSION VON CD73 UND GLUT-1 MIT DEN ZUGEHÖRIGEN KLINISCHEN DATEN.	- 168 -

VII. Bibliographie

1. Krebsregisterdaten Zf, e.V. GdeKiD. Krebs in Deutschland für 2013/2014. Robert Koch Institut; 2017.
2. Koller KM, Mackley HB, Liu J, Wagner H, Talamo G, Schell TD, et al. Improved survival and complete response rates in patients with advanced melanoma treated with concurrent ipilimumab and radiotherapy versus ipilimumab alone. *Cancer Biol Ther.* 2017;18(1):36-42.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
5. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123(3191):309-14.
6. Barker HE, Paget JT, Khan AA, Harrington KJ. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(7):409-25.
7. Mayer A. Tumor-Pathophysiologie Universitätsmedizin Mainz Klinik und Poliklinik für Radioonkologie und Strahlentherapie 2018 [28.03.2018]. Available from: <http://www.unimedizin-mainz.de/radioonkologie-und-strahlentherapie/wissenschaftler/forschungsgruppen/tumorpathophysiologie.html>.
8. Bernhard EJ. Interventions that induce modifications in the tumor microenvironment. *Cancer Radiother.* 2011;15(5):376-82.
9. Wolchok JD, Hodi FS, Weber JS, Allison JP, Urba WJ, Robert C, et al. Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1291:1-13.
10. Kobold S, Duewell P, Schnurr M, Subklewe M, Rothenfusser S, S E. Immunotherapy in tumors—activated T cells as a new treatment modality. *Dtsch Arztebl Int.* 2015:809-15.
11. Reiser M, Kuhn F-P, Debus J. *Radiologie.* Stuttgart: Thieme; 2011.
12. Ohta A, Sitkovsky M. Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. *Front Immunol.* 2014;5:304.
13. Silk AW, Bassetti MF, West BT, Tsien CI, Lao CD. Ipilimumab and radiation therapy for melanoma brain metastases. *Cancer Med.* 2013;2(6):899-906.
14. Bankhead P, Loughrey MB, Fernandez JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):16878.
15. Moll I. *Dermatologie.* Hamburg: Thieme; 2016
16. DKG, DDG. S3-Leitlinie Malignes Melanom; Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche dermatologische Gesellschaft: AWMF; 2016.
17. Garbe C. *Management des malignen Melanoms.* Heidelberg: Springer Verlag; 2006.
18. Krebsregisterdaten Zf. Malignes Melanom der Haut: Robert Koch Institut; 2015 [updated 1.11.2017]. Available from: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Melanom/melanom_node.html.
19. Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, et al. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland. Robert Koch Institut; 2016.
20. Hengge UR, R D. *Malignes Melanom.* Köln: Deutscher Ärzte-Verlag Köln; 2006.
21. Plewig G, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M. *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie:* Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2018. XXVI, 2265 p.
22. Grabbe S, von Stebut-Borschitz E, Kollegen u. *Dermatologie Skript [Lehrskript].* 2016.
23. Hegde PS, Karanikas V, Evers S. The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition. *Clin Cancer Res.* 2016;22(8):1865-74.
24. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature.* 2017;541(7637):321-30.
25. Straub B, W R. *Pathologie leicht gemacht - Begleitskript zum Kurs der Pathologie.* In: Mainz U, editor. *Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz* 2016.
26. Sinn P. *Malignes Melanom Electronic Learning Institute of Pathology Heidelberg:* Universität Heidelberg; 2017 [updated 28.03.2018]. Available from: <https://eliph.klinikum.uni-heidelberg.de/allg/94/malignes-melanom>.
27. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009;27(36):6199-206.

28. Patel KR, Lawson DH, Kudchadkar RR, Carthon BC, Oliver DE, Okwan-Duodu D, et al. Two heads better than one? Ipilimumab immunotherapy and radiation therapy for melanoma brain metastases. *Neuro Oncol.* 2015;17(10):1312-21.
29. Frinton E, Tong D, Tan J, Read G, Kumar V, Kennedy S, et al. Metastatic melanoma: prognostic factors and survival in patients with brain metastases. *J Neurooncol.* 2017;135(3):507-12.
30. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7-30.
31. Garbe C, Terheyden P, Keilholz U, Kolbl O, Hauschild A. Treatment of melanoma. *Dtsch Arztebl Int.* 2008;105(49):845-51.
32. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892):949-54.
33. Goldinger SM, Zimmer L, Schulz C, Ugurel S, Hoeller C, Kaehler KC, et al. Upstream mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway inhibition: MEK inhibitor followed by a BRAF inhibitor in advanced melanoma patients. *Eur J Cancer.* 2014;50(2):406-10.
34. Gadiot J, Hooijkaas AI, Deken MA, Blank CU. Synchronous BRAF(V600E) and MEK inhibition leads to superior control of murine melanoma by limiting MEK inhibitor induced skin toxicity. *Onco Targets Ther.* 2013;6:1649-58.
35. Korn EL, Liu PY, Lee SJ, Chapman JA, Niedzwiecki D, Suman VJ, et al. Meta-analysis of phase II cooperative group trials in metastatic stage IV melanoma to determine progression-free and overall survival benchmarks for future phase II trials. *J Clin Oncol.* 2008;26(4):527-34.
36. Schmidberger H, Rapp M, Ebersberger A, Hey-Koch S, Loquai C, Grabbe S, et al. Long-term survival of patients after ipilimumab and hypofractionated brain radiotherapy for brain metastases of malignant melanoma: sequence matters. *Strahlenther Onkol.* 2018;194(12):1144-51.
37. Fife KM, Colman MH, Stevens GN, Firth IC, Moon D, Shannon KF, et al. Determinants of outcome in melanoma patients with cerebral metastases. *J Clin Oncol.* 2004;22(7):1293-300.
38. Plasswilm L GM, Putora Paul-Martin. Radioimmuntherapie – die neue Strategie im Kampf gegen Krebs? *Schweizer Zeitschrift für Onkologie.* 2016;02/2016.
39. Liang Y, Peng H. STING-cytosolic DNA sensing: the backbone for an effective tumor radiation therapy. *Ann Transl Med.* 2016;4(3):60.
40. Vlodaysky I, Beckhove P, Lerner I, Pisano C, Meirovitz A, Ilan N, et al. Significance of heparanase in cancer and inflammation. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society.* 2012;5(2):115-32.
41. Lee Y, Auh SL, Wang Y, Burnette B, Wang Y, Meng Y, et al. Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8+ T cells: changing strategies for cancer treatment. *Blood.* 2009;114(3):589-95.
42. Gao H, Dong Z, Gong X, Dong J, Zhang Y, Wei W, et al. Effects of various radiation doses on induced T-helper cell differentiation and related cytokine secretion. *Journal of radiation research.* 2018;59(4):395-403.
43. Honeychurch J, Illidge TM. The influence of radiation in the context of developing combination immunotherapies in cancer. *Ther Adv Vaccines Immunother.* 2017;5(6):115-22.
44. Bose D. cGAS/STING Pathway in Cancer: Jekyll and Hyde Story of Cancer Immune Response. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11):2456.
45. Chen Q, Sun L, Chen ZJ. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat Immunol.* 2016;17(10):1142-9.
46. Deng L, Liang H, Xu M, Yang X, Burnette B, Arina A, et al. STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity.* 2014;41(5):843-52.
47. Butterfield LH, Kaufman HL, Marincola F. *Cancer Immunotherapy Principles and Practice*: Demos Medical Publishing; 2017.
48. Gerber SA, Lim JY, Connolly KA, Sedlacek AL, Barlow ML, Murphy SP, et al. Radio-responsive tumors exhibit greater intratumoral immune activity than nonresponsive tumors. *Int J Cancer.* 2014;134(10):2383-92.
49. Letendre P, Monga V, Milhem M, Zakharia Y. Ipilimumab: from preclinical development to future clinical perspectives in melanoma. *Future Oncology.* 2017;13(7):625-36.

50. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*. 2010;363(8):711-23.
51. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*. 2011;364(26):2517-26.
52. CiRen B, Wang X, Long Z. The evaluation of immunotherapy and chemotherapy treatment on melanoma: a network meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7(49):81493-511.
53. Hodi FS, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann KF, McDermott DF, et al. Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2016;17(11):1558-68.
54. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *The New England journal of medicine*. 2015;372(21):2006-17.
55. Chang CH, Qiu J, O'Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell*. 2015;162(6):1229-41.
56. Cretenet G, Clerc I, Matias M, Loisel S, Craveiro M, Oburoglu L, et al. Cell surface Glut1 levels distinguish human CD4 and CD8 T lymphocyte subsets with distinct effector functions. *Sci Rep*. 2016;6:24129.
57. Harder N, Schönmeier R, Nekolla K, Meier A, Brieu N, Vanegas C, et al. Automatic discovery of image-based signatures for ipilimumab response prediction in malignant melanoma. *Scientific reports*. 2019;9(1):7449-.
58. Knisely JP, Yu JB, Flanigan J, Sznol M, Kluger HM, Chiang VL. Radiosurgery for melanoma brain metastases in the ipilimumab era and the possibility of longer survival. *Journal of neurosurgery*. 2012;117(2):227-33.
59. Mathew M, Tam M, Ott PA, Pavlick AC, Rush SC, Donahue BR, et al. Ipilimumab in melanoma with limited brain metastases treated with stereotactic radiosurgery. *Melanoma Res*. 2013;23(3):191-5.
60. Sharabi AB, Lim M, DeWeese TL, Drake CG. Radiation and checkpoint blockade immunotherapy: radiosensitisation and potential mechanisms of synergy. *Lancet Oncol*. 2015;16(13):e498-509.
61. Eckert F FR, Fokas E, Gaipl U, Hecht M, Krause M. Stellungnahme zur Strahlentherapie in Kombination mit Immuntherapie. Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie eV. 2018.
62. Rodriguez-Ruiz ME, Rodriguez I, Garasa S, Barbes B, Solorzano JL, Perez-Gracia JL, et al. Abscopal Effects of Radiotherapy Are Enhanced by Combined Immunostimulatory mAbs and Are Dependent on CD8 T Cells and Crosspriming. *Cancer Res*. 2016;76(20):5994-6005.
63. Vanpouille-Box C, Formenti SC, Demaria S. Toward Precision Radiotherapy for Use with Immune Checkpoint Blockers. *Clin Cancer Res*. 2018;24(2):259-65.
64. Gartrell RD, Marks DK, Hart TD, Li G, Davari DR, Wu A, et al. Quantitative Analysis of Immune Infiltrates in Primary Melanoma. *Cancer Immunol Res*. 2018;6(4):481-93.
65. Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Yuan J, Postow MA, Wong P, Capone M, et al. Increases in Absolute Lymphocytes and Circulating CD4⁺ and CD8⁺ T Cells Are Associated with Positive Clinical Outcome of Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. *Clin Cancer Res*. 2016;22(19):4848-58.
66. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014;515(7528):568-71.
67. Barua S, Fang P, Sharma A, Fujimoto J, Wistuba I, Rao AUK, et al. Spatial interaction of tumor cells and regulatory T cells correlates with survival in non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2018;117:73-9.
68. Gide TN, Silva IP, Quek C, Ahmed T, Menzies AM, Carlino MS, et al. Close proximity of immune and tumor cells underlies response to anti-PD-1 based therapies in metastatic melanoma patients. *OncoImmunology*. 2020;9(1):1659093.
69. Halama N, Spille A, Lerchl T, Brand K, Herpel E, Welte S, et al. Hepatic metastases of colorectal cancer are rather homogeneous but differ from primary lesions in terms of immune cell infiltration. *Oncoimmunology*. 2013;2(4):e24116.

70. Woo SR, Corrales L, Gajewski TF. The STING pathway and the T cell-inflamed tumor microenvironment. *Trends in immunology*. 2015;36(4):250-6.
71. Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science*. 2015;348(6230):74-80.
72. Horsman MR, Vaupel P. Pathophysiological Basis for the Formation of the Tumor Microenvironment. *Front Oncol*. 2016;6:66.
73. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(2):225-39.
74. Mayer A. Die klinische Bedeutung endogener Marker der Tumorphypoxie [Habilitationsschrift]. Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg Universität Mainz: Johannes Gutenberg Universität Mainz; 2015.
75. Thomlinson RH, Gray LH. The Histological Structure of Some Human Lung Cancers and the Possible Implications for Radiotherapy. *British Journal of Cancer*. 1955;9(4):539-49.
76. Grinberg O, Novozhilov B, Grinberg S, Friedman B, Swartz HM, editors. *Axial Oxygen Diffusion in the Krogh Model. Oxygen Transport to Tissue XXVI*; 2005 2005//; Boston, MA: Springer US.
77. Schmidt; R, Lang; F, Heckmann M. *Physiologie des Menschen*. Würzburg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2011. 979 p.
78. Vaupel P, Hockel M, Mayer A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO₂ histography. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(8):1221-35.
79. Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Seminars in radiation oncology*. 2004;14(3):198-206.
80. Chaplin DJ, Olive PL, Durand RE. Intermittent blood flow in a murine tumor: radiobiological effects. *Cancer Res*. 1987;47(2):597-601.
81. Kimura H, Braun RD, Ong ET, Hsu R, Secomb TW, Papahadjopoulos D, et al. Fluctuations in red cell flux in tumor microvessels can lead to transient hypoxia and reoxygenation in tumor parenchyma. *Cancer Res*. 1996;56(23):5522-8.
82. Wang M, Zhao J, Zhang L, Wei F, Lian Y, Wu Y, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer*. 2017;8(5):761-73.
83. Harris AL. Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2:38.
84. Rankin EB, Nam JM, Giaccia AJ. Hypoxia: Signaling the Metastatic Cascade. *Trends Cancer*. 2016;2(6):295-304.
85. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*. 2016;41(3):211-8.
86. Warburg O. The Metabolism of Carcinoma Cells. *The Journal of Cancer Research*. 1925;9(1):148-63.
87. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33.
88. Walenta S, Mueller-Klieser WF. Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Seminars in radiation oncology*. 2004;14(3):267-74.
89. Brizel DM, Schroeder T, Scher RL, Walenta S, Clough RW, Dewhirst MW, et al. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001;51(2):349-53.
90. Sedlakova O, Svastova E, Takacova M, Kopacek J, Pastorek J, Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. *Front Physiol*. 2014;4:400.
91. Helmlinger G SA, Dellian M, Forbes NS, Jain RK. Acid Production in Glycolysis-impaired Tumors Provides New Insights into Tumor Metabolism. *Clinical Cancer Research*. May 2002.
92. Weinberg R. *The Biology of Cancer*: Taylor & Francis; 2013. 876 p.
93. Estrella V, Chen T, Lloyd M, Wojtkowiak J, Cornell HH, Ibrahim-Hashim A, et al. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res*. 2013;73(5):1524-35.
94. Gupta S, Roy A, Dwarakanath BS. Metabolic Cooperation and Competition in the Tumor Microenvironment: Implications for Therapy. *Front Oncol*. 2017;7:68.

95. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia-Driven Adenosine Accumulation: A Crucial Microenvironmental Factor Promoting Tumor Progression. *Adv Exp Med Biol.* 2016;876:177-83.
96. Ohta A. A Metabolic Immune Checkpoint: Adenosine in Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2016;7:109.
97. Di Virgilio F. Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res.* 2012;72(21):5441-7.
98. Sitkovsky MV, Hatfield S, Abbott R, Belikoff B, Lukashev D, Ohta A. Hostile, hypoxia-A2-adenosinergic tumor biology as the next barrier to overcome for tumor immunologists. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(7):598-605.
99. Eltzschig HK. Extracellular adenosine signaling in molecular medicine. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany).* 2013;91(2):141-6.
100. Volmer JB, Thompson LF, Blackburn MR. Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated adenosine production is tissue protective in a model of bleomycin-induced lung injury. *J Immunol.* 2006;176(7):4449-58.
101. Ghiringhelli F, Bruchard M, Chalmin F, Rebe C. Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immunoescape. *Journal of biomedicine & biotechnology.* 2012;2012:473712.
102. Morote-Garcia JC, Rosenberger P, Kuhlicke J, Eltzschig HK. HIF-1-dependent repression of adenosine kinase attenuates hypoxia-induced vascular leak. *Blood.* 2008;111(12):5571-80.
103. Kordaß T, Osen W, Eichmüller SB. Controlling the Immune Suppressor: Transcription Factors and MicroRNAs Regulating CD73/NT5E. *Frontiers in immunology.* 2018;9:813-.
104. Umansky V, Shevchenko I, Bazhin AV, Utikal J. Extracellular adenosine metabolism in immune cells in melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63(10):1073-80.
105. Mediavilla-Varela M, Luddy K, Noyes D, Khalil FK, Neuger AM, Soliman H, et al. Antagonism of adenosine A2A receptor expressed by lung adenocarcinoma tumor cells and cancer associated fibroblasts inhibits their growth. *Cancer Biol Ther.* 2013;14(9):860-8.
106. Zhi X, Wang Y, Zhou X, Yu J, Jian R, Tang S, et al. RNAi-mediated CD73 suppression induces apoptosis and cell-cycle arrest in human breast cancer cells. *Cancer science.* 2010;101(12):2561-9.
107. Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D, et al. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(4):1547-52.
108. Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, et al. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *Journal of cancer research and clinical oncology.* 2008;134(3):365-72.
109. Zhou JZ, Riquelme MA, Gao X, Ellies LG, Sun LZ, Jiang JX. Differential impact of adenosine nucleotides released by osteocytes on breast cancer growth and bone metastasis. *Oncogene.* 2015;34(14):1831-42.
110. Beavis PA, Divisekera U, Paget C, Chow MT, John LB, Devaud C, et al. Blockade of A2A receptors potently suppresses the metastasis of CD73⁺ tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(36):14711-6.
111. Takagi H, King GL, Robinson GS, Ferrara N, Aiello LP. Adenosine mediates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in retinal pericytes and endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science.* 1996;37(11):2165-76.
112. Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MK, et al. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(35):13132-7.
113. Ohta A, Ohta A, Madasu M, Kini R, Subramanian M, Goel N, et al. A2A adenosine receptor may allow expansion of T cells lacking effector functions in extracellular adenosine-rich microenvironments. *J Immunol.* 2009;183(9):5487-93.
114. Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, et al. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood.* 2008;111(1):251-9.
115. Linnemann C, Schildberg FA, Schurich A, Diehl L, Hegenbarth SI, Endl E, et al. Adenosine regulates CD8 T-cell priming by inhibition of membrane-proximal T-cell receptor signalling. *Immunology.* 2009;128(1 Suppl):e728-37.

116. Hasko G, Kuhel DG, Chen JF, Schwarzschild MA, Deitch EA, Mabley JG, et al. Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J.* 2000;14(13):2065-74.
117. Vaupel P, Mayer A. Can respiratory hyperoxia mitigate adenosine—driven suppression of antitumor immunity? *Annals of Translational Medicine.* 2015;3(19).
118. Mandapathil M, Szczepanski MJ, Szajnik M, Ren J, Lenzner DE, Jackson EK, et al. Increased ectonucleotidase expression and activity in regulatory T cells of patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(20):6348-57.
119. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine.* 2007;204(6):1257-65.
120. Nikolova M, Carriere M, Jenabian MA, Limou S, Younas M, Kok A, et al. CD39/adenosine pathway is involved in AIDS progression. *PLoS Pathog.* 2011;7(7):e1002110.
121. Ernst PB, Garrison JC, Thompson LF. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. *J Immunol.* 2010;185(4):1993-8.
122. Ohta A, Kini R, Ohta A, Subramanian M, Madasu M, Sitkovsky M. The development and immunosuppressive functions of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Front Immunol.* 2012;3(190):190.
123. Kerkar SP, Restifo NP. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2012;72(13):3125-30.
124. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:267-96.
125. Hatfield SM, Kjaergaard J, Lukashev D, Schreiber TH, Belikoff B, Abbott R, et al. Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation. *Sci Transl Med.* 2015;7(277):277ra30.
126. Neumann AK, Yang J, Biju MP, Joseph SK, Johnson RS, Haase VH, et al. Hypoxia inducible factor 1 alpha regulates T cell receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(47):17071-6.
127. Atkuri KR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Culturing at atmospheric oxygen levels impacts lymphocyte function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(10):3756-9.
128. Lukashev D, Klebanov B, Kojima H, Grinberg A, Ohta A, Berenfeld L, et al. Cutting edge: hypoxia-inducible factor 1alpha and its activation-inducible short isoform I.1 negatively regulate functions of CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 2006;177(8):4962-5.
129. Mancino A, Schioppa T, Larghi P, Pasqualini F, Nebuloni M, Chen IH, et al. Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions. *Blood.* 2008;112(9):3723-34.
130. Corzo CA, Condamine T, Lu L, Cotter MJ, Youn JI, Cheng P, et al. HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *The Journal of experimental medicine.* 2010;207(11):2439-53.
131. Zhang Y, Ertl HC. Starved and Asphyxiated: How Can CD8(+) T Cells within a Tumor Microenvironment Prevent Tumor Progression. *Front Immunol.* 2016;7:32.
132. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood.* 2007;109(9):3812-9.
133. Chang CH, Curtis JD, Maggi LB, Jr., Faubert B, Villarino AV, O'Sullivan D, et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell.* 2013;153(6):1239-51.
134. Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *The British journal of radiology.* 1953;26(312):638-48.
135. Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* 1996;56(19):4509-15.
136. Hockel M, Knoop C, Schlenger K, Vorndran B, Baussmann E, Mitze M, et al. Intratumoral pO₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology.* 1993;26(1):45-50.

137. Nordmark M, Alsner J, Keller J, Nielsen OS, Jensen OM, Horsman MR, et al. Hypoxia in human soft tissue sarcomas: adverse impact on survival and no association with p53 mutations. *Br J Cancer*. 2001;84(8):1070-5.
138. Nordmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, et al. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2005;77(1):18-24.
139. Rudat V, Stadler P, Becker A, Vanselow B, Dietz A, Wannemacher M, et al. Predictive value of the tumor oxygenation by means of pO₂ histography in patients with advanced head and neck cancer. *Strahlenther Onkol*. 2001;177(9):462-8.
140. Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ, et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(27):11091-6.
141. Turcotte M, Spring K, Pommey S, Chouinard G, Cousineau I, George J, et al. CD73 is associated with poor prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Res*. 2015;75(21):4494-503.
142. Yang Q, Du J, Zu L. Overexpression of CD73 in prostate cancer is associated with lymph node metastasis. *Pathol Oncol Res*. 2013;19(4):811-4.
143. Lopes N, Bergsland CH, Bjørnslett M, Pellinen T, Svindland A, Nesbakken A, et al. Digital image analysis of multiplex fluorescence IHC in colorectal cancer recognizes the prognostic value of CDX2 and its negative correlation with SOX2. *Laboratory Investigation*. 2020;100(1):120-34.
144. Halse H, Colebatch AJ, Petrone P, Henderson MA, Mills JK, Snow H, et al. Multiplex immunohistochemistry accurately defines the immune context of metastatic melanoma. *Sci Rep*. 2018;8(1):11158.
145. Wahlby C, Erlandsson F, Bengtsson E, Zetterberg A. Sequential immunofluorescence staining and image analysis for detection of large numbers of antigens in individual cell nuclei. *Cytometry*. 2002;47(1):32-41.
146. Parra ER, Uraoka N, Jiang M, Cook P, Gibbons D, Forget MA, et al. Validation of multiplex immunofluorescence panels using multispectral microscopy for immune-profiling of formalin-fixed and paraffin-embedded human tumor tissues. *Sci Rep*. 2017;7(1):13380.
147. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol*. 2016;17(12):e542-e51.
148. Ladanyi A. Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015;28(5):490-500.
149. Koelzer VH, Sirinukunwattana K, Rittscher J, Mertz KD. Precision immunoprofiling by image analysis and artificial intelligence. *Virchows Arch*. 2019;474(4):511-22.
150. Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, Hockel M. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res*. 1991;51(12):3316-22.
151. Hockel M, Schlenger K, Knoop C, Vaupel P. Oxygenation of carcinomas of the uterine cervix: evaluation by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res*. 1991;51(22):6098-102.
152. Knocke T-H, Weitmann H-D, Feldmann H-J, Selzer E, Pötter R. Intratumoral pO₂-measurements as predictive assay in the treatment of carcinoma of the uterine cervix. *Radiotherapy and Oncology*. 1999;53(2):99-104.
153. Milosevic M, Warde P, Menard C, Chung P, Toi A, Ishkanian A, et al. Tumor hypoxia predicts biochemical failure following radiotherapy for clinically localized prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(7):2108-14.
154. Supernat A, Markiewicz A, Welnicka-Jaskiewicz M, Seroczynska B, Skokowski J, Sejda A, et al. CD73 expression as a potential marker of good prognosis in breast carcinoma. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. 2012;20(2):103-7.
155. Leth-Larsen R, Lund R, Hansen HV, Laenholm AV, Tarin D, Jensen ON, et al. Metastasis-related plasma membrane proteins of human breast cancer cells identified by comparative quantitative mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2009;8(6):1436-49.
156. Prentice RL. Surrogate endpoints in clinical trials: definition and operational criteria. *Statistics in medicine*. 1989;8(4):431-40.

157. Vaupel P, Mayer A. Tumor Oxygenation Status: Facts and Fallacies. *Adv Exp Med Biol.* 2017;977:91-9.
158. Vaupel P, Mayer A. Tumor Hypoxia: Causative Mechanisms, Microregional Heterogeneities, and the Role of Tissue-Based Hypoxia Markers. *Adv Exp Med Biol.* 2016;923:77-86.
159. Buller CL, Loberg RD, Fan MH, Zhu Q, Park JL, Vesely E, et al. A GSK-3/TSC2/mTOR pathway regulates glucose uptake and GLUT1 glucose transporter expression. *American journal of physiology Cell physiology.* 2008;295(3):C836-43.
160. Muller-Haegeler S, Muller L, Whiteside TL. Immunoregulatory activity of adenosine and its role in human cancer progression. *Expert review of clinical immunology.* 2014;10(7):897-914.
161. Burghoff S, Gong X, Viethen C, Jacoby C, Flogel U, Bongardt S, et al. Growth and metastasis of B16-F10 melanoma cells is not critically dependent on host CD73 expression in mice. *BMC Cancer.* 2014;14:898.
162. Jiang T, Xu X, Qiao M, Li X, Zhao C, Zhou F, et al. Comprehensive evaluation of NT5E/CD73 expression and its prognostic significance in distinct types of cancers. *BMC Cancer.* 2018;18(1):267.
163. Syrjanen L, Luukkaala T, Leppilampi M, Kallioinen M, Pastorekova S, Pastorek J, et al. Expression of cancer-related carbonic anhydrases IX and XII in normal skin and skin neoplasms. *APMIS.* 2014;122(9):880-9.
164. Slominski A, Kim TK, Brozyna AA, Janjetovic Z, Brooks DL, Schwab LP, et al. The role of melanogenesis in regulation of melanoma behavior: melanogenesis leads to stimulation of HIF-1 α expression and HIF-dependent attendant pathways. *Arch Biochem Biophys.* 2014;563:79-93.
165. Dura M, Nemejcova K, Jaksa R, Bartu M, Kodet O, Ticha I, et al. Expression of Glut-1 in Malignant Melanoma and Melanocytic Nevi: an Immunohistochemical Study of 400 Cases. *Pathol Oncol Res.* 2019;25(1):361-8.
166. Yan S, Coffing BN, Li Z, Xie H, Brennick JB, Beg HA, et al. Diagnostic and Prognostic Value of ProEx C and GLUT1 in Melanocytic Lesions. *Anticancer research.* 2016;36(6):2871-80.
167. Mihic-Probst D, Ikenberg K, Tinguely M, Schraml P, Behnke S, Seifert B, et al. Tumor cell plasticity and angiogenesis in human melanomas. *PLoS One.* 2012;7(3):e33571.
168. Carvalho KC, Cunha IW, Rocha RM, Ayala FR, Cajaiba MM, Begnami MD, et al. GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(6):965-72.
169. Parente P, Coli A, Massi G, Mangoni A, Fabrizi MM, Bigotti G. Immunohistochemical expression of the glucose transporters Glut-1 and Glut-3 in human malignant melanomas and benign melanocytic lesions. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008;27:34.
170. Koch A, Lang SA, Wild PJ, Gantner S, Mahli A, Spanier G, et al. Glucose transporter isoform 1 expression enhances metastasis of malignant melanoma cells. *Oncotarget.* 2015;6(32):32748-60.
171. Poulsen H, Morth P, Egebjerg J, Nissen P. Phosphorylation of the Na⁺,K⁺-ATPase and the H⁺,K⁺-ATPase. *FEBS Lett.* 2010;584(12):2589-95.
172. Monteiro I, Vigano S, Faouzi M, Treilleux I, Michielin O, Menetrier-Caux C, et al. CD73 expression and clinical significance in human metastatic melanoma. *Oncotarget.* 2018;9(42):26659-69.
173. Mayer A, Zahnreich S, Brieger J, Vaupel P, Schmidberger H. Downregulation of EGFR in hypoxic, diffusion-limited areas of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer.* 2016;115(11):1351-8.
174. Ager C, Reilley M, Nicholas C, Bartkowiak T, Jaiswal A, Curran M, et al. 31st Annual Meeting and Associated Programs of the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC 2016): part two: National Harbor, MD, USA. 9-13 November 2016. *Journal for Immunotherapy of Cancer.* 2016;4(Suppl 1):107-221.
175. Wang W, Yu D, Sarnaik AA, Yu B, Hall M, Morelli D, et al. Biomarkers on melanoma patient T cells associated with ipilimumab treatment. *J Transl Med.* 2012;10:146.
176. Tjin EP, Krebbers G, Meijlink KJ, van de Kastele W, Rosenberg EH, Sanders J, et al. Immune-escape markers in relation to clinical outcome of advanced melanoma patients following immunotherapy. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(6):538-46.

177. Hadrup S, Donia M, Thor Straten P. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society*. 2013;6(2):123-33.
178. Feldmeyer L, Gaide O, Speiser DE. Clinical Implications of CD8+ T-cell infiltration in frequent and rare cancers. *J Invest Dermatol*. 2013;133(8):1929-32.
179. Fujii H, Josse J, Tanioka M, Miyachi Y, Husson F, Ono M. Regulatory T Cells in Melanoma Revisited by a Computational Clustering of FOXP3+ T Cell Subpopulations. *J Immunol*. 2016;196(6):2885-92.
180. Weiss SA, Han SW, Lui K, Tchack J, Shapiro R, Berman R, et al. Immunologic heterogeneity of tumor-infiltrating lymphocyte composition in primary melanoma. *Hum Pathol*. 2016;57:116-25.
181. Heindl A, Nawaz S, Yuan Y. Mapping spatial heterogeneity in the tumor microenvironment: a new era for digital pathology. *Lab Invest*. 2015;95(4):377-84.
182. Clemente CG, Mihm MC, Jr., Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996;77(7):1303-10.
183. Morrison C, Pabla S, Conroy JM, Nesline MK, Glenn ST, Dressman D, et al. Predicting response to checkpoint inhibitors in melanoma beyond PD-L1 and mutational burden. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2018;6(1):32-.
184. Diem S, Hasan Ali O, Ackermann CJ, Bomze D, Koelzer VH, Jochum W, et al. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node metastases of stage III melanoma correspond to response and survival in nine patients treated with ipilimumab at the time of stage IV disease. *Cancer Immunol Immunother*. 2018;67(1):39-45.
185. Brooks JM, Menezes AN, Ibrahim M, Archer L, Lal N, Bagnall CJ, et al. Development and Validation of a Combined Hypoxia and Immune Prognostic Classifier for Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res*. 2019;25(17):5315-28.
186. Koelzer VH, Gisler A, Hanhart JC, Griss J, Wagner SN, Willi N, et al. Digital image analysis improves precision of PD-L1 scoring in cutaneous melanoma. *Histopathology*. 2018;73(3):397-406.
187. Microscopy CZ. AxioVision Manual. Carl Zeiss Microscopy; 2013.
188. Tóth ZE, Mezey É. Simultaneous Visualization of Multiple Antigens with Tyramide Signal Amplification using Antibodies from the same Species. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2007;55(6):545-54.
189. Myers R. Technical Brief of Heat Induced Epitope Retrieval Leica Biosystems: Leica Biosystems; 2018 [updated 08.04.2018]. Available from: <https://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/technical-brief-of-heat-induced-epitope-retrieval/>.
190. K RV, Jones D, Udupa V. A simple and effective heat induced antigen retrieval method. *MethodsX*. 2016;3:315-9.
191. Sally Davis A RA, Becker S, Moyer JE, Sandouk A, Skinner J, Taubenberger JK. Characterizing and Diminishing Autofluorescence in Formalin-fixed Paraffin-embedded Human Respiratory Tissue. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2014.
192. Wright Cell Imaging Facility TWRI. Autofluorescence: Causes and Cures. 2001.
193. Shivanandan A, Radenovic A, Sbalzarini IF. MosaicIA: an ImageJ/Fiji plugin for spatial pattern and interaction analysis. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:349.
194. Gonciarz K, Sbalzarini I, Mayer A, Otto M, Bankhead P, Schmidberger H. Spatial interaction analysis in QuPath using MOSAICSuite. 2018.
195. Group M. Interaction analysis plugin for ImageJ. In: Group M, editor. 2012.
196. Mayer A, Hockel M, Horn LC, Schmidberger H, Vaupel P. GLUT-1 staining of squamous cell carcinomas of the uterine cervix identifies a novel element of invasion. *Int J Oncol*. 2011;38(1):145-50.
197. Mayer A, Schmidt M, Seeger A, Serras AF, Vaupel P, Schmidberger H. GLUT-1 expression is largely unrelated to both hypoxia and the Warburg phenotype in squamous cell carcinomas of the vulva. *BMC Cancer*. 2014;14:760.
198. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(1):23-34.

199. Tawbi HA, Forsyth PA, Algazi A, Hamid O, Hodi FS, Moschos SJ, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab in Melanoma Metastatic to the Brain. *The New England journal of medicine*. 2018;379(8):722-30.
200. Davies MA, Liu P, McIntyre S, Kim KB, Papadopoulos N, Hwu WJ, et al. Prognostic factors for survival in melanoma patients with brain metastases. *Cancer*. 2011;117(8):1687-96.
201. Long GV, Atkinson V, Lo S, Sandhu S, Guminski AD, Brown MP, et al. Combination nivolumab and ipilimumab or nivolumab alone in melanoma brain metastases: a multicentre randomised phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2018;19(5):672-81.
202. Turgeon GA, Weickhardt A, Azad AA, Solomon B, Siva S. Radiotherapy and immunotherapy: a synergistic effect in cancer care. *The Medical journal of Australia*. 2019;210(1):47-53.
203. Postow MA, Callahan MK, Barker CA, Yamada Y, Yuan J, Kitano S, et al. Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *The New England journal of medicine*. 2012;366(10):925-31.
204. Franklin C, Livingstone E, Roesch A, Schilling B, Schadendorf D. Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions. *Eur J Surg Oncol*. 2017;43(3):604-11.
205. Johnson DB, Bordeaux J, Kim JY, Vaupel C, Rimm DL, Ho TH, et al. Quantitative Spatial Profiling of PD-1/PD-L1 Interaction and HLA-DR/IDO-1 Predicts Improved Outcomes of Anti-PD-1 Therapies in Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2018;24(21):5250-60.
206. Pantanowitz L, Valenstein PN, Evans AJ, Kaplan KJ, Pfeifer JD, Wilbur DC, et al. Review of the current state of whole slide imaging in pathology. *J Pathol Inform*. 2011;2(1):36.
207. Hamilton PW, Bankhead P, Wang Y, Hutchinson R, Kieran D, McArt DG, et al. Digital pathology and image analysis in tissue biomarker research. *Methods (San Diego, Calif)*. 2014;70(1):59-73.
208. Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. *BioTechniques*. 2007;42(1):71-5.
209. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity*. 2013;39(4):782-95.
210. Feichtenbeiner A, Haas M, Buttner M, Grabenbauer GG, Fietkau R, Distel LV. Critical role of spatial interaction between CD8(+) and Foxp3(+) cells in human gastric cancer: the distance matters. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(2):111-9.
211. Kruger JM, Wemmert C, Sternberger L, Bonnas C, Dietmann G, Gancarski P, et al. Combat or surveillance? Evaluation of the heterogeneous inflammatory breast cancer microenvironment. *The Journal of pathology*. 2013;229(4):569-78.
212. Barua S, Solis L, Parra ER, Uraoka N, Jiang M, Wang H, et al. A Functional Spatial Analysis Platform for Discovery of Immunological Interactions Predictive of Low-Grade to High-Grade Transition of Pancreatic Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. *Cancer Inform*. 2018;17:1176935118782880.
213. Ahmed F, Haass NK. Microenvironment-Driven Dynamic Heterogeneity and Phenotypic Plasticity as a Mechanism of Melanoma Therapy Resistance. *Front Oncol*. 2018;8:173.
214. Berghoff AS, Ricken G, Widhalm G, Rajky O, Dieckmann K, Birner P, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) in melanoma brain metastases. *Histopathology*. 2015;66(2):289-99.
215. Teixido C, Gonzalez-Cao M, Karachaliou N, Rosell R. Predictive factors for immunotherapy in melanoma. *Ann Transl Med*. 2015;3(15):208.
216. Yuan J, Gnjjatic S, Li H, Powel S, Gallardo HF, Ritter E, et al. CTLA-4 blockade enhances polyfunctional NY-ESO-1 specific T cell responses in metastatic melanoma patients with clinical benefit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(51):20410-5.
217. Gerdes MJ, Sevinsky CJ, Sood A, Adak S, Bello MO, Bordwell A, et al. Highly multiplexed single-cell analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded cancer tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(29):11982-7.
218. Giesen C, Wang HA, Schapiro D, Zivanovic N, Jacobs A, Hattendorf B, et al. Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nature methods*. 2014;11(4):417-22.
219. Lee SS, Bindokas VP, Kron SJ. Multiplex three-dimensional optical mapping of tumor immune microenvironment. *Sci Rep*. 2017;7(1):17031.

220. Farahani N, Braun A, Jutt D, Huffman T, Reder N, Liu Z, et al. Three-dimensional Imaging and Scanning: Current and Future Applications for Pathology. *J Pathol Inform.* 2017;8(1):36.
221. Li Y, Patel SP, Roszik J, Qin Y. Hypoxia-Driven Immunosuppressive Metabolites in the Tumor Microenvironment: New Approaches for Combinational Immunotherapy. *Front Immunol.* 2018;9:1591.
222. Stagg J, Divisekera U, Duret H, Sparwasser T, Teng MW, Darcy PK, et al. CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res.* 2011;71(8):2892-900.
223. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 2013;19(11):1423-37.
224. Singer K, Kastenberger M, Gottfried E, Hammerschmied CG, Buttner M, Aigner M, et al. Warburg phenotype in renal cell carcinoma: high expression of glucose-transporter 1 (GLUT-1) correlates with low CD8(+) T-cell infiltration in the tumor. *Int J Cancer.* 2011;128(9):2085-95.
225. Antonioli L, Yegutkin GG, Pacher P, Blandizzi C, Hasko G. Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities. *Trends Cancer.* 2016;2(2):95-109.
226. Ji RR, Chasalow SD, Wang L, Hamid O, Schmidt H, Cogswell J, et al. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(7):1019-31.
227. Bifulco C, Capone M, Feng Z, Madonna G, Simeone E, Curvietto M, et al. MISIPI study: Melanoma ImmunoScore evaluation in patients treated with Ipilimumab. *Journal of Translational Medicine.* 2014;12(Suppl 1):P11-P.
228. Capone M, Madonna G, Sebastiao N, Bird J, Ayala F, Caracò C, et al. Immunoscore: a new possible approach for melanoma classification. *Journal for Immunotherapy of Cancer.* 2014;2(Suppl 3):P193-P.
229. Herbst RS, Soria JC, Kowanzet M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature.* 2014;515(7528):563-7.
230. Obeid JM, Hu Y, Erdag G, Leick KM, Slingluff CL, Jr. The heterogeneity of tumor-infiltrating CD8+ T cells in metastatic melanoma distorts their quantification: how to manage heterogeneity? *Melanoma Res.* 2017;27(3):211-7.
231. Wong PF, Wei W, Smithy JW, Acs B, Toki MI, Blenman KRM, et al. Multiplex Quantitative Analysis of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Immunotherapy Outcome in Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res.* 2019;25(8):2442-9.
232. Passarelli A, Mannavola F, Stucci LS, Tucci M, Silvestris F. Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget.* 2017;8(62):106132-42.
233. Jacobs JF, Nierkens S, Figdor CG, de Vries IJ, Adema GJ. Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy? *Lancet Oncol.* 2012;13(1):e32-42.
234. Sperduto PW, Kased N, Roberge D, Xu Z, Shanley R, Luo X, et al. Summary report on the graded prognostic assessment: an accurate and facile diagnosis-specific tool to estimate survival for patients with brain metastases. *J Clin Oncol.* 2012;30(4):419-25.
235. Harter PN, Bernatz S, Scholz A, Zeiner PS, Zinke J, Kiyose M, et al. Distribution and prognostic relevance of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and PD-1/PD-L1 immune checkpoints in human brain metastases. *Oncotarget.* 2015;6(38):40836-49.
236. Passiglia F, Bronte G, Bazan V, Natoli C, Rizzo S, Galvano A, et al. PD-L1 expression as predictive biomarker in patients with NSCLC: a pooled analysis. *Oncotarget.* 2016;7(15):19738-47.
237. Hamid O, Schmidt H, Nissan A, Ridolfi L, Aamdal S, Hansson J, et al. A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. *J Transl Med.* 2011;9:204.
238. Airley RE, Loncaster J, Raleigh JA, Harris AL, Davidson SE, Hunter RD, et al. GLUT-1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of the cervix: Relationship to pimonidazole binding. *International Journal of Cancer.* 2003;104(1):85-91.
239. Qin Y, Roszik J, Chattopadhyay C, Hashimoto Y, Liu C, Cooper ZA, et al. Hypoxia-Driven Mechanism of Vemurafenib Resistance in Melanoma. *Mol Cancer Ther.* 2016;15(10):2442-54.

240. Evans SM, Koch CJ. Prognostic significance of tumor oxygenation in humans. *Cancer Lett.* 2003;195(1):1-16.
241. Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(4):266-76.
242. Kunkel M, Reichert TE, Benz P, Lehr HA, Jeong JH, Wieand S, et al. Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2003;97(4):1015-24.
243. Kang SS, Chun YK, Hur MH, Lee HK, Kim YJ, Hong SR, et al. Clinical significance of glucose transporter 1 (GLUT1) expression in human breast carcinoma. *Japanese journal of cancer research : Gann.* 2002;93(10):1123-8.
244. Cantuaria G, Fagotti M.D A, Ferrandina G, Magalhães A, Nadji M.D M, Angioli M.D R, et al. GLUT-1 expression in ovarian carcinoma [Part of PhD Thesis]. 2001;92:1144-50.
245. Kawamura T, Kusakabe T, Sugino T, Watanabe K, Fukuda T, Nashimoto A, et al. Expression of glucose transporter-1 in human gastric carcinoma: association with tumor aggressiveness, metastasis, and patient survival. *Cancer.* 2001;92(3):634-41.
246. Chen X, Lu P, Zhou S, Zhang L, Zhao JH, Tang JH. Predictive value of glucose transporter-1 and glucose transporter-3 for survival of cancer patients: A meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(8):13206-13.
247. Younes M, Brown RW, Stephenson M, Gondo M, Cagle PT. Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. *Cancer.* 1997;80(6):1046-51.
248. Koch A, Ebert EV, Seitz T, Dietrich P, Berneburg M, Bosserhoff A, et al. Characterization of glycolysis-related gene expression in malignant melanoma. *Pathol Res Pract.* 2020;216(1):152752-.
249. Lee JH, Gulec SA, Kyshtoobayeva A, Sim MS, Morton DL. Biological factors, tumor growth kinetics, and survival after metastasectomy for pulmonary melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2009;16(10):2834-9.
250. Graham K, Unger E. Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. *International journal of nanomedicine.* 2018;13:6049-58.
251. Jayaprakash P, Ai M, Liu A, Budhani P, Bartkowiak T, Sheng J, et al. Targeted hypoxia reduction restores T cell infiltration and sensitizes prostate cancer to immunotherapy. *J Clin Invest.* 2018;128(11):5137-49.
252. Afzal MZ, Mercado RR, Shirai K. Efficacy of metformin in combination with immune checkpoint inhibitors (anti-PD-1/anti-CTLA-4) in metastatic malignant melanoma. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):64.
253. Morello S, Capone M, Sorrentino C, Giannarelli D, Madonna G, Mallardo D, et al. Soluble CD73 as biomarker in patients with metastatic melanoma patients treated with nivolumab. *J Transl Med.* 2017;15(1):244.
254. Young A, Ngiow SF, Madore J, Reinhardt J, Landsberg J, Chitsazan A, et al. Targeting Adenosine in BRAF-Mutant Melanoma Reduces Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Res.* 2017;77(17):4684-96.
255. Young A, Ngiow SF, Barkauskas DS, Sult E, Hay C, Blake SJ, et al. Co-inhibition of CD73 and A2AR Adenosine Signaling Improves Anti-tumor Immune Responses. *Cancer Cell.* 2016;30(3):391-403.
256. Iannone R, Miele L, Maiolino P, Pinto A, Morello S. Adenosine limits the therapeutic effectiveness of anti-CTLA4 mAb in a mouse melanoma model. *American journal of cancer research.* 2014;4(2):172-81.
257. Pisacane AM, Picciotto F, Risio M. CD31 and CD34 expression as immunohistochemical markers of endothelial transdifferentiation in human cutaneous melanoma. *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology.* 2007;29(1):59-66.
258. Hendrix MJC, Seftor EA, Seftor REB, Chao J-T, Chien D-S, Chu Y-W. Tumor cell vascular mimicry: Novel targeting opportunity in melanoma. *Pharmacol Ther.* 2016;159:83-92.
259. e.V. GdeKiD. *Epidemiologie von Krebserkrankungen.* Robert Koch Institut; 2015.
260. Wenger RH, Kurtcuoglu V, Scholz CC, Marti HH, Hoogewijs D. Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia (Auckland, NZ).* 2015;3:35-43.

VIII. Anhang

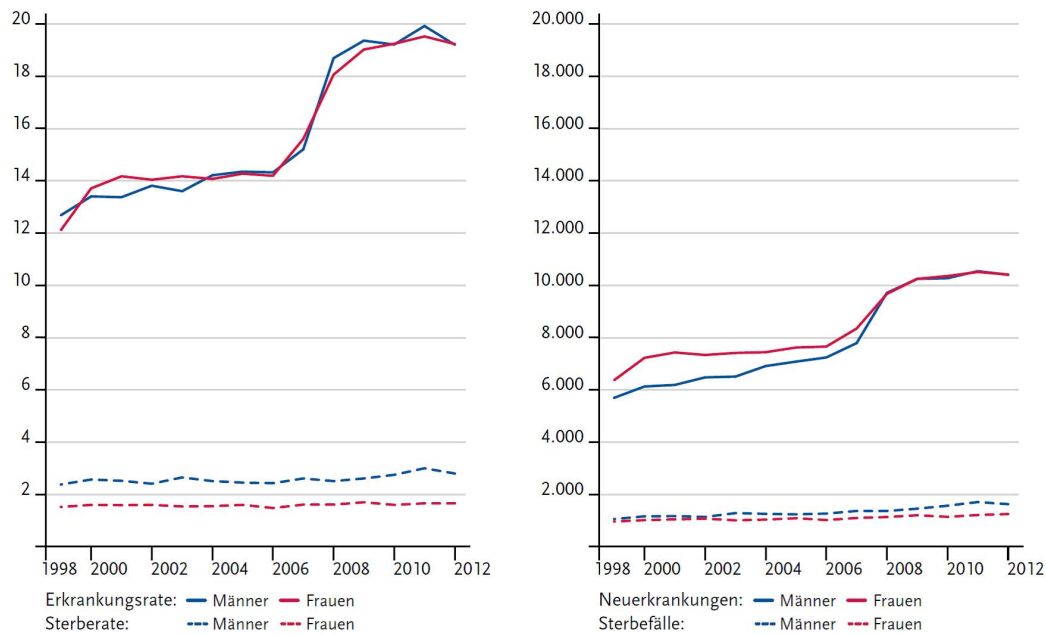


Abbildung 63: Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität (links), sowie absolute Zahlen der Neuerkrankungs- und Sterbefälle (rechts) nach Geschlecht in Deutschland von 1999-2012. Hierbei zeigt sich ein starker Anstieg der Inzidenz bei relativ konstanten Sterberaten. Dieser Verlauf ist mutmaßlich auf das sich verwirklichende erhöhte Risiko für maligne Krebserkrankungen der Haut durch veränderte Freizeitgewohnheiten, bei gleichzeitig verbesserten Früherkennungsmaßnahmen zurückzuführen (18).

Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebserkrankungen in Deutschland 2012 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs)

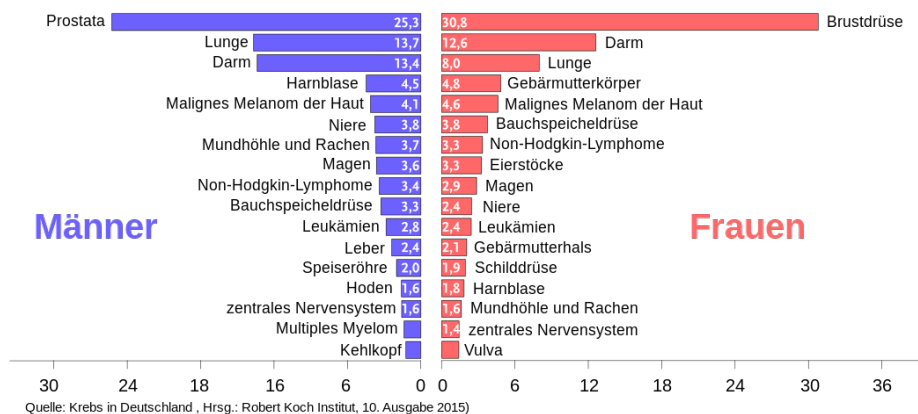


Abbildung 64: Der prozentuale Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2012. Mit einem prozentualen Anteil von 4.1 % bzw. 4.6 % ist das maligne Melanom sowohl für Männer, als auch für Frauen mittlerweile eine der häufigsten Tumorlokalisationen nach der Prostata bzw. Brustdrüse, der Lunge und dem Darm. Basierend auf Daten des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts, Stand 2012 <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=47147008> (1.11.17)

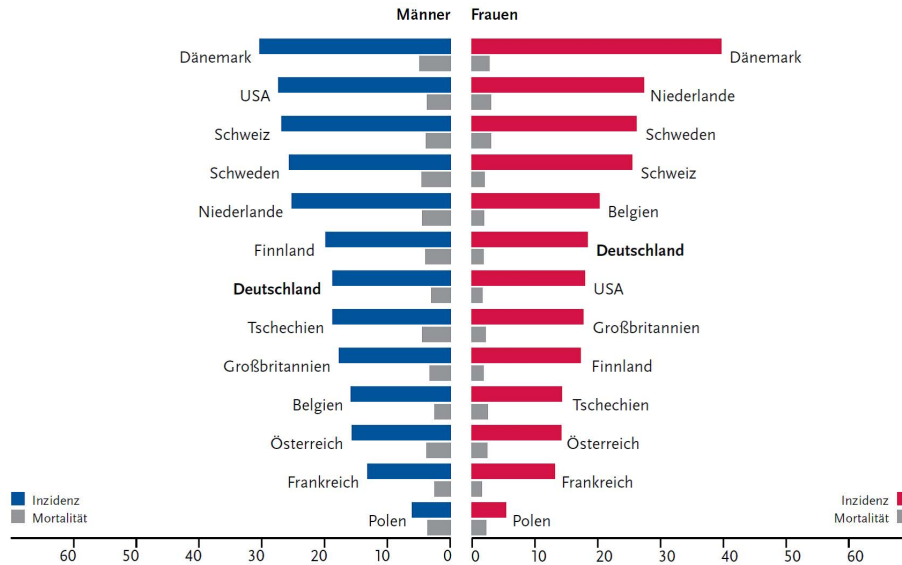


Abbildung 65: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten im internationalen Vergleich je 100.000 Einwohner. Im internationalen Vergleich bewegt sich die Inzidenz des malignen Melanoms in Deutschland mit ca. 20 Erkrankten /100.000 Einwohner im Mittelfeld. Auffällig ist besonders die hohe Inzidenz des malignen Melanoms in nordeuropäischen Staaten, allen voran Dänemark und Schweden. (259).

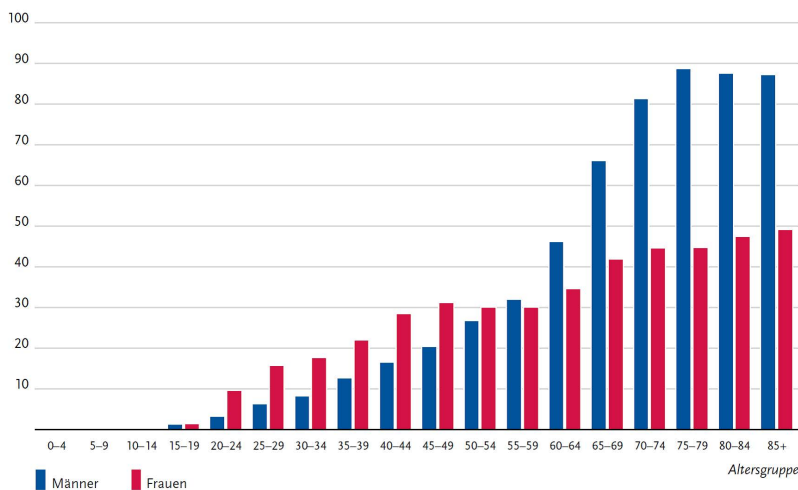


Abbildung 66: Altersspezifische Erkrankungsrate des malignen Melanoms nach Geschlecht, Deutschland 2011-2012 je 100.000 Einwohner. Es kann gezeigt werden, dass die altersspezifische Erkrankungsrate mit zunehmendem Alter stark ansteigt, wobei sich mit Ende des mittleren Lebensalters (>60 Jahre) eine weitgehende Sättigung der Kurve bei 50 Erkrankten/100.000 Einwohner für Frauen und 90/100.000 Einwohner für Männer einstellt. Auffällig ist des Weiteren die starke Zunahme der Erkrankungsrate unter Männern ab dem 55. Lebensjahr, wohingegen im jungen Alter der relative Anteil von Frauen noch überwiegt. http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Melanom/melanom_node.html (1.11.17) aus (18)

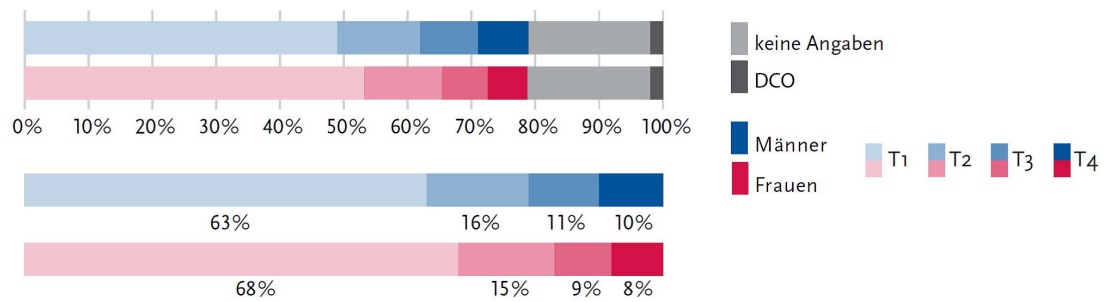


Abbildung 67: Verteilung der T-Stadien bei Melanom-Erstdiagnose nach Geschlecht, Deutschland 2012. Oben inklusive fehlender Daten. Unten: nur gültige Werte. Aus den Abbildungen geht hervor, dass in der Mehrzahl der Fälle das maligne Melanoms im Stadium T1 entdeckt wird und im Folgenden entsprechend gut behandelt werden kann. Aufgrund engmaschiger Vorsorgeuntersuchungen und Präventionsprogramme sinkt entsprechend der relative Anteil von Erstdiagnosen mit zunehmendem T-Stadium, sodass nur noch 10 % aller malignen Melanome im Stadium T4 erstdiagnostiziert werden (18).

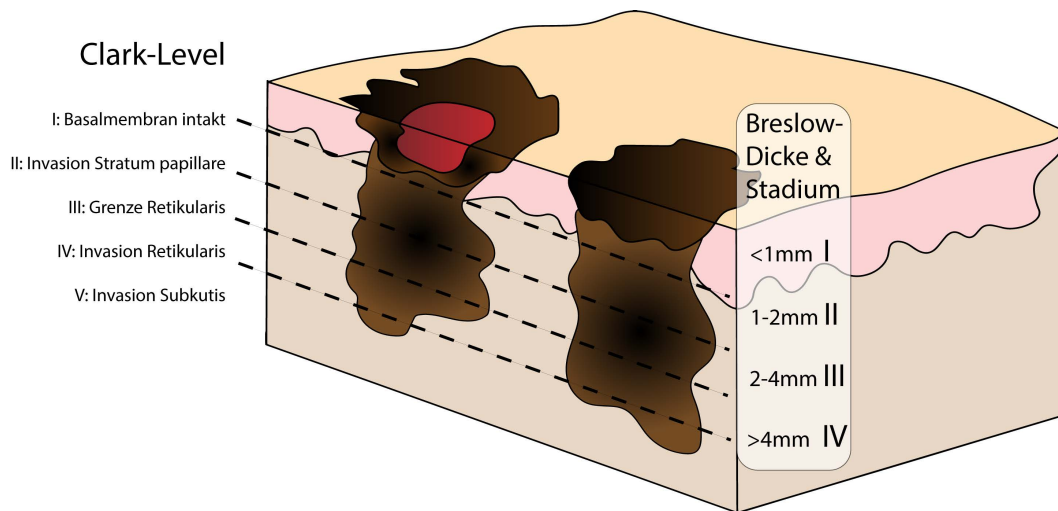


Abbildung 68: Gegenüberstellung der Klassifikationen der Tumordicke nach Breslow (in mm) und des Invasionslevels nach Clark (Level I-V). Mit zunehmender Infiltrationstiefe der Melanomzellen in die Haut nimmt das Tumorstadium nach Breslow zu. Eine Eindringtiefe > 4 mm entspricht somit einem Breslow-Stadium IV (21).

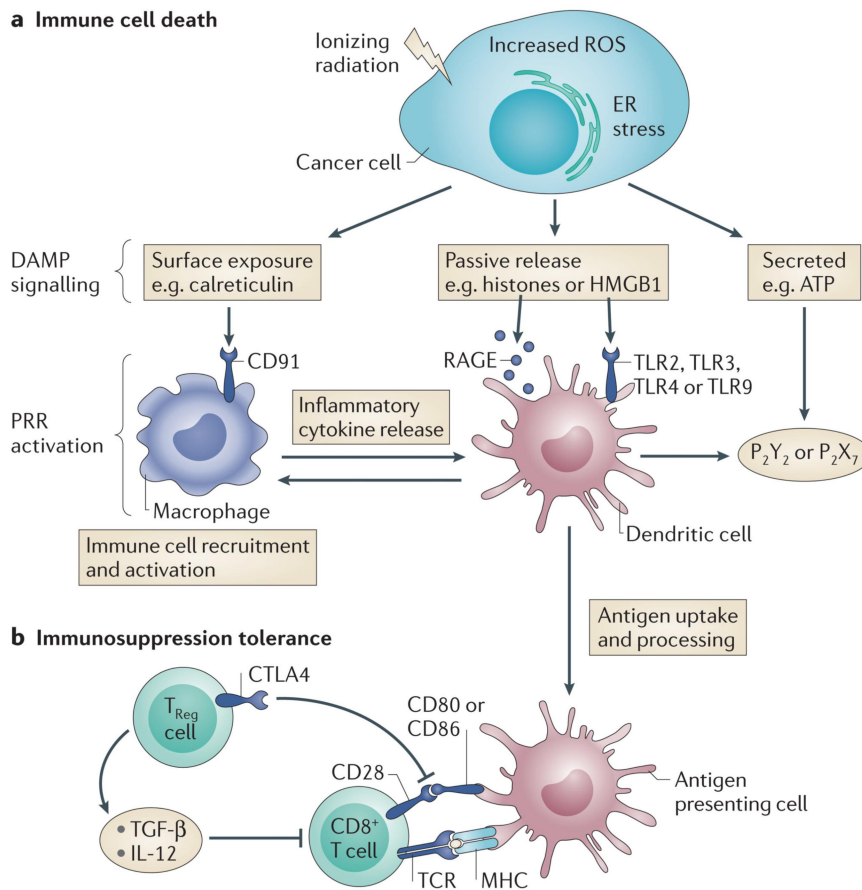


Abbildung 69: Folgen des strahleninduzierten Zelltodes. Die Bestrahlung von Krebszellen leitet über eine Kaskade von Mechanismen, zu denen u.a. die Generierung reaktiver O_2 Spezies (ROS) gehört, deren Zelltod ein, der wiederum zur Freisetzung von DAMPs führt. Es werden hierbei drei Typen von DAMP-Signalen unterschieden: (1) DAMPs, die auf der Zelloberfläche exponiert sind, (2) passiv aus der absterbenden Zelle freigesetzte DAMPs (wie high-mobility group protein „HMGB1“) und (3) aktiv sezernierte DAMPs (wie z.B. ATP). Das Ausmaß des jeweiligen Freisetzungsmodus der DAMPs hängt entscheidend von der Art des Zellstresses ab, d.h. Apoptose, Nekrose oder Zellstress resultieren in unterschiedlichen Freisetzungsmustern von DAMPs. Die infolge der DAMP-Freisetzung in Gang gesetzte Signalkaskade ist notwendig, um schließlich eine effektive adaptive Immunantwort auf die noch verbliebenen Tumorzellen einzuleiten. Durch die im Rahmen des Zelltodes freigesetzten Moleküle werden zum einen DZ zur Phagozytose der absterbenden Zelle angeregt (so aktiviert HMGB1 über TLR2 und TLR4 die DZ, während ATP über purinerge P_2Y und P_2X -Rezeptoren weitreichende immunstimulatorische Wirkungen auf DZ, NK-Zellen, Makrophagen und T-Zellen ausübt). Zum anderen kommt es über Calreticulin zu einer Aktivierung von Pathogen-recognition receptors (PRR) auf Makrophagen infolge dessen die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Zellen des angeborenen Immunsystems unterstützt wird und es zu einer Ausschüttung immunstimulierender Zytokine kommt, die die inflammatorische Reaktion weiter unterhalten. Das nun vorherrschende immunstimulierende Zytokinmilieu unterstützt aktivierte DZ in ihrer Funktion als APZ und fördert die Prozessierung der phagozytierten Antigene, wie auch deren Präsentation an $CD8^+$ CTL über MHC-I-Rezeptoren. Zur Aktivierung der T-Zellen werden wiederum Kostimulatorische Signale benötigt, die über die Interaktion von CD80 und CD86 auf APZ mit CD28 auf der T-Zelle generiert werden. Über die Immunmodulation im Rahmen der Freisetzung von DAMPs werden zudem die inhibitorischen Mechanismen von T_{reg} über CTLA-4 überwunden, sodass insgesamt am Ende der Kaskade eine effektive Immunantwort steht. (6)

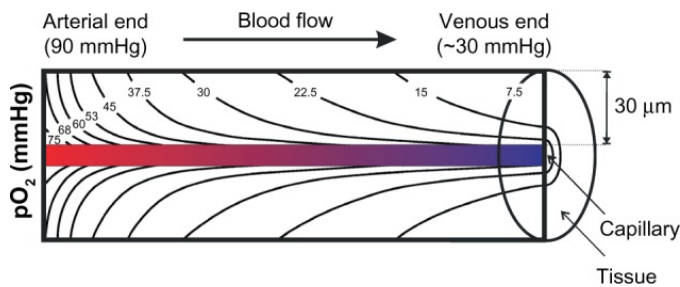


Abbildung 70: Darstellung des Zylindermodells zur Sauerstoffdiffusion nach Krogh (260). Hier soll verdeutlicht werden, dass in Normalgeweben, wie auch in soliden Tumoren sowohl ein longitudinaler wie auch ein radialer Diffusionsgradient für Sauerstoff existiert. Dabei kommt es einerseits zum Abfall des Sauerstoffpartialdrucks mit Zunahme der Gefäßstrecke (d.h. der Annäherung an das venöse Gefäßsystem), als auch mit zunehmender Distanz des Gewebes von dem Gefäß selbst. Folglich werden die niedrigsten Sauerstoffpartialdrücke im Gewebe am venösen Schenkel des Gefäßsystems beobachtet, die gleichzeitig besonders von einem Sauerstoffmangel (Hypoxie) gefährdet sind (77).

Supplementärer Bildatlas:

Darstellung des methodischen Vorgehens der digitalen Bildanalyse eines whole slide Tumorpräparates in QuPath anhand der Färbung zu IF-108 V74:

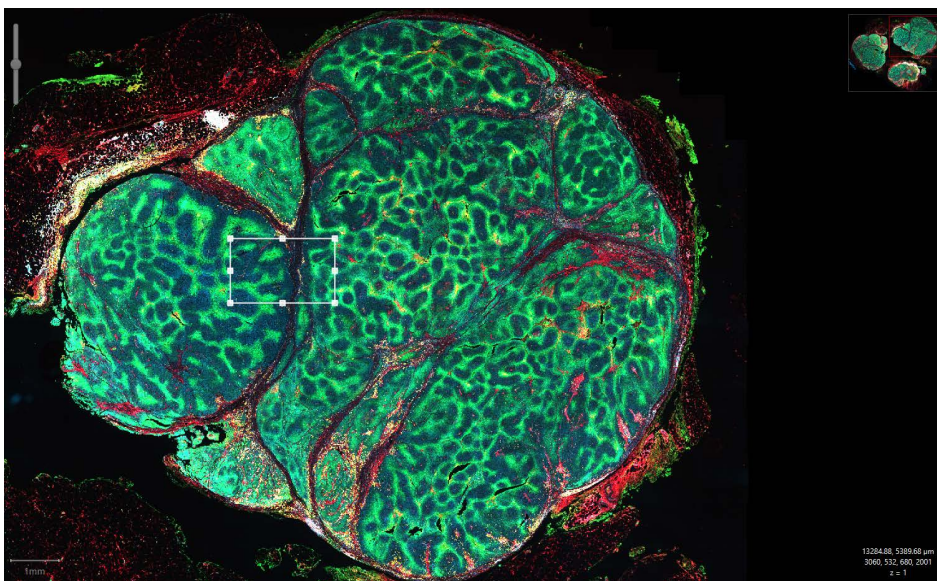


Abbildung 71: Überblick einer Lymphknotenmetastase eines Melanoms, 4-Kanal-IF mit den Färbungen für Zellkerne (DAPI, blau), Glukosetransporter GLUT-1 (grün), CD73 (rot) und CD8 (gelb) Erläuterung: In diesem Ausschnitt einer Lymphknotenmetastase erkennt man eine heterogene Verteilung hypoxischer Regionen, die mit dem Antikörper gegen GLUT-1 markiert wurden. Die in rot gefärbten CD73 positiven Zellen können bereits bei dieser Stufe der Vergrößerung (0.52x) allem Anschein nach vor allem im Stroma und insbesondere in Gefäßen lokalisiert werden. Die Expression von CD73 in Melanomzellen ist demgegenüber rar. Nimmt man diese beiden Erkenntnisse zusammen wird deutlich, dass Hypoxie v.a. in Geweberealen auftritt, die eine bestimmte Distanz von meist stromal lokalisierten CD73 positiven Gefäßen haben und somit einem großen Diffusionsgradienten aufweisen, weshalb jene hypoxischen Areale einen charakteristischen zirkulären und ellipsoiden Aufbau haben. Gelegentlich finden sich allerdings auch CD73 positive Zellen innerhalb hypoxischer Areale: diese Zellen könnten zu nicht-perfundierten Gefäßen oder Zelltypen zugeordnet werden, die auch in hypoxischen Zonen lokalisiert sind (z.B. Melanomzellen). Insgesamt ist eine Ko-Lokalisation von GLUT-1 und CD73 in diesem Gewebe allerdings sehr spärlich. Die fehlende Ko-Lokalisation zwischen CD73 und GLUT-1 ist eine unerwartete Entdeckung, da CD73 in der Literatur als ein Hypoxie-induziertes Antigen gilt. Die Infiltration von CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen ist ebenfalls spärlich und beschränkt sich im Wesentlichen auf stromale Bereiche, wobei bei dieser Stufe der Vergrößerung natürlich individuelle Lymphozyten nur schwer sichtbar sind.

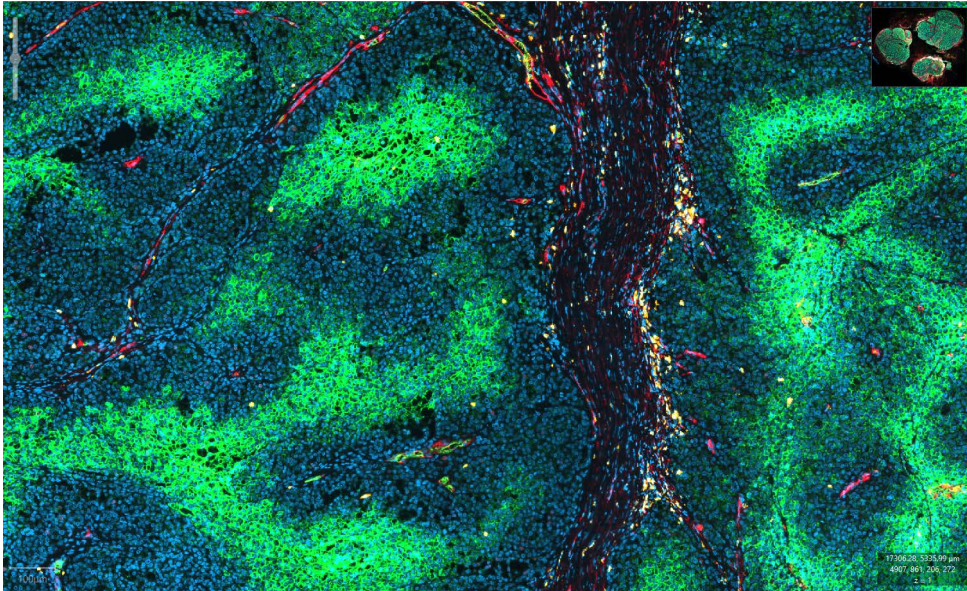


Abbildung 72: Aus Abbildung 71 vergrößerter Ausschnitt (5.5x). In der Übersicht zeigt sich ein stromaler Bereich innerhalb der Lymphknotenmetastase, der eine dichte Infiltration CD8 positiver zytotoxischer T-Lymphozyten aufweist.

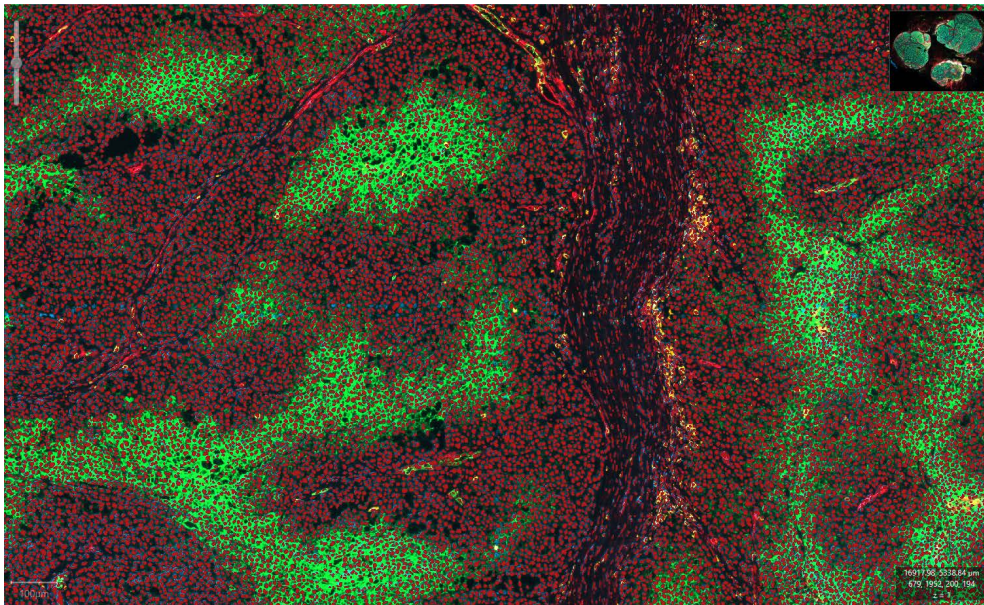


Abbildung 73: Beispiel der einzelzellbasierten Segmentierung. In diesem Ausschnitt wurden exakt 24.764 Zellen auf der Basis der Zellkerne (in rot) aus dem DAPI Kanal segmentiert

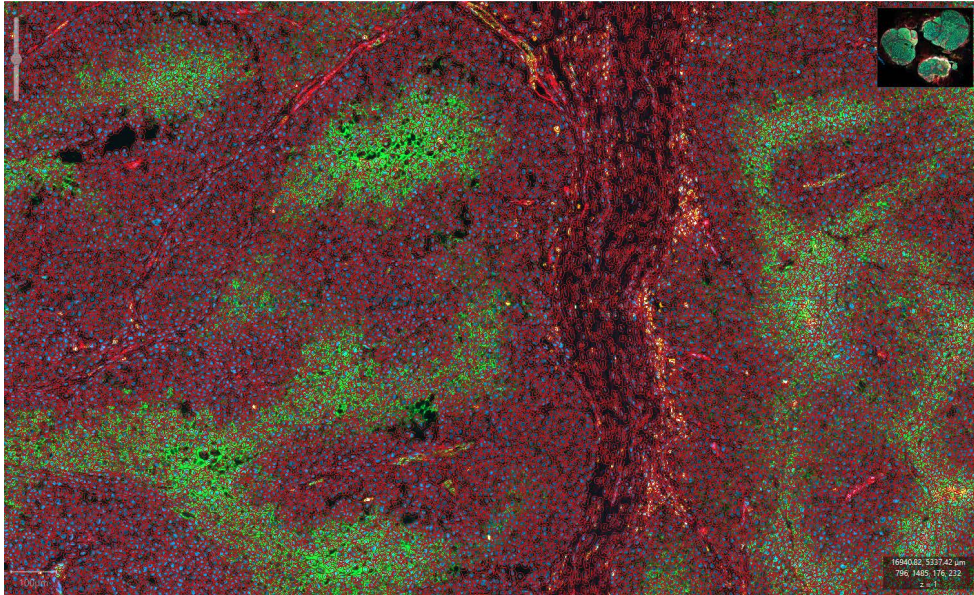


Abbildung 74: Beispiel der einzelzellbasierten Segmentierung des oben gezeigten Ausschnitts. In dieser Abbildung sind nun die Zellgrenzen in rot dargestellt

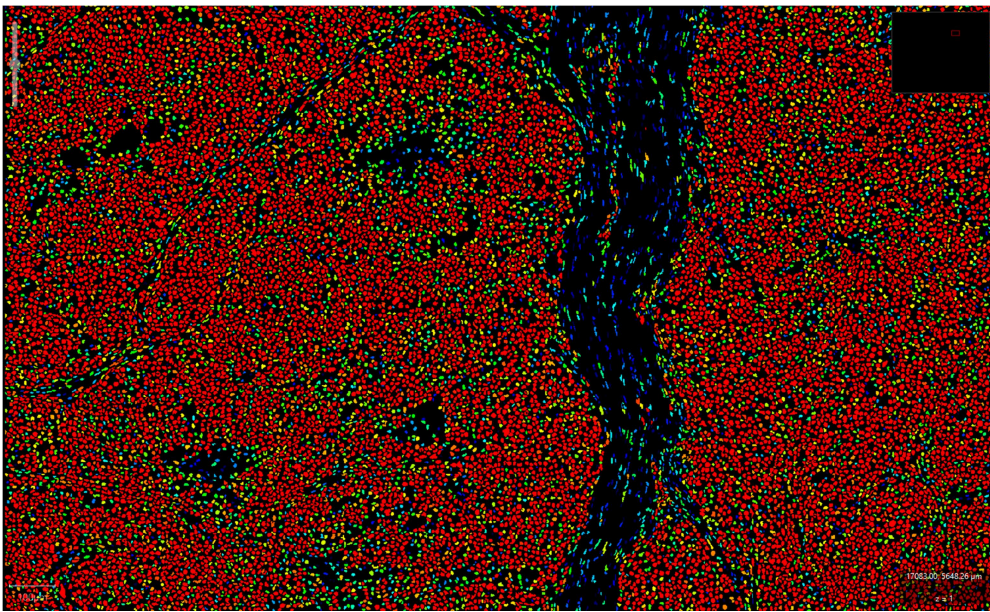


Abbildung 75: Darstellung der Heatmap für das Verhältnis von Zellkern zur Gesamtfläche der Zelle, was als in diesem Fall als ausreichend gute Annäherung zur Identifikation der Tumorzellen dienen kann. Rote Zellen stellen hierbei diejenigen Zellen mit einem großen Zellkern/Zellflächen-Verhältnis dar (vermeintliche Tumorzellen), wohingegen die Farbabstufungen bis hin zu blau ein kleiner werdendes Zellkern/ Zellflächen-Verhältnis anzeigen.

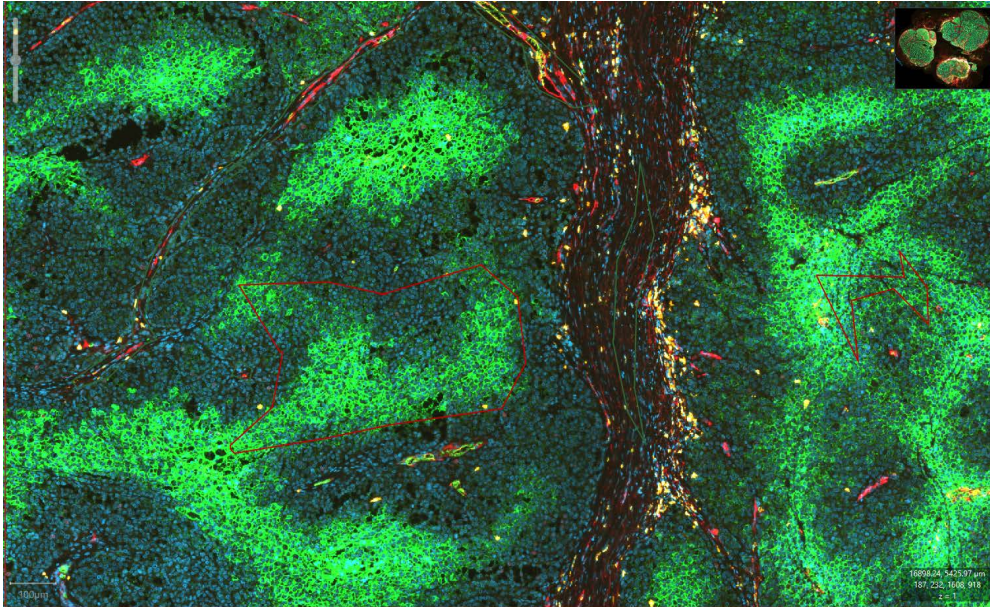


Abbildung 76: Beispiel der Anwendung des maschinellen Lernens für die Zellklassifikation in Tumor – und Stromazellen. Hierbei werden mithilfe des Zeichentools eindeutige Regionen mit Tumorzellen (rote Figuren) bzw. Stromazellen (grüne Figuren) definiert. Auf Grundlage der in jenen Regionen vorherrschenden Parameter (Zellgröße, Kernpleomorphie, Farbeintensität der IF-Kanäle, Lage der Zellen) wendet der Algorithmus des maschinellen Lernens diese Eigenschaften für das gesamte Präparat an und erkennt somit alle Stroma - und Tumorzellen nach den zuvor definierten Eigenschaften in dem whole slide Präparat.

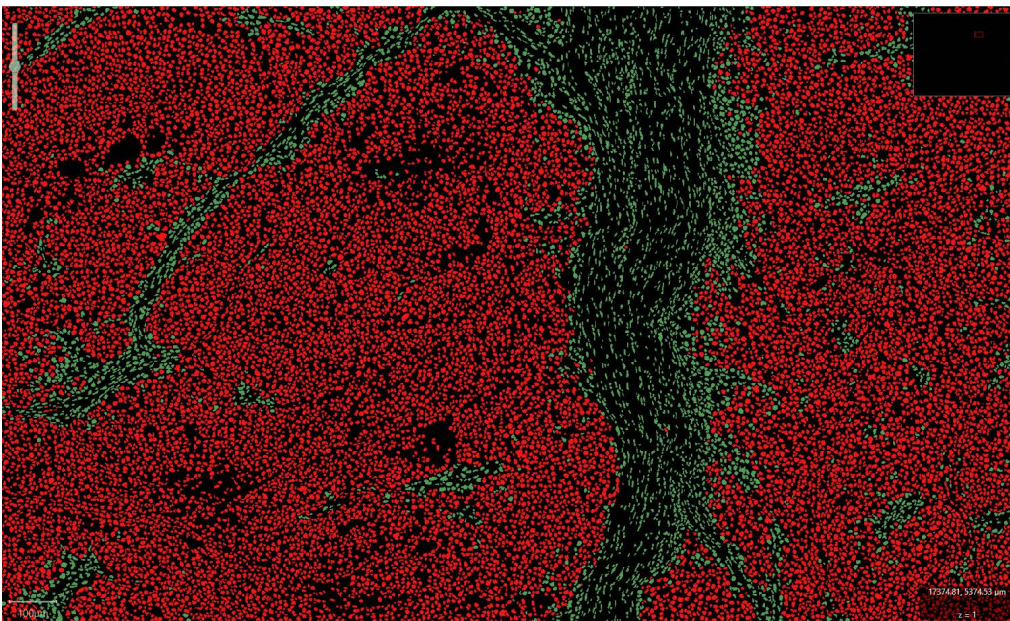


Abbildung 77: Darstellung der Klassifikation in Tumorzellen (rot) und Stromazellen (grün) mithilfe des maschinellen Lernens. Das Ergebnis dieser maschinellen Klassifikation ist bereits bei starker Vergrößerung als sehr genau zu erachten. Dabei wurden 4.388 Stromazellen und 19.859 Tumorzellen detektiert.

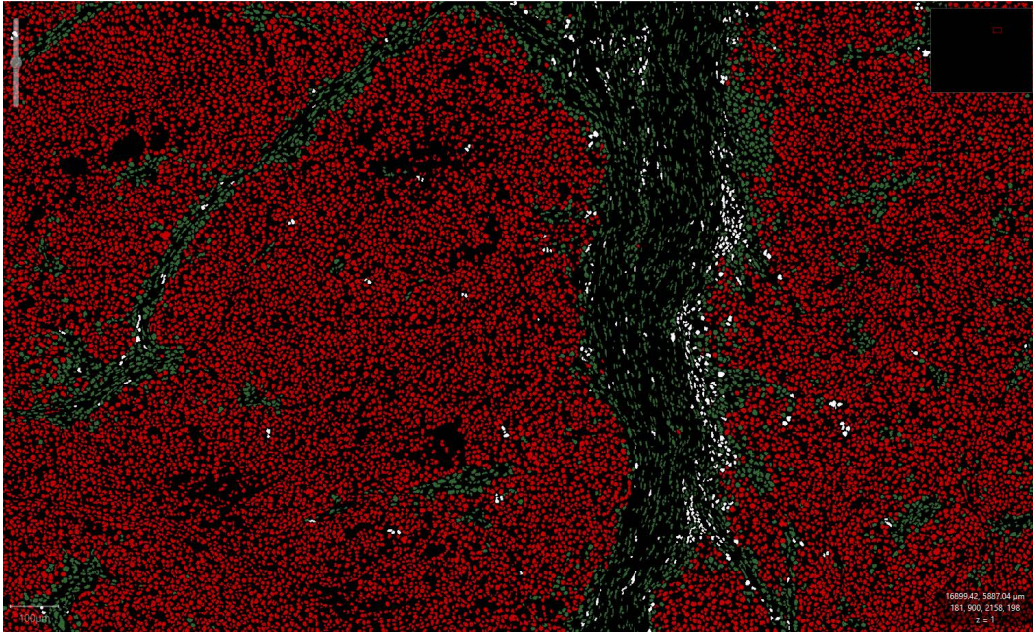


Abbildung 78: Anschließend vorgenommene Klassifikation der Immunzellen (weiß) nach dem Schwellenwertprinzip. Hierbei wurden in dem Ausschnitt exakt 517 CD8⁺ Zellen detektiert. Diese mussten für den Gelbkanal (CD8) allesamt eine maximale Farbeintensität der Zelle („Cell“) über dem definierten Schwellenwert aufweisen.

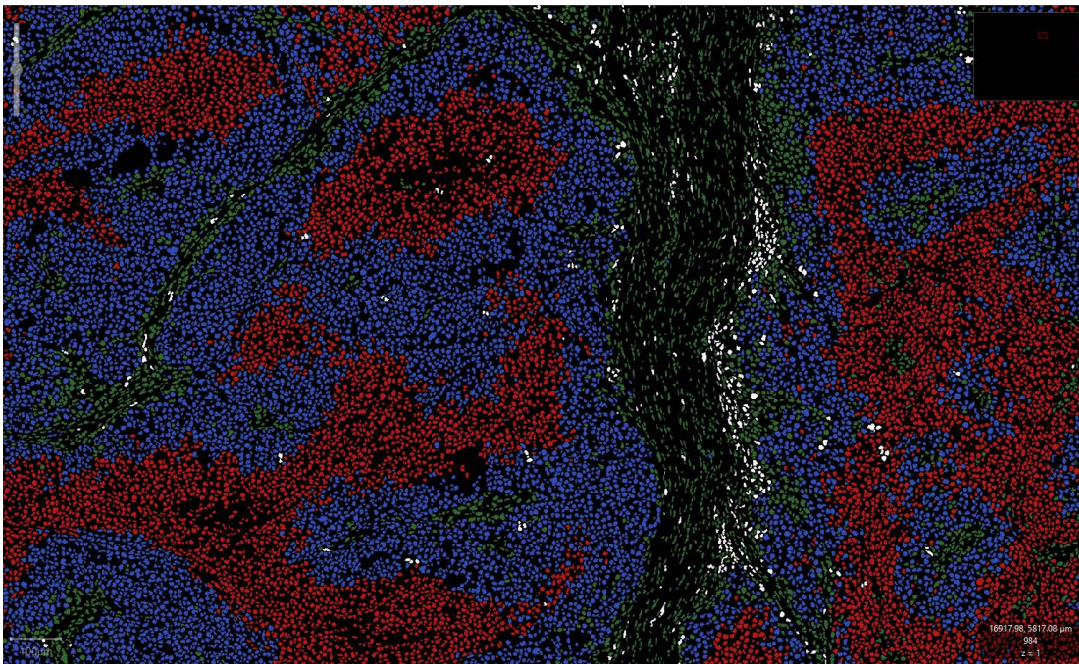


Abbildung 79: Anschließend vorgenommene Unterscheidung hypoxischer (rot) und normoxischer (blau) Tumorzellen. Hierbei wurden ebenfalls mithilfe des Schwellenwertprinzips hypoxische Tumorzellen als solche definiert, die im grün-Kanal (GLUT-1) eine größere mittlere Farbeintensität der Zellmembran zeigten als der definierte Schwellenwert. Zellen, deren mittlere Farbeintensität im Grün-Kanal unter dem Schwellenwert lag, wurden folglich als normoxisch klassifiziert. Insgesamt konnten so 9.142 hypoxische und 10.717 normoxische Tumorzellen in dem Ausschnitt klassifiziert werden.

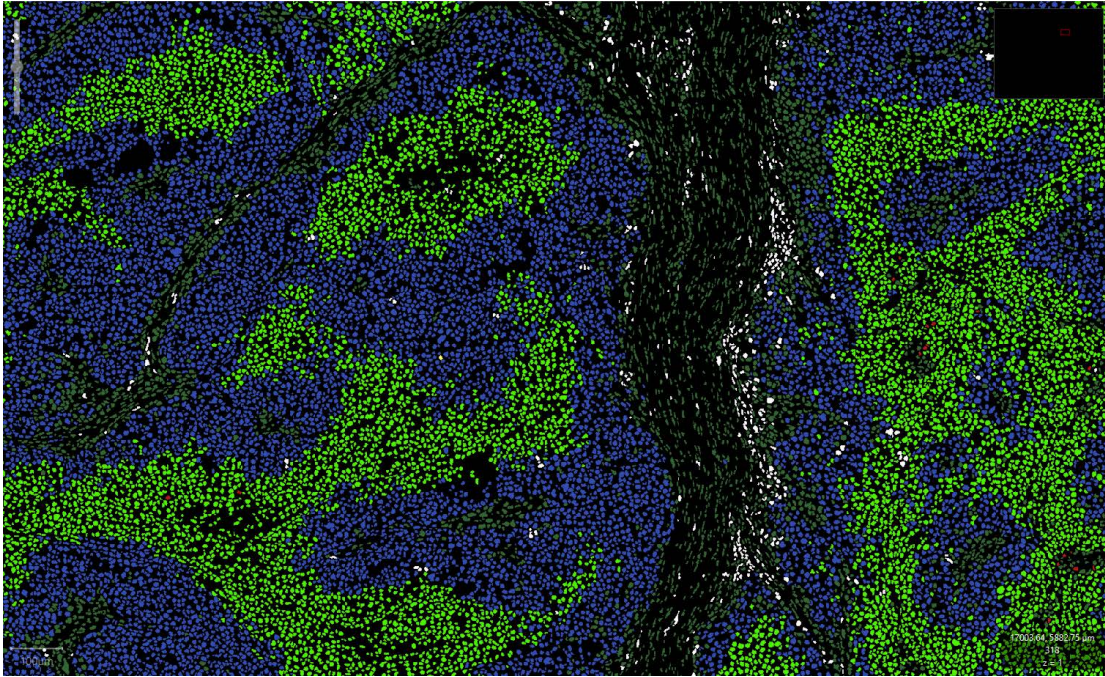


Abbildung 80: Subklassifikation der hypoxischen und normoxischen Tumorzellen in CD73 positive (rot für hypoxische, CD73⁺ Tumorzellen bzw. gelb für normoxische CD73⁺ Tumorzellen) bzw. CD73 negative hypoxische (neongrün) respektive normoxische (blau) Tumorzellen. Diese Subklassifikation erfolgte ebenfalls mithilfe des Schwellenwertprinzips, wobei nun im rot-Kanal (CD73) ein definierter Schwellenwert zu erreichen war, den Zellen zum Erlangen des Attributs CD73⁺ mit ihrer mittleren Farbeintensität der Zellmembran überschreiten mussten. So konnten in diesem Zellausschnitt 25 hypoxische CD73⁺ Zellen, 9.117 hypoxische CD73⁻ Zellen, 2 normoxische CD73⁺ Zellen und 10.715 normoxische CD73⁻ Zellen detektiert werden.

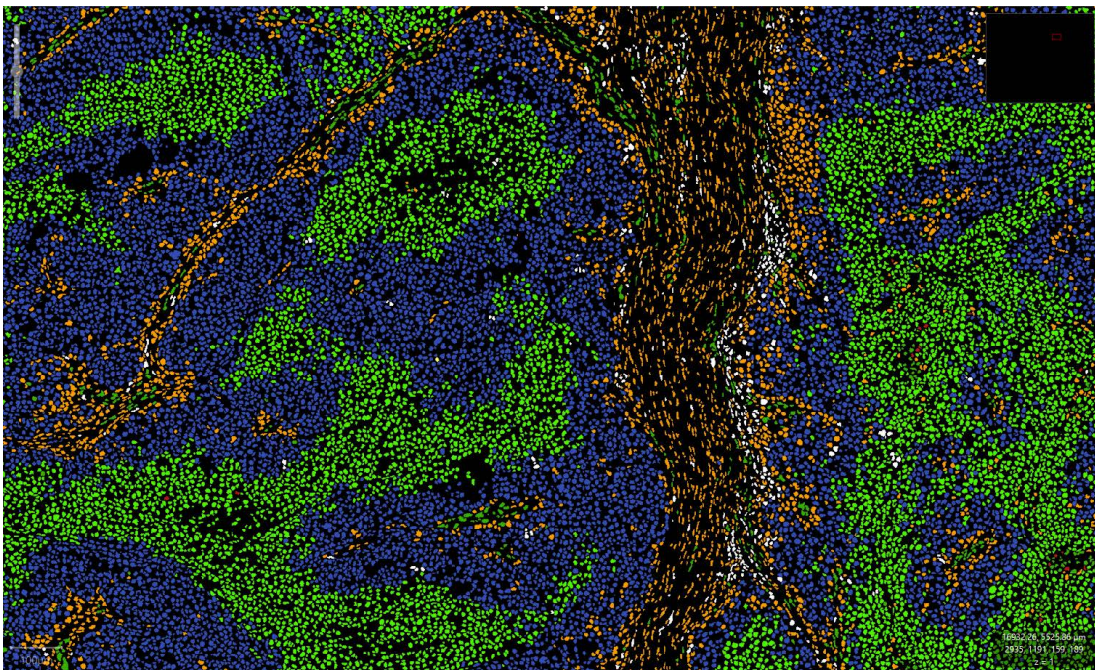


Abbildung 81: Abbildung aller Zellklassen der ausgewählten ROI. Hierbei wurden die Stromazellen noch nach ihrer CD73-Färbintensität in CD73⁺ (grün) und CD73⁻ (orange) Zellpopulationen unterschieden. Die restlichen Zellpopulationen zeigen weiterhin die oben beschriebene Farbdarstellung. Demnach wurden die Stromazellen nun in 737 CD73⁺ Zellen und 3.651 CD73⁻ Zellen unterteilt.

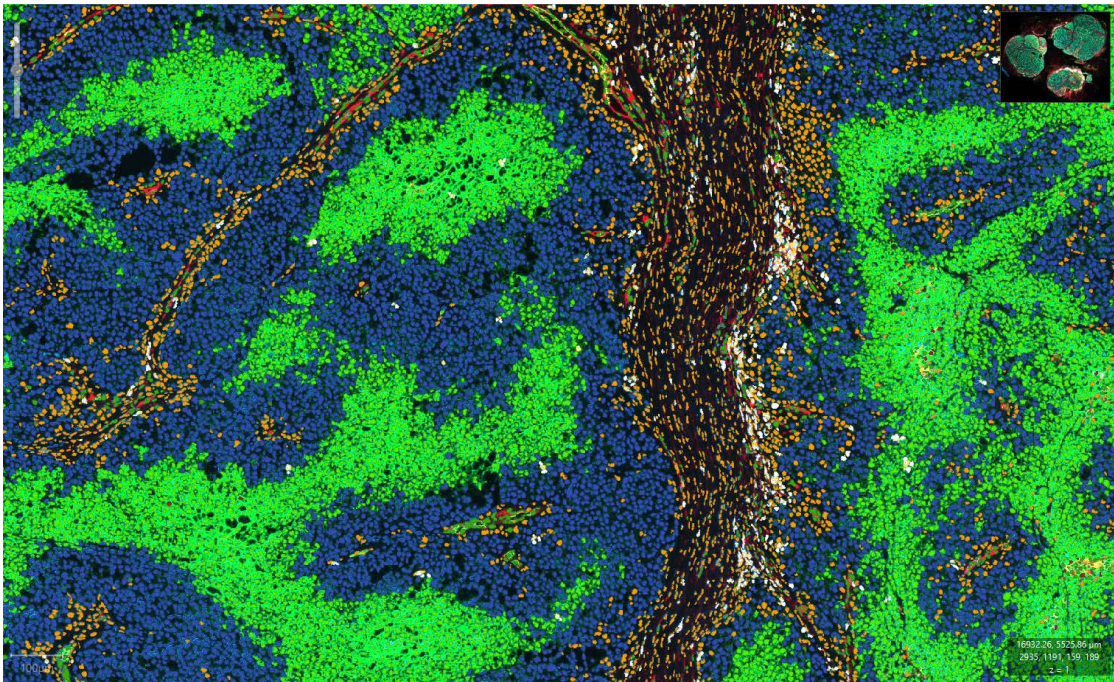


Abbildung 82: Ergebnis der vollständigen Zellklassifikation mit darunter gelegter Darstellung der IF-Kanäle. Man sieht in der Übersicht bereits eine sehr exakte Deckungsgleichheit der IF-Kanäle mit der durchgeführten Klassifikation.

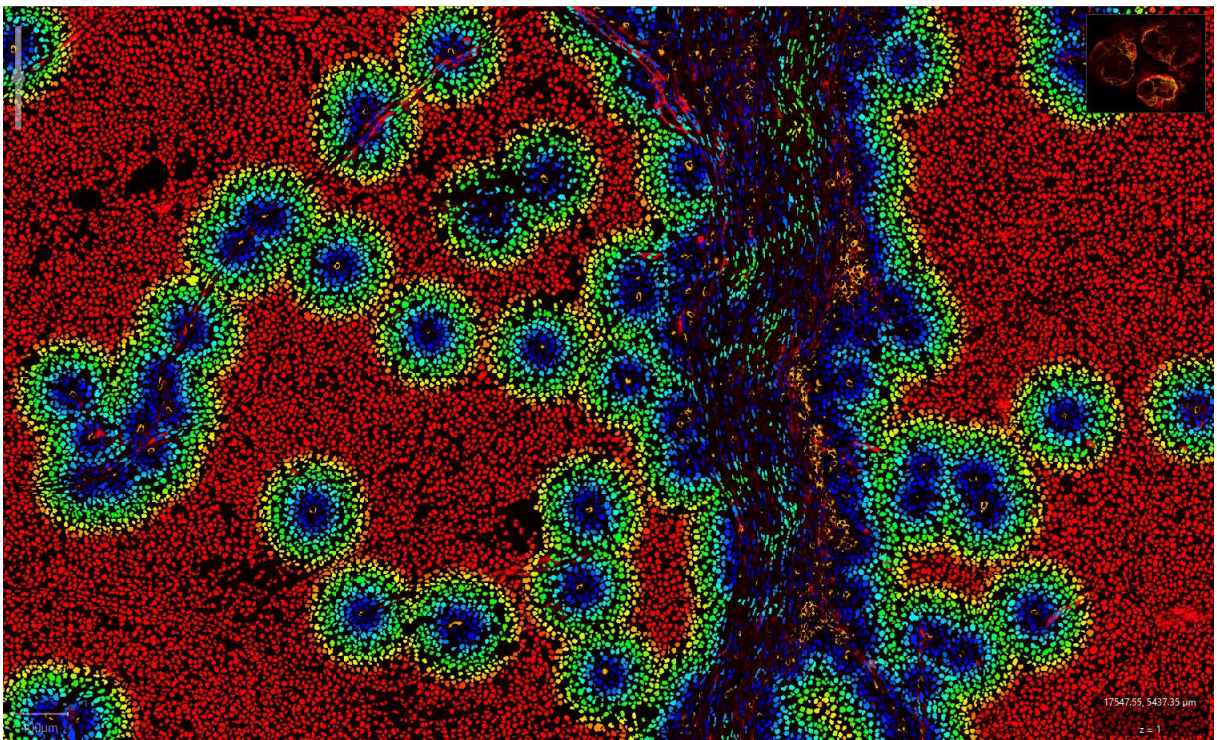


Abbildung 83: Resultate der Distanztransformation für $CD8^+$ CTL in Form einer Heatmap. Mit zunehmenden Abstand der Immunzellen (gelber IF-Kanal) zu der beobachteten Zelle kommt es zu einem Farbumschlag von blau über grün und gelb zu rot. Man erkennt somit in diesem Ausschnitt sehr gut, dass sich die Immunzellen insbesondere in Gefäßnähe (roter IF-Kanal) innerhalb des Stromas aufhalten (blaue Farbe) und nur vereinzelt das Tumorgewebe infiltrieren (vornehmlich rot unterlegt). Diese Heatmap kann erst nach Ausführung des Distanzskripts für $CD8^+$ Zellen, dass die Distanzen jeder Immunzelle zu der nächstgelegenen Zellklasse berechnet (z.B. Distanz Immunzelle zu $CD73^+$ hypoxischer Tumorzelle) und aufgerufen werden.

Name	Class	ROI	Centroid X μm	Centroid Y μm	Nucleus: Area	Nucleus: Perimeter	Nucleus: Circularity	Nucleus: Max caliper	Nucleus: Min caliper	Nucleus: Eccentricity	Nucleus: Channel 1 mean	Nucleus: Channel 1 sum	Nucleus: Channel 1
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	17951.6	5364.4	15.19	13.99	0.976	5.237	3.897	0.678	1069.6	44924	120.72
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	17961.5	5374.3	15.61	14.94	0.879	5.588	4.069	0.692	822.29	37003	81.12
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	17980	5374.9	16.45	15.56	0.854	6.162	3.698	0.813	948.5	41734	125.65
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	17989.9	5380.5	14.35	16.71	0.646	6.905	2.729	0.914	2822.3	118537	894.99
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	17968.2	5381.7	23.21	21.41	0.636	9.186	4.42	0.885	973.35	58401	125.32
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	17979.4	5386.3	13.92	14.68	0.812	6.397	2.618	0.898	859.23	33510	45.73
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	18000.7	5387.8	40.08	25.94	0.748	11.18	4.428	0.926	4416.5	415154	1447.5
Stroma:CD73-	Stroma:CD73-	Polygon	17955.4	5390.8	24.47	20	0.769	8.216	4.058	0.896	2543	167835	710.72
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	18002.4	5397.2	25.74	25.12	0.512	11.18	3.778	0.939	5290.4	380911	1711.8
Stroma:CD73-	Stroma:CD73-	Polygon	17978	5398.9	11.39	12.7	0.887	5.237	3.196	0.737	4070.4	138395	1206.3
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	17991.5	5401.6	25.74	25.29	0.506	11.49	2.744	0.972	5872.5	375843	1951.8
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	18016.3	5402.9	38.39	25.04	0.77	10.27	5.23	0.86	3010.4	295021	845.22
Stroma:CD73-	Stroma:CD73-	Polygon	18038.5	5409.8	21.52	21.74	0.572	10.08	2.991	0.96	4959.1	292588	1421.5
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	18005.4	5409.8	16.88	23.2	0.394	11.06	2.241	0.982	1739.9	78297	582.25
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	18023	5411.1	16.45	19.65	0.536	7.822	3.595	0.93	3131.1	134636	790.28
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	18034.7	5417.2	22.78	20.07	0.711	8.666	3.486	0.918	4089.9	257662	1139.5
Stroma:CD73-	Stroma:CD73-	Polygon	18048.8	5420	37.97	25.74	0.72	10.65	4.684	0.906	4714	471400	1188.3
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	18024	5421.7	74.26	37.43	0.666	16.94	6.24	0.937	3503.2	623574	848.45
Stroma:CD73-	Stroma:CD73-	Polygon	18007.1	5422.9	25.74	18.67	0.928	6.397	5.752	0.274	2665.8	194600	566.54
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	18044.6	5430.4	15.19	15.29	0.817	6.162	3.188	0.875	1065.4	44747	126.16
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	18061.2	5436	64.55	39.86	0.511	16.53	6.478	0.944	3896.3	662378	1231.3
Stroma:CD73-	Stroma:CD73-	Polygon	18032.8	5444.8	11.39	12.05	0.986	4.593	3.248	0.629	2016.2	64520	357.9
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	18042.3	5445.5	26.16	18.57	0.953	6.905	5.196	0.579	4848.6	349098	1149.7
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	18058.6	5447.6	9.282	11.33	0.909	3.787	3.215	0.419	883.13	26494	89.21
Stroma:CD73-	Stroma:CD73-	Polygon	18074.2	5448.5	23.21	18.62	0.841	6.496	5.196	0.459	1573.6	100712	303.86
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	18038.8	5453.3	38.82	29.86	0.547	12.89	5.444	0.925	4030.5	403046	1035.4
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	18053.3	5457.6	48.52	31.35	0.621	12.94	5.519	0.921	2700	326697	495
Immune cells	Immune cells	Polygon	18043.6	5458.5	53.16	37.27	0.481	14.02	7.01	0.905	7279.8	982769	2022.3
Immune cells	Immune cells	Polygon	18085.4	5463	32.91	33.47	0.369	15.92	3.897	0.98	3193.6	271458	1313.1
Stroma:CD73-	Stroma:CD73-	Polygon	18038.5	5464.4	18.14	17.09	0.78	7.406	3.571	0.875	3379.6	168978	555.68
Stroma:CD73+	Stroma:CD73+	Polygon	18063.2	5468.6	16.02	31.7	0.448	9.715	2.108	0.845	1100.0	61047	111.67

Column filter

Show histograms Copy to clipboard Save

Abbildung 84: Ausschnitt aus dem generierten Datensatz zu der definierten ROI. Dieser gibt sowohl die Zellkoordinaten der jeweiligen Zellklasse wieder, als auch die Messzahlen zu dem Distanzskript. Diese Zellkoordinaten sind die spätere Grundlage für die Arbeiten in der statistischen Datenanalyse und insbesondere für die spatiale Analyse der Zellinteraktion in MosaicSuite, wohingegen die Distanzen zu den Immunzellen essentiell für die Analyse in Tableau sind.

		Statistiken													
		% CD8+	% Stroma: CD73+	% Stroma: CD73-	% Tumorhypox: CD73+	% Tumorhypox: CD73-	% Tumorhypox: CD73+	% Tumorhypox: CD73-	% Stroma gesamt	% Tumor hypox	% Tumor normox	% Tumor: CD73+	Überlebenszeit	Gesamtzellzahl	
N	Gültig	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	
	Fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mittelwert		7.12	18.82	12.73	9.76	32.52	2.91	16.09	31.52	42.24	19.00	14.61	14.82	617618.65	
Standardfehler des Mittelwertes		1.217	1.882	1.435	1.839	2.980	0.619	2.880	2.812	2.217	2.905	3.362	112510.645		
Median		5.00	18.00	11.00	6.00	33.00	2.00	12.00	30.00	44.00	20.00	7.00	6.00	607862.00	
Standardabweichung		6.890	10.809	8.243	10.565	17.121	3.556	13.246	16.156	16.542	12.735	16.888	19.316	646324.448	
Schiefte		2.856	626	1.294	2.028	0.988	1.628	7.863	-1.112	1.243	1.052	2.000	1.688	481	
Standardfehler der Schiefe		.409	.409	.409	.409	.409	.409	.409	.409	.409	.409	.409	.409	.409	
Minimum		0	4	2	0	3	0	0	8	5	1	0	0	8224	
Maximum		37	46	40	46	66	13	66	75	82	58	72	73	2169274	
Perzentile	25	3.00	8.00	7.00	3.00	18.00	.00	6.00	18.50	30.50	9.50	4.00	2.00	220852.00	
	50	5.00	18.00	11.00	6.00	33.00	2.00	12.00	30.00	44.00	20.00	7.00	6.00	607862.00	
	75	10.00	26.50	18.00	13.00	46.00	3.00	24.50	43.00	55.00	25.50	21.00	18.00	1387286.50	

Abbildung 85: Deskriptive Statistiken aus SPSS zum untersuchten Patientenkollektiv exklusive der ZNS-Metastasen der $n_2=33$. Für diese Patientengruppe wurden die erfassten Anteile der intratumoralen Zellpopulationen im Hinblick auf deren Mittelwert, Median, Minimum, Maximum, Quartile und die Standardabweichung untersucht. Weiterhin wurden die Lage- und Streumaße für den das Gesamtüberleben des Patientenkollektivs erfasst.

		Statistiken													
		% CD8+	% Stroma: CD73+	% Stroma: CD73-	% Tumorhypox: CD73+	% Tumorhypox: CD73-	% Tumorhypox: CD73+	% Tumorhypox: CD73-	% Stroma gesamt	% Tumor hypox	% Tumor normox	% Tumor: CD73+	Überlebenszeit	Gesamtzellzahl	
N	Gültig	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	Fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mittelwert		1.17	14.83	15.67	6.17	24.33	1.67	28.67	30.00	30.17	29.50	7.17	31.33	411244.00	
Standardfehler des Mittelwertes		.401	2.725	3.283	2.301	4.248	.494	8.943	5.447	4.722	8.789	2.892	8.369	107501.893	
Median		1.00	15.50	17.50	4.50	27.00	1.50	23.00	31.50	33.50	23.00	5.50	33.00	411696.50	
Standardabweichung		.983	6.876	8.042	5.838	10.405	1.211	21.908	13.342	11.566	21.529	7.083	20.500	283304.784	
Schiefte		1.438	-.221	-1.324	1.226	-.982	-.075	1.716	-.167	-2.236	1.696	.959	-.211	.213	
Standardfehler der Schiefe		.845	.845	.845	.845	.845	.845	.845	.845	.845	.845	.845	.845	.845	
Minimum		0	5	1	1	3	0	12	10	7	13	0	5	133101	
Maximum		3	24	25	18	34	7	70	49	39	70	19	53	789373	
Perzentile	25	.75	8.75	10.75	1.75	15.25	.75	12.75	19.00	26.50	14.50	1.50	9.50	149139.00	
	50	1.00	15.50	17.50	4.50	27.00	1.50	23.00	31.50	33.50	23.00	5.50	33.00	411696.50	
	75	1.50	20.25	20.50	10.75	33.25	3.00	40.75	39.25	36.00	42.25	13.00	53.00	832874.25	

Abbildung 86: Deskriptive Statistiken aus SPSS zum Patientenkollektiv, unter ausschließlicher Betrachtung von Patienten mit Melanompräparaten aus ZNS-Lokalisation $n_3=4$, $N_3=6$. Auch für diese Patientengruppe wurden die erfassten Anteile der intratumoralen Zellpopulationen im Hinblick auf deren Mittelwert, Median, Minimum, Maximum, Quartile und die Standardabweichung untersucht. Weiterhin wurden die Lage- und Streumaße für den das Gesamtüberleben des Patientenkollektivs erfasst. Im Vergleich mit den oben gezeigten Gruppen kann ein signifikant geringerer Anteil CD8⁺ CTL beobachtet werden. Ebenso kann eine längere mediane Überlebenszeit bei geringerem medianem Anteil hypoxischer Tumorzellen beobachtet werden. Aufgrund der geringen Fallzahl des hier beschriebenen Patientenkollektivs ist die Anwendbarkeit auf eine Grundgesamtheit allerdings nicht möglich, weshalb lediglich von Tendenzen gesprochen werden sollte.

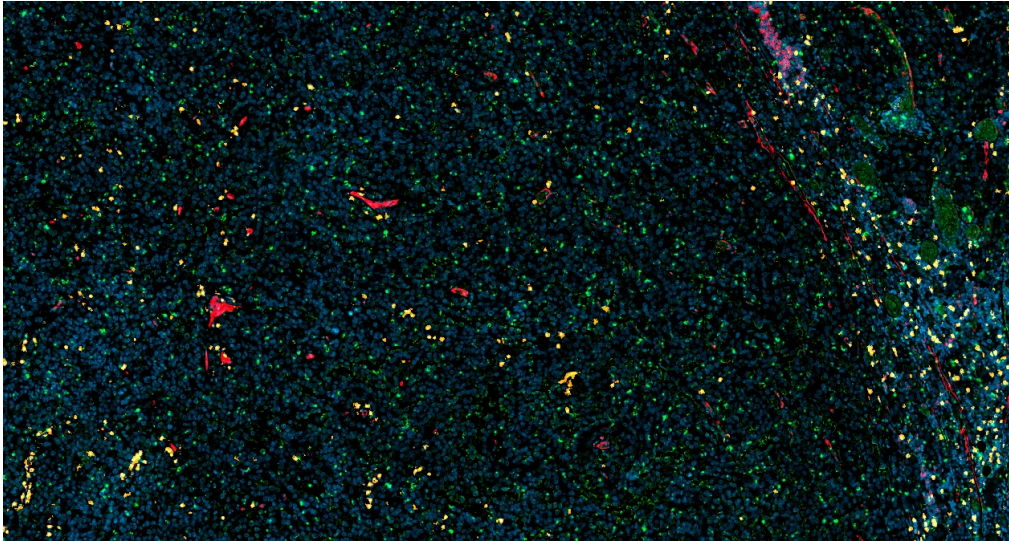


Abbildung 87: Ausschnitt aus einer multiplex-IF-Färbung einer LK-Metastase mit CA IX (grün), CD8 (gelb) und CD73 (rot). Es zeigt sich eine unspezifische nukleäre Anfärbung von CA-IX mit einem starken Hintergrundsignal. Dieser Befund ist mutmaßlich auf die minimale oder fehlende Expression von CA-IX in dem Gewebe zurückzuführen, wobei die hochverstärkte IHC zur Darstellung dieses artifiziellen Färberesultats führt. Aufgrund dieser biologisch nicht plausiblen Anfärbung wurde CA-IX als Marker zur Darstellung der Hypoxie im malignen Melanom verworfen.

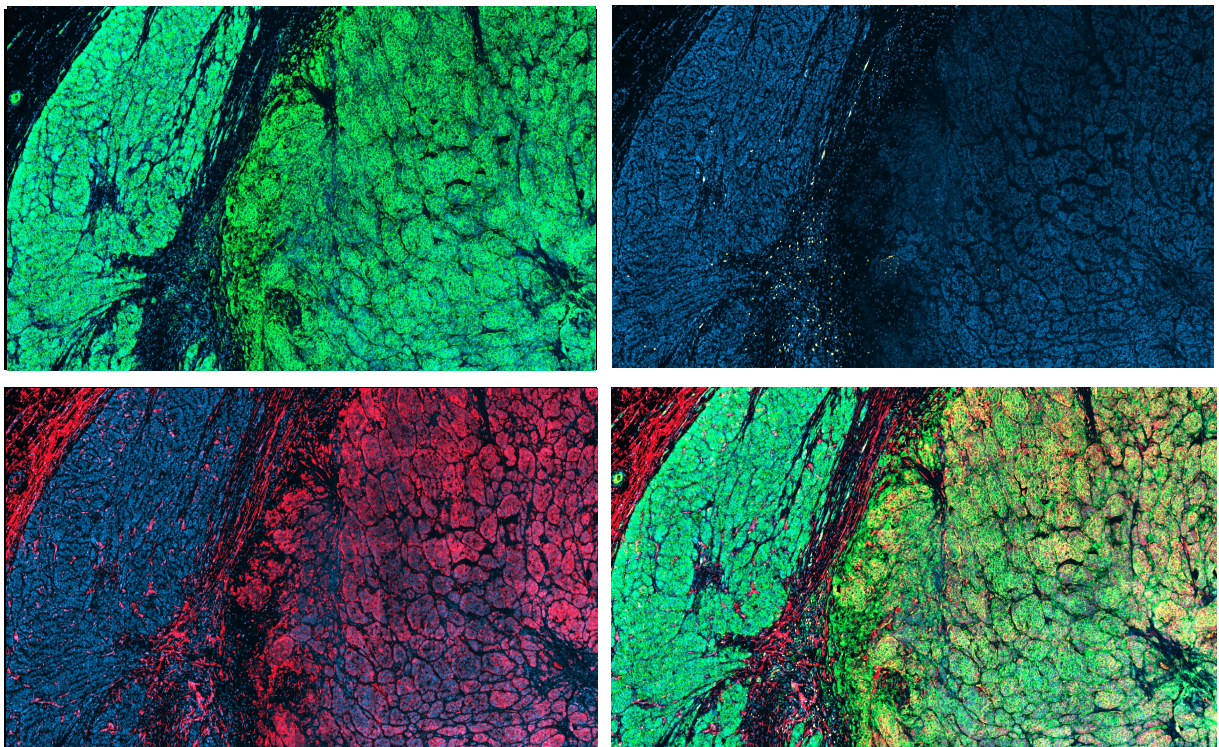


Abbildung 88: Immunfluoreszenzfärbungen aus IF-134 VII58: Darstellung der Immunevasion $CD8^+$ CTL (gelb) aus Regionen einer sich stark überschneidenden Expression der Marker GLUT-1 (grün) und CD73 (rot) entsprechend einer hypoxischen und Adenosin-vermittelten Immunsuppression.

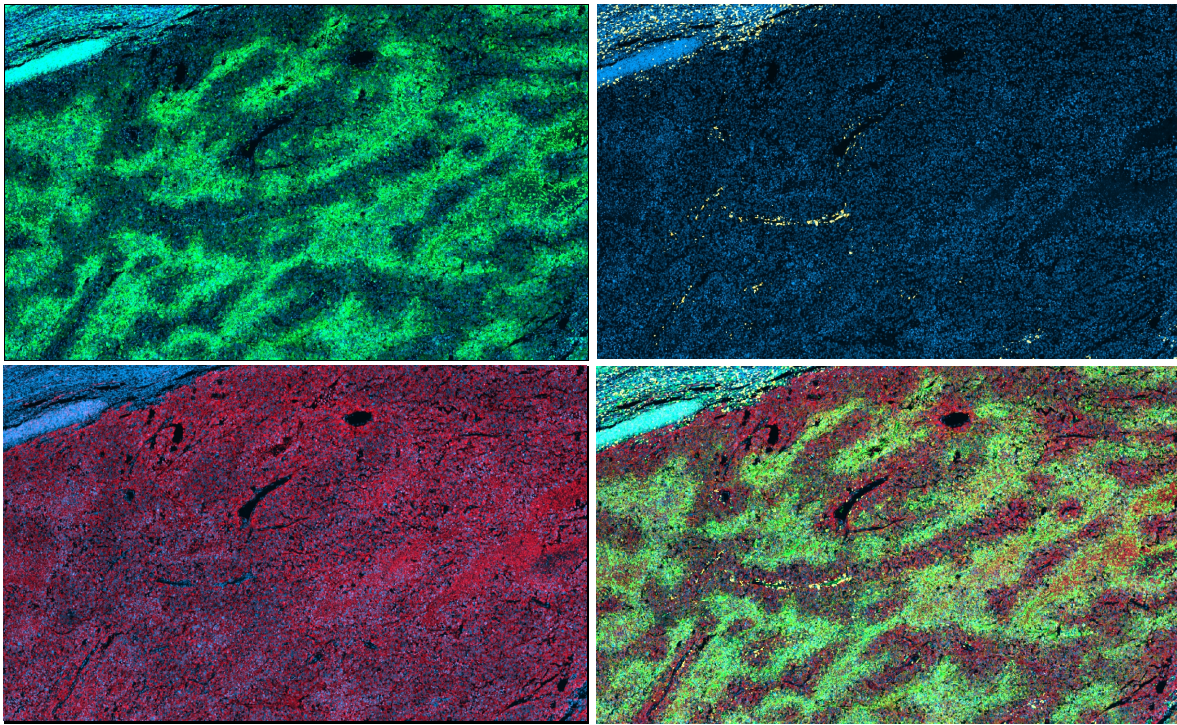


Abbildung 89: Immunfluoreszenzfärbungen aus IF-141 VIII03: Darstellung der Immunevasion $CD8^+$ CTL (gelb) aus Regionen einer sich stark überschneidenden Expression der Marker GLUT-1 (grün) und CD73 (rot) entsprechend einer hypoxischen und adenosin-vermittelten Immunsuppression. Es zeigt sich weiterhin eine starke CD73 Expression im gesamten Tumorpräparat, wohingegen die GLUT-1 Expression eine ausgeprägte Heterogenität, entsprechend des O_2 -Diffusionsgradienten, aufweist.

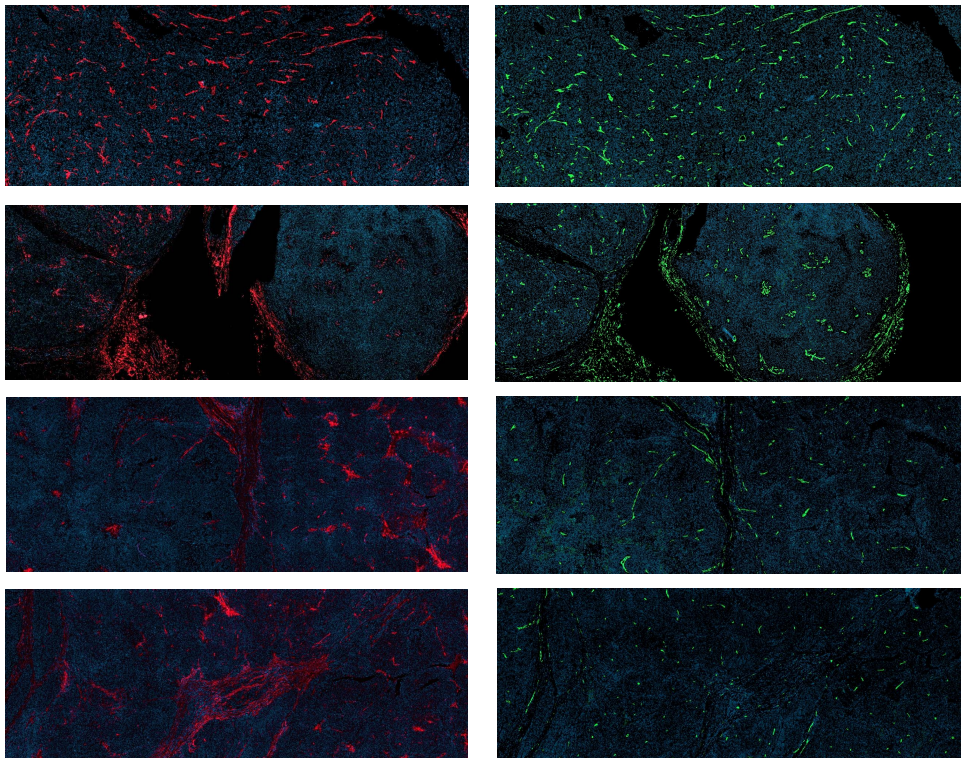


Abbildung 90: Gegenüberstellung der Immunfluoreszenzfärbungen aus der Untersuchungsserie und der Nebenserie für die möglichen Gefäßmarker CD73 und CD34: CD73 (rot) zeigt in den hier gezeigten Färbungen der Untersuchungsserie eine etwas stärkere Expression auf Endothelzellen im Stroma, wie auch in kleinen Bereichen im Tumor. Hingegen ist die Expression auf CD34 (grün) etwas weniger stark ausgeprägt, wobei CD34 allerdings sehr exakt auch kleinste Blutgefäße darzustellen vermag. Nachteil von CD34 war die gleichzeitig starke Hintergrundexpression auf Melanomzellen. Diese können gerade im fortgeschrittenen Melanom-Stadium durch ein vaskuläres Mimikry eine Expression von Gefäßmarkern wie CD34, aber auch von CD73, aufweisen, was eine exakte Beurteilung des Färbemusters erschwert.

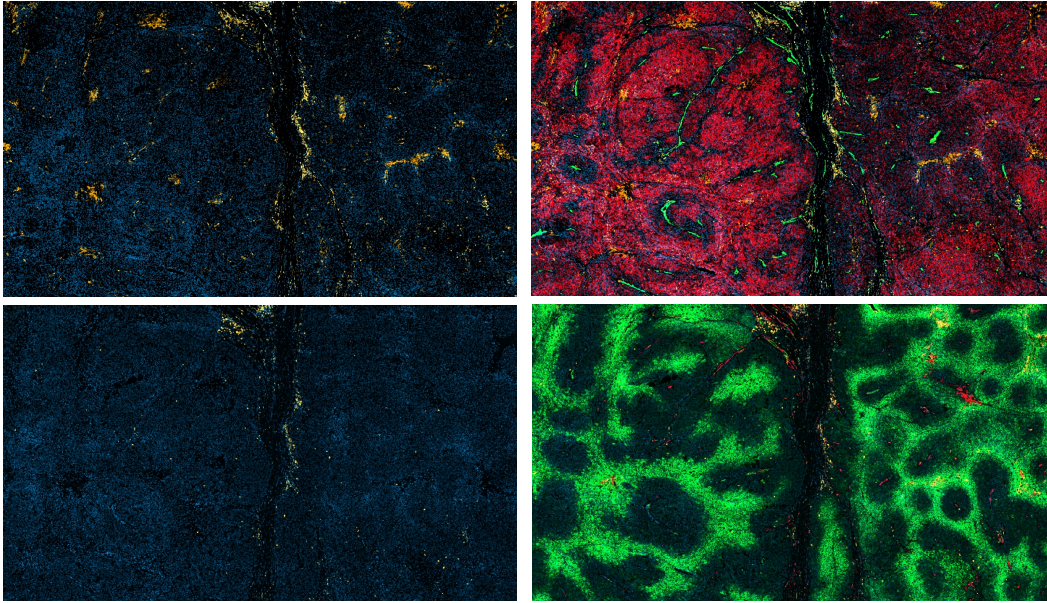


Abbildung 91: Vergleichende Analyse der IF-Färbungen für CD8 (oben links) und CD45 (unten links) aus den IF-Präparaten IF-114 V96 (oben rechts) bzw. IF-108 V74 (unten rechts). Durch den Vergleich der Färbungen für CD45 und CD8 kann gezeigt werden, dass CD8⁺ CTL nur einen kleinen Anteil der Immunzellen im Tumor einnehmen und somit noch wesentlich mehr Immunzellpopulationen im Rahmen der anti-Tumor-Immunantwort eine bedeutende Rolle spielen. Auf der rechten Seite sind die vollständigen IF-Färbungen mit Na⁺K⁺ATPase (rot), CD34 (grün) und CD45 (gelb) in dem oberen Ausschnitt, sowie CD73 (rot), GLUT-1 (grün) und CD8 (gelb) im unteren Ausschnitt gezeigt.

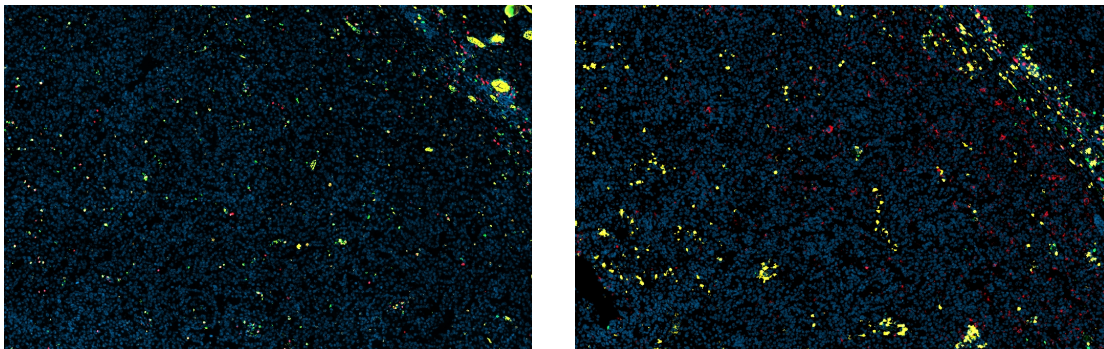


Abbildung 92: Vergleichende Analyse zweier Probefärbungen für verschiedene Immunzellpopulationen. Im linken Ausschnitt sind die Immunzellpopulationen FoxP3⁺ T_{reg} (gelb), CD8⁺ CTL (grün) und GranzymB⁺ Immunzellen (rot) gezeigt. Bereits hieraus lässt sich zeigen, dass FoxP3⁺ Immunzellen aufgrund ihrer starken Präsenz im Tumor eine bedeutende Rolle im Rahmen der anti-Tumor Immunantwort spielen könnten. Weiterhin zeigt sich, dass nur ein geringer Prozentsatz CD8⁺ CTL eine Granzym B Ko-Expression aufweist, was zum einen den geringen Aktivierungsgrad dieser Zellen im Tumor widerspiegelt, wie auch verdeutlicht, dass noch andere Zellen wie z.B. NK-Zellen (CD56⁺) eine wichtige Effektorfunktion einnehmen könnten. Der Vergleich mit dem rechten Ausschnitt (gleiche Lokalisation innerhalb des Tumors) in dem die Marker CD56 (rot), CD8 (gelb) und GranzymB (grün) gefärbt wurden, verdeutlicht zum anderen, dass CD8⁺ CTL im Gelbkanal (Cy3) wesentlich besser dargestellt werden als noch im grün-Kanal (FITC). Weiterhin wird Granzym B im grün Kanal schlechter dargestellt als noch im rot-Kanal. Es wird weiterhin deutlich, dass auch CD56⁺ NK-Zellen vermutlich ebenfalls eine bedeutende Rolle als Effektorzellpopulationen besitzen, zumal sich hier eine starke Tumoringfiltration findet.

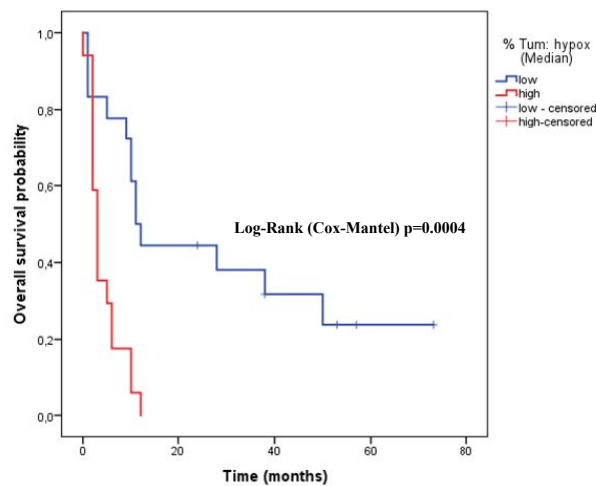


Abbildung 93: Kaplan-Meier-Analyse zur Überlebenszeit des untersuchten Patientenkollektivs (n=35) in Abhängigkeit der jeweiligen Ausprägung der Tumorphypoxie. Das Kollektiv wurde hierbei nach dem in der deskriptiven Statistik bestimmten Median der Tumorphypoxie (=42.00 %) dichotomisiert. Die Überlebensfunktionen des Patientenkollektivs unterscheiden ein Patientenkollektiv, das einen Anteil der Tumorphypoxie <42.00 % (blau) und einen Anteil der Tumorphypoxie >42.00 % (rot) aufweist. Es kann ein signifikant längeres medianes Überleben für Patienten mit besser oxygenierten Tumoren (11 vs. 3 Monate, 95 % KI-Intervall: 8.2-13.8 Monate vs. 2.0-4.0 Monate) gezeigt werden. Der mittels Log-Rank-Statistiken ermittelte p-Wert liegt deutlich unter dem Signifikanzniveau von $p < 0.05$, womit der hier gezeigte Zusammenhang als statistisch signifikant bezeichnet werden kann.

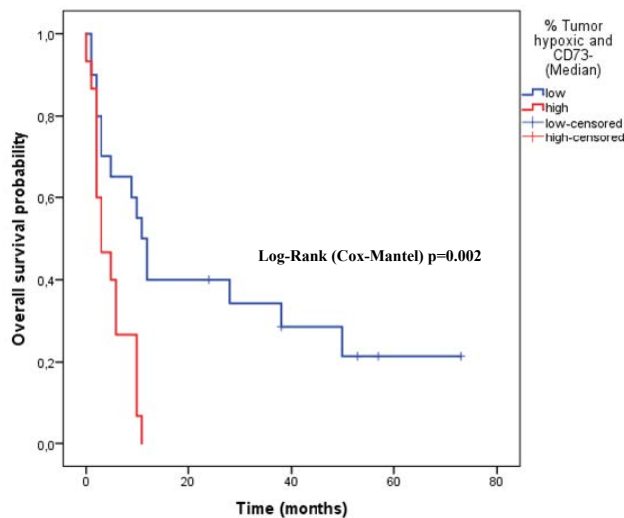


Abbildung 94: Kaplan-Meier-Analyse zur Überlebenszeit des untersuchten Patientenkollektivs (n=35) in Abhängigkeit der jeweiligen Ausprägung der Tumorphypoxie. Das Kollektiv wurde hierbei nach dem in der deskriptiven Statistik bestimmten Median der Tumorphypoxie (=33.00 %) dichotomisiert. Die Überlebensfunktionen des Patientenkollektivs unterscheiden ein Patientenkollektiv, das einen Anteil der Tumorphypoxie <33.00 % (blau) und einen Anteil der Tumorphypoxie >33.00 % (rot) aufweist. Es kann ein signifikant längeres medianes Überleben für Patienten mit besser oxygenierten CD73- Tumoren beobachtet werden (11 vs. 3 Monate, 95 % KI-Intervall: 8.1-13.9 Monate vs. 0.0 – 6.8 Monate). Der mittels Log-Rank-Statistiken ermittelte p-Wert liegt deutlich unter dem Signifikanzniveau von $p < 0.05$, womit der hier gezeigte Zusammenhang als statistisch signifikant bezeichnet werden kann.

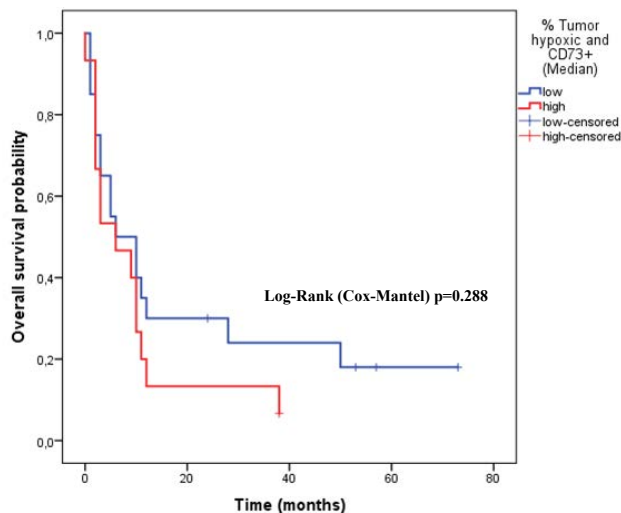


Abbildung 95: Kaplan-Meier-Analyse zur Überlebenszeit des gesamten Patientenkollektivs in Abhängigkeit des Anteils $CD73^+$ hypoxischer Tumorzellen. Das Kollektiv wurde hierbei nach dem in der deskriptiven Statistik bestimmten Median $CD73^+$ hypoxischer Tumorzellen ($=6.00\%$) dichotomisiert, da dieser dem optimalen Cut-off-Wert entspricht. Die Überlebensfunktionen des Patientenkollektivs unterscheiden ein Patientenkollektiv, das einen Anteil der $CD73^+$ hypoxischer Tumorzellen $<6.00\%$ (blau) und einen Anteil der $CD73^+$ hypoxischer Tumorzellen $>6.00\%$ (rot) aufweist. Es kann kein signifikant längeres medianes Überleben für Patienten mit einem geringeren Anteil $CD73^+$ hypoxischer Tumorzellen beobachtet werden (mediane Überlebenszeit 6 vs. 6 Monate). Mithilfe der Log-Rank-Statistik wurde zudem ein p -Wert von 0.288 ermittelt, womit der in den Überlebensfunktionen gezeigte Zusammenhang somit als nicht signifikant auf dem Niveau von $\alpha < 0.05$ anzusehen ist.

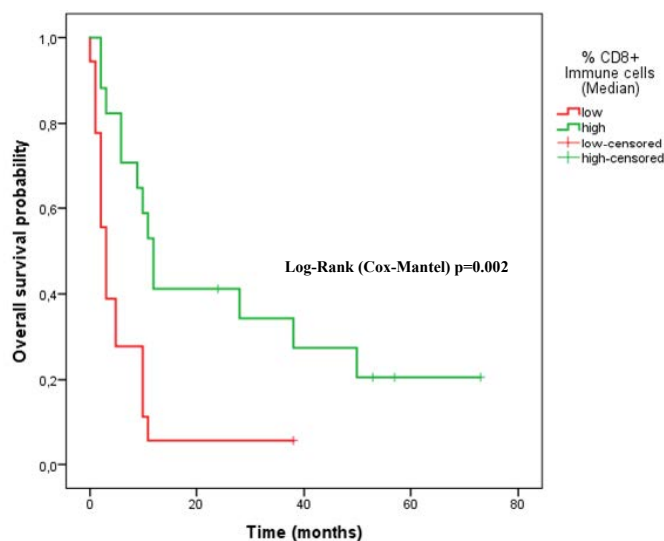


Abbildung 96: Kaplan-Meier-Analyse zur Überlebenszeit des gesamten Patientenkollektivs in Abhängigkeit des Ausmaßes der $CD8^+$ Immunezellinfiltration in den Tumor. Das Kollektiv wurde nach dem in der deskriptiven Statistik bestimmten Median des $CD8^+$ Immunezellanteils im Tumor ($=4.00\%$) dichotomisiert. Die Überlebensfunktionen des Patientenkollektivs unterscheiden ein Patientenkollektiv, das einen Anteil $CD8^+$ Immunezellen $<4.00\%$ (rot) und einen Anteil $CD8^+$ Immunezellen $>4.00\%$ (grün) aufweist. Es kann ein signifikant längeres medianes Überleben für Patienten mit einem größeren Anteil $CD8^+$ Immunezellen im Tumorpräparat beobachtet werden (12 vs. 3 Monate, 95 % KI-Intervall: 9,3-14,7 Monate vs. 1,6 vs. 4,4 Monate), wobei der hier gezeigte p -Wert von 0.002 mithilfe von Log-Rank Statistiken ermittelt wurde.

TNM-Stadium	Ausdehnung		AJCC-Stadium des malignen Melanoms
Melanoma-in situ			0
T1	Tumordicke \leq 1mm	T1a: Ohne Ulzeration und Mitoserate $<1/\text{mm}^2$	IA
		T1b: Mit Ulzeration oder Mitoserate $\geq 1/\text{mm}^2$	IB
T2	Tumordicke: 1,01–2 mm	T2a: Ohne Ulzeration	IIA
		T2b: Mit Ulzeration	
T3	Tumordicke: 2,01–4 mm	T3a: Ohne Ulzeration	IIB
		T3b: Mit Ulzeration	
T4	Tumordicke: >4 mm	T4a: Ohne Ulzeration	IIC
		T4b: Mit Ulzeration	
N1	Solitärer regionaler Lymphknoten (LK)	N1a: Mikroskopisch N1b: Makroskopisch	IIIA-IIIC: abhängig von Primärtumorgröße, Ulzeration und Lymphknotenbefall bzw. Auftreten von Satelliten – und In-transit-Metastasen
N2	2–3 regionäre Lymphknoten	N2a: Mikroskopisch	
		N2b: Makroskopisch N2c: Kein Lymphknotenbefall, aber Satelliten- und/oder In-transit-Metastasen	
N3	<ul style="list-style-type: none"> • ≥ 4 regionäre Lymphknoten oder • Satelliten/In-Transit-Metastasen mit regionärem LK-Befall oder • Verbackene LK 		
M1	Fernmetastasen	• M1a: Haut-/LK-Metastasen jenseits der Region	IV
		• M1b: Lungenmetastasen	
		• M1c: Andere Fernmetastasen	

Tabelle 12: Klassifikation des AJCC-Stadiums (7. Edition) des malignen Melanoms in Abhängigkeit von TNM-Stadium und Ausdehnung des malignen Melanoms in der histopathologischen Untersuchung (27).

AJCC Stadium des malignen Melanoms		IA	IB - IIB	IIC - IIIC	IV
Klinische Untersuchung		✓	✓	✓	✓
Sonografie	Lymphknoten		✓	✓	✓
	Abdomen				✓
Blutuntersuchung	Tumormarker S100		✓	✓	✓
	Tumormarker LDH			✓	✓
Molekularpathologische Diagnostik	BRAF,- NRAS,-c-kit-Mutationen			Ab IIIB	✓
Radiologische Diagnostik	Ganzkörper-CT/MRT/ PET			✓	✓
	MRT-Kopf			✓	✓
	Skelettszintigrafie				✓

Tabelle 13: Stadienangepasstes diagnostisches Vorgehen beim malignen Melanom (16).

AJCC Stadium	5-Jahres-Überlebensrate des malignen Melanoms
0-Ia	>90 %
Ib-IIc	ca. 70 %
IIIa-IIIc	20-40 %
IV	< 5 %

Tabelle 14: 5- Jahres Überlebensrate beim malignen Melanom in Abhängigkeit des Tumorstadiums (15).

	IPI before irradiation (n= 20)	IPI after irradiation (n= 21)	Difference between groups (p-values)
<i>Age (years)</i>			
Median (range)	62.5	52	0.28
Mean	61	53	0.05
<i>Sex</i>			
Male	70% (14)	67% (14)	1.00
Female	30% (6)	33% (7)	
<i>RPA Classification</i>			
3	40% (8)	33% (7)	0.66
2	60% (12)	67% (14)	
1	0% (0)	0% (0)	
<i>Mode of Radiotherapy</i>			
STX alone	45% (9)	29% (6)	0.34
STX + WBRT	15% (3)	19% (4)	1.00
WBRT alone	40% (8)	52% (11)	0.54
<i>Surgical resection</i>	15% (3)	33% (7)	0.24
<i>No. of cycles of IPI</i>			
Median (range)	4	4	0.97
Mean	3.5	3.7	0.72
<i>Time interval between irradiation and IPI (months, relative to begin of irradiation)</i>			
Median	-3 (-28; 0)	+1 (0; 21)	0.65
Mean	6.6	4	0.24
<i>Further systemic therapy^a</i>			
Inhibition of MAPK signaling	BRAF inhibitor MEK Inhibitor	25% (5) 15% (3)	48% (10) 15% (3)
Anti PD-1/PD-L1		20% (4)	15% (3)
Conventional therapy ^b		80% (16)	81% (17)

RPA recursive partitioning analysis, MAPK mitogen-activated protein kinase, BRAF v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B, MEK MAPK/ERK kinase, PD-1 programmed cell death protein 1, PD-L1 programmed cell death 1 ligand 1

^aSome patients received multiple treatments

^bInterleukin 2, Interferon α , polychemotherapy regimens (dacarbazine, temozolomide, paclitaxel, carboplatin)

Tabelle 15: Klinische Daten des in der retrospektiven Kohortenstudie untersuchten Patientenkollektivs aus (36). Gezeigt sind die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen des untersuchten Patientenkollektivs, welche entweder Ipilimumab (IPI) vor oder nach dem definierten Radiotherapie-Regime erhielten. Hinsichtlich des Alters und Geschlechts zeigt sich hierbei kein signifikanter Einfluss auf das OS bei Vergleich der beiden Patientengruppen. Auch konnte bei Vergleich der verschiedenen Therapie-Regime und bereits angewendeter systemischer Therapien zwischen den beiden Gruppen kein relevanter Einfluss auf das OS festgestellt werden. Die N=73 chirurgisch resezierten Tumorpräparate, welche im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit ausgewertet und analysiert wurden, wurden aus diesem Patientenkollektiv rekrutiert, wobei aus den ursprünglich $n_1=41$ Patienten für $n_2=35$ Patienten histologische Präparate vorhanden waren.

Patienten-Nr.	Präparatenummer	Färbenummer Untersuchungsserie	Färbenummer Nebenserie und Einzelfärbungen	Lokalisation	Iplimumab vor oder nach Strahlentherapie	1=verstorben 2=Patient noch lebend oder aus der Beobachtung ausgeschlossen	Beobachtungszeitraum bis Ereignis 1 oder 2
1	H 29613/12	IF-108 V74	IF-114 V96	Haut	vor		2
1	H 13663/14	IF-109 V82	IF-116 V12	Haut	vor		2
1	2722-2013	IF-134 VII54	--	Haut	vor		2
2	H 36352/13	IF-109 V81	IF-116 V11	Lymphknoten	vor		2
3	NP 1529/12	IF-109 V83	IF-117 V124	Hirnmastase	nach		28
3	1481-2013	IF-134 VII57	--	Haut	nach		28
3	1386-2015	IF-134 VII58	--	Lymphknoten	nach		28
4	H 16970/11	IF-107 V67	IF-117 V19	Haut	nach		12
4	H 25205/11	IF-108 V72	IF-117 V121	Lymphknoten	nach		12
4	1064-2009	IF-134 VII56	--	Haut	nach		12
4	393-2010	IF-135 VII62	--	Lymphknoten	nach		12
4	395-2010	IF-135 VII61	--	Haut	nach		12
4	2683-2011	IF-135 VII60	--	Lymphknoten	nach		12
4	2684-2011	IF-138 VII90	--	Haut mit Lymphknoten	nach		12
4	4084-2011	IF-135 VII65	--	Haut	nach		12
4	4086-2011	IF-135 VII63	--	Haut	nach		12
5	NP699/12	IF-110 V86	IF-117 V126	Hirnmastase	nach		11
6	H 2010021045	IF-106 V64	IF-117 V16	Lymphknoten	nach		50
6	2506-2011	IF-135 VII64	--	Lymphknoten	nach		50
6	2507-2011	IF-135 VII66	--	Lymphknoten	nach		50
7	H 20371/13	IF-109 V78	IF-114 V97	Lymphknoten	vor		24
7	4623-2011	IF-138 VII86	--	Haut	vor		24
8	NP 1722/13	IF-110 V85	IF-117 V27	Hirnmastase	nach		5
9	SS2010071457	IF-106 V63	IF-117 V15	Lung Metastase	vor		38
9	NP 1116/13	IF-110 V87	IF-117 V125	Hirnmastase	vor		38
10	H 15255/12	IF-108 V73	IF-114 V94	Lymphknoten	nach		38
10	H 18398/12	IF-109 V77	IF-115 V95	Lymphknoten	nach		38
11	H 11564/12	IF-107 V69	IF-116 V16	Lymphknoten	vor		3
11	H 11564/12	IF-107 V70	--	Lymphknoten	vor		3
12	H 31606/13	IF-109 V79	IF-116 V19	Lungenmetastase und Pleur	vor		10
12	H 35632/13	IF-109 V80	IF-116 V10	Lymphknoten	vor		10
12	4354-2012	IF-136 VII70	--	Haut	vor		10
12	4355-2012	IF-136 VII71	--	Haut	vor		10
12	0036-2014	IF-136 VII72	--	Haut	vor		10
13	H 22665/11	IF-105 V61	IF-117 V120	Rectum	vor		1
14	H 40183/12	IF-108 V75	IF-116 V17	Ohrmuschel	vor		6
14	0816-2013	IF-136 VII73	--	Ohrmuschel	vor		6
15	H 18915/13	IF-108 V76	IF-116 V18	Lymphknoten	nach		11
15	4501-2011	IF-136 VII74	--	Lymphknoten	nach		11
16	NP 1841/14	IF-110 V84	IF-117 V128	Hirnmastase	nach		53
16	NP 219/16	IF-110 V88	IF-117 V123	Hirnmastase	nach		53
16	1272-2013	IF-138 VII89	--	Haut	nach		53
16	4665-2011	IF-138 VII85	--	Haut	nach		53
17	SS2010071001	IF-106 V62	IF-117 V14	Myocard	nach		73
18	H 5673/11	IF-106 V65	IF-117 V17	Lymphknoten	nach		5
18	1795-2011	IF-138 VII87	--	Lymphknoten	nach		5
19	H 9586/11	IF-107 V66	IF-117 V18	Knochen	nach		3
19	3977-2009	IF-138 VII91	--	Haut	nach		3
19	870-2010	IF-136 VII67	--	Lymphknoten	nach		3
20	4166/09	IF-135 VII59	--	Haut	nach		2
21	1177-2013	IF-134 VII50	--	Haut	vor		9
22	H 35392/12	IF-134 VII55	--	Lungenmetastase	vor		2
23	1203-2011	IF-134 VII51	--	Lymphknoten	nach		10
24	H 1755/12	IF-138 VII80	--	Haut	vor		2
25	H38635/11	IF-137 VII79	--	Rectum	vor		6
26	3728-2012	IF-136 VII68	--	Lymphknoten	vor		2
27	0491-2014	IF-136 VII69	--	Haut	vor		1
28	4881-2014	IF-134 VII52	--	Haut	nach		9
28	4879-2014	IF-137 VII76	--	Haut	vor		10
28	4880-2014	IF-137 VII75	--	Haut	vor		10
29	3137-2012	IF-134 VII53	--	Lymphknoten	vor		10
30	H 3085/11	IF-137 VII77	--	GIT (Magen)	vor		0
31	E07895/11 D-H	IF-138 VII82	--	Lymphknoten	nach		3
31	E07895/11 D-H	IF-138 VII83	--	Lymphknoten	nach		3
31	E07895/11 D-H	IF-138 VII92	--	Lymphknoten	nach		3
31	E07895/11 D-H	IF-138 VII93	--	Lymphknoten	nach		3
31	E07895/11 D-H	IF-138 VII94	--	Lymphknoten	nach		3
32	09-102639	IF-137 VII78	--	Haut	vor		3
33	H/10/13393	IF-141 VIII03	--	Lymphknoten	nach		12
34	H11770/14	IF-141 VIII04	--	GIT (Gallenblase)	nach		57
34	H11770/14	IF-141 VIII05	--	Leber	nach		57
35	H 6651/12	IF-108 V71/ IF-107 V68	IF-117 V122	Gaumenschleimhaut	vor		1
35	687-2012	IF-138 VII88	--	Gaumenschleimhaut	vor		1
Cave: Patient-Nr. 35a wurde aufgrund einer unmöglichen Kernfärbung von der einzelzellbasierten Analyse ausgeschlossen!							
Probepreparat	17208-15	IF-104 V55	--	Lymphknoten	--	--	--
Probepreparat	17208-16	IF-104 V56	--	Lymphknoten	--	--	--
Probepreparat	17208-17	IF-104 V57	--	Lymphknoten	--	--	--
Probepreparat	17208-18	IF-104 V58	--	Lymphknoten	--	--	--
Probepreparat	17208-19	IF-111 V89	--	Lymphknoten	--	--	--
Probepreparat	17208-20	IF-111 V90	--	Lymphknoten	--	--	--
Probepreparat	17208-21	IF-112 V91	--	Lymphknoten	--	--	--
Probepreparat	17208-22	IF-113 V92	--	Lymphknoten	--	--	--
Probepreparat	17208-23	IF-113 V93	--	Lymphknoten	--	--	--
kein Melanom							

Tabelle 16: Tabellarische Auflistung aller im Rahmen der Arbeit durchgeführten multiplex-IF-Färbungen mit zugehörigen Histo-Präparaten, sowie den klinischen Daten aus dem untersuchten Patientenkollektiv. Es können hierbei die Untersuchungsserie einerseits, welche mithilfe der Antikörperkombination CD73, GLUT-1 und CD8 die eingangs aufgeworfene Hypothese näher untersuchen soll, sowie die Einzelfärbungen andererseits unterschieden werden. Rot dargestellt sind diejenigen Gewebeschnitte, die nachträglich in der Histologie keinen Tumorbefall durch Melanomzellen aufwiesen. Durch die Verknüpfung der einzelnen IF-Färbungen mit den klinischen Daten des hier bereits anonymisierten Patientenkollektivs können nach der Analyse der IF-Färbungen alle hieraus gewonnenen quantitativen und spatialen Daten mit den klinischen Daten korreliert werden und damit gleichfalls die klinische Bedeutung der extrahierten Daten hervorgehoben werden.

Antigen	Puffer zur Antigen-Demaskierung	Primär-Antikörper-Hersteller	Primär-Ak (Kat.-Nr. und Verdünnung)	Detektionssystem	Färbemuster
CD73/ NT5E	Citrat, pH 6.0	Cell Signaling Techn., Danvers, MA	13160 (mono*), 1:50	ImmPRESS Anti-Rabbit (Vector)	Membranär
GLUT-1	Tris/EDTA, pH 9.0	GeneTex Inc., Irvine, CA	GTX62480 (mono*), 1:500	ImmPRESS Anti-Rabbit (Vector)	Membranär
CD8	Tris/EDTA, pH 9.0	DAKO, Hamburg Germany	M 7103 (mono*), 1:50	ImmPRESS Anti-Mouse (Vector)	Membranär
CD34	Tris/EDTA, pH 9.0	Abcam, Cambridge, UK	ab81289 (mono*), 1:100	ImmPRESS Anti-Rabbit (Vector)	Membranär
CD39/ NPTD1	Citrat, pH 6.0	Abcam, Cambridge, UK	ab178572(mono*), 1:50/ 1:100	ImmPRESS Anti-Mouse (Vector)	Membranär
FoxP3	Citrat, pH 6.0	Cell Signaling Techn., Danvers, MA	98377 (mono*), 1:50	ImmPRESS Anti-Rabbit (Vector)	zytoplasmatisch
GranzymB	Tris/EDTA, pH 9.0	DAKO, Hamburg Germany	M7235 (mono*), 1:25	ImmPRESS Anti-Mouse (Vector)	zytoplasmatisch
CD56/ NCAM	Tris/EDTA, pH 9.0	Roche, Basel, Switzerland	760-4596 (mono*), ready to use	ImmPRESS Anti-Rabbit (Vector)	Membranär
Na⁺K⁺-ATPase	Tris/EDTA, pH 9.0	Abcam, Cambridge, UK	ab76020 (mono*), 1:100	ImmPRESS Anti-Rabbit (Vector)	Membranär
ENT-1	Tris/EDTA, pH 9.0	Abcam, Cambridge, UK	ab182023 (mono*), 1:50	ImmPRESS Anti-Rabbit (Vector)	Membranär
Carbonic Anhydrase IX	Tris/EDTA, pH 9.0	Abcam, Cambridge, UK	ab108351 (mono*), 1:50	ImmPRESS Anti-Rabbit (Vector)	Membranär
CD45	Tris/EDTA, pH 9.0	DAKO, Hamburg Germany	M0701 (mono*), 1:50	ImmPRESS Anti-Mouse (Vector)	Membranär

* monoklonaler Antikörper

Tabelle 17: Antikörper, immunhistochemische Technik und resultierende Färbemuster.

No.	Histo	Lokalisation	% CD8+ Immunzellen	% Stroma: CD73+	% Stroma: CD73-	% Tum:hyox: CD73+	% Tum:hyox: CD73-	% Tum:normox: CD73+	% Tum:normox: CD73-	% Stroma gesamt	% Tum: hyox	% Tum: normox	% Tum: CD73+	Iplimumab vor oder nach Bestrahlung	Beobachtungs zeitraum bis Ereignis 1 oder 2	1=verstorben 2=lebend oder aus der Beobachtung gefallen	Gesamtzellzahl	CD8 Infiltrations muster
1	IF-108 V74	Haut	3	10	4	3	48	1	32	14	51	32	4	vor	2	1	1804467	2
2	IF-109 V81	LK	3	4	14	2	53	0	24	18	55	24	2	vor	2	1	744263	1
3	IF-109 V83	Hirnmastase	1	14	13	6	33	3	30	28	39	33	8	nach	28	1	769373	3
3	IF-134 VII57	LK	5	8	22	2	32	1	30	30	34	31	3	nach	28	1	1256184	2
4	IF-135 VII60	LK	5	16	11	5	33	3	27	27	38	31	7	nach	12	1	1582666	2
5	IF-110 V86	Hirnmastase	1	24	25	16	18	3	13	49	34	15	19	nach	11	1	154485	2
6	IF-106 V64	LK	37	20	10	6	25	0	2	30	31	2	7	nach	50	1	607862	3
7	IF-109 V78	Haut	7	24	40	5	14	2	8	65	19	10	6	vor	24	2	184422	2
8	IF-110 V85	Hirnmastase	1	16	19	2	33	0	30	35	35	30	2	nach	5	1	587108	1
9	IF-106 V63	Lungenmetastase	4	32	11	13	18	8	14	43	31	22	21	vor	38	2	400851	3
9	IF-110 V87	Hirnmastase	2	5	17	0	6	0	70	22	6	70	0	vor	38	2	262994	3
10	IF-108 V73	LK	18	34	22	9	7	3	6	56	17	9	13	nach	38	1	982806	3
11	IF-107 V69/7C	LK	2	21	11	11	33	5	17	32	44	22	16	vor	3	1	908437	2
12	IF-109 V80	LK	3	24	20	19	14	9	11	43	33	20	28	vor	10	1	989188	1
13	IF-105 V61	Rectum	3	8	2	3	26	2	56	11	29	58	4	vor	1	1	2159274	1
14	IF-108 V75	Ohr	8	17	3	8	40	3	21	20	48	24	11	vor	6	1	148043	2
15	IF-108 V76	LK	14	34	5	5	37	1	5	39	42	5	6	nach	11	1	1505879	3
16	IF-110 V84	Hirnmastase	0	19	17	9	24	2	12	36	33	13	11	nach	53	2	361791	2
16	IF-110 V88	Hirnmastase	1	9	1	3	30	0	16	10	33	16	3	nach	53	2	133101	3
16	IF-138 VII89	Haut	9	28	17	6	14	2	25	44	20	27	7	nach	53	2	361791	2
17	IF-106 V62	Myocard	12	8	3	0	30	0	47	11	30	47	0	nach	73	2	1004090	3
18	IF-138 VII87	LK	2	7	9	1	66	0	15	16	67	15	1	nach	5	1	450895	2
19	IF-136 VII67	LK	1	7	10	2	52	0	28	18	54	28	2	nach	3	1	1359408	2
20	IF-135 VII59	Haut	1	7	2	19	63	2	6	8	82	8	22	nach	2	1	164630	2
21	IF-134 VII50	Haut	11	30	10	11	18	11	9	40	29	20	21	vor	9	1	257282	2
22	IF-134 VII55	Lungenmetastase	8	12	10	15	39	5	11	22	54	16	21	vor	2	1	51852	2
23	IF-134 VII51	Haut	3	14	7	10	44	3	19	20	55	22	14	nach	10	1	350201	2
24	IF-138 VII80	Haut	0	37	15	15	32	0	1	53	47	1	15	vor	2	1	8224	1
25	IF-137 VII79	Rectum	6	8	15	4	54	1	13	23	57	14	4	vor	6	1	1848768	2
26	IF-136 VII68	LK	11	19	11	34	21	2	2	29	55	5	35	vor	2	1	537568	2
27	IF-136 VII69	Haut	4	46	29	6	11	2	3	75	17	4	8	vor	1	1	330199	1
28	IF-137 VII76	Haut	3	12	7	4	56	0	12	19	60	12	72	vor	10	1	1319428	2
29	IF-134 VII53	Haut	13	20	8	3	36	1	19	28	39	20	4	vor	10	1	1375165	2
30	IF-137 VII77	Magen	3	18	19	13	43	2	3	37	55	6	15	vor	0	1	52155	1
31	IF-138 VII93	LK	9	6	7	34	20	13	9	13	53	23	47	nach	3	1	1786540	3
32	IF-137 VII78	Haut	3	20	11	5	50	0	12	31	55	12	5	vor	3	1	584752	2
33	IF-141 VII103	LK	7	12	21	46	3	11	0	33	49	11	56	nach	12	1	1682170	2
34	IF-141 VII105	Leber	14	33	13	0	5	0	34	46	5	34	0	nach	57	2	21497	3
35	IF-138 VII88	Gaumenschleimhaut	3	25	21	3	36	3	10	46	39	12	5	vor	1	1	160465	2

Anmerkungen: grün= Präparat mit der höchsten Zellzahl des jeweiligen Patienten
lila= Hirnmastase

¹ 17,6% Nekrose
² 41,3% Nekrose
³ 12,83% Nekrose

Tabelle 18: Auflistung der gerundeten quantitativen Daten mit den zugehörigen klinischen Daten des gesamten Patientenkollektivs mit denjenigen Tumorpräparaten, welche die höchste Gesamtzellzahl aufweisen (nach dem Prinzip 1 Patient: 1 Präparat) inklusive aller ausgewerteter Tumorpräparate aus ZNS-Lokalisationen. Grün unterlegt sind dabei nach wie vor diejenigen Präparate, die für den jeweiligen Patient in die Überlebensdatenanalyse in SPSS aufgenommen wurden. Lila dargestellt sind demgegenüber alle Präparate zerebraler Metastasen.

No.	Histo	Lokalisation	% CD8+ Immunzellen	% Stroma: CD73+	% Stroma: CD73-	% Tum:hyox: CD73+	% Tum:hyox: CD73-	% Tum:normox: CD73+	% Tum:normox: CD73-	% Stroma gesamt	% Tum: hyox	% Tum: normox	% Tum: CD73+	Iplimumab vor oder nach Bestrahlung	Beobachtungs zeitraum bis Ereignis 1 oder 2	1=verstorben 2=lebend oder aus der Beobachtung gefallen	Gesamtzellzahl	CD8 Infiltrations muster
1	IF-108 V74	Haut	3	10	4	3	48	1	32	14	51	32	4	vor	2	1	1804467	2
2	IF-109 V81	LK	3	4	14	2	53	0	24	18	55	24	2	vor	2	1	744263	1
3	IF-134 VII57	LK	5	8	22	2	32	1	30	30	34	31	3	nach	28	1	1256184	2
4	IF-135 VII60	LK	5	16	11	5	33	3	27	27	38	31	7	nach	12	1	1582666	2
6	IF-106 V64	LK	37	20	10	6	25	0	2	30	31	2	7	nach	50	1	607862	3
7	IF-109 V78	Haut	7	24	40	5	14	2	8	65	19	10	6	vor	24	2	184422	2
9	IF-106 V63	Lungenmetastase	4	32	11	13	18	8	14	43	31	22	21	vor	38	2	400851	3
10	IF-108 V73	LK	18	34	22	9	7	3	6	56	17	9	13	nach	38	1	982806	3
11	IF-107 V69	LK	2	21	11	11	33	5	17	32	44	22	16	vor	3	1	908437	2
12	IF-109 V80	LK	3	24	20	19	14	9	11	43	33	20	28	vor	10	1	989188	1
13	IF-105 V61	Rectum	3	8	2	3	26	2	56	11	29	58	4	vor	1	1	2159274	1
14	IF-108 V75	Ohr	8	17	3	8	40	3	21	20	48	24	11	vor	6	1	148043	2
15	IF-108 V76	LK	14	34	5	5	37	1	5	39	42	5	6	nach	11	1	1505879	3
16	IF-138 VII89	Haut	9	28	17	6	14	2	25	44	20	27	7	nach	53	2	361791	2
17	IF-106 V62	Myocard	12	8	3	0	30	0	47	11	30	47	0	nach	73	2	1004090	3
18	IF-138 VII87	LK	2	7	9	1	66	0	15	16	67	15	1	nach	5	1	450895	2
19	IF-136 VII67	LK	1	7	10	2	52	0	28	18	54	28	2	nach	3	1	1359408	2
20	IF-135 VII59	Haut	1	7	2	19	63	2	6	8	82	8	22	nach	2	1	164630	2
21	IF-134 VII50	Haut	11	30	10	11	18	11	9	40	29	20	21	vor	9	1	257282	2
22	IF-134 VII55	Lungenmetastase	8	12	10	15	39	5	11	22	54	16	21	vor	2	1	51852	2
23	IF-134 VII51	Haut	3	14	7	10	44	3	19	20	55	22	14	nach	10	1	350201	2
24	IF-138 VII80	Haut	0	37	15	15	32	0	1	53	47	1	15	vor	2	1	8224	1
25	IF-137 VII79	Rectum	6	8	15	4	54	1	13	23	57	14	4	vor	6	1	1848768	2
26	IF-136 VII68	LK	11	19	11	34	21	2	2	29	55	5	35	vor	2	1	537568	2
27	IF-136 VII69	Haut	4	46	29	6	11	2	3	75	17	4	8	vor	1	1	330199	1
28	IF-137 VII76	Haut	3	12	7	4	56	0	12	19	60	12	72	vor	10	1	1319428	2
29	IF-134 VII53	Haut	13	20	8	3	36	1	19	28	39	20	4	vor	10	1	1375165	2
30	IF-137 VII77	Magen	3	18	19	13	43	2	3	37	55	6	15	vor	0	1	52155	1
31	IF-138 VII93	LK	9	6	7	34	20	13	9	13	53	23	47	nach	3	1	1786540	3
32	IF-137 VII78	Haut	3	20	11	5	50	0	12	31	55	12	5	vor	3	1	584752	2
33	IF-141 VII103	LK	7	12	21	46	3	11	0	33	49	11	56	nach	12	1	1682170	2
34	IF-141 VII105	Leber	14	33	13	0	5	0	34	46	5	34	0	nach	57	2	21497	3
35	IF-138 VII88	Gaumenschleimhaut	3	25	21	3	36	3	10	46	39	12	5	vor	1	1	160465	2

Anmerkungen: ¹ 12,83% Nekrose

Tabelle 19: Auflistung der gerundeten quantitativen Daten mit den zugehörigen klinischen Daten desjenigen Patientenkollektivs exklusive aller Tumorpräparate aus ZNS-Lokalisationen (n₂=33).

No.	Histo	Lokalisation	% CD8+ Immunzellen	% Stroma: CD73+	% Stroma: CD73-	% Tum: hypox: CD73+	% Tum: hypox: CD73-	% Tum: normox: CD73+	% Tum: normox: CD73-	% Stroma gesamt	% Tum: hypox	% Tum: normox	% Tum: CD73+	Ipilimumab vor oder nach	Beobachtungs- zeitraum bis Ereignis 1 oder 2	1=verstorben 2=lebend oder aus der Beobachtung gefallen	Gesamtzellzahl/ muster	CD8 Infiltrations
3	IF-109 V83	Hirnmastase	1	15	14	6	34	3	31	28	39	33	8	nach	11	1	76933	3
5	IF-110 V85	Hirnmastase	1	24	25	16	18	3	13	49	34	15	19	nach	11	1	154485	2
8	IF-110 V85	Hirnmastase	1	16	19	2	33	0	30	35	35	30	2	nach	5	1	587108	1
9	IF-110 V87	Hirnmastase	3	5	18	1	7	1	70	22	7	70	0	vor	38	2	262994	3
16	IF-110 V84 ¹	Hirnmastase	0	19	17	9	24	2	12	36	33	13	11	nach	53	2	560403	3
16	IF-110 V88 ²	Hirnmastase	1	10	1	3	20	1	16	10	33	16	3	nach	53	2	133101	2

Anmerkungen: ¹ 17,6% Nekrose
² 41,3% Nekrose

Tabelle 20: Auflistung der gerundeten quantitativen Daten und zugehörigen klinischen Daten desjenigen Patientenkollektivs ausschließlich derjenigen Tumorpräparate, welche aus ZNS-Lokalisationen entnommen wurden (n₃=5; N₃=6).

Patienten-Nr.	Präparatenummer	Färbenummer Untersuchungsreihe	Färbenummer Nebenserie und Einzelfärbungen	Lokalisation	Ipilimumab vor oder nach Strahlentherapie	1=verstorben 2=Patient noch lebend oder aus der Beobachtung ausgeschieden	Beobachtungszeitraum bis Ereignis 1 oder 2
1	H 29613/12	IF-108 V74	IF-114 V96	Haut	vor	1	2
1	H 13663/14	IF-109 V82	IF-116 V12	Haut	vor	1	2
1	2722-2013	IF-134 V1154	--	Haut	vor	1	2
2	H 36352/13	IF-109 V81	IF-116 V111	Lymphknoten	vor	1	2
3	NP 1529/12	IF-109 V83	IF-117 V124	Hirnmastase	nach	1	28
3	1481-2013	IF-134 V1157	--	Haut	nach	1	28
3	1386-2015	IF-134 V1158	--	Lymphknoten	nach	1	28
4	H 16970/11	IF-107 V67	IF-117 V119	Haut	nach	1	12
4	H 25205/11	IF-108 V72	IF-117 V121	Lymphknoten	nach	1	12
4	1064-2009	IF-134 V1156	--	Haut	nach	1	12
4	393-2010	IF-135 V1162	--	Lymphknoten	nach	1	12
4	395-2010	IF-135 V1161	--	Haut	nach	1	12
4	2683-2011	IF-135 V1160	--	Lymphknoten	nach	1	12
4	2684-2011	IF-138 V1190	--	Haut mit Lymphknoten	nach	1	12
4	4084-2011	IF-135 V1165	--	Haut	nach	1	12
4	4086-2011	IF-135 V1163	--	Haut	nach	1	12
5	NP699/12	IF-110 V86	IF-117 V126	Hirnmastase	nach	1	11
6	H 2010021045	IF-106 V64	IF-117 V116	Lymphknoten	nach	1	50
6	2506-2011	IF-135 V1164	--	GIT	nach	1	50
6	2507-2011	IF-135 V1166	--	Lymphknoten	nach	1	50
7	H 20371/13	IF-109 V78	IF-114 V97	Lymphknoten	vor	2	24
7	4623-2011	IF-138 V1186	--	Haut	vor	2	24
8	NP 1722/13	IF-110 V85	IF-117 V27	Hirnmastase	nach	1	5
9	552010071457	IF-106 V63	IF-117 V15	Lung Metastase	vor	2	38
9	NP 1116/13	IF-110 V87	IF-117 V125	Hirnmastase	vor	2	38
10	H 15255/12	IF-108 V73	IF-114 V94	Lymphknoten	nach	1	38
10	H 18398/12	IF-109 V77	IF-115 V95	Lymphknoten	nach	1	38
11	H 11564/12	IF-107 V69	IF-116 V16	Lymphknoten	vor	1	3
11	H 11564/12	IF-107 V70	--	Lymphknoten	vor	1	3
12	H 31606/13	IF-109 V79	IF-116 V19	Lungenmetastase und Pleur	vor	1	10
12	H 35632/13	IF-109 V80	IF-116 V10	Lymphknoten	vor	1	10
12	4354-2012	IF-136 V1170	--	Haut	vor	1	10
12	4355-2012	IF-136 V1171	--	Haut	vor	1	10
12	0036-2014	IF-136 V1172	--	Haut	vor	1	10
13	H 22665/11	IF-105 V61	IF-117 V120	Rectum	vor	1	1
14	H 40183/12	IF-108 V75	IF-116 V17	Ohrmuschel	vor	1	6
14	0816-2013	IF-136 V1173	--	Ohrmuschel	vor	1	6
15	H 18915/13	IF-108 V76	IF-116 V18	Lymphknoten	nach	1	11
15	4501-2011	IF-136 V1174	--	Lymphknoten	nach	1	11
16	NP 1841/14	IF-110 V84	IF-117 V128	Hirnmastase	nach	2	53
16	NP 219/16	IF-110 V88	IF-117 V123	Hirnmastase	nach	2	53
16	1272-2013	IF-138 V1189	--	Haut	nach	2	53
16	4665-2011	IF-138 V1185	--	Haut	nach	2	53
17	552010071001	IF-106 V62	IF-117 V114	Myocard	nach	2	73
18	H 5673/11	IF-106 V65	IF-117 V117	Lymphknoten	nach	1	5
18	1795-2011	IF-138 V1187	--	Lymphknoten	nach	1	5
19	H 9586/11	IF-107 V66	IF-117 V118	Knochen	nach	1	3
19	3977-2009	IF-138 V1191	--	Haut	nach	1	3
19	870-2010	IF-136 V1167	--	Lymphknoten	nach	1	3
20	4166/09	IF-135 V1159	--	Haut	nach	1	2
21	1177-2013	IF-134 V1150	--	Haut	vor	1	9
22	H 35392/12	IF-134 V1155	--	Lungenmetastase	vor	1	2
23	1203-2011	IF-134 V1151	--	Lymphknoten	nach	1	10
24	62951/08 (1) D2	IF-138 V1180	--	Haut	vor	1	2
25	H38635/11	IF-137 V1179	--	Rectum	vor	1	6
26	3728-2012	IF-136 V1168	--	Lymphknoten	vor	1	2
27	0491-2014	IF-136 V1169	--	Haut	vor	1	1
28	4881-2014	IF-134 V1152	--	Haut	nach	2	9
28	4879-2014	IF-137 V1176	--	Haut	vor	1	10
28	4880-2014	IF-137 V1175	--	Haut	vor	1	10
29	3137-2012	IF-134 V1153	--	Lymphknoten	vor	1	10
30	H 3085/11	IF-137 V1177	--	GIT (Magen)	vor	1	0
31	E07895/11 D-H	IF-138 V1182	--	Lymphknoten	nach	1	3
31	E07895/11 D-H	IF-138 V1183	--	Lymphknoten	nach	1	3
31	E07895/11 D-H	IF-138 V1192	--	Lymphknoten	nach	1	3
31	E07895/11 D-H	IF-138 V1193	--	Lymphknoten	nach	1	3
31	E07895/11 D-H	IF-138 V1194	--	Lymphknoten	nach	1	3
32	09-102639	IF-137 V1178	--	Haut	vor	1	3
33	H/10/13393	IF-141 V1103	--	Lymphknoten	nach	1	12
34	H11770/14	IF-141 V1104	--	GIT (Gallenblase)	nach	2	57
34	H11770/14	IF-141 V1105	--	Leber	nach	2	57
35	H 6651/12	IF-108 V71/ IF-107 V68	IF-117 V122	Gaumenschleimhaut	vor	1	1
35	687-2012	IF-138 V1188	--	Gaumenschleimhaut	vor	1	1

Cave: Patient-Nr. 35a wurde aufgrund einer unmöglichen Kernfärbung von der einzelzellbasierten Analyse ausgeschlossen!

Probepreparat	17208-15	IF-104 V55	--	Lymphknoten	--	--
Probepreparat	17208-16	IF-104 V56	--	Lymphknoten	--	--
Probepreparat	17208-17	IF-104 V57	--	Lymphknoten	--	--
Probepreparat	17208-18	IF-104 V58	--	Lymphknoten	--	--
Probepreparat	17208-19	IF-111 V89	--	Lymphknoten	--	--
Probepreparat	17208-20	IF-111 V90	--	Lymphknoten	--	--
Probepreparat	17208-21	IF-112 V91	--	Lymphknoten	--	--
Probepreparat	17208-22	IF-113 V92	--	Lymphknoten	--	--
Probepreparat	17208-23	IF-113 V93	--	Lymphknoten	--	--

Präparate mit starker Ko-Expression von CD73 und GLUT-1 im Tumor
kein Melanom bzw. aus der Auswertung ausgeschlossen

Tabelle 21: Darstellung der IF-Färbungen der Melanom Serie unter Hervorheben derjenigen Präparate mit einer überlappenden intratumoralen Expression von CD73 und GLUT-1 mit den zugehörigen klinischen Daten. In rot hervorgehoben sind hierbei jene Präparate, in denen eine vermehrte Expression von CD73 unter gleichzeitiger „Mit-Expression“ von GLUT-1 beobachtet werden konnte. Zusätzliche Markierung derjenigen Präparate, die sich nach histologischer Auswertung nicht als Melanom herausgestellt hatten (lila)

Das Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI)
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
bestätigt

Herrn Maximilian Haist, geb. am 29.04.1994 in Mainz,

mit diesem

Zertifikat

die erfolgreiche Teilnahme am ganztägigen Fortbildungskurs

„Statistische Auswertungen mit der Software IBM® SPSS®“

am 23.11.2017

Hierbei wurden Kenntnisse und Fertigkeiten zu den folgenden Inhalten vermittelt:

- Unterscheidung konfirmatorischer und explorativer Analysen
- Prinzipien der Datenerfassung und Dateneingabe
- Konzeption von Datentabellen und Dateneingabe in IBM® SPSS®
- Datenmanagement (Plausibilitätskontrollen, Datenkorrekturen)
- Einfache univariate Auswertungen mit IBM® SPSS®
- Interaktive Nachbearbeitung von Diagrammen mit IBM® SPSS®
- Praktische Übungen: grafische und numerische Deskriptionen
- Ableitung von Variablen
- Kategorialisierung stetiger Variablen
- Auswahl und Auswertung von Teilkollektiven

Dr. Astrid Schneider
(IMBEI Mainz)

IX. Danksagung

Mein Dank gilt zuvorderst meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Arnulf Mayer, für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, die Möglichkeit meine Promotion in einem zukunftsweisenden Feld der Onkologie und in der mit innovativsten wissenschaftlichen Methoden operierenden Arbeitsgruppe „Tumorpathophysiologie“ durchführen zu können. Weiterhin bedanken möchte ich mich für die engagierte Betreuung, die Korrektur des Manuskripts, sowie die unschätzbaren Erfahrungen, die ich im Rahmen zahlreicher Diskussionen zum aktuellen Stand der Forschung sammeln konnte. Seine wissenschaftlichen Kenntnisse und Erfahrungen sowie seine konstruktiven Ratschläge haben mich immer wieder motiviert und diese Arbeit wesentlich geprägt.

Besonders hervorzuheben ist an dieser Stelle auch das freundschaftliche, auf gegenseitige Zusammenarbeit angelegte und gleichzeitig wissenschaftlich herausfordernde Klima in der AG, das nicht zuletzt die Weiterentwicklung methodischer Ansätze ermöglichte, wie auch Inspiration für die vorliegende Arbeit war. Ich möchte mich daher ausdrücklich bei Herr Matthias Otto und Herr Justus Kaufmann bedanken.

Vor allem danke ich Frau Erika Budo für die kompetente und liebenswürdige Unterstützung, wie auch die umfassende Betreuung während des Entstehungsprozesses dieser Arbeit. Sie brachte mir die Grundlagen der Laborarbeit bei und begleitete mich mit ihrer langjährigen Erfahrung und ihrer großen Hilfsbereitschaft während meiner experimentellen Versuche. Sie stand mir jederzeit fachlich, wie auch menschlich zur Seite und wusste stets schwierige Probleme zu lösen.

Danken möchte ich ebenso der Leitung des Instituts, Herrn Univ.-Prof. Heinz Schmidberger, für die Unterstützung, die gute Kooperation und die Förderung meiner Arbeit. Auch möchte ich mich bei der Firma VARIAN für die finanzielle Unterstützung des Forschungsprojekts bedanken.

Herrn Dr. Peter Bankhead gilt es an dieser Stelle noch einmal explizit dankend zu erwähnen, da er mit der Entwicklung von QuPath und durch die Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe das in dieser Arbeit verwendete methodische Vorgehen erst ermöglicht hatte.

Für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit gebührt Herrn Dr. besonderer Dank.

Schließlich möchte ich einen besonders herzlichen Dank meiner Familie und meinen Freunden aussprechen, die mir auf meinem Weg zur Dissertation stets mit zwei lachenden Augen, dem nötigen Humor, inspirierenden Ideen, aber auch kritischer Reflexion zur Seite gestanden haben und daher mit Sicherheit wesentlichen Anteil an meiner nachhaltigen Begeisterung und Freude für diesen Themenkomplex, wie auch an der Entstehung dieser Arbeit haben.

X. Erklärungen

Wissenschaftlicher Vorstand der Universitätsmedizin
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Obere Zahlbacher Straße 63
55131 Mainz

Armsheim, 15.03.2020

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Maximilian Haist, erkläre hiermit, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt wurde. Alle von mir benutzten Veröffentlichungen, ungedruckten Materialien, sonstige Hilfsmittel sowie Textstellen, die ich wörtlich oder inhaltlich aus gedruckten oder ungedruckten Arbeiten übernommen habe, habe ich als solche gekennzeichnet und mit den erforderlichen bibliographischen Angaben nachgewiesen. Unterstützungsleistungen, die ich von anderen Personen erhalten habe, wurden in der Dissertationsschrift als solche benannt.

Dass ich bei der Anfertigung der wissenschaftlichen Arbeit die „Satzung der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ in ihrer jeweils geltenden Fassung zur Kenntnis genommen habe und ihre Grundsätze eingehalten wurden.

Darüber hinaus erkläre ich, dass mir die Gelegenheit zum Promotionsvorhaben nicht kommerziell vermittelt und insbesondere nicht eine Person oder Organisation eingeschaltet wurde, die gegen Entgelt Betreuer beziehungsweise Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

Die Dissertation wurde bei keiner anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich vorgelegt, weder im In- noch im Ausland.

Überdies bin ich nicht im Besitz eines anderen Doktorgrades. Ein bisher erworbener Doktorgrad wurde mir nicht aberkannt und ich habe bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet.

Mir ist bekannt, dass die Zulassung zur Promotion zu versagen ist, wenn die Unterlagen unvollständig oder die Angaben unrichtig sind. Ich bin darüber informiert, dass ich zur Führung des Dokortitels erst mit Aushändigung der Promotionsurkunde berechtigt bin.

Mit freundlichen Grüßen

Maximilian Haist

Wissenschaftlicher Vorstand der Universitätsmedizin
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Obere Zahlbacher Straße 63
55131 Mainz

Armsheim, 15.03.2020

Erklärung bezüglich Strafverfahren

Mit diesem Schreiben bestätige ich, Haist, Maximilian, geboren am 29.04.1994 in Mainz, dass gegen mich weder ein gerichtliches Strafverfahren noch ein staatsanwaltliches Ermittlungsverfahren anhängig ist, noch berufs- oder disziplinarrechtliche Maßnahmen getroffen oder eingeleitet worden sind.

Mit freundlichen Grüßen

Maximilian Haist

XI. Veröffentlichung

Teile dieser Arbeit wurden im November 2018 zur Veröffentlichung im International Journal of Radiation Oncology mit dem folgenden Titel „The Extent of Initial Tumor Infiltration By CD8-positive CTL in Non-CNS Tissue is Correlated with Survival Following Radiation Therapy and Ipilimumab for Brain Metastases of Malignant Melanoma“ eingereicht:

Mayer A, Haist M, Rapp M, Bankhead P, Vaupel P, Loquai C, et al.

The Extent of Initial Tumor Infiltration By CD8-Positive CTL in Non-CNS Tissue Is Correlated with Survival Following Radiation Therapy and Ipilimumab for Brain Metastases of Malignant Melanoma. International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics. 2018;102(3):e164-e5.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.07.628>

Abstract:

The anti-melanoma immune response is variable. Hypoxia has been reported to tip the scale towards immune escape by the generation of immunosuppressive adenosine (ADO) via 5'-ectonucleotidase (CD73) on malignant cells. Conversely, radiotherapy causes immunogenic cell death and may stimulate anti-tumor immune reactions which can be further enhanced by the application of immune checkpoint inhibitors. We reasoned that melanomas with high baseline numbers of CD8-positive cytotoxic T-lymphocytes (CTL), less hypoxia, and low CD73 expression might show a better clinical outcome even in an advanced state of the disease. We set out to test this hypothesis in a cohort of 32 patients who received radiotherapy (either whole brain radiotherapy, WBRT, or stereotactic radiotherapy, STX) for brain metastases of malignant melanomas in conjunction with Ipilimumab (IPI).

XII. Lebenslauf

Armsheim, 15.03.2020

Maximilian Haist