

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

Methodik zur Analyse spatialer Interaktionen multipler Zellpopulationen in Whole-  
Slide-Gewebeschnitten nach Mehrkanal-Immunfluoreszenzfärbung

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

Vorgelegt von

Matthias Otto  
aus Heidelberg

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Begutachtung:

2. Begutachtung:

Tag der Promotion:

07. Dezember 2021

# Inhaltsverzeichnis

Titelblatt.....	I
Terminblatt.....	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
1 Abkürzungsverzeichnis .....	1
2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....	2
3 Einleitung .....	5
4 Literaturdiskussion .....	9
4.1 Notwendigkeit von Interaktionsanalysen .....	9
4.2 Spatale Interaktionsanalyse.....	12
4.3 Molekularbiologische Zusammenhänge .....	33
5 Material und Methoden .....	41
5.1 Material.....	41
5.2 Methoden .....	44
6 Ergebnisse .....	48
6.1 Ergebnis der Färbung.....	48
6.2 Weiterentwicklung der Software .....	50
6.3 Proof-of-Concept-Analyse der HNO-Präparate .....	59
6.4 Proof-of-Concept-Analyse des Microarrays.....	64
7 Diskussion .....	69
7.1 Färbung.....	69
7.2 Proof-of-Concept der Softwarelösung .....	71
7.3 Pathophysiologie der Interaktionen in Tumoren .....	81
7.4 Diskussion der verschiedenen Interaktionsanalysetechniken.....	87
7.5 Ausblick.....	89
8 Zusammenfassung .....	91

9	Literaturverzeichnis.....	93
10	Anhang .....	105
10.1	Tabelle Verteilung der Marker in den HNO-Präparaten.....	105
10.2	Tabelle Interaktionsanalyse zur hypoxievermittelten Adenosinproduktion in HNO-Präparaten .....	106
10.3	Tabelle Interaktionsanalyse zur hypoxieinduzierten Immunsuppression in den HNO-Präparaten.....	107
10.4	Tabelle Interaktionsanalyse FoxP3 im Microarray .....	108
10.5	Praktische Anwendung und Skript.....	111
10.6	Wissenschaftliche Beiträge .....	115
11	Danksagung.....	116

# 1 Abkürzungsverzeichnis

A2AR	Adenosin-2A-Rezeptor	ENT1	Equilibrative nucleoside transporter 1
A2BR	Adenosin-2B-Rezeptor	FITC	Fluorescein Isothiocyanat
ADO	Extrazelluläres Adenosin	FoxP3	Transkriptionsfaktor Forkhead box protein 3
ADP	Adenosindiphosphat	HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 $\alpha$
AMP	Adenosinmonophosphat	ICCB	Intensity correlation coefficient-based analyses
ATP	Adenosintriphosphat	IL	Interleukin
CA9	Carboanhydrase 9	PBS	Phosphate buffered saline
CBC	Coordinate based colocalisation analyses	ROI	Region of interest
CD39	Ektonukleosid- Triphosphat- Diphosphohydrolase 1	TBS-T	Tris-buffered saline with Tween 20
CD73 /NT5E	Ekto-5'-Nukleotidase	Tregs	Regulatorische T-Zellen
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte- associated protein 4	TRIS	Tris(hydroxymethyl)- Aminomethan
DAPI	4',6-Diamidin-2- Phenylindol		
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		

## 2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1	Zusammenstellung der verwendeten Geräte und Materialien.....	41
Tabelle 2	Primärantikörper .....	42
Tabelle 3	Sekundärantikörper.....	42
Tabelle 4	Fluorochrome.....	43
Tabelle 5	Verteilung der Marker in den HNO-Präparaten .....	105
Tabelle 6	Ergebnisse der Interaktionsanalyse zur hypoxievermittelten Adenosinproduktion in den HNO-Präparaten.....	106
Tabelle 7	Interaktionsanalyse zur hypoxieinduzierten Immunsuppression in den HNO-Präparaten .....	107
Tabelle 8	Interaktionsanalyse zur hypoxieinduzierten Immunsuppression im Microarray .....	108
Abbildung 1	Darstellung von zwei zufälligen Punktverteilungen, die digital registriert wurden .....	10
Abbildung 2	Spots aus dem Tissue-Microarray, der in der Proof-of-Concept-Analyse eingesetzt wurde. ....	11
Abbildung 3	Ausschnitte aus Spot A3, A4 und F4 des Microarrays, der im Proof-of-Concept eingesetzt wurde.....	12
Abbildung 4	Kugel auf einer schiefen Ebene. ....	21
Abbildung 5	Schematische Darstellung des in dieser Arbeit angewandten Plummer-Potentials in seiner Ausgangsform und der zugehörigen ersten Ableitung .....	22
Abbildung 6	Effekt der Strength .....	24
Abbildung 7	Effekt der length scale $\sigma$ auf die Streckung der Potentialkurve.....	25
Abbildung 8	Schema eines Wahrscheinlichkeitsdichte-Distanz-Diagramms.....	26
Abbildung 9	Interaktionsanalyse zweier Szenarien.....	28
Abbildung 10	Abstraktes Punktmuster zur Veranschaulichung der Auswirkung verschiedener Potentialformen auf das Model-fit .....	29
Abbildung 11	Verschiedene Potentialformen im Vergleich (Step, Plummer, Linear, Hernquist, Non-parametric) .....	30

Abbildung 12	Darstellung der molekularbiologischen Zusammenhänge zwischen den angefärbten Biomarkern .....	34
Abbildung 13	Darstellung der verwendeten Marker .....	48
Abbildung 14	Übersicht über einen Whole-Slide-Scan eines Pharynxkarzinoms aus der ersten Serie .....	49
Abbildung 15	Übersicht über einen Whole-Slide-Scan eines weiteren Präparates aus dem gleichen Pharynxkarzinom.....	49
Abbildung 16	Übersichtsaufnahme des gefärbten Tissue-Microarrays .....	50
Abbildung 17	Ausschnitt aus dem Whole-Slide-Scan eines Hypopharynxkarzinoms.....	51
Abbildung 18	Schematische Darstellung des Ablaufes der Interaktionsanalyse ....	52
Abbildung 19	Vorgenommene Änderungen am ursprünglichen Workflow .....	54
Abbildung 20	Ausschnitt aus dem Whole-Slide-Scan in Abbildung 14.....	55
Abbildung 21	Wahrscheinlichkeitsdichte-Distanz-Diagramm zu der Zellverteilung in Abbildung 9 .....	55
Abbildung 22	Interaktionsanalyse zwischen CD73 und CA9 in dem Ausschnitt aus Abbildung 9 .....	56
Abbildung 23	Anteil klassifizierter Zellen an der Gesamtheit der Zellen auf dem jeweiligen Präparat.....	59
Abbildung 24	Im Tumor lokalisierter Anteil markierter Zellen.....	60
Abbildung 25	Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen CD73 und CA9. ....	61
Abbildung 26	Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen ENT1 und CA9. ....	62
Abbildung 27	Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen ENT1 und CD73. ....	62
Abbildung 28	Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen FoxP3 und CA9. ....	63
Abbildung 29	Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen FoxP3 und Tumor.....	63
Abbildung 30	Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen FoxP3 und Stroma. ....	64
Abbildung 31	Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen FoxP3 und CA9 im Microarray. ....	65

Abbildung 32	Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen FoxP3 und Tumor im Microarray.....	66
Abbildung 33	Darstellung der Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen FoxP3 und Tumor, aufsteigend geordnet nach Zahl an CA9+ Zellen .....	67
Abbildung 34	Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen FoxP3 und Stroma im Microarray.....	68
Abbildung 35	Artefakte und Besonderheiten der Färbungen .....	70
Abbildung 36	Whole-Slide-Scan eines Larynxkarzinoms.....	72
Abbildung 37	Ablauf der Klassifikation der Zellen .....	77
Abbildung 38	Ausschnitt aus dem Whole-Slide-Scan des Pharynxkarzinoms in Abbildung 14 .....	78
Abbildung 39	Beispielhafte Anwendung einer Maske in der Interaktionsanalyse. ....	79
Abbildung 40	Ergebnisse der Interaktionsanalysen (Maske) .....	80
Abbildung 41	Ergebnisse der Interaktionsanalysen (Hierarchie). ....	81
Abbildung 42	Ausschnitt aus dem Whole-Slide-Scan des Larynxkarzinoms aus Abbildung 36 .....	84



### 3 Einleitung

Maligne Tumoren sind komplexe Gewebe, die in verschiedenen Kompartimenten eine Vielzahl von Zelltypen beherbergen. Zwischen diesen Kompartimenten findet eine Kommunikation über ein großes Spektrum von humoralen und zellulären Mechanismen statt. Während das Stroma unter anderem die für die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung des Tumors unabdingbaren Blutgefäße sowie eine Reihe weiterer Zelltypen enthält, ist das Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe durch interindividuell unterschiedlich stark entdifferenzierte Zellen und Zellverbände gekennzeichnet. Das Ausmaß dieser Entdifferenzierung wird in der klassischen Pathologie auf Grundlage visueller Engramme beurteilt. Hierbei sind viel Erfahrung, adäquates Training und die bemerkenswerte Fähigkeit des menschlichen visuellen Systems Voraussetzung für die Erkennung komplexer Muster und die Zuordnung zu Phänotypen, woraus sich prognostische oder therapeutische Schlussfolgerungen ergeben.

Seit mehreren Jahrzehnten bestehen Bestrebungen, Prozesse der Bildverarbeitung auf computergestützte Systeme zu übertragen. Diese zielen auf:

- i) eine größere Objektivität und Reproduzierbarkeit der Analyse,
- ii) die Gewinnung quantitativer Daten als Grundlage für Therapieentscheidungen sowie
- iii) die Charakterisierung räumlicher Verhältnisse unterschiedlicher Zellpopulationen zueinander, da von ihnen auf pathophysiologische Zusammenhänge rückgeschlossen werden kann.

Aufgrund der Komplexität dieser Fragestellungen, methodischer Hürden und der erforderlichen Rechenleistung der Computersysteme sind viele Ansätze zur Lösung der Probleme in der klinischen Routine für Jahrzehnte weitgehend unbeachtet geblieben. Diese Situation hat sich erst in den letzten Jahren geändert [1]. In der Laborchemie konnten Methoden entwickelt werden, um multiple Antigene mittels Fluoreszenzfärbung in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Tumorschnitten routinemäßig mit vertretbarem Aufwand nachzuweisen. Dies wurde erst durch eine erhebliche Signalamplifikation ermöglicht, da zuvor die Autofluoreszenz der Paraffinschnitte den sinnvollen Einsatz von Fluoreszenzfärbungen für diese

Anwendung verhindert hatte. Nun können multiple Eigenschaften der Zellen gleichzeitig in ein und demselben Tumorschnitt erfasst werden [2]. Zudem standen lange Zeit praktisch nur Methoden zur Bewertung von Ausschnitten von Tumoren zur Verfügung, sodass bereits die Wahl der „Regions of interest“ (ROI) einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis hatte. Dies änderte sich mit der Einführung von automatisierten Mikroskopen bzw. Gewebescannern, die die komplette Erfassung von Tumorschnitten nicht nur im Hellfeld, sondern auch in multiplen (3 bis 8) Fluoreszenzkanälen ermöglichen. Schließlich wurden Software-Algorithmen zur Bildsegmentierung und damit zur Analyse derartiger digitaler Präparate auf der Ebene der einzelnen Zelle verbessert bzw. zum Teil auf Basis jahrelanger Forschungsarbeiten neu entwickelt.

Nachdem initial lediglich eine Reihe von kommerziellen Softwarelösungen verfügbar war, steht seit 2017 das Open Source Projekt „QuPath“ zur Verfügung, das nach einer Phase rasanter Weiterentwicklung zu einem Standard für den Einsatz in der Forschung der digitalen Pathologie geworden ist. Punkt (i) und (ii) sind durch QuPath von einem lange unlösbaren Problem zur Routine transformiert worden, während die Möglichkeiten in Bezug auf (iii) nun erstmals in den Fokus wissenschaftlicher Arbeit rücken.

Die in Punkt iii) genannten räumlichen Interaktionen sind untrennbar mit dem intakten Zellverbund des Tumors verbunden. Der konventionelle Ansatz der Krebsforschung, pathophysiologische Zusammenhänge an isolierten Zellkulturen zu untersuchen, stößt diesbezüglich nicht nur an Grenzen, sondern kann sogar prinzipiell fehlerhafte Ergebnisse hervorbringen, da die Abläufe innerhalb von Tumoren nur im Kontext der multidirektionalen Interaktionen zwischen unterschiedlichen Zelltypen verstanden werden können. Die Methoden der räumlichen (= spatialen) Analyse sind auf anderen Gebieten der Wissenschaft bereits gut etabliert, die Komplexität der funktionellen Abläufe in Zellverbänden kann durch etablierte Co-Lokalisationsanalysen jedoch bislang nicht adäquat abgebildet werden. Auf dem Gebiet der Tumorforschung ist hier also noch wesentliche Pionierarbeit zu leisten.

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, eine Methodik zu etablieren, die es ermöglicht, dem bloßen Auge verborgene Zusammenhänge zwischen verschiedenen Strukturen und funktionellen Abläufen innerhalb des Tumors in Form von räumlichen Zusammenhängen aufzudecken und diese auf eine zuverlässige und reproduzierbare

Weise zu quantifizieren. Aus den räumlichen Interaktionen ließe sich dann vor dem Hintergrund klinischer Informationen auf biologische Mechanismen zurückschließen.

Um dies zu erreichen wurde hier in wissenschaftlicher Kooperation mit Softwareentwicklern vom Max-Planck-Institut in Dresden sowie des Medical Research Council, Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh, United Kingdom, eine Kombination aus zwei bisher separat verwendeten Open-Source-Programmen, QuPath und MosaicSuite, für die Interaktionsanalyse etabliert. Das Ergebnis dieser Arbeit ist die Integration von MosaicSuite als Funktionalität in QuPath und somit eine weiterentwickelte und an die speziellen Bedürfnisse der digitalen Pathologie angepasste Form der Interaktionsanalyse.

Durch Kombination der breiten Palette an Funktionen für die Gewebeanalyse von QuPath mit der räumlichen Interaktionsanalyse von MosaicSuite in einem Programm gelingt es, nicht nur Distanzen zwischen Zellen auszulesen und auszuwerten, wie es in herkömmlichen Co-Lokalisationsanalysen der Fall ist, sondern anhand von Potentialmodellen zufällige von nicht zufälligen Zellformationen zu unterscheiden, die Stärke der Interaktion zu quantifizieren, die Kraft zwischen den Zellen in Abhängigkeit von ihrem Abstand einzuschätzen, die Richtung der Interaktion zu bestimmen und letztendlich die gefundene Interaktion auf statistische Signifikanz zu überprüfen. Dies lässt erstmals differenziertere Aussagen zu Zell-Zell-Interaktionen zu. Mithilfe dieser Methodik wird die Bearbeitung einer Vielzahl histologischer Schnitte in kurzer Zeit möglich und es kann ein hohes Maß an belastbaren Informationen aus der räumlichen Verteilung beliebiger Biomarker gewonnen werden. Im Rahmen einer Proof-of-Concept-Analyse an einer Serie von Tumorpräparaten sowie einem Tissue-Microarray von Tumoren der Kopf-Hals-Region wurde die Funktionalität und Praktikabilität der Methodik geprüft. In zukünftigen Arbeiten wäre eine Zusammenführung von klinischen Daten und der spatialen Analyse erstrebenswert, um aus den Interaktionen auf zellulärer Ebene Erkenntnisse über biologische Zusammenhänge zu gewinnen, die relevant für Prognose und Therapie sind.

Grundlage der Interaktionsanalyse ist die Darstellung von Markern mithilfe der Technik der vierfach fluoreszenzmarkierten Färbung, die einen direkten Blick auf deren räumliche Anordnung im Tumor erlaubt. Es ist durch diese Technik möglich, mehrere krankheitsrelevante Marker in einem einzigen histologischen Schnitt ohne Artefakte, die durch virtuelles Übereinanderlegen mehrerer einzeln gefärbter Schnitte entstehen

können, zu beurteilen und somit echte Zell-Zell-Interaktionen zu betrachten. Die realen Zustände innerhalb der Tumoren können also im Gegensatz zu früheren Techniken simultan betrachtet werden.

Die vorliegende Arbeit wurde im Kontext der Thematik des Forschungsgebietes der Arbeitsgruppe , Klinik und Poliklinik für Radioonkologie und Strahlentherapie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, durchgeführt. Ziel der Gruppe ist die Etablierung eines Arsenalns von Methoden zur Beschreibung spatialer Phänomene in Tumoren.

## 4 Literaturdiskussion

### 4.1 Notwendigkeit von Interaktionsanalysen

Aus der räumlichen Verteilung von Markern und Zellen im Gewebe lassen sich Rückschlüsse auf funktionelle Zusammenhänge ziehen. Dabei ist eine rein visuelle Beurteilung von Verteilungsmustern unzuverlässig und nicht ausreichend reproduzierbar. Das folgende Beispiel entstammt einer Arbeit von William Feller, einem kroatisch-amerikanischen Mathematiker und Wahrscheinlichkeitstheoretiker, der eine bemerkenswerte Beobachtung machte: Im zweiten Weltkrieg wurde London von Luftangriffen verwüstet. Die Aufzeichnung der Einschlagspunkte auf einer Karte ließen deutlich Bereiche mit hoher Dichte an Einschlägen, demgegenüber jedoch auch unversehrte Gebiete erkennen. Dies führte zu dem Schluss, dass die Angriffe nach einem bestimmten Muster erfolgten. Der bombardierte Bereich wurde durch ein Raster in 576 Felder von jeweils einem Viertel Quadratkilometer aufgeteilt und es erfolgte eine Auszählung der Einschläge pro Gitterfeld. Feller konnte zeigen, dass die Einschläge, entgegen vorheriger Annahmen, zufällig erfolgt waren und sich die Zahl der Einschläge pro Flächenabschnitt mit erstaunlicher Genauigkeit durch eine Poisson-Verteilung annähern ließ. Feller führt diesen Fall als Beispiel für eine "räumliche Verteilung zufälliger Punkte" an und kommentiert: „We have here an instructive illustration of the established fact that to the untrained eye randomness appears as regularity or tendency to cluster“ [3]. Die menschliche Betrachtung scheint dazu zu neigen, Ordnungen in Systeme hineinzuzinterpretieren, die zufällig entstanden sind.

Abbildung 1 zeigt zwei zufällige Punktverteilungen (a und b), die übereinandergelegt wurden (c). Der von W. Feller beschriebene Effekt ist nicht nur in Verteilungen von Punkten einer Population, sondern auch von mehreren Populationen zu beobachten. In rot sind Bereiche markiert, die keinen einzigen Punkt enthalten, während teilweise direkt daneben Bereiche in grün hervorgehoben zu sehen sind, die 10 oder mehr Punkte aufweisen. Es handelt sich hier jedoch um zwei zufällige Verteilungen von Punkten und die Punkte der beiden Populationen gruppieren sich weder in sich noch untereinander, wie durch computergestützte Analysen bestätigt wird.

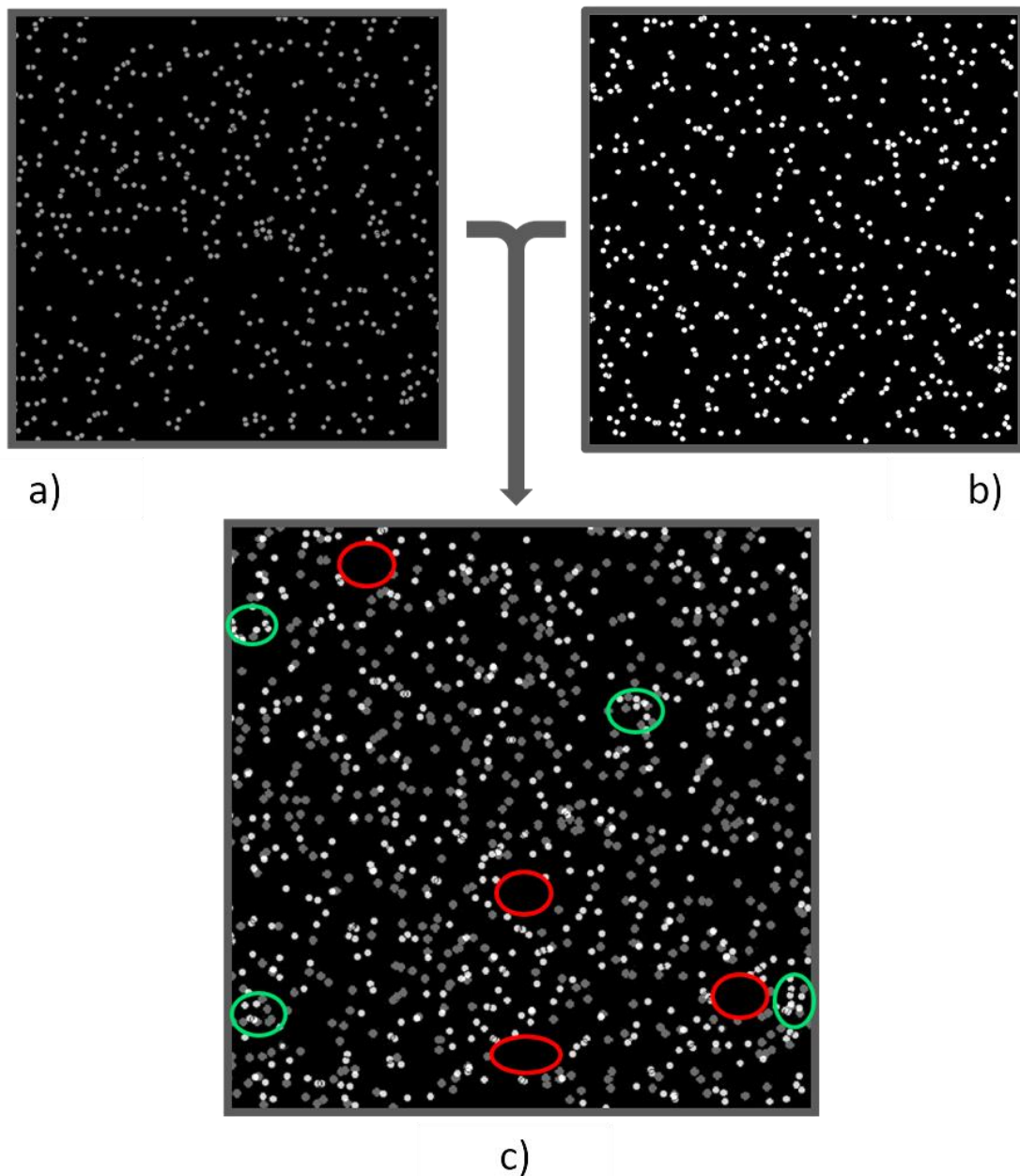
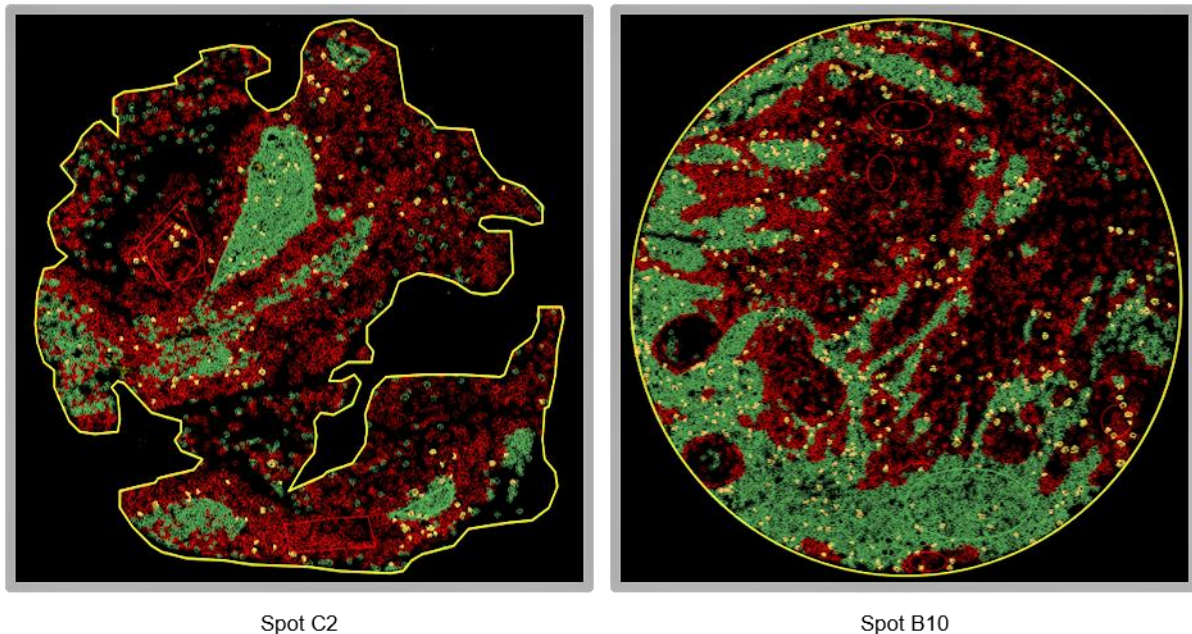


Abbildung 1 Darstellung von zwei zufälligen Punktverteilungen (dunkelgrau in a und hellgrau in b, in „R“ erstellt), die digital registriert wurden (c). Exemplarisch sind Punkthäufungen in grün markiert und Bereiche, die frei von Punkten sind, sind rot markiert.

Bei der Untersuchung von spatialen Verteilungen sollten wir uns also reproduzierbarer Methoden bedienen, da die Fähigkeit des Menschen, solche Verteilungen valide zu beurteilen, nicht ausreichend ist.

In Spot C2 des Microarray (Abbildung 2 links) ist die Infiltration der FoxP3+ Zellen (gelb) aus dem Stromagewebe (grün) in das Tumorgewebe (dunkelrot) relativ deutlich. In Spot B10 (Abbildung 2 rechts) sehen wir hingegen eine Tendenz der FoxP3+ Zellen,

die Tumorzellen zu meiden. Wiederum ist hier scheinbar keine weitere Untersuchung notwendig, um zu erkennen, wie sich die FoxP3+ Zellen zum Tumor verhalten.



*Abbildung 2 Spots aus dem Tissue-Microarray, der in der Proof-of-Concept-Analyse eingesetzt wurde. Tumor in dunkelrotem Overlay, Stroma in grünem Overlay, FoxP3 in gelbem Overlay; links Spot C2 mit positiver Interaktion zwischen FoxP3 und Tumor, rechts Spot B10 mit negativer Interaktion zwischen FoxP3 und Tumor (Daten nicht gezeigt).*

Zellverteilungen und Morphologie sind allerdings nicht immer eindeutig und verschiedene Arbeiten zeigen eine deutliche inter- und intraindividuelle Variabilität in den Ergebnissen visueller Untersuchungen von histologischen Gewebeschnitten [4], die auf grundlegenden Urteilsfehlern des Menschen beruhen [5-7]. Uneindeutige Definitionen der Morphologie können zusätzlich zu Abweichungen der Ergebnisse bei verschiedenen Untersuchenden führen [8].

Die drei in Abbildung 3 gezeigten Beispiele verdeutlichen die Überlegenheit einer computergestützten Co-Lokalisationsanalyse. Sie weist eine signifikante Interaktion in einem der drei gezeigten Spots nach, die der visuellen Beurteilung entgeht.



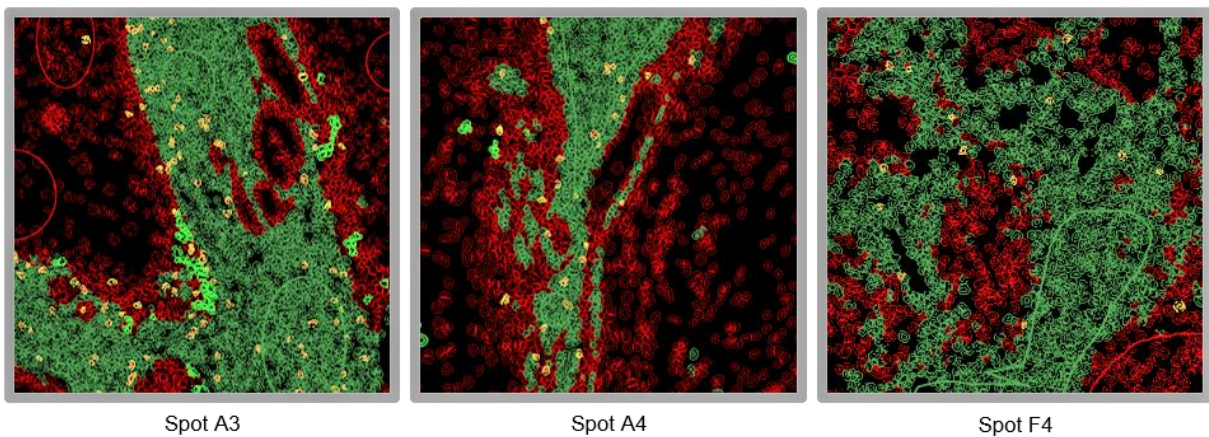


Abbildung 3 Ausschnitte aus Spot A3, A4 und F4 des Microarrays, der im Proof-of-Concept eingesetzt wurde. Gezeigt sind FoxP3 (gelb), CA9 (hellgrün), Tumor (dunkelrot) und Stroma (dunkelgrün). In Spot A4 zeigt sich eine signifikante Interaktion zwischen FoxP3 und Tumor.

Einige Arbeiten, die klinische Aussagen über die Bedeutung von Zellen in Geweben machen, stützen ihre Aussagen lediglich auf eine Beschreibung des Erscheinungsbildes, das sich durch manuelle Auszählung in den Gewebeschnitten ergibt [9-11]. Dabei verzichtet man auf einen großen Anteil der Informationen, die aus der Verteilung der Punkte gewonnen werden können und es ist somit naheliegend, dass eine (computergestützte) spatiale Analyse eine dieser Methode überlegene Technik ist.

## 4.2 Spatiale Interaktionsanalyse

### 4.2.1 Interaktionsanalyse - Bisherige Methoden und neue technische Möglichkeiten

Spatiale Interaktionen sind seit einiger Zeit Gegenstand von Untersuchungen in verschiedensten wissenschaftlichen Bereichen, vor allem in der Biologie, Epidemiologie und Soziologie, aber auch in der Forstwirtschaft und in der Medizin [12, 13]. Von der genauen Kenntnis über die Lage von Untersuchungsobjekten zueinander verspricht man sich tiefere Einsichten in die Mechanismen der jeweiligen Systeme. So werden die Anordnung von Sternen in Kugelsternhaufen, die Positionen von Bäumen in Wäldern, die Lebensräume von Tieren in der Umwelt, oder die Lage von Proteinen innerhalb des Zellkerns untersucht. Für diese Analysen bedient man sich immer komplexerer Werkzeuge, deren Leistungsfähigkeit wir den Fortschritten in der Computertechnik und der Datenverarbeitung sowie ausgereifterer Softwaretechnik verdanken.



Auch in medizinischem Kontext wurden vergleichbare Technologien bereits eingesetzt, anfänglich in erster Linie in der Epidemiologie, die sich mit der Erforschung von Krankheitsverteilungen in bestimmten Arealen beschäftigt, jedoch auch bei Untersuchungen von Zielstrukturen einzelner Zellen und deren Organellen in der Biologie, Molekularbiologie und in der medizinischen Grundlagenforschung [14, 15]. Die Problemstellungen, die sich in diesem Bereich ergeben, haben aufgrund der hohen Zahl von Einzelobjekten und der Bedeutung ihrer Verteilung im untersuchten Bereich Ähnlichkeit mit den Untersuchungen, die in der vorliegenden Arbeit an Tumorpräparaten durchgeführt wurden.

Moderne Zellerkennungssoftware ist in der Lage, sowohl Intensität der Färbung in verschiedenen Farbspektren, als auch Form und Größe der Zellen sowie Informationen aus Machine-Learning-Prozessen in die Klassifikation von allen Zellen auf einem Scan einfließen zu lassen. Dies eröffnet bislang unerreichte Möglichkeiten und Geschwindigkeiten in der Verarbeitung von Schnittpräparaten. Tumor- und Stroma-Klassifikation werden zum Beispiel innerhalb kurzer Zeit zuverlässig umgesetzt und ermöglichen die getrennte Betrachtung der einzelnen Kompartimente.

Die Interaktionsanalyse kann allerdings nur so viel Information aus den Präparaten extrahieren, wie es die Modelle erlauben, auf denen die Analyse basiert. Ein Kritikpunkt der Co-Lokalisationsanalyse ist, dass sie keine Ursachen der Co-Lokalisation erkennen, sondern nur Verteilungen beschreiben können. Räumliche Interaktion ist also keinesfalls automatisch mit Kausalität gleichzusetzen. Auch die Interaktionsanalyse ist Confoundern ausgesetzt und kann durch einige Faktoren in ihrem Ablauf beeinflusst werden.

#### *4.2.2 Begriffe der Analyse räumlicher Verteilungen*

Co-Lokalisation ist ein Begriff, der für das wissenschaftliche Feld der Untersuchung spatialer Verteilungen lange namensgebend war. Mit Co-Lokalisation ist zunächst nur die Position zweier Merkmale an derselben Stelle gemeint. Man verspricht sich von der Feststellung räumlicher Übereinstimmung Rückschlüsse auf funktionelle Zusammenhänge der untersuchten Objekte. Mit fortschreitenden Möglichkeiten in der Co-Lokalisationsanalyse wurde der Begriff für unterschiedliche Zusammenhänge verwendet und somit auch auf abstoßende Interaktionen erweitert. Diese werden zum Beispiel im Gegensatz zur „Co-Co-Lokalisation“ „Anti-Co-Lokalisation“ genannt [16].

In der Epidemiologie wird bei Kenntnis eines Krankheitsherdes nach Ursachen und Verbreitung im Umfeld dieses Herdes gesucht. Entsprechend war ein zentraler Bestandteil der Methodik lange Zeit die Erkennung sogenannter Cluster [13]. Im Gegensatz hierzu wird eine Verteilung mit überzufällig großen Abständen als Regularity bezeichnet [17], was einem abstoßenden Verhalten der Untersuchungsobjekte zueinander gleichkommt.

Zwei Begriffe beziehen sich auf die Art der übergeordneten Herangehensweisen, um Co-Lokalisation nachzuweisen. Ein Ansatz geht von der Signalstärke der Pixel aus, die sogenannten „Intensity correlation coefficient-based analyses (ICCB)“. Die Untersuchung an Pixeln ist weniger komplex, also mit geringerem Rechenaufwand verbunden und wird daher schon lange Zeit angewendet. Der neuere, auf der Erkennung von Objekten beruhende Ansatz, nennt sich „Coordinate based colocalisation analyses (CBC)“. Er ist technisch aufwendiger, erfordert komplexere Software und ist mit größerem Rechenaufwand verbunden. Die Informationen, die mit dieser Technik gewonnen werden können, sind allerdings auch wesentlich aussagekräftiger. Wichtige Vertreter etablierter Techniken beider Ansätze zur Erkennung von Co-Lokalisation werden in den beiden folgenden Abschnitten näher erläutert.

#### *4.2.2.1 Intensity correlation coefficient-based analyses (ICCB)*

Der theoretische Hintergrund der ICCB reicht zum Teil über 120 Jahre zurück. Viele der heute angewandten Methoden, sowohl der ICCB als auch der objektbasierten Co-Lokalisationsanalyse, greifen zum Teil auf diese Grundlagen zurück [18]. Innerhalb der signalstärkebasierten Techniken haben sich verschiedene Ansätze zur Co-Lokalisationsanalyse etabliert, nämlich die Untersuchung von Korrelation und Co-Occurance sowie Koeffizienten, die Anteile beider Ansätze beinhalten.

Korrelationstechniken basieren auf folgendem prinzipiellen Vorgehen: Für jedes Pixel eines digital erfassten Präparates werden die Signalstärken der zu untersuchenden Marker erfasst. Die Signalstärke für einen Marker wird in jedem Pixel mit der Signalstärke des anderen Markers abgeglichen und korreliert. Bei Korrelationsverfahren kommen beispielsweise Pearson's correlation coefficient [15, 19-22], Spearman's rank correlation coefficient [19] oder R-Koeffizient [23] zur Anwendung.

Zum Nachweis von Co-Occurance verwendet man beispielsweise die Overlap-Methode, bei der für jedes Pixel die Signalstärke der beiden Kanäle abgeglichen wird. Bei Intensitäten beider Kanäle über einem bestimmten Threshold, der das Hintergrundrauschen aus der Untersuchung ausklammert, ist eine Co-Occurance anzunehmen [19].

Koeffizienten, die sowohl die Signalintensität als auch den Overlap berücksichtigen, sind beispielsweise der Manders Overlap-Coefficient [21, 22, 24] oder der „H Koeffizient“ nach Herce (Hcoeff) [23, 25]. Eine aktuellere Methode, die „maximum entropy cupola“, verbindet die „maximum entropy method“ mit der Gaußschen Glockenkurve und hat besondere Stärken in der Auswertung der Korrelation zweier Kanäle auch bei hohem Bildrauschen [16].

Vor- und Nachteile der jeweiligen Techniken sowie weitere Methoden sind in [4, 7, 19-21, 23, 25-27] detailliert dargelegt.

Die Einordnung der Ergebnisse als signifikant oder nicht-signifikant ist für jede Co-Lokalisationsanalyse von zentraler Bedeutung. Eine zuverlässige Methode ist notwendig, um die Belastbarkeit der gewonnenen Informationen zu prüfen. Eine etablierte Variante eines solchen Tests ist, die Untersuchung auf Co-Lokalisation mit einem Bild gleicher Grundvoraussetzungen, aber zufälliger Objektverteilung zu wiederholen und die Ergebnisse zu vergleichen. Dies wird zum Beispiel ermöglicht, indem die Signalintensitäten des einen Kanals in einem Bildausschnitt mit den Intensitäten des anderen Kanals auf einem benachbarten oder zufällig gewählten Teil des Bildes abgeglichen werden [4, 26]. Die Signalintensitäten haben dadurch keinen Bezug mehr zueinander und so stellt das Ergebnis einer aus dieser Vorgehensweise resultierenden Analyse einen guten Referenzwert für eine zufällige Verteilung dar.

Der Abgleich von Signalintensitäten bringt einige Limitationen mit sich. Co-Lokalisationen können nur an einzelnen Punkten festgestellt werden. Aus der räumlichen Verteilung der untersuchten Objekte können keine Informationen gewonnen werden, wenn sich keine Überschneidungen zwischen den Objekten finden, wodurch ein großer Teil der enthaltenen Information verloren geht. Zudem können diese Techniken nicht zwischen Artefakten und tatsächlichen Untersuchungsobjekten unterscheiden.

#### 4.2.2.2 *Objektbasierte Verfahren / Coordinate based colocalisation analyses (CBC)*

Aktuellere Programme in der Bildanalyse weisen die geschilderten Nachteile der ICCB nicht auf und eröffnen die Möglichkeit, große Zahlen von Zellen oder Objekten schnell und zuverlässig zu segmentieren und einer Auswertung mittels koordinaten- und objektbasierter Programme zugänglich zu machen [28]. Diese Techniken können durch die Auswertung der Positionen der Objekte zueinander tiefergehende Informationen über die Zusammenhänge gewinnen.

Um Punktverteilungen auf Cluster und Interaktionen zu untersuchen, existieren ebenfalls verschiedene Ansätze, die in erster Linie der Single-Molecule-Localization-Microscopy entstammen. Bei den meisten dieser Techniken ist ein Test der Ergebnisse auf Signifikanz möglich, der meist durch den Vergleich mit einer zufälligen Verteilung erfolgt.

Analog zur ICCB ist die oben aufgeführte Overlap-Methode zur Co-Lokalisationsanalyse auch in der objektbasierten Co-Lokalisationsanalyse möglich. Hierbei wird aus der Fläche eines Objektes der einen Klasse der Massenschwerpunkt bestimmt und ermittelt, ob sich dieser im Bereich eines Objektes der anderen Klasse befindet. Ist dies der Fall, so wird dies als Overlap bezeichnet [4]. Die Overlap-Technik ist nur in geringem Maße von Voreinstellungen abhängig, die Einfluss auf das Ergebnis der Messung nehmen können und erfasst einen Großteil der gefärbten Signale. Darunter sind jedoch auch Färbeartefakte und Hintergrundrauschen. Außerdem sind Färbungen verschiedener Marker in ihrer Intensität oft unterschiedlich, sodass man für die verschiedenen Kanäle unterschiedliche Thresholds anlegen muss, um einen sinnvollen Abgleich zu ermöglichen. Es können nur Co-Lokalisationen erkannt werden, bei denen sich die Strukturen auch tatsächlich in einem entsprechenden Maße überlappen, abstoßendes Verhalten ist also nicht darstellbar.

Durch die Methodik des Density-based-Clustering werden Cluster in Punktverteilungen ermittelt. Hierbei wird eine Zahl an Punkten und ein Radius, in dem die Punkte zu finden sein müssen, festgelegt. Punktverbände, die sich näher beieinander als dieser Radius befinden und die die Mindestzahl an benachbarten Punkten erfüllen, gelten als Cluster [29].

Die Tessellation (engl.: Mosaik) bildet anhand der Abstände der Punkte Netze um sie herum, sodass Gesamtbilder entstehen, die den Kacheln eines Mosaiks ähneln. Mit derartigen Aufteilungen wird in der Computergrafik gearbeitet, weshalb für solche

„Meshes“ bereits hochentwickelte Software existiert, die auch eine Erkennung von Clustern ermöglicht [30]. Zwei wichtige Techniken zur Erstellung des Mesh sind die Delaunay-Triangulierung [30, 31] sowie die Voronoi-Tessellation [18, 30, 32]. Durch Einfärbung der Kacheln mit einer Signalintensität, die antiproportional zur Fläche der Kachel ist, lassen sich die Cluster anschaulich darstellen. Zwei Beispiele für Interaktionsanalyse-Software auf Basis dieser Methode sind ClusterViSu [32] und Coloc Tesseler (CT) [18].

Ripleys K-Funktion beschreibt die Menge an gefundenen Interaktionspartnern in verschiedenen Entfernungsabschnitten. Eine übermäßig hohe Zahl an Interaktionspartnern in einer bestimmten Entfernung entspricht einem Cluster, eine niedrige Zahl an Interaktionspartnern beschreibt eine abstoßende Interaktion bzw. eine Regularity [33, 34]. Es handelt sich also um eine Beschreibung der beobachteten Wahrscheinlichkeitsdichten, die durch Signifikanzniveaus gesichert werden kann.

Die G-Cross-Funktion drückt die Verteilung von zwei Punktgruppen zueinander aus. Sie errechnet die Wahrscheinlichkeitsdichte für jede Entfernung von einem Punkt der Gruppe 1, dort mindestens einen Punkt der Gruppe 2 anzutreffen. Grundlage der Berechnung ist hierbei die Dichte der untersuchten Punkte [35].

Die „Nearest-Neighbor-Technik“ ermittelt den Abstand jedes Punktes zu seinem nächsten Nachbarn [36]. Eine Interaktion wird angenommen, wenn die Distanz unter einem bestimmten Grenzwert liegt [4]. Da diese Technik nicht auf eine räumliche Überschneidung der Objekte angewiesen ist, erweitert sich die Vielfalt der zu untersuchenden Interaktionsmuster deutlich. Die Nearest-Neighbor-Analyse hat zudem den Vorteil, dass durch vorherige Segmentierung, also Bestimmung der zu untersuchenden Bereiche, Artefakte von der Analyse ausgeschlossen werden können. Allerdings ist auch diese Technik nicht völlig frei von Artefakten und die vorherige Selektion der zu untersuchenden Strukturen hat unweigerlich einen Informationsverlust in den ausgeschlossenen Signalen zur Folge.

Die in dieser Arbeit etablierte Interaktionsanalyse basiert ebenfalls auf dem Nearest-Neighbor-Prinzip. Dabei bedient sich MosaicIA des Paar-Potentials zur Beschreibung der Interaktionen einzelner Objekte. Die Entfernung zwischen zwei Punkten ist, vereinfacht gesagt, eine Funktion ihres Paar-Potentials [14, 37]. Auch diese Methode hat den Vorteil, dass die interagierenden Objekte nicht überlappen müssen, um eine Co-Lokalisation nachzuweisen [14].

### 4.2.3 Software zur Bildverarbeitung

Seit den 1960er Jahren werden Computersysteme zur Auswertung von Bildmaterial in den Biowissenschaften angewandt [38]. Die ständigen Verbesserungen der Bildaufnahmetechnik verlangten schnellere und funktionellere Software zur Verarbeitung und Speicherung von immer größeren Datenmengen. Gleichzeitig wurden die Fragestellungen, die mit der Software beantwortet werden sollten, immer komplexer und spezifischer. Hersteller von optischen Systemen stellen heutzutage Software zur Verfügung, welche oft an die jeweilige Hardware des Herstellers gebunden ist. Beispiele für solche Programme sind ZEN (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) oder Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA). Andere Unternehmen stellen lediglich die Software zur Bildverarbeitung bereit, zum Beispiel IMACEL (LPIXEL Inc., Otemachi, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan) und bieten durch die Verwendung von Daten-Clouds weit höhere Rechenleistungen, als sie an Computern in den meisten Labors bislang zur Verfügung steht [39]. Im Gegensatz zu den kommerziellen Programmen erlauben es verschiedene Open-Source-Programme den Forschungsgruppen, die Software den speziellen Anforderungen entsprechend anzupassen, sodass sich diese Programme kontinuierlich weiterentwickeln. So kann beispielsweise ImageJ als eines der am weitesten verbreiteten Analyseprogramme auf eine über 30-jährige Geschichte in der Bildverarbeitung zurückblicken, in der ein großes Spektrum an zusätzlichen Funktionen entwickelt wurde [40, 41]. Verschiedene alternative Open-Source-Programme existieren mit jeweils etwas unterschiedlichen Schwerpunkten in der Zielgruppe und Funktionalität. Einige weitere wichtige Vertreter von Open-Source-Bildverarbeitungsprogrammen sind CellProfiler [42] oder BioImageXD [43].

#### 4.2.3.1 QuPath

QuPath ist eine solche Open-Source-Software, die von [Paul Bankhead](#), initial am Northern Ireland Molecular Pathology Laboratory, Centre for Cancer Research and Cell Biology, Queen's University Belfast, aktuell am Medical Research Council, Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh, United Kingdom, unter anderem für die Auswertung von fluoreszenzmarkierten Whole-Slide-Scans entwickelt wurde [44]. QuPath ermöglicht das Einlesen, die Einstellung der Kanalintensitäten, die Zellerkennung sowie die Klassifikation der einzelnen Zelltypen und viele weitere Funktionen. Die erhaltenen Daten können exportiert und in anderen

Analyseprogrammen weiterverarbeitet werden. Die enthaltene Skriptfunktion ermöglicht es, die Funktionalität des Programms verhältnismäßig leicht zu erweitern.

QuPath erlaubt es, in den Präparaten Tumorzellen von Stromazellen mittels Machine-Learning-Algorithmen zu unterscheiden [44]. So können nicht nur die Marker zueinander ins Verhältnis gesetzt werden, sondern auch die Marker zu dem Kompartiment, in dem sie exprimiert sind.

Die Klassifikationsfunktion bedient sich, je nach Einstellung, aller verfügbaren Parameter, die bei der Zellerkennung gewonnen werden und wird durch Einteilung bestimmter Bereiche in Subklassen wie beispielsweise „Tumor“ oder „Stroma“ trainiert. Diese Lernbeispiele einbeziehend erstellt das Programm selbstständig einen „Classifier“ und schlägt eine Unterteilung in Tumor und Stroma vor. Diese kann, wenn gewünscht, durch Ergänzung zusätzlicher definierter Bereiche optimiert werden.

#### *4.2.4 Software für spezifische Interaktionsanalysen*

Innerhalb der Software zur Bildanalyse wurden verschiedene Programme zur Co-Lokalisationsanalyse erstellt. Jedes dieser Programme bedient sich anderer Methoden und hat verschiedene Stärken in der Analyse von Co-Lokalisationen. Auch das Untersuchungsmaterial, für das die Programme geeignet sind, unterscheidet sich.

Eine mögliche Methode zur Interaktionsanalyse aus der Arbeitsgruppe stellt spatstat (spatial point pattern analysis) dar, ein Software-Paket auf Basis der Statistik-Plattform R. Spatstat wird vor allem in den Geowissenschaften verwendet. Das Softwarepaket befasst sich in erster Linie mit Punktverteilungen im zweidimensionalen Raum und ist für die hier genannte Problemstellung geeignet, da durch sehr detaillierte Einstellungsmöglichkeiten die Analyse von Zellverbänden möglich wird. Die Funktionen und Darstellungsmöglichkeiten in spatstat sind vielfältiger als beispielsweise in MosaicIA, die Bedienung ist allerdings deutlich komplexer. Einige Softwarepakete auf Basis von R sind in der Analyse einzelner Zellen bereits verwendet worden [40, 45].

Beispiele für verschiedene weitere Programme der Co-Lokalisationsanalyse sind ColocalizR [46], Clus-DoC [47], ClusterViSu [32], Coloc Tesseler (CT) [18], COLA [48], SubcellularDistribution pipeline [49] oder SACA [50].

#### 4.2.4.1 Fiji ImageJ MosaicIA

Fiji (Fiji is just ImageJ) ist ein Software-Paket, welches die Funktionen und Plugins der weit verbreiteten Bildverarbeitungssoftware ImageJ zusammenführt [40] und ist selbst ebenfalls in der Lage, Gewebeschnitte auszuwerten [51]. In dieser Arbeit wurde das Open-Source Fiji Plugin MosaicSuite und die hierin enthaltene Interaktionsanalyse MosaicIA verwendet, die von der MOSAIC Group des Max-Planck-Instituts für molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden für die Detektion und Quantifizierung von spatialen Interaktionen entwickelt wurde. Der Begriff der Interaktion trägt der Tatsache Rechnung, dass Ziel der Untersuchung im Gegensatz zu bisherigen Analysemethoden nicht nur die Erkennung von Co-Lokalisationen ist, sondern dass in diesem Ansatz mittels physikalischer Modelle anziehende und abstoßende Kräfte modelliert und somit Interaktionen im physikalischen Sinne zugrunde gelegt werden [28].

Ursprünglich wurde MosaicIA für die Analyse von spatialen Interaktionen im Zellkern entwickelt und entstammt der Bioinformatik. Der theoretische Hintergrund der Interaktionsanalyse enthält jedoch keine Beschränkung auf diesen Anwendungsbereich, sodass die Methodik ohne Weiteres an ganzen Zellverbänden angewendet werden kann. Hierfür können entweder Bilddateien oder zwei- und dreidimensionale Datensätze verwendet werden [52]. Die einzelnen Zellen werden als punktförmige Objekte betrachtet und auf Paar-Interaktionen überprüft [52]. Darüber hinaus beinhaltet das Programm eine Signifikanztestung, mittels derer sich die Signifikanz der quantifizierten Interaktionen testen lässt [52]. Im Folgenden sind einige Begriffe erklärt, die für das Verständnis der Interaktionsanalyse grundlegend sind.

##### 4.2.4.1.1 Potential und Strength

Um die Interaktionen zwischen Punktgruppen zu analysieren, bedient sich MosaicIA eines physikalischen Modells [28]. Hierbei werden die Distanzen zwischen den nächsten Nachbarn der Objekte der zu beobachtenden Verteilung den Distanzen in einer zufälligen Verteilung gegenübergestellt. Diese Distanzverteilung wird parametrisiert und der beobachteten Distanzverteilung angenähert. Der Unterschied zwischen den gemessenen und den zufälligen Distanzen ist Grundlage der abschließenden Signifikanztestung. Details dieses Ablaufs werden im Folgenden dargelegt. Von zentraler Bedeutung bei der Parametrisierung und Annäherung der zufälligen Distanzverteilung in der spatialen Analyse mit MosaicIA ist die Erstellung



der sogenannten Potentialkurve. Das Potential ordnet allen Abständen zwischen Zellen einer Population und ihren jeweiligen nächsten Nachbarn einer anderen Population diskrete Energieniveaus zu [52]. Die gesamte Interaktion wird also anhand eines Spektrums von Energieniveaus charakterisiert. Häufig auftretende Distanzen entsprechen energetisch günstigen Potentialniveaus.

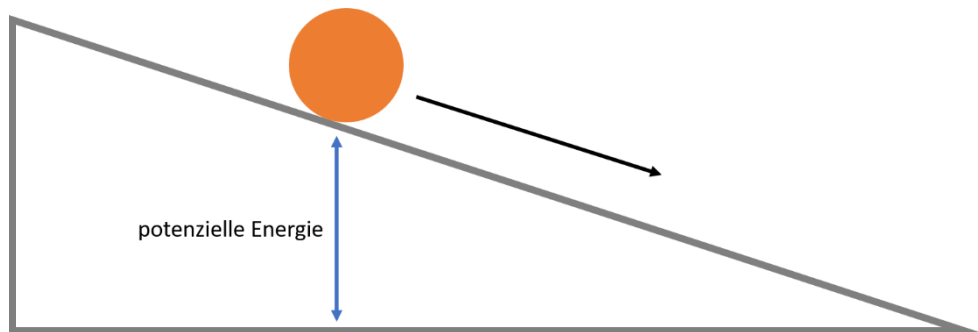


Abbildung 4 Kugel auf einer schiefen Ebene.

Stark vereinfacht kann die Potentialkurve mit einer schiefen Ebene aus der klassischen Mechanik verglichen werden. Eine Kugel auf dieser Ebene besitzt eine bestimmte potenzielle Energie, die proportional zur Höhe auf der schiefen Ebene ist. Je weiter oben, desto höher die Energie. Die Kugel strebt einen Zustand geringerer potenzieller Energie an und rollt nach unten. Das untere Ende der schiefen Ebene stellt also einen Zustand geringerer potenzieller Energie dar als das obere. Die Richtung, in die sich die Kugel bewegt, wird von der schiefen Ebene bestimmt, in diesem Fall ist die Ebene nach rechts geneigt, wodurch die Kugel nach rechts unten rollt. Die Potentialkurve, die in MosaicIA zur Anwendung kommt, weist einige Parallelen zu diesem Modell auf. Jeder Punkt auf der Potentialkurve stellt wie jeder Punkt auf der schiefen Ebene ein bestimmtes Energieniveau dar. Das Vorzeichen der Steigung der Potentialkurve bestimmt, ebenso wie bei der schiefen Ebene, in welche Richtung Objekte in dieser Distanz streben - aufeinander zu (positive Steigung der Potentialkurve) oder voneinander weg (negative Steigung, analog zur dargestellten schiefen Ebene in Abbildung 4). Die Steigung der Kurve bestimmt wie auch bei der schiefen Ebene zudem die Kraft, die auf die Objekte wirkt. Je steiler die Kurve, desto größer die Kraft, die die Objekte erfahren. Die Steigung einer Funktion wird durch ihre erste Ableitung ausgedrückt. Daher gibt die erste Ableitung der Potentialkurve die Kraft an, die zwischen Objekten in der jeweiligen Distanz wirkt. Bei einer gekrümmten Potentialkurve ändert sich also auch diese Kraft in Abhängigkeit von der Distanz.

Die Form des Ausgangspotentials kann vor der Analyse gewählt werden. In Abbildung 5 ist durch die dunkelblaue Kurve die Ausgangsform des in dieser Arbeit verwendeten Plummer-Potentials schematisch dargestellt, das für die Beschreibung der Distanzverteilung zwischen Sternen innerhalb von Kugelsternhaufen verwendet wurde [53]. Ein Modell aus der Astronomie, das Gravitationseffekte in kosmischem Maßstab beschreibt, erscheint zunächst weit entfernt von biomedizinischen Anwendungen, doch die Beschreibung der Objektverteilungen basiert in beiden Fällen auf dem gleichen Grundprinzip. Die Potentialkurve dient der Beschreibung der Kräfte, die in einer Menge zunächst chaotisch verteilter Objekte eine bestimmte Distanzverteilung hervorrufen. In der hier gezeigten Ausgangsform der Plummer-Potentialkurve liegt der Punkt mit dem niedrigsten Potential, also dem geringsten Energieniveau, bei einer Distanz von Null (blaue Kurve in Abbildung 5). Stellt man sich analog zum Modell der schiefen Ebene eine Kugel vor, die von einem beliebigen Punkt auf der blauen Potentialkurve in Abbildung 5 nach unten rollt, wird sie immer am tiefsten Punkt der Kurve landen, also hier bei  $X = 0$ . Eine Punktverteilung, die durch dieses Potential beschrieben wird, zeichnet sich folglich durch geringe Abstände zwischen den Punkten aus, da die Potentialkurve den Zustand geringster Energie als minimalen Abstand zum nächsten Nachbarn beschreibt [28].

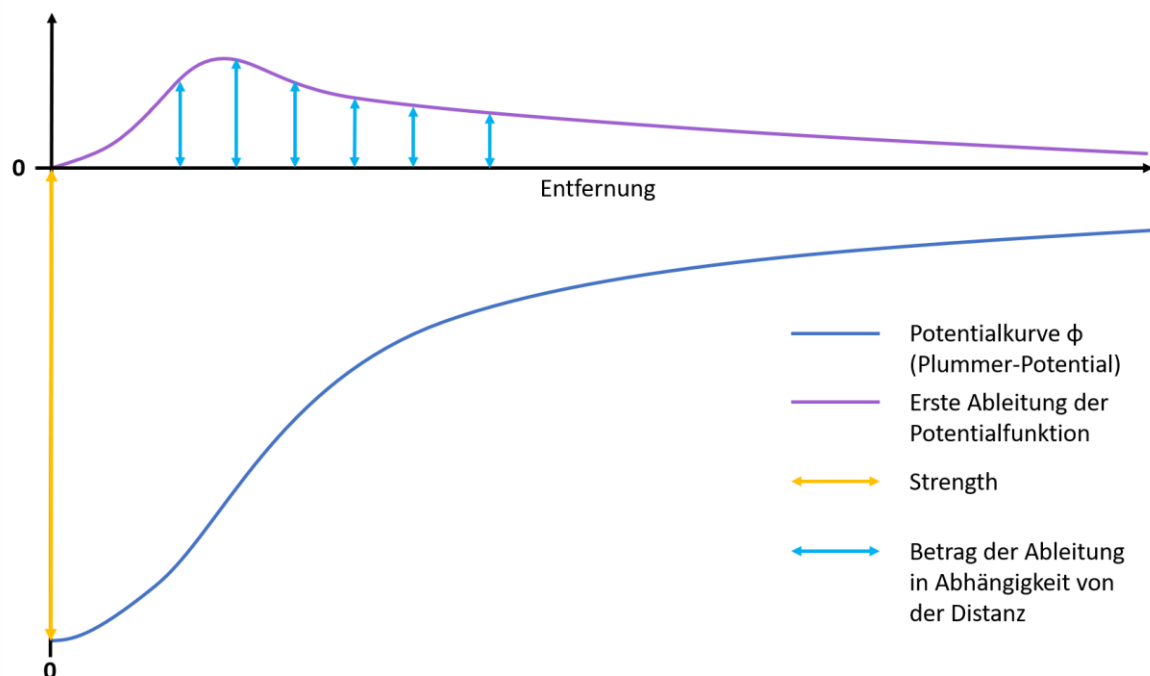
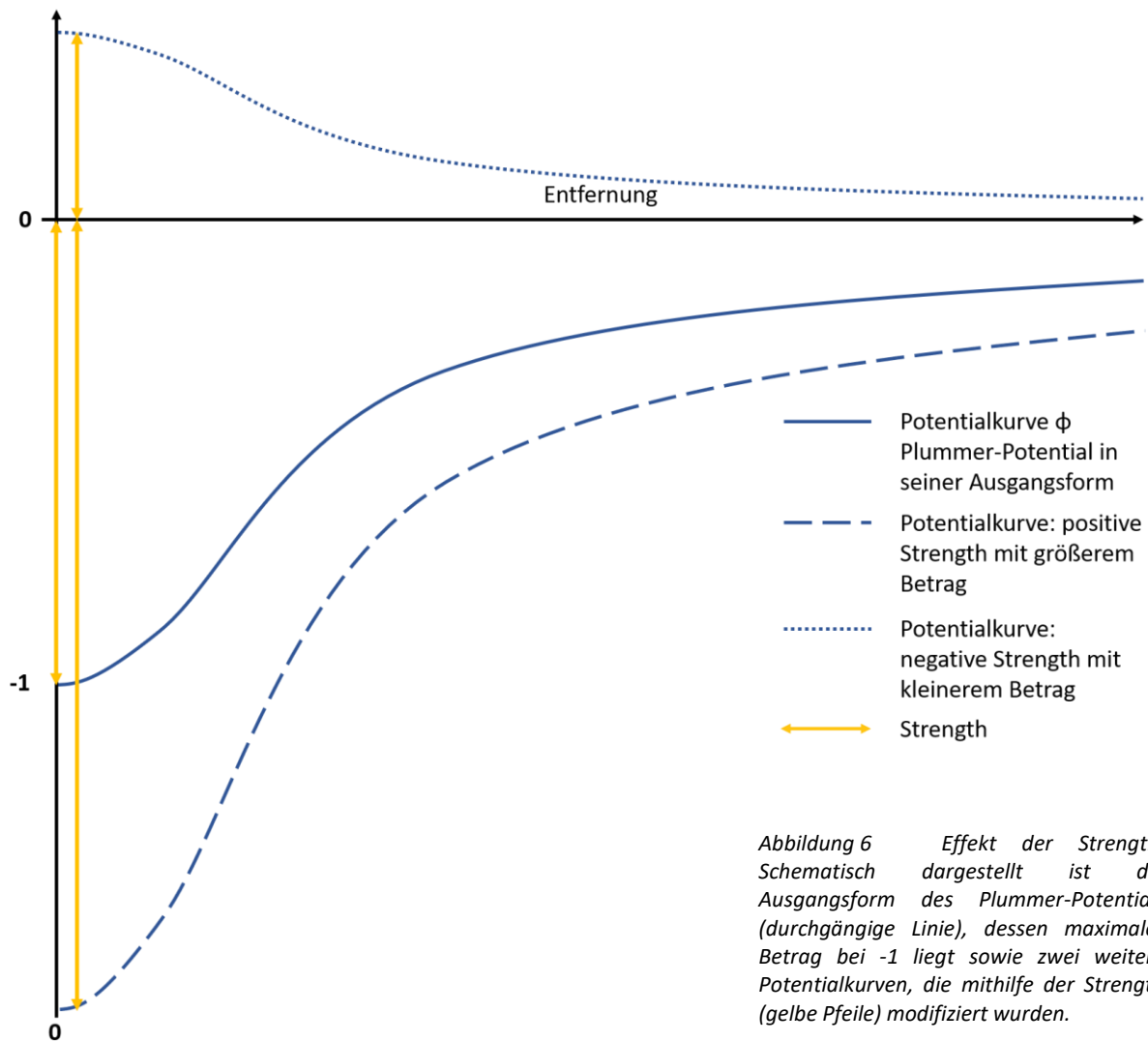


Abbildung 5 Schematische Darstellung des in dieser Arbeit angewandten Plummer-Potentials in seiner Ausgangsform (dunkelblaue Kurve) und der zugehörigen ersten Ableitung (lila Kurve). Zusätzlich sind die Strength als Maß für die Stärke der gesamten Interaktion (gelber Pfeil) und die Beträge der ersten Ableitung der Potentialfunktion als Maß für die Kraft zwischen Objekten in Abhängigkeit von der Distanz (hellblaue Pfeile) dargestellt.

Die durch das Potentialmodell errechnete physikalische Kraft, die auf die Punkte wirkt, ergibt sich für jeden Punkt, wie oben erläutert, aus der Ableitung der Potentialkurve (Abbildung 5, lila Kurve). Somit ist die Kraft zwischen den Punkten wie auch das Potential eine Funktion der Entfernung zwischen den Punkten. Diese Kraft ist in Abbildung 5 beispielhaft für einige Distanzen durch die hellblauen Pfeile hervorgehoben. In verschiedenen Distanzen der Objekte zueinander wirken also unterschiedliche Kräfte zwischen ihnen. Die Ableitung des Potentials erreicht im steilsten Bereich der Kurve ihr Maximum und ist im gezeigten Beispiel auf der gesamten Kurve positiv. Das bedeutet, dass bei der Distanz, an der die Steigung der Potentialkurve am größten ist, auch die Kraft, die zwischen Punkten in der Verteilung wirkt, am stärksten sein muss. Größere und kleinere Entfernungen bedeuten eine kleinere, aber weiterhin positive Kraft. Je größer die Entfernung, desto geringer wird die Anziehung. Diese Potentialkurve stellt also eine im gesamten Betrachtungsbereich anziehende Interaktion dar, was einer Verteilung mit überzufällig geringen Abständen zwischen den Objekten entspricht. Im Gegensatz dazu hat eine Potentialkurve mit negativer Steigung eine negative erste Ableitung, was einer abstoßenden Kraft zwischen den Objekten entspricht. Die sog. „Strength“ ist der Parameter, der den maximalen Betrag der Potentialkurve und somit die maximale Energiedifferenz in der Interaktion bestimmt (Abbildung 5, gelber Pfeil). Eine große Strength bedeutet große Unterschiede in den Energieniveaus und somit eine starke gesamte Interaktion zwischen den Punktgruppen. Sie ist nicht mit der Kraft, die auf die einzelnen Objekte wirkt, zu verwechseln, die wie oben erläutert vom Betrag der ersten Ableitung abhängt.

Durch Modifikation ihrer nicht parametrisierten Ausgangsform können Potentialkurven mittels Strength und  $\sigma$  zur Darstellung verschiedener Distanzverteilungen angepasst werden. In Abbildung 6 soll die Auswirkung der Strength als einer der variablen Parameter hervorgehoben werden. Bei der Errechnung des Model-fit wird immer zunächst die Ausgangsform des jeweiligen Potentials verwendet, die im Fall des Plummer-Potentials negativ ist und die Y-Achse bei -1 im Nullpunkt der X-Achse trifft (Abbildung 6, Kurve mit durchgängiger Linie). Diese Ausgangsfunktion wird durch Multiplikation mit der Strength modifiziert, was eine Streckung der Potentialfunktion entlang der Y-Achse zur Folge hat (beispielhaft ist die breit gestrichelte Kurve in Abbildung 6 gezeigt). Eine positive Strength hat eine negative Potentialkurve zufolge und umgekehrt, da die Ausgangsform des Plummer-Potentials negativ ist (beispielhaft für eine negative Strength ist die fein gestrichelte Linie gezeigt).



Übertragen auf die schiefe Ebene aus Abbildung 4 bedeutet ein größerer Betrag der Strength, die Ebene wird höher, also steiler. Durch den größeren Potentialunterschied auf gleicher Distanz vergrößert sich auch der Betrag der ersten Ableitung, wodurch die Kraft zwischen den einzelnen Objekten in dieser Distanz größer wird. Eine große Strength der gesamten Interaktion geht also häufig mit stärkeren Kräften zwischen den Objekten an verschiedenen Stellen einher, beschreibt an sich aber etwas völlig anderes, nämlich das maximale Energieniveau der gesamten Interaktion.

Analog kann auch die Streckung der Potentialkurve entlang der X-Achse modifiziert werden (Abbildung 7). Hierfür wird die sog. „length scale“, auch „ $\sigma$ “, verwendet. Ein Wert  $<1$  bedeutet eine Stauchung entlang der X-Achse, ein Wert  $>1$  hat eine Streckung entlang der X-Achse zur Folge.

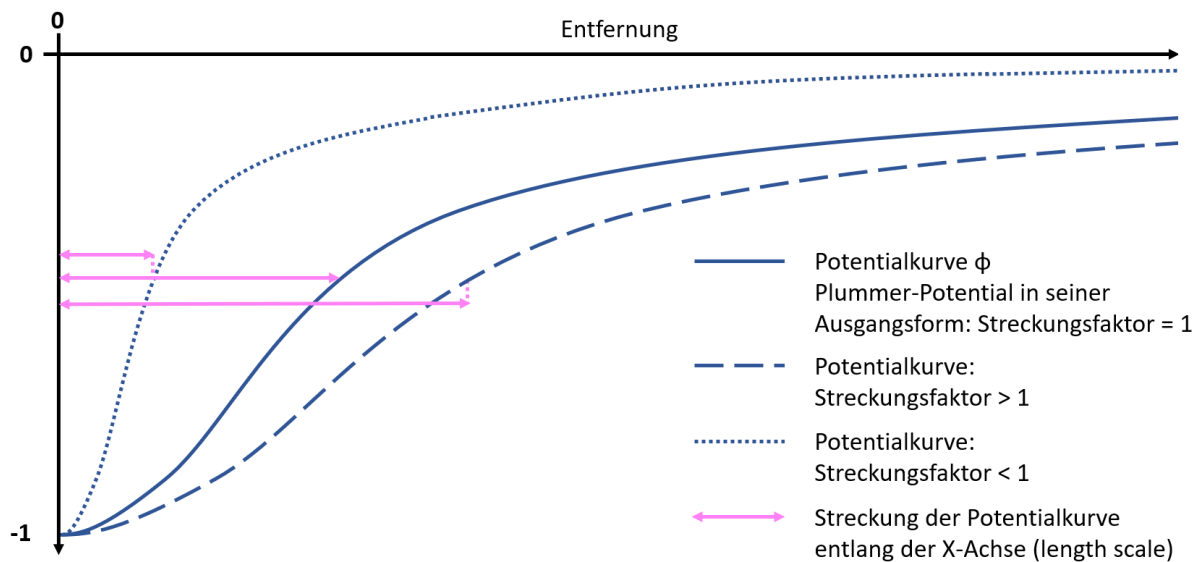


Abbildung 7 Effekt der length scale  $\sigma$  auf die Streckung der Potentialkurve. In durchgängiger Linie ist die Ausgangsform des Plummer-Potentials dargestellt. In breit gestrichelter Linie eine gestreckte - sowie in fein gestrichelter Linie eine gestauchte Modifikation der Ausgangskurve. Die pinken Pfeile veranschaulichen die Streckung der Kurve auf einem fixen Potentialniveau.

Um zu verdeutlichen, wie die Potentialkurve nun in die Interaktionsanalyse einfließt, werden die Schritte, die von der MosaicIA durchgeführt werden, im Folgenden kurz erklärt. Wie oben bereits erläutert, beruht die Analyse auf den Entfernungen zwischen Objekten der Gruppe A zu ihren nächsten Nachbarn der Gruppe B. Für alle möglichen Distanzen werden anhand der Messwerte der Distanzen relative Beträge der Aufenthaltswahrscheinlichkeit ermittelt, die in blau aufgetragen werden (Abbildung 8, blaue Kurve). Die Fläche unter dieser Kurve entspricht der Wahrscheinlichkeit, diese Distanzen tatsächlich zu messen. Eine solche Kurve nennt man Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung, ein Begriff aus der Stochastik. Für die weiteren Berechnungen ist es notwendig, die beobachteten Distanzen in dieser Form aufzutragen, da die weiteren Schritte auf diesem Formalismus basieren. Wenn die untersuchten Zellen nah beieinander liegen, werden viele kleine Distanzen gemessen und eine hohe Wahrscheinlichkeitsdichte im Diagramm nahe dem Nullpunkt aufgetragen. Der Gipfel der blauen Kurve befindet sich also weit links. Die Farbwahl durch MosaicIA ist hier nicht eindeutig, da in den Grafiken der Software sowohl die Kurve der beobachteten Distanzen als auch die Potentialkurve in blau aufgetragen werden. Es ist also darauf zu achten, um welche Kurve es sich jeweils handelt.

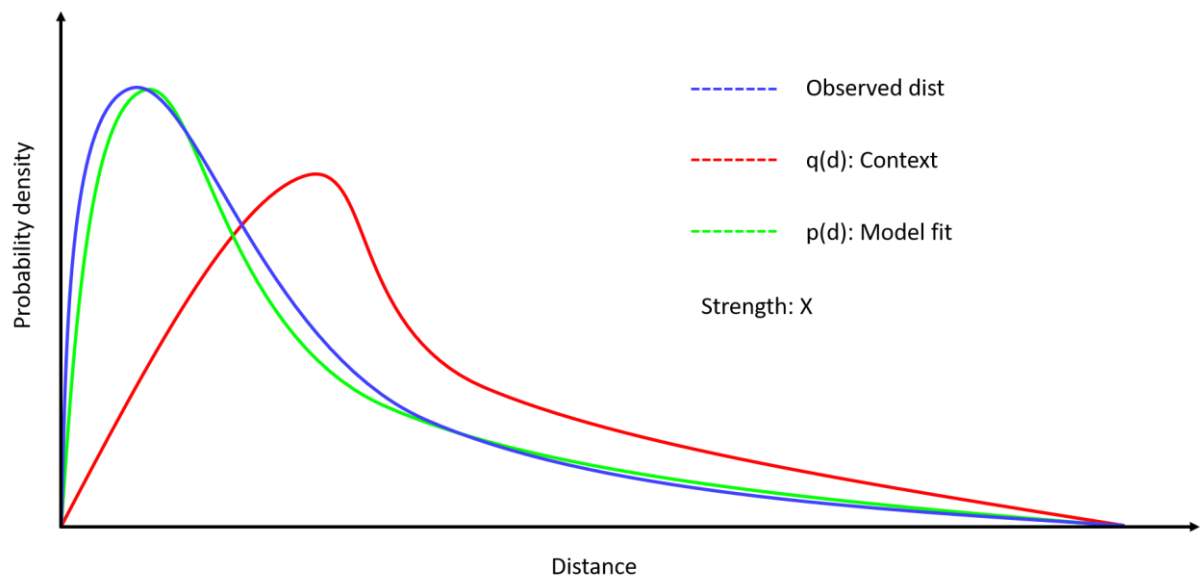


Abbildung 8 Schema eines Wahrscheinlichkeitsdichte-Distanz-Diagramms. Die Contextkurve ist in rot, die gemessene Distanzverteilung in blau ( $dist = distances$ ) und das errechnete Model-fit in grün dargestellt.

Das Programm erstellt nun aus den Parametern, die der blauen Kurve in Abbildung 8 zugrunde liegen, nämlich ROI und Zahl der Objekte, eine weitere Kurve. In dieser weiteren Kurve wird dargestellt, wie sich die gleiche Zahl von Punkten ohne Wechselwirkung zueinander in der gleichen ROI verteilen würden (Fall der Complete-Spatial-Randomness). Bei der Erstellung der Zufallskurve ist das Potential zugrunde gelegt [14]. Es hat hier allerdings durch eine Strength von null keinen Betrag und dadurch auch keine Auswirkung auf die Distanzverteilung. Eine Strength ungleich Null würde eine Interaktion implizieren. Die entstehende Wahrscheinlichkeitsdichte-verteilung wird als rote Kurve aufgetragen. Diese ist der sog. „Context“ [14], also die Bezugskurve für die folgende Interaktionsanalyse. Die Position der blauen Kurve in Bezug zur roten ergibt bereits einen ersten Eindruck, wie die Zellen zueinander verteilt sind. Befindet sich die blaue Kurve links der roten, sind die gemessenen Abstände im Vergleich zu einer zufälligen Verteilung kleiner (Clustering). Befindet sie sich rechts der roten Kurve, sind die Abstände größer als in einer Zufallsverteilung (Regularity). Im nächsten Schritt wird die Zufallsverteilung mithilfe der Potentialkurve solange modifiziert, bis sie die gemessenen Distanzen möglichst gut abbildet [14]. Um dies zu erreichen, muss die Potentialkurve selbst angepasst werden, da sie in der Ausgangsform noch keinen Bezug zu den beobachteten Distanzen hat. Die Anpassung der Potentialkurve erfolgt, wie in Abbildung 6 und Abbildung 7 dargestellt

durch Strength und length scale. Durch die so veränderten Energieniveaus und die Kräfte, die nun für verschiedene Distanzen vom Potential vorgegeben werden, ändert sich die Verteilung der zuvor zufällig verteilten Punkte. Diese resultierende Kurve wird in grün dargestellt und heißt Model-fit, da es sich um ein Modell der beobachteten Distanzverteilung handelt. Sie beschreibt eine Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion, die sich von einer Zufallsverteilung nur durch die Eigenschaft der Punkte, sich gegenseitig anzuziehen oder abzustößen, unterscheidet [52]. Die Strength, die für die optimale Anpassung des Model-fit notwendig war, ist Grundlage für die Beurteilung der Interaktion.

Wie durch unterschiedlich hohe Werte der Strength die Model-fits unterschiedlich stark modifiziert werden, wird im folgenden Beispiel deutlich. In Abbildung 9 sind die Interaktionsanalysen von zwei Szenarien dargestellt, bei denen sich die Beträge der Strength deutlich unterscheiden. Links wurden zwei zufällige Punktverteilungen (gelb und violett) auf eine Interaktion untersucht. MosaicIA erstellt ein Model-fit, das eine minimale Abstoßung zwischen den Punktgruppen postuliert. Dies äußert sich in der Potentialkurve mit konstant negativer Steigung und negativer Strength von -0,68 (roter Rahmen) (beachte in der Grafik  $-6,8 \cdot 10^{-1}$ ). Ein so geringes Potential hat eine sehr kleine erste Ableitung, sodass die Kräfte zwischen den Objekten im gesamten Bereich sehr gering sind. Dies ist mit einer schiefen Ebene zu vergleichen, die fast komplett flach ist. So geringe Kräfte haben kaum eine Änderung der Anordnung der Punktverteilung im Model-fit zur Folge. Somit liegt das Model-fit beinahe über der Kurve der zufälligen Verteilung, was eine zufällige Entstehung der Punktanordnung sehr wahrscheinlich macht. Im rechten Szenario der Abbildung 9 findet MosaicIA eine Anziehung, was sich in der Potentialkurve mit konstant positiver Steigung, und positiver Strength äußert. Die Strength beträgt hier 6,23 (gelber Rahmen) und ist somit über 9-mal so groß wie die des linken Szenarios. Die Kräfte zwischen den Objekten sind durch den höheren Betrag der Ableitung dieser Potentialkurve (Ableitung nicht dargestellt) wesentlich größer und das Ergebnis ist eine Verschiebung des Model-fit in Richtung geringerer Distanzen. Analog wären auf einer nach links abschüssigen schiefen Ebene aus dem Beispiel in Abbildung 4 die Kugeln nach links unten gerollt. Es handelt sich hier, im Gegensatz zum linken Szenario, durch den großen Unterschied zwischen Model-fit und Zufallsverteilung um eine signifikante Interaktion.

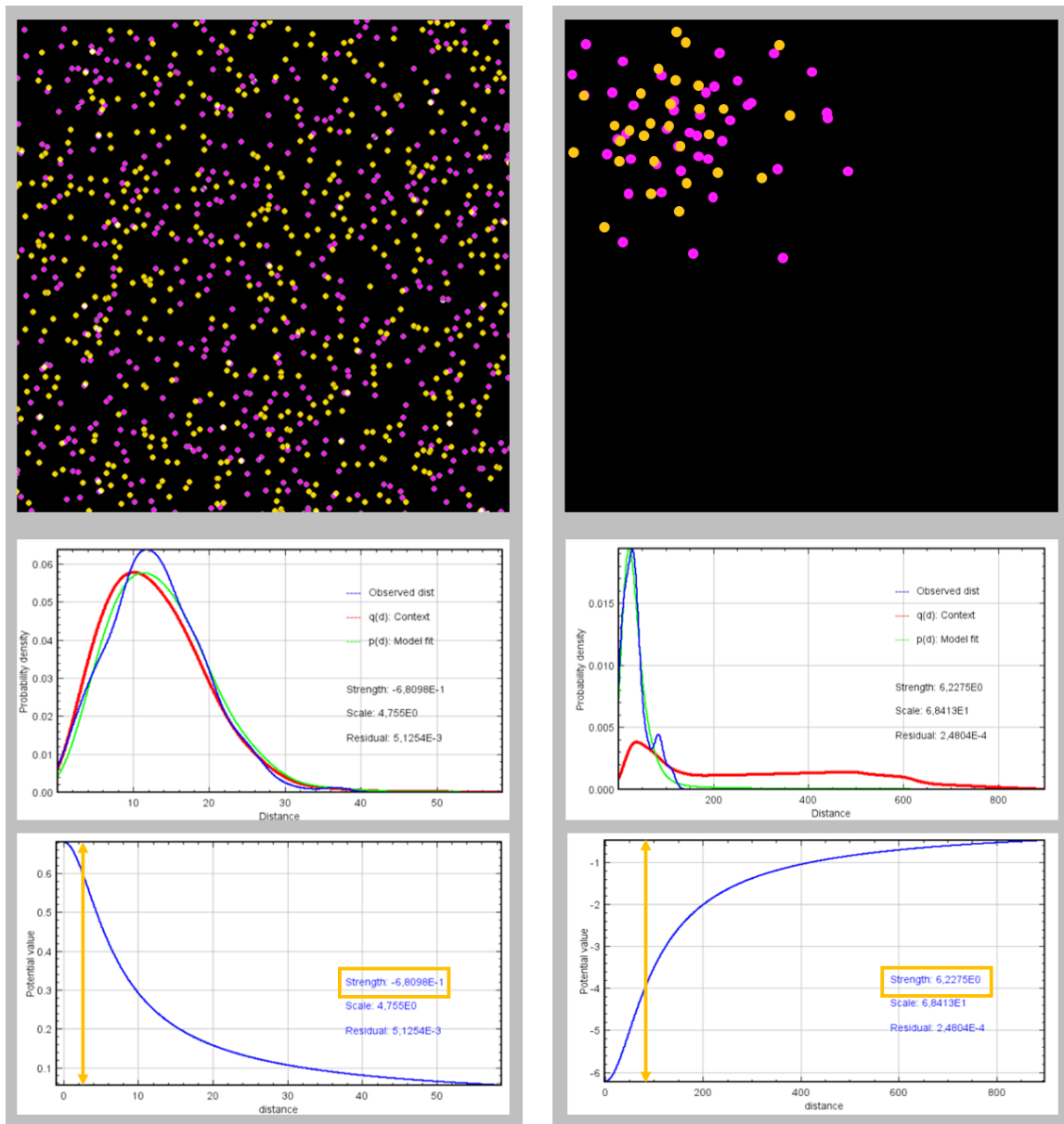


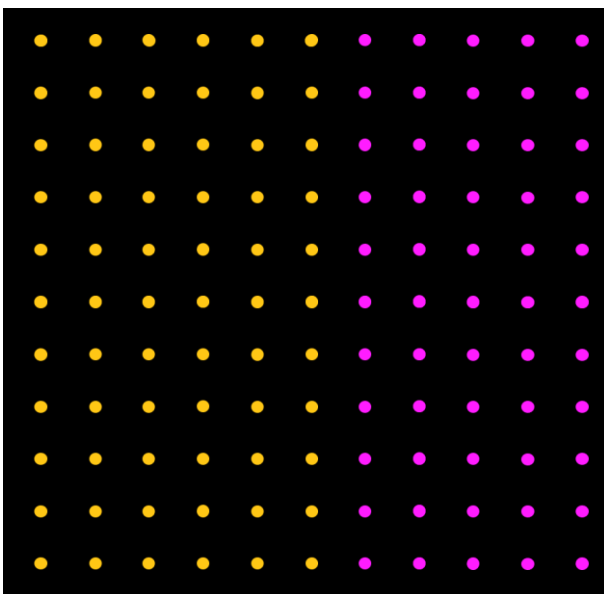
Abbildung 9 Interaktionsanalyse zweier Szenarien. Links: Überprüfung auf Interaktion zwischen zwei zufälligen Verteilungen (analog zu Abbildung 1). Rechts zwei Punktgruppen mit positiver Interaktion. In beiden Spalten sind jeweils unter der Abbildung der Punktgruppen die zugehörigen Wahrscheinlichkeitsdichte-Distanz-Diagramme und die Potentialkurven dargestellt. Die Strength ist in den Potentialkurven jeweils zusätzlich durch einen gelben Pfeil veranschaulicht und durch einen gelben Rahmen hervorgehoben.

Wie bereits erwähnt wird bei der Erstellung des Model-fit eine immer gleiche Ausgangsform des ausgewählten Potentials unter anderem durch die Strength modifiziert (siehe Abbildung 6) bis das resultierende Model-fit zufriedenstellend ist. Die Formen der verschiedenen Ausgangspotentiale wurden von Shivanandan et al. [14] anschaulich dargestellt. Um nun zu zeigen, wie sich die Form des Ausgangspotentials auf das resultierende Model-fit auswirkt, wurden am folgenden manuell erstellten Beispiel (Abbildung 10) alle auswählbaren Potentialformen in MosaicIA für die



Erstellung des Model-fit verwendet. Die gelben Punkte wurden auf eine Interaktion mit den violetten Punkten untersucht.

Bei der Punktverteilung handelt es sich um eine besondere Anordnung, da nur bestimmte Abstände vorkommen. Dies äußert sich in Abbildung 11 in den blauen Kurven der beobachteten Distanzen in den Wahrscheinlichkeitsdichte-Distanz-Diagrammen, die mehrere Maxima in gleichen Abständen aufweisen. Eine solche Verteilung unterscheidet sich stark von in Zellverbänden vorkommenden sowie von zufälligen Verteilungen, sodass eine perfekte Abbildung durch das Model-fit nicht zu erwarten ist. Allerdings ist so der Versuch der Anpassung des Model-fit gut nachvollziehbar.



*Abbildung 10 Abstraktes Punktmuster zur Veranschaulichung der Auswirkung verschiedener Potentialformen auf das Model-fit. Es wurde die Interaktion zwischen gelben und violetten Punkten untersucht.*

In Abbildung 11 sind die Wahrscheinlichkeitsdichte-Distanz-Diagramme und die zugehörigen Potentialkurven zu den verschiedenen Ausgangsformen der Potentiale dargestellt. Das Step-Potential kann nur einen sprunghaften Übergang zwischen zwei Potentialniveaus darstellen, was sich in einem senkrechten Strich in der Potentialkurve sowie in einem Sprung im Model-fit darstellt, welches ansonsten die Form der Contextkurve (rote Kurve in den linken Abbildungen) nachvollzieht. Das Plummer- und das Hernquist-Potential sind die komplexeren Potentialformen, die einen kurvenartigen Verlauf der Potentialfunktion zulassen. Die lineare Potentialform entspricht funktional der schiefen Ebene aus Abbildung 4 und stellt einen konstanten Übergang zwischen zwei Potentialniveaus dar. Das nicht-parametrische Modell stellt eine Sonderform dar, weil es keine Signifikanztestung in MosaicIA zulässt. Allerdings ermöglicht es eine freiere Annäherung der Potentialkurve.

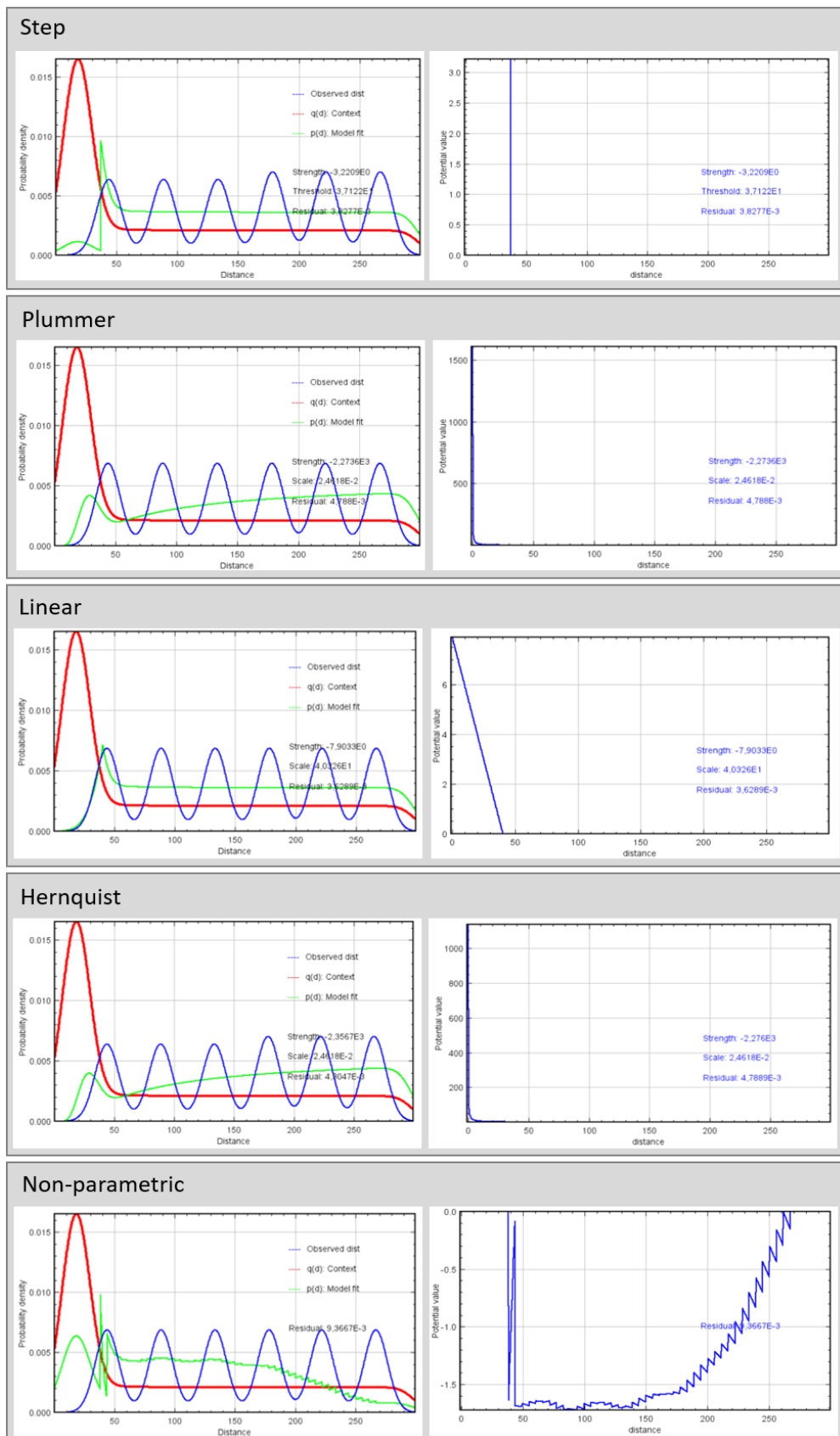


Abbildung 11 Verschiedene Potentialformen im Vergleich (Step, Plummer, Linear, Hernquist, Non-parametric). Gezeigt sind jeweils links die resultierenden Wahrscheinlichkeitsdichte-Distanz-Diagramme aus der Interaktionsanalyse des Punktmusters in Abbildung 10 sowie die zugehörigen Potentialkurven rechts. Die Contextkurve (links, rot) und die beobachteten Distanzen (links, blau) sind in allen fünf Varianten identisch, nur die Potentialkurven und das daraus resultierende Model-fit (links, grün) unterscheiden sich.

Verschiedene Potentialformen können spezifische Zusammenhänge jeweils zutreffend darstellen und unterscheiden sich in der Komplexität der zu untersuchenden Interaktionen. Beispielsweise lässt sich mittels des einfachen Step-Potentials das Ergebnis von klassischen Co-Lokalisationsanalysen nachbilden, bei denen Zellen mit einem Abstand unterhalb eines Thresholds als co-lokalisiert gelten [14]. In dieser Arbeit wurde das Plummer-Potential gewählt, da sich hiermit die besten Annäherungen des Model-fit erzielen lassen und im Gegensatz zu anderen Potentialformen eine Signifikanztestung möglich ist. Bei der Wahl der Potentialform ist wichtig, dass ein gutes Model-fit erzielt wird, und dass für alle Untersuchungen die gleiche Potentialform zur Anwendung kommt. Nur Ergebnisse, die mit der gleichen Potentialform entstanden sind, sind untereinander vergleichbar.

Der vom Paar-Potential ausgehende Ansatz ist im Vergleich zu bisherigen Co-Lokalisationsanalysen neu, denn es wird von der Interaktion zwischen den Zellen auf die gesamte Zellverteilung zurückgeschlossen. Durch Anwendung von Interaktionspotentialen zwischen den Interaktionspartnern lässt sich überprüfen, ob eine Verteilung durch diese intrinsische Eigenschaft entstanden sein kann. Die Analyse der beobachteten Verteilung geht also von der Form und Kraft der Beziehung zwischen den einzelnen Punkten aus und nicht primär von einer äußeren Betrachtung. Diese Art der Analyse scheint für die Suche nach Interaktionen zwischen Zellen oder Markern einen logischeren Ansatz zu verfolgen als bisherige Co-Lokalisationsanalysen. Entscheidend ist zudem, dass durch eine sich an die mathematische Modellierung der Interaktion anschließende Monte-Carlo-Simulation eine Signifikanztestung möglich ist.

#### *4.2.4.1.2 Kernel*

Grundlage der Berechnungen in der Analyse sind kurvenartige Verteilungen der Wahrscheinlichkeitsdichte. In der Realität handelt es sich jedoch um eine Vielzahl diskreter Distanzen, die sich so nicht durch eine Kurve darstellen lassen. Nur durch Zusammenfassung mehrerer Distanzen in bestimmten Distanzbereichen lässt sich hieraus eine Kurve ableiten. Mithilfe der Kernel-Schätzung ist es möglich, die Vielzahl der einzelnen Distanzen in eine Kurve der Wahrscheinlichkeitsdichte umzuwandeln. Bildlich gesprochen entspricht der Kernel einem Bereich vorgegebener Fläche, der über verschiedene Areale des Messbereichs bewegt wird und jeweils die Verteilung der gemessenen Distanzen angibt. Je größer man den Kernel wählt, desto

gleichmäßiger ist die Kurve, da geringe Abweichungen in den größeren Messbereichen verschwimmen [54]. Ein zu groß gewählter Kernel kann jedoch auch wichtige Details in der Verteilung kaschieren. In MosaicIA wird die Kernel-Dichteschätzung für die Darstellung des Wahrscheinlichkeitsdichte-Diagramms und der Contextkurve verwendet [14].

#### *4.2.4.1.3 Signifikanztestung*

In der anschließenden Signifikanztestung wird mithilfe von Monte-Carlo-Simulationen das Ergebnis auf Signifikanz geprüft. Hierbei wird untersucht, ob die gemessene Zellverteilung vergleichbar ist mit einer zufällig generierten Verteilung. Dieser Vergleich der gemessenen und der durch zufällige Generierung entstandenen Verteilungskurven wird nun in der eigentlichen Monte-Carlo-Simulation viele Male wiederholt, in dieser Arbeit 1000mal. Je häufiger die beobachtete Verteilungskurve durch die generierte Zufallsverteilung getroffen wird, desto wahrscheinlicher ist eine zufällige Entstehung der gemessenen Zellverteilung, die somit nicht signifikant ist. Aus der Zahl der Übereinstimmungen in der Monte-Carlo-Simulation von zufälliger und gemessener Zellverteilung ergibt sich der p-Wert [52]. In Kenntnis dieses Vorgehens kann also bei einer Strength von 0 nie Signifikanz vorliegen, da dies einer zufälligen Verteilung entspricht.

#### *4.2.5 Auswahl der ROI*

Ein grundsätzliches Problem in der spatialen Analyse ist die Auswahl des Betrachtungsbereiches. Dies betrifft vor allem objektbasierte Verfahren. Sie können keine absoluten, sondern immer nur relative Aussagen bezüglich der Co-Lokalisation treffen. Methoden der ICCB können nur zwei Signale an einer Stelle auf Korrelation untersuchen. Objektbasierte Verfahren hingegen leiten aus der Verteilung und räumlichen Anordnung der Objekte Interaktionen ab, die immer nur vor dem Kontext der ROI betrachtet werden können. Eine Verteilung, die in einer ROI als Regularity erkannt wird, kann sich in einer anderen ROI als Cluster darstellen. Die Ergebnisse der Untersuchung unterscheiden sich zum Teil auch erheblich, wenn man unterschiedlich große Bereiche desselben Untersuchungsareals zur Analyse verwendet. Dieser Effekt ist vor allem bei heterogenen Untersuchungsarealen stark ausgeprägt. Varianten dieses Problems sind in verschiedenen Fachrichtungen bekannt, die sich mit spatialer Analyse beschäftigen: in der Geographie das Modifiable-Areal-Unit-Problem [55], in der Geowissenschaft das Change-of-Support-

Problem“ [56]. Alle beschreiben letztlich das gleiche Problem aus unterschiedlichen Sichtweisen. Die Perspektive des Modifiable-Areal-Unit-Problem entspricht weitgehend der Problematik in der Betrachtung von Zellen. Dieses wird von verschiedenen Analysetechniken auf unterschiedliche Weise berücksichtigt, muss jedoch vor allem auch immer bei der Betrachtung der Ergebnisse bedacht werden.

Hierbei wird zudem noch außer Acht gelassen, dass es sich bei den Präparaten, die mittels Interaktionsanalyse untersucht werden können, um zweidimensionale Ausschnitte von dreidimensionalen Systemen handelt. Die Komplexität der untersuchten Gewebe wird bereits durch die zweidimensionale Darstellung nicht vollständig erfasst.

### **4.3 Molekularbiologische Zusammenhänge**

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der hier erarbeiteten spatialen Interaktionsanalyse wurde eine Proof-of-Concept-Analyse von Interaktionen zwischen verschiedenen endogenen Markern in Tumorschnitten (Carboanhydrase 9 (CA9), Ekto-5'-Nukleotidase (CD73), Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) und Forkhead Box Protein 3 (FoxP3)) durchgeführt. Die zugrundeliegenden physiologischen Zusammenhänge, deren Verständnis für die Interpretation der Interaktionsanalyse notwendig ist, sind zur besseren Anschaulichkeit in Abbildung 12 dargestellt und werden im Folgenden erläutert. Da es sich bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Markern um eng mit dem hypoxischen Geschehen im Tumorgewebe assoziierte Faktoren handelt, wird der näheren Beschreibung eine Darstellung zu Entstehung und Auswirkungen der Hypoxie vorangestellt.

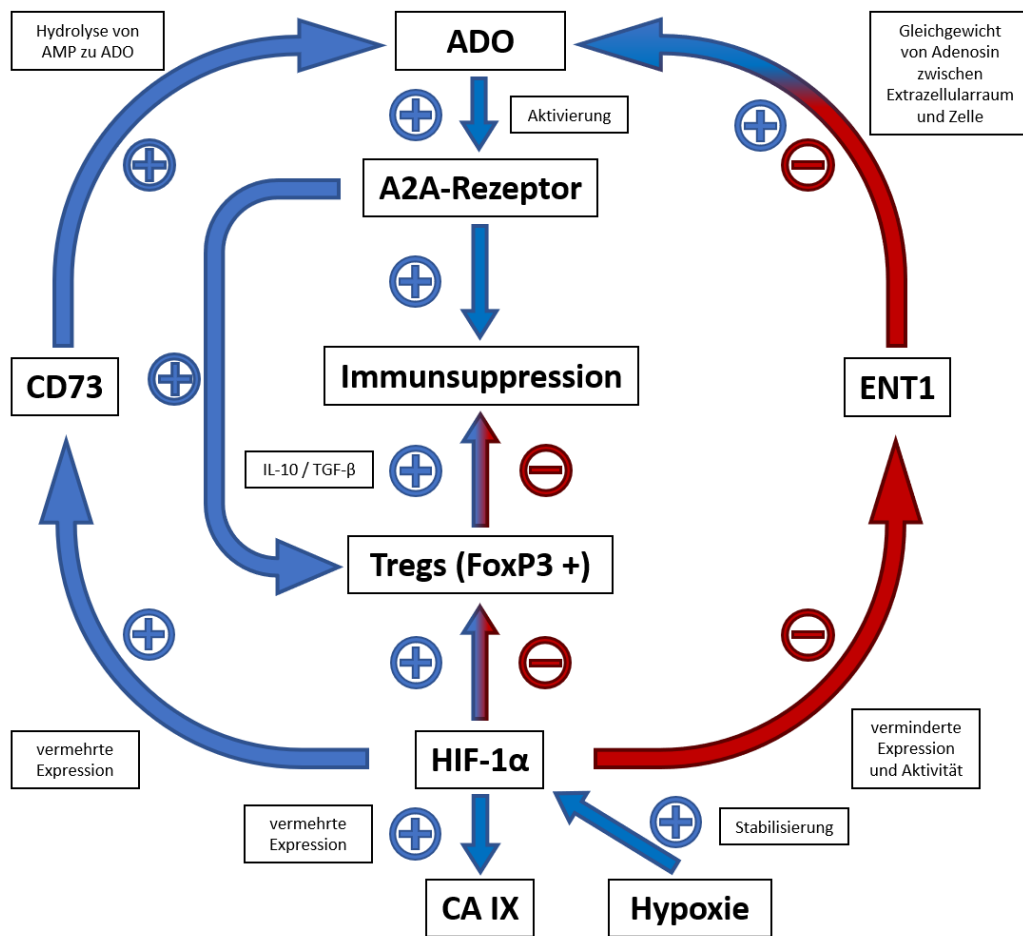


Abbildung 12 Darstellung der molekularen Zusammenhänge zwischen den angeführten Biomarkern. Blaue Pfeile stellen einen verstärkenden Einfluss dar, rote Pfeile einen abschwächenden Einfluss. Die blau-roten Pfeile illustrieren, dass situationsabhängig entgegengesetzte Wirkungen möglich sind, bzw. dass über die gezeigten Zusammenhänge in der Literatur Uneinigkeit besteht. Die verwendeten Abkürzungen gehen aus dem Abkürzungsverzeichnis hervor.

#### 4.3.1 Hypoxie

Hypoxie kann in zahlreichen Geweben auftreten und Kompensationsmechanismen in Gang setzen [57-59]. Die Sauerstoffversorgung aller Gewebe ist von mehreren Faktoren abhängig, so zum Beispiel vom Blutfluss in den Gefäßen, von der Distanz der Gefäße zu den Zellen, also der Diffusionsstrecke, und vom Hämoglobingehalt des Blutes. Wenn die Gefäße kein Blut mehr führen oder der Blutfluss stagniert, kommt es zu einer plötzlichen Unterbrechung der Sauerstoffversorgung, der sogenannten „akuten Hypoxie“ [60]. Demgegenüber gibt es Formen der Hypoxie, deren Ursache in der Gewebsarchitektur liegt [60]. Die Distanz zu den Gefäßen ist im gesunden Gewebe meist klein genug, um eine ausreichend kurze Diffusionsstrecke zu gewährleisten und

somit eine diffusionsbedingte Hypoxie zu vermeiden. In Tumoren hingegen kommt es aufgrund des ungeordneten Gewebe- und Gefäßwachstums zu verlängerten Diffusionsstrecken, sodass eine adäquate Sauerstoffversorgung nicht mehr gewährleistet ist. Die Gefäße selbst sind zudem nicht mehr optimal geformt, um einen homogenen Blutfluss sicherzustellen. Es entstehen nicht selten Gefäße, die aufgrund ihrer Form nicht mehr von einem Erythrozyten passiert werden können und daher nur noch von Plasma perfundiert werden. All das bewirkt in gesunden Zellen eine Restriktion des Wachstums und der Differenzierung bis hin zur Nekrose und Apoptose [59, 60].

Ein verringertes Sauerstoffangebot stellt für Tumorzellen ebenfalls eine vitale Bedrohung dar. Hier sind allerdings wichtige Mechanismen, wie unter anderem die Apoptose, außer Kraft gesetzt. Folglich sind manche Tumorzellen dazu in der Lage, dem Zelltod zu entgehen, indem sie sich durch Genom- und Proteomveränderungen den neuen Umständen anpassen [61]. Hierdurch findet eine Selektion aggressiverer Tumorphänotypen statt, die resistenter gegen Hypoxie, aber in vielen Fällen auch gegen weitere Faktoren, wie zum Beispiel Strahlung, sind [59, 60]. In der Konsequenz sind in Tumoren mehr Zellen in der Lage, in hypoxischen Arealen zu überleben. So enthalten beispielsweise 50-60% aller soliden Tumoren hypoxische oder anoxische Areale [60]. Bei der Absiedelung von Mikrometastasen begünstigen diese veränderten Eigenschaften das Überleben dieser Zellen, wodurch die Prognose von Tumorkranken eingeschränkt sein kann [62].

#### 4.3.1.1 *HIF-1 $\alpha$*

Zellen reagieren auf Hypoxie über Umstellung ihres Metabolismus durch Proteomveränderungen. Eine Schlüsselrolle in diesem Vorgang spielt der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). Die Regulation von Stabilisierung und Abbau des HIF-1 $\alpha$  ist gut erforscht [63, 64]. Er stellt als Transkriptionsfaktor den Startpunkt für verschiedene Veränderungen im Gewebe, wie z.B. Expression von Enzymen der Glykolyse oder Angiogenese, dar [65] und induziert unter anderem Oberflächenproteine wie CA9 [58], welches in dieser Arbeit als Hypoxiemarker verwendet wurde, sowie CD73 [65].

Erhöhte Sauerstoffniveaus vermitteln über den Abbau von HIF-1 $\alpha$  eine reduzierte Expression des immunsuppressiven TGF- $\beta$ , CTLA-4, der Adenosin-produzierenden Ectonucleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase 1 (CD39) und CD73, der

Adenosinrezeptoren A2A-Rezeptor (A2AR) und A2B-Rezeptor (A2BR) sowie des Treg-Transkriptionsfaktors FoxP3 [66]. Immunaktive Zellen wie T-Zellen und Antigen-präsentierende Zellen werden durch HIF-1 $\alpha$  in Proliferation und Aktivität gehemmt [65]. HIF-1-vermittelte Mechanismen tragen somit zu verminderter Immunfunktion sowie erhöhter Metastasierungsfähigkeit und Invasivität der Tumorzellen bei [67, 68] und versehen den Tumor mit besseren Überlebenschancen im hypoxischen Gewebe.

Erhöhte HIF-1-Spiegel in Tumoren, auch in Kopf-Hals-Tumoren, sind oft mit erhöhter Mortalität und schlechterer Prognose vergesellschaftet [59, 65, 69-71]. Versuche konnten zeigen, dass HIF-negative Mäuse mit Brustkrebs sowohl ein späteres und gehemmtes Tumorwachstum als auch weniger pulmonale Metastasenbildung aufwiesen [72, 73]. In Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle konnte dagegen nachgewiesen werden, dass bei Überexpression von HIF-1 $\alpha$  pro-apoptotische Faktoren herunterreguliert und anti-apoptotische Faktoren hochreguliert waren [74].

#### *4.3.2 Extrazelluläres Adenosin (ADO)*

Aus verletzten und zugrunde gegangenen Zellen tritt ATP, ADP und AMP aus. ATP wird durch die membranständige Hydrolase CD39 in AMP umgewandelt, welches dann durch das ebenfalls membranständige CD73 in Adenosin gespalten wird. Sowohl CD39 als auch CD73 werden unter Einfluss von Hypoxie über das HIF-1-System verstärkt exprimiert [65, 66, 75, 76].

Der Abbau von Adenosin wird von der Adenosin-Desaminase katalysiert. In diesem Schritt wird Adenosin zu Inosin abgebaut. Die Adenosin-Desaminase wird in hypoxischem Umfeld herunterreguliert und der Abbau von Adenosin somit verringert [77]. Alternativ kann Adenosin auch durch Nukleosid-Transporter (ENT1) in die Zelle aufgenommen und durch die Adenosin-Kinase wieder in AMP umgewandelt werden [78]. Die Adenosin-Kinase wiederum wird durch Hypoxie über das HIF-1-System in seiner Aktivität gehemmt [66, 77], wodurch der Abbau von Adenosin unter hypoxischen Bedingungen nur verlangsamt stattfinden kann.

Neben seiner Rolle als Bestandteil des zellulären Energieträgers ATP reguliert Adenosin Entzündungsreaktionen unter physiologischen Bedingungen und ist entscheidend an Mechanismen der tumor- und hypoxievermittelten Immunsuppression beteiligt. In einem gesunden Organismus hat extrazelluläres Adenosin neben anderen Funktionen zum Beispiel im neuronalen und kardiovaskulären System die Aufgabe, das Gewebe vor überschießenden



Immunreaktionen zu schützen [65, 79]. Durch verschiedene Mechanismen sind Entzündungsreaktionen, Gewebeverletzungen und Energiemangelzustände häufig von erhöhten extrazellulären Adenosinspiegeln begleitet [65, 78, 80]. Adenosin vermittelt über den G-Protein-gekoppelten A2AR [65], der auf T-Zellen und anderen Immunzellen exprimiert wird, eine Hemmung der Aktivität des Immunsystems im Sinne einer negativen Rückkopplung unter anderem über eine T-Zell- und Zytokinhemmung [81-84]. Adenosin ist somit ein wichtiger Bestandteil der Autoregulation von Entzündungsprozessen und essenziell zur Vermeidung von Autoimmunität [85, 86].

Im Tumorgewebe befördert Adenosin Überleben und Wachstum entarteter Zellen, da auch hier der immunsuppressive Effekt des Adenosins eine Möglichkeit des Immune-Escape bietet. Die für Tumoren typische Hypoxie führt zu stark erhöhten Adenosinspiegeln [65, 81, 85, 87], wodurch eine Hemmung des Immunsystems [65, 78, 85] und der Apoptose erfolgt [88]. Zudem befördert ADO die Angiogenese [89-92].

#### 4.3.3 Marker

##### 4.3.3.1 Carboanhydrase 9 (CA9)

Carboanhydrasen (CA) regulieren durch reversible Hydratisierung von CO<sub>2</sub> in Bicarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) und H<sup>+</sup> den pH-Wert, wodurch Ab- und Antransport von Metaboliten im Blut unter hypoxischen Bedingungen ermöglicht werden [72]. Hypoxie führt durch konsekutive pH-Wert-Erniedrigung zu Zelltod. CA9 spielt somit eine entscheidende Rolle für das Überleben der Zellen in hypoxischem Gewebe [93] und wird durch HIF-1α induziert [58, 94].

CA9 ist eines von vielen Isoenzymen aus der Familie der Carboanhydrasen. In einigen Organen, nämlich Leber, Kolon, Magen und Herz, wird sie unter physiologischen Bedingungen exprimiert [95]. Ansonsten kommt sie fast ausschließlich in Tumorgewebe vor und ist somit ein - wenn auch nicht idealer – Tumormarker. Sie ist als Transmembranprotein typischerweise auf der Zelloberfläche lokalisierbar [96]. In vielen Tumoren gilt sie als verlässlicher endogener Hypoxiemarker [95, 97].

##### 4.3.3.2 Ekto-5'-Nukleotidase (CD73)

Die Ekto-5'-Nukleotidase, im Cluster der Differenzierung CD73, katalysiert die Hydrolyse von extrazellulärem AMP in ADO [98], nachdem extrazelluläres ADP durch CD39 in AMP umgewandelt wurde [78]. Adenosin selbst lässt sich in Paraffinschnitten nicht direkt nachweisen, weshalb CD73 stellvertretend als Marker für die Aktivität der

Adenosinproduktion gewählt wurde. Es ist meist auf der Zellmembran nachweisbar [99], jedoch existieren auch nicht zellgebundene Formen von CD73 [100].

In vielen Tumorentitäten ist CD73 überexprimiert und hemmt die Immunreaktion, während Tumorwachstum und Metastasierung gesteigert werden [98]. So wird CD73-Expression bei Brustkrebs mit schlechterem Überleben in Verbindung gebracht. Zudem vermittelt CD73 Resistenz gegen Tumorthherapie mit Trastuzumab [101].

Es wird diskutiert, ob CD73 zur Neovaskularisation im Tumorgewebe beiträgt oder ob das vermehrte Gefäßwachstum in Anwesenheit von CD73 auf einem adenosinrezeptorvermittelten Effekt beruht, der durch die Adenosinproduktion gesteigert wird [102]. In jedem Fall ist die Expression von CD73 in Endothel mehrfach beschrieben [76, 99, 103].

In diversen Studien, u.a. auch in vivo an Mäusen, wurde die Rolle von CD73 im Immune-Escape von Tumoren näher untersucht. In einem hypoxischen Tumormikromilieu kommt es über das HIF-System zu einer Hochregulation von CD73 und CD39 [76, 99, 103-107]. Der dadurch bedingte Anstieg der Adenosinkonzentration bewirkt die bereits beschriebene Immunsuppression.

#### *4.3.3.3 Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (ENT1)*

ENT1 transportiert Nucleoside, unter anderem auch Adenosin, über die Zellmembran. Wie der Name besagt, ist dieser Transport nicht gerichtet, sondern konzentrationsabhängig, das heißt bei hohen Konzentrationen von Adenosin im Extrazellularraum wird Adenosin durch ENT1 über die Zellmembran in das Zellinnere transportiert und umgekehrt.

ENT1 nimmt durch seine Fähigkeit, Adenosin aus dem interstitiellen Raum zu entfernen, eine wichtige Rolle in der Beendigung der adenosinvermittelten Immunsuppression ein. So erhöhen sich in Geweben mit ENT1-negativen Kardiomyozyten unter hypoxischen Bedingungen die Adenosinspiegel [108]. Geringere Adenosinspiegel führten in Versuchen an Kardiomyozyten zu schlechterem Zellüberleben und geringeren immunsuppressiven Effekten [109]. Auch Transplantatschäden wurden in Tierversuchen durch ENT1-vermittelte Adenosinkonzentrationserhöhung verringert [110].

ENT1 wird unter hypoxischen Bedingungen durch HIF-1 $\alpha$  auf Transkriptionsebene sowohl in seiner Produktion als auch in seiner Aktivität herunterreguliert und somit die

Akkumulation von ADO im Extrazellularraum wesentlich begünstigt, sodass sich in Versuchen Erhöhungen der Adenosin-Halbwertszeit in Hypoxie auf das fünffache gezeigt haben. Dieser Effekt wird unter anderem in Zellversuchen bei chronischer Hypoxie deutlich [77, 105, 111].

#### 4.3.3.4 Regulatorische T-Zellen und Forkhead Box Protein 3 (FoxP3)

Zentrale Funktionen der regulatorischen T-Zellen (kurz Tregs) sind die situationsbedingte Anpassung der Immunfunktion und Schutz vor überschießenden Reaktionen gegenüber körpereigenen Geweben und exogenen Epitopen. Individuen, denen durch Thymektomie Tregs fehlen oder deren Tregs in ihrer Funktion eingeschränkt sind, leiden unter autoimmunologischen Symptomen [112]. Mutationen im FoxP3-Gen verursachen Syndrome mit Immundysregulation [113]. Eine immunsuppressive Wirkung der Tregs auf andere Zellen, wie zum Beispiel zytotoxische T-Zellen, wird über unterschiedliche Mechanismen vermittelt [78, 114-118]. Tregs sind in ihrer Funktion als Mediator der Immunreaktion zu verstehen, wobei sie meist, jedoch nicht immer, eine Hemmung des Immunsystems vermitteln [114].

Tregs exprimieren CD39 und CD73 [78, 83, 117, 119] und vermitteln somit eine hemmende Wirkung auf die Effektorzellen [117]. Es konnte gezeigt werden, dass aus der Inaktivierung von A2AR bzw. von CD39 und CD73 eine geringere Effektivität von Tregs resultierte [78]. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Tregs selbst durch A2AR und A2BR induziert werden und die Differenzierung neuer Tregs angeregt wird [65, 83].

FoxP3 ist ein Zielprotein von HIF-1 $\alpha$  und Tregs werden durch HIF-1 $\alpha$  auf verschiedenen Wegen in Expression und Aktivität verstärkt [63, 115, 120, 121]. Andererseits sind HIF-1 $\alpha$ -vermittelte Mechanismen bekannt, die die Entwicklung und Aktivität von Tregs hemmen und den Abbau von FoxP3 befördern [63, 122]. Die Kontroverse um das Verhältnis zwischen FoxP3 und Hypoxie besteht weiterhin in der Literatur.

FoxP3 ist ein Transkriptionsfaktor, der in Tregs exprimiert wird [123]. FoxP3-Expression wurde jedoch auch in anderen Zellen, beispielsweise in CD8+ Zellen, beschrieben [124], wobei FoxP3 auf aktivierten T-Zellen nicht im Zellkern, sondern im Zytoplasma vorkommt [125]. Durch seine Aktivität als Transkriptionsfaktor reguliert FoxP3 die immunmodulatorische Funktion der Tregs. Durch Verlust von FoxP3

verlieren diese Zellen ihre spezifische Funktion und können sich durch IL-2-abhängige Mechanismen sogar in Zellen mit proinflammatorischer Funktion umwandeln [63].

Tregs haben die Eigenschaft, den Körper vor überschießenden Immunreaktionen zu schützen. Hieraus können sich verbesserte Wachstumsbedingungen für Tumoren ergeben. In der klinischen Praxis sind entsprechende Zusammenhänge zwischen Treg-Infiltration des Tumorgewebes und schlechter Prognose bekannt [116, 126]. Auf der anderen Seite verbessert bei einigen Tumorentitäten die Infiltration des Tumorgewebes durch Tregs die Prognose [123, 127]. Zu diesen Tumorentitäten zählen auch Kopf-Hals-Tumoren [11, 116, 123].

Die Ursache der unterschiedlichen prognostischen Bedeutung von Tregs in verschiedenen Tumoren ist nicht abschließend geklärt. Es existieren mehrere Erklärungsansätze, die in verschiedenen Arbeiten ausführlich diskutiert werden [10, 11, 114, 116, 118, 123, 124, 126, 127].

#### *4.3.3.5 DAPI*

DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol) bindet spezifisch DNA und bildet einen fluoreszierenden Komplex [128]. Es ist gut zur Markierung von DNA und somit Zellkernen geeignet [129]. Dabei ist die Stärke der Färbung abhängig von der Menge an DNA im jeweiligen Zellkern [130]. Diese Fluoreszenzfärbung kann verwendet werden, um mittels Techniken wie beispielweise Wasserscheidealgorithmen die einzelnen Zellkerne automatisiert zu erkennen [131].

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Geräte und Zubehör

Tabelle 1 Zusammenstellung der verwendeten Geräte und Materialien

Gerät	Firma	Modell	Modell-/ Katalognummer
Feinwaage	Sartorius	Extend	BD ED 100
Polypropylen Röhrchen	Greiner Bio-One	Cellstar Tubes 15ml	188271
Mikroreaktionsgefäße	Greiner Bio-One	Reaktionsgefäß 1,5ml	618201
pH-Meter	Schott Instruments	Lab 850	10709784
Pipette	Eppendorf	Eppendorf Research 1000 µl (variabel)	3111 000.165
Pipette	Eppendorf	Eppendorf Research 100 µl (variabel)	3111 000.149
Pipette	Eppendorf	Eppendorf Research 10 µl (variabel)	3111 000.122
Pipettenspitze	Tip One	1000 µl blue graduated tip	S1111-6701
Pipettenspitze	Tip One	200 µl yellow tip	S1111-0706
Pipettenspitze	Tip One	10/20 µl XL graduated tip	S1110-3700
Magnetrührer	Heidolph	MR3000	504-00011-00
Thermomixer	Eppendorf	Thermomixer Compact	5350 000.013
Waage	Ohaus	Adventurer Pro	AV2101
Wärmeschrank	Memmert (Schwabach)	TV-40u	770633

### 5.1.2 Primärantikörper

Tabelle 2 Primärantikörper

Antigen	Spezies	Firma	Bezeichnung / Katalognummer	Verdünnung	Puffer
CA9	Rabbit monoclonal	Abcam	EPR4151(2), ab108351	1:200	Tris/ EDTA pH 9
CD73	Rabbit monoclonal	Cell Signaling Technology	D7F9A, #13160	1:100	Citrat pH 6
ENT1	Rabbit monoclonal	Abcam	SP120, ab182023	1:50	Tris/ EDTA pH 9
FoxP3	Rabbit monoclonal	Cellsignal	D2W8E, #98377	1:50	Citrat pH 6
Pan Zytokeratin	Mouse monoclonal	Biocare Medical	AE1/AE3+8/18, CM 162 B	1:100	Tris/ EDTA pH 9

### 5.1.3 Sekundärantikörper

Tabelle 3 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Zielspezies	Firma	Katalognummer
SuperPicture (Polymer Detection kit)	Rabbit	Life Technologies GmbH	879263
SuperPicture (Polymer Detection kit)	Mouse	Life Technologies GmbH	879163

Die Sekundärantikörper werden unverdünnt verwendet.

#### 5.1.4 Fluorochrome

Tabelle 4 Fluorochrome

Fluorochrom	Firma	Verdünnung	Katalognummer
Alexa 546 Tyramide	Thermo Fisher Scientific	1:100	B40954
Cyanine 3 Plus	Perkin Elmer	1:50	NEL744001KT
Cyanine 5 Plus	Perkin Elmer	1:50	NEL745E001KT
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol, Dihydrochlorid)	Thermo Fisher Scientific	1:2000	D1306
FITC (Fluorescein isothiocyanate)	Thermo Fisher Scientific	1:250	46410

#### 5.1.5 Puffer und Lösungen

Das Blocking Medium (Dako Antibody Diluent) wurde für eine Erhöhung der Spezifität der Färbung verwendet. Folgende Pufferlösungen sind für den Färbeprozess notwendig: TBS-T, Citrat (pH 6), Tris/EDTA (pH 9), PBS. Zur Reduktion der Autofluoreszenz wurde eine Kupfersulfat-Ammoniumacetat-Lösung (pH5) verwendet.

#### 5.1.6 Präparate

Nach Etablierung der Methodik der Interaktionsanalyse wurde eine Proof-of-Concept-Analyse an 12 Präparaten von Plattenepithelkarzinomen verschiedener Ursprungsgewebe der Kopf-Hals-Region

durchgeführt. Zuerst erfolgte die Färbung durch Multikanal-Immunfluoreszenztechnik, dann die Digitalisierung als Whole-Slide-Scans. Beispiele der angefärbten Präparate sind in Abbildung 14, Abbildung 15 und Abbildung 36 zu sehen.

Zudem wurde der Microarray HN801a von der Firma US Biomax Inc. verwendet, auf dem 80 Gewebeschnitte (Spots) von 40 Patienten aufgetragen sind, von jedem Patienten stammen also 2 Präparate. Die ersten 60 der enthaltenen Spots zeigen Ausschnitte aus Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region, die restlichen Spots normales Gewebe. Es handelt sich bei den malignen Tumoren um 16 Paare von Präparaten aus dem Larynx, 5 Paare aus der Nase und 9 Paare aus der Zunge. Da

die Beurteilung von Normalgewebe nicht Gegenstand der Untersuchung dieser Arbeit war, wurden nur die Spots A1 bis F10 berücksichtigt, die Tumorgewebe enthalten. Der Durchmesser der Spots beträgt 1,5 mm und die Dicke 5 µm. Klinische Daten zu den Präparaten stehen nicht zur Verfügung. Eine Übersicht des angefärbten Microarrays ist in Abbildung 16 gezeigt.

## **5.2 Methoden**

### *5.2.1 Immunfluoreszenzfärbung*

Die Färbung der Präparate erfolgte nach dem Protokoll der Arbeitsgruppe [1], welches eine Modifikation des ursprünglichen Protokolls von Tóth und Mezey [2] darstellt. Sie beruht auf der tyramidbasierten Signalamplifikation, welche die Erkennung von sehr schwachen Signalen und somit die Untersuchung auch nur in geringem Maße exprimierter Marker in den Tumorschnitten möglich macht. Durch Verwendung der Mikrowelle wird der mehrfache Einsatz von Antikörpern einer identischen Spezies möglich, da zwischen den einzelnen Färbezyklen der Proteinanteil der Antikörper soweit denaturiert wird, dass Sekundärantikörper aus dem nächsten Zyklus nicht mehr an die Antikörper des vorherigen Färbungsablaufes binden. Die Limitation in dieser Färbemethode besteht also in erster Linie in der Wahl der Fluorochrome, deren Spektren weit genug voneinander entfernt sein müssen, damit sie unter Verwendung verfügbarer Filtersätze mit guter Signaltrennung differenziert werden können.

Zur Markierung der Marker wurde eine Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbung an Paraffinschnitten aus der Kopf-Hals-Region angewandt. Dabei kamen, wie bereits erläutert, DAPI sowie Antikörper gegen CA9, CD73 und ENT-1 zum Einsatz. In einer weiteren Färbeserie an Schnitten aus den gleichen Präparaten wurden dann DAPI sowie Antikörper gegen CA9, Pan-Zytokeratin und FoxP3 verwendet. Diese Färbung wurde auch an einem Tumormikroarray angewendet, der Ausschnitte aus Tumoren der Kopf-Hals-Region enthielt.

#### *5.2.1.1 Entparaffinierung*

Zur Entparaffinierung wurden die Präparate dreimal für je 10 Minuten in Xylol geschwenkt. Dann durchliefen sie eine absteigende Ethanolreihe in den Konzentrationen 100% für 5 Minuten, 96% ebenfalls für 5 Minuten und 70% für 2



Minuten. Hierdurch wurden die Präparate entparaffiniert. Zur Reinigung folgte eine Spülung in Aqua destillata und TBS-T für jeweils 2 Minuten.

#### *5.2.1.2 Antigendemaskierung und endogene Peroxidaseaktivität*

Die Antigendemaskierung erfolgte durch Kochen in der Mikrowelle. Je nach Primärantikörper ist auf den richtigen Puffer zu achten, wobei hier im Durchlauf mit CD73 und FoxP3 Citrat (pH 6) und für alle anderen Antikörper Tris/EDTA (pH 9) verwendet wurden. Die Verwendung der Mikrowelle ermöglicht darüber hinaus eine weitestgehende Eliminierung der endogenen Peroxidaseaktivität, die anderenfalls zu Artefakten in der Färbung führen würde. Durch mehrmalige Behandlung bei 800 Watt für ca. 45 Sekunden wurde der Puffer zum Kochen gebracht. Danach wurde für 90 Sekunden bei 800 Watt und schließlich bei 180 Watt für weitere 15 Minuten weitergekocht.

#### *5.2.1.3 Autofluoreszenzbehandlung*

Vor der Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte die Behandlung mit Kupfersulfat (Ammoniumacetat)-Lösung, um die Autofluoreszenz auf dem Präparat zu minimieren. Hierfür wurden die Präparate zunächst zweimal für je 10 Minuten mit PBS gespült und dann für 5 Minuten in Aqua destillata gewaschen. Nun folgte die Behandlung mit Kupfersulfat-Ammoniumacetat-Lösung für 10 Minuten. Danach wurden die Präparate durch 5minütiges Waschen in Aqua destillata, zweimal je 10minütiges Waschen in PBS und einmaliges Waschen in TBS-T gründlich von dem Agens gereinigt.

#### *5.2.1.4 Antikörper*

Um die Spezifität der Färbung zu optimieren, wurde vor dem Primärantikörper das Blocking-Medium aufgetragen, welches 10 Minuten auf dem Schnitt verblieb. Ohne erneutes Waschen wurde dann der Primärantikörper aufgetragen, der wiederum eine Stunde inkubierte. Der Primärantikörper musste zuvor durch Verdünnung der jeweiligen Stammlösung mit sterilem PBS auf gebrauchsfertige Konzentrationen gebracht werden und mindestens eine halbe Stunde bei 27°C und 300rpm im Thermomixer inkubieren. Der Primärantikörper wurde dreimal für je 2 Minuten sorgfältig mit TBS-T abgewaschen und es folgte die Sekundärantikörperbehandlung. Hierbei ist vor allem auf die Spezies des monoklonalen Primärantikörpers zu achten, wobei in dieser Arbeit nur „Rabbit“- und „Mouse“-spezifische Sekundärantikörper zur Verwendung kamen. Der Sekundärantikörper wurde nach einer Einwirkzeit von 10 Minuten wiederum durch dreimaliges Waschen für je 2 Minuten mit TBS-T entfernt.

#### *5.2.1.5 Fluorochrome*

In den für die Ergebnisse dieser Arbeit verwendeten Aufnahmen wurden die Fluorochrome Cy3+, Cy5+, Alexa 546 und FITC verwendet. Auch die Fluorochrome mussten durch unterschiedliche Verdünnungen der jeweiligen Stock-Solutions in Working-Solutions umgewandelt werden. Für Cy3+ und Cy5+ war das Verdünnungsmedium vom Hersteller vorgegeben, im Falle von Alexa 546 und FITC wurde ein eigenes Verdünnungsmedium eingesetzt, in welchem wiederum Wasserstoffperoxid im Verhältnis 1:2000 verdünnt wurde. Das Fluorochrom wirkte für 10 Minuten auf dem Präparat ein und wurde dann wiederum durch dreimaliges Waschen für je 2 Minuten mit TBS-T entfernt.

#### *5.2.1.6 Weitere Färberunden*

Formal schließt die Behandlung mit dem Fluorochrom die Färbung ab und die Auswertung unter dem Mikroskop wäre bereits möglich. Der Vorgang wurde nun von dem Schritt der Demaskierung in der Mikrowelle an mit anderen Primär- und Sekundärantikörpern und anderen Fluorochromen wiederholt, um weitere Antigene anzufärben.

#### *5.2.1.7 DAPI-Kernfärbung*

Nach dem dritten und letzten Durchlauf folgte die Kernfärbung mit DAPI. Auch hier wurde zunächst aus der Stock-Solution und Aqua destillata eine Working-Solution im Verhältnis 1:2000 hergestellt, welche dann auf den Schnitt aufgebracht werden konnte. Nach 10 Minuten wurde das DAPI abgegossen und die Präparate wurden zweimal für je 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen.

#### *5.2.1.8 Eindecken und Digitalisierung*

Abschließend wurden die gefärbten Präparate eingedeckt. Nachdem das Eindeckmedium getrocknet war, wurden die Färbungen unter dem Fluoreszenzmikroskop stichprobenartig beurteilt und die Präparate wurden für die digitale Weiterverarbeitung von MORPHISTO GmbH (Schumannstraße 144, Offenbach am Main) gescannt. Dabei kam der Scanner ZEISS Axio Scan.Z1 zum Einsatz.

#### *5.2.2 Auswertung der Gewebeschnitte*

Zur Auswertung der Gewebeschnitte wurden die eingangs beschriebenen Programme herangezogen, mithilfe derer die Erkennung einzelner Zellen und die Analyse der räumlichen Verteilung möglich ist. Dies waren die Open-Source-Software QuPath und

MosaicSuite. Die Adaptation der Software für den hier erforderlichen Einsatz und die Überprüfung ihrer Praktikabilität für die wissenschaftliche Arbeit waren Hauptaufgaben dieser Dissertation. Auf Grundlagen von QuPath und MosaicSuite wurde in der Literaturdiskussion eingegangen, die Beschreibung der Softwareadaptation und des Proof-of-Concept erfolgt im Ergebnisteil.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Ergebnis der Färbung

#### 6.1.1 Ergebnisse der Markierung

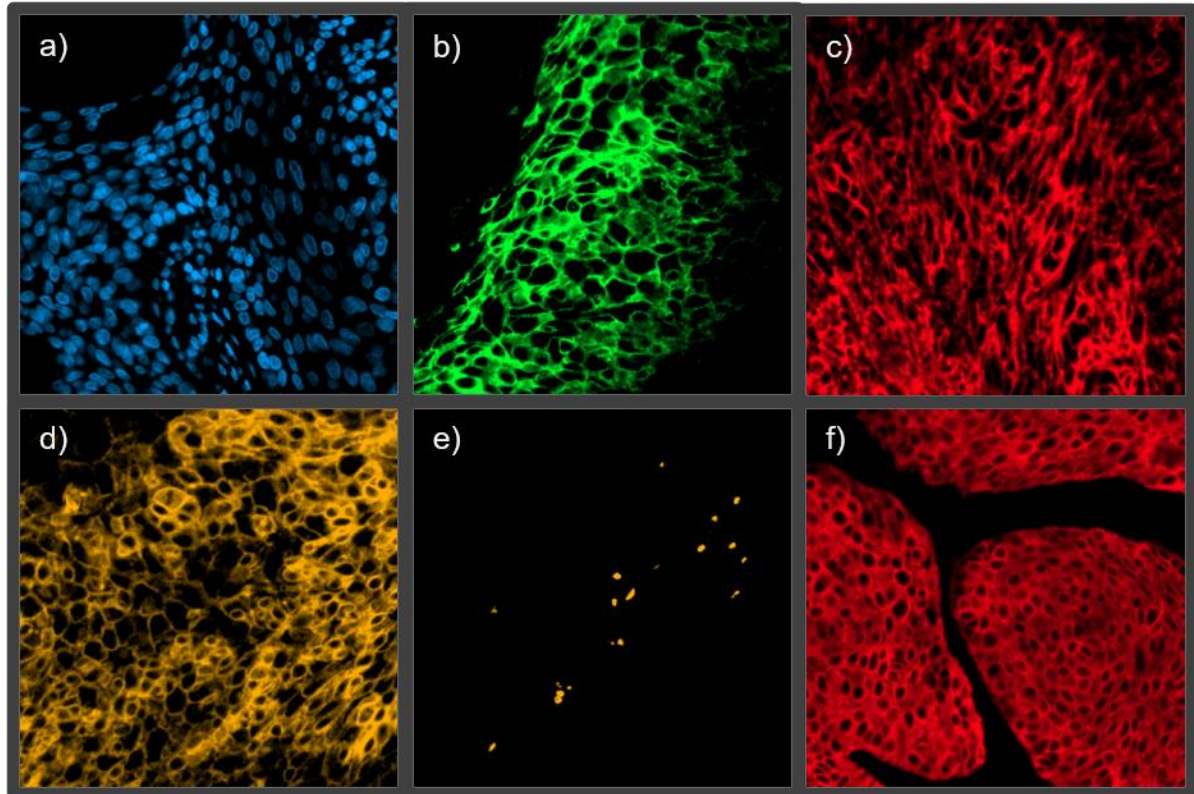


Abbildung 13 Darstellung der verwendeten Marker. a) DAPI; b) CA9; c) CD73; d) ENT1; e) FoxP3; f) Pan-Zytokeratin.

In Abbildung 13 sind repräsentative Abbildungen der erzielten Färberegebnisse dargestellt. Abbildung a zeigt die Zellkernfärbung mit DAPI, die als Basis für die Zellsegmentierung dient. In b, c und d sind CA9, CD73 und ENT1 gefärbt, die entlang der Zellmembran exprimiert sind. Die Färbung von FoxP3 im Zellkern ist in e dargestellt. Das Zytoskelett wird durch Pan-Zytokeratin markiert (f). Diese Färbung dient, da sie das Stroma nicht anfärbt, als Basis für die Tumor-Stroma-Klassifikation.

### 6.1.2 Beurteilung der Färbeverfahren der Whole-Slide-Präparate und des Tissue-Microarray

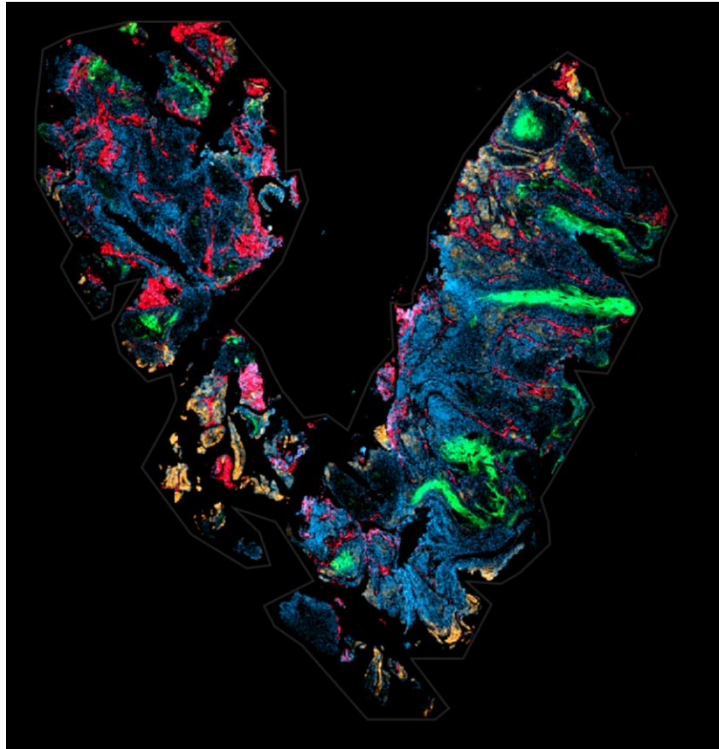


Abbildung 14 Übersicht über einen Whole-Slide-Scan eines Pharynxkarzinoms aus der ersten Serie. CA9 (grün), ENT1 (gelb), CD73 (rot) und DAPI (blau).

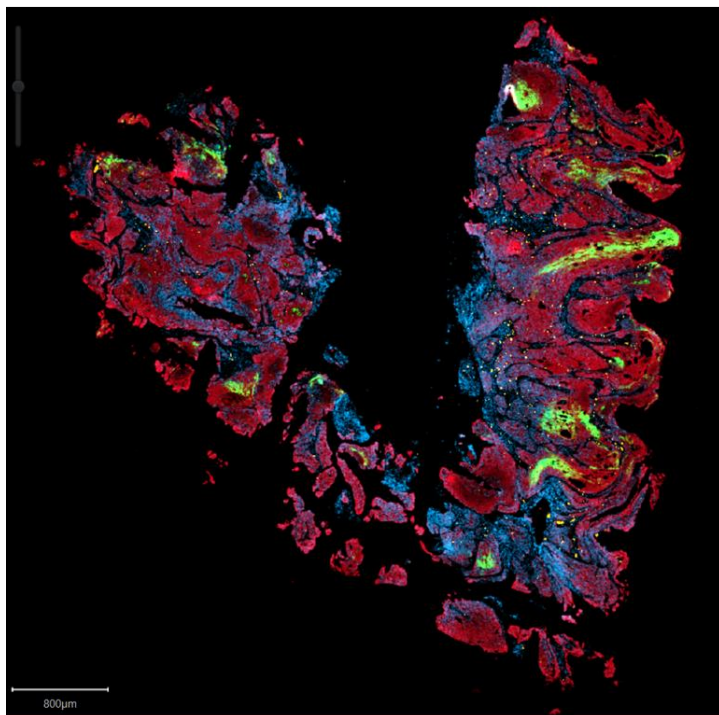


Abbildung 15 Übersicht über einen Whole-Slide-Scan eines weiteren Präparates aus dem gleichen Pharynxkarzinom. CA9 (grün), FoxP3 (gelb), Pan-Zytokeratin (rot) und DAPI (blau).

Als Beispiel für die Ergebnisse der Färbung in der ersten und zweiten Serie sind in Abbildung 14 und Abbildung 15 die Whole-Slide-Scans von zwei Präparaten aus einem Pharynxkarzinom in den entsprechenden Färbungen abgebildet. Das Ergebnis der Färbung des Microarrays in der zweiten Serie ist in Abbildung 16 dargestellt.

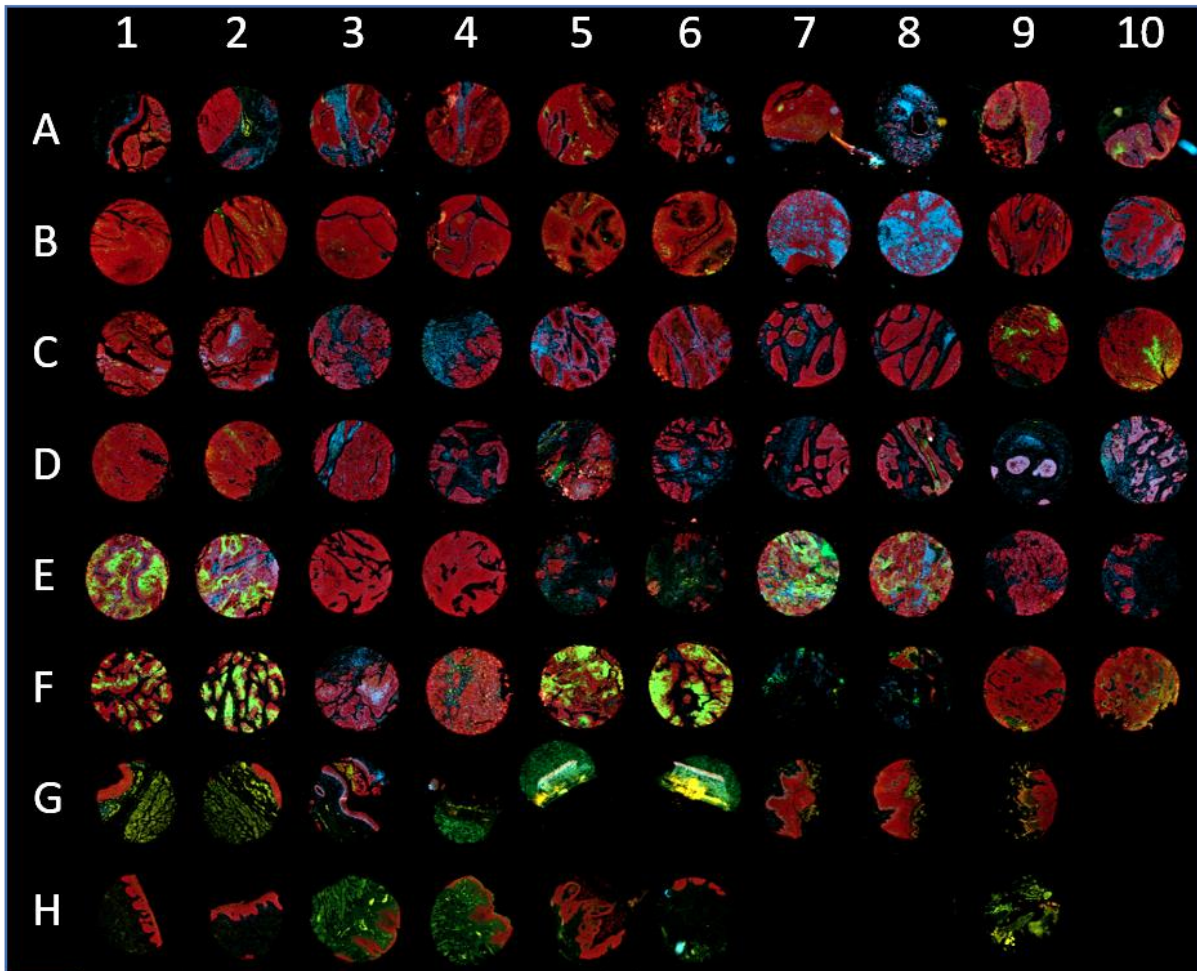


Abbildung 16 Übersichtsaufnahme des gefärbten Tissue-Microarrays. Die Benennung der Spots erfolgt in Zeilen (A-H) und Spalten (1-10).

## 6.2 Weiterentwicklung der Software

### 6.2.1 Einführung in die Funktionsweise

In der Literaturdiskussion wurde unter Potential und Strength (4.2.4.1.1) detailliert auf die Bedeutung der Begriffe, die für das Verständnis der Interaktionsanalyse in MosaicIA notwendig sind, eingegangen. Hier erfolgt nun eine kompakte Darstellung eines vollständigen Analyseablaufs, um den Nutzen der in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Änderungen an der ursprünglichen Methodik zu verdeutlichen.



Die Analyse mittels des Plugins von QuPath und MosaicIA besteht aus mehreren Schritten. Die Auswirkungen der Softwareveränderungen, die zu diesem Analyseablauf führten, werden im Anschluss detailliert erklärt.

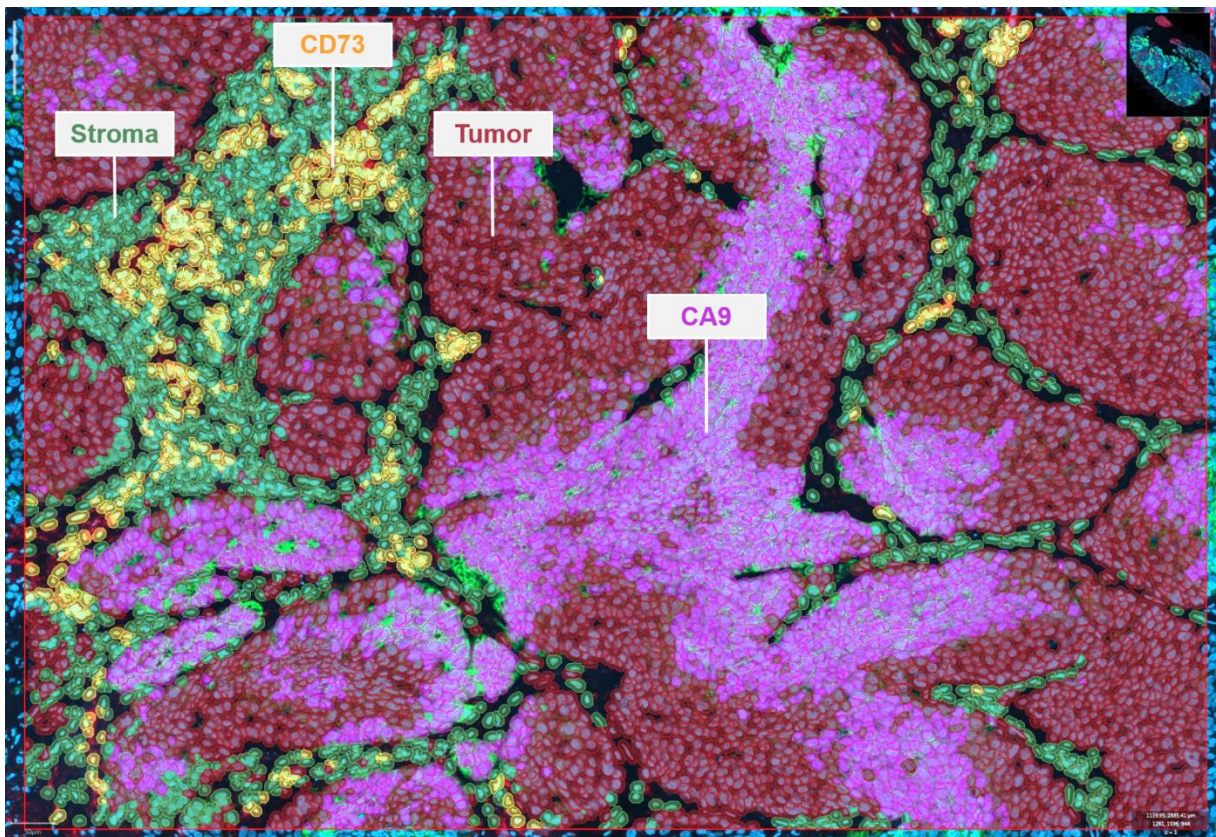


Abbildung 17 Ausschnitt aus dem Whole-Slide-Scan eines Hypopharynxkarzinoms. Mit einem farbigen Overlay versehen sind Stromazellen (grün), Tumorzellen (dunkelrot), CD-73 (gelb) und CA9 (violett).

Als Beispiel einer Interaktionsanalyse mit QuPath und MosaicIA wird hier untersucht, ob CA9+ Zellen (also hypoxische Zellen) mit CD73+ Zellen interagieren (CD73 stellt sich in unseren Untersuchungen als Gefäßmarker im Stroma dar). Der Bildausschnitt (Abbildung 17) aus dem Whole-Slide-Scan eines Hypopharynxkarzinoms zeigt das Ergebnis der Bearbeitung des Tumorpräparates mit QuPath. Hierbei werden im ersten Schritt alle Zellen einzeln erkannt und die Signalintensitäten der verschiedenen Immunfluoreszenzfärbungen erfasst. Im nächsten Schritt erfolgt die Zuordnung dieser Zellen zu unterschiedlichen Klassen anhand von Schwellenwerten in der Signalintensität der Färbung, hier beispielsweise CA9 in violetterm und CD73 in gelbem Overlay. Optional können weitere Einteilungen der Zellen vorgenommen werden, wie beispielsweise die Klassifikation in Tumor- und Stromagewebe mittels Machine-Learning-Algorithmen. Diese Klassifikation liefert vielfältige weitere Informationen über

die Gewebearchitektur, ist jedoch für die Interaktionsanalyse nicht zwingend erforderlich.

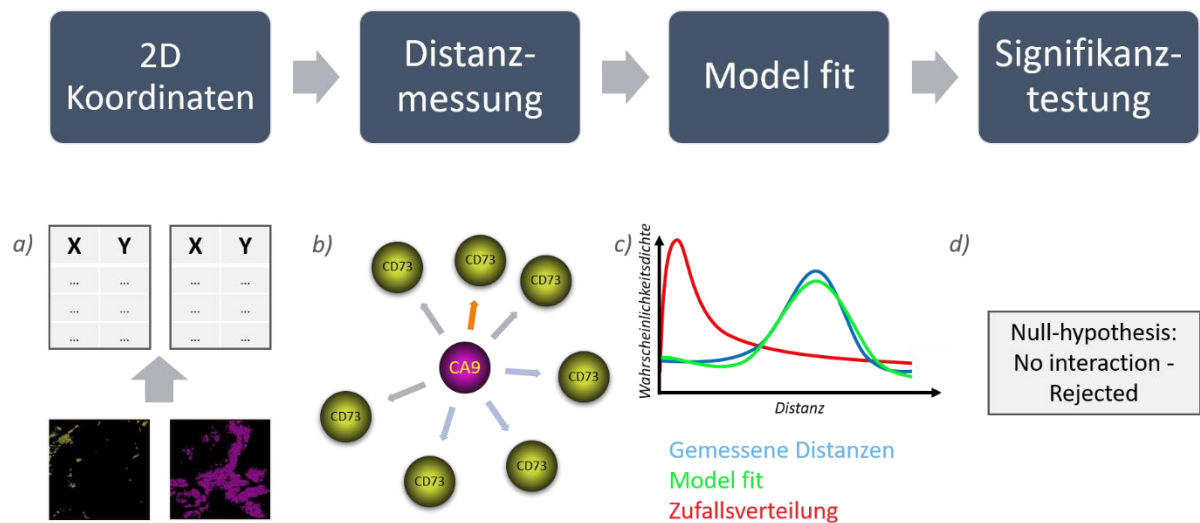


Abbildung 18 Schematische Darstellung des Ablaufes der Interaktionsanalyse. a) bis d) stellen den jeweils darüber aufgeführten Schritt der Analyse bildlich dar.

Nachdem die Zellen in QuPath erkannt, gezählt, räumlich zugeordnet und klassifiziert wurden, erfolgt die weitere Analyse in MosaicIA. Abbildung 18 gibt die essenziellen Schritte in MosaicIA in einem Flussdiagramm (obere Zeile) mit grafischer Darstellung der Einzelschritte a-d jeweils darunter wieder. Hierbei werden die Schritte teilweise analog zur Darstellung in 4.2.4.1.1 nochmals aufgeführt, da sie für das Verständnis der vorgenommenen Änderungen an der Software von zentraler Bedeutung sind. Die Positionsdaten aller Zellen der Klassen „CA9“ und „CD73“ werden in Form von zweidimensionalen Koordinaten (a) als Ausgangspunkt für die Interaktionsanalyse bereitgestellt. Es folgt die Detektion der nächstgelegenen CD73+ Zelle zu jeder CA9+ Zelle (b) und die Distanzmessung zwischen jedem dieser Zellpaare (der geringste Abstand ist durch einen orangenen Pfeil gekennzeichnet). Aus den gemessenen Distanzdaten aller Zellen wird ein Wahrscheinlichkeitsdichte-Entfernungs-Diagramm aufgetragen (c - blaue Kurve), um sie der weiteren Verarbeitung in MosaicIA zugänglich zu machen. Anhand der Zahl der Zellen im Präparat und der ROI wird eine synthetische Zufallsverteilung der Zellen, die Contextkurve, simuliert (c - rote Kurve). Diese wird durch das Model-fit (c - grüne Kurve), eine mithilfe der Potentialkurve modifizierte zufällige Punktverteilung, angenähert. Wie in 4.2.4.1.1 erläutert, spielt hierbei die Strength eine entscheidende Rolle. Die Abweichung des Model-fit zur



Contextkurve stellt somit den Unterschied der beobachteten Zellverteilung von einer zufälligen Verteilung (rote Kurve) dar. Je größer diese Abweichung, desto sicherer handelt es sich um eine nicht zufällige Verteilung der beiden gemessenen Marker und desto relevanter ist somit eine hypothetische Interaktion. Der gemessene Unterschied wird mittels Monte-Carlo-Simulation auf Signifikanz überprüft (d). Es sind Interaktionen denkbar, bei denen die Ableitung der Potentialkurve sowohl Bereiche mit positiven als auch Bereiche mit negativen Werten besitzt. Eine solche Interaktion würde folglich verschieden gerichtete Kräfte zwischen den Zellen in Abhängigkeit von der Distanz vorhersagen. Eine Potentialkurve, deren Ableitung einen solchen Vorzeichenwechsel enthält, wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht angetroffen. Vereinfachend wird im Folgenden daher bei Interaktionen mit negativer Ableitung der Potentialkurve und somit einer negativen Strength von einer negativen, also abstoßenden Interaktion gesprochen. Umgekehrt werden Interaktionen mit positiver Ableitung der Potentialkurve im Folgenden als positiv, also als anziehend bezeichnet.

## 6.2.2 Änderungen am ursprünglichen Workflow

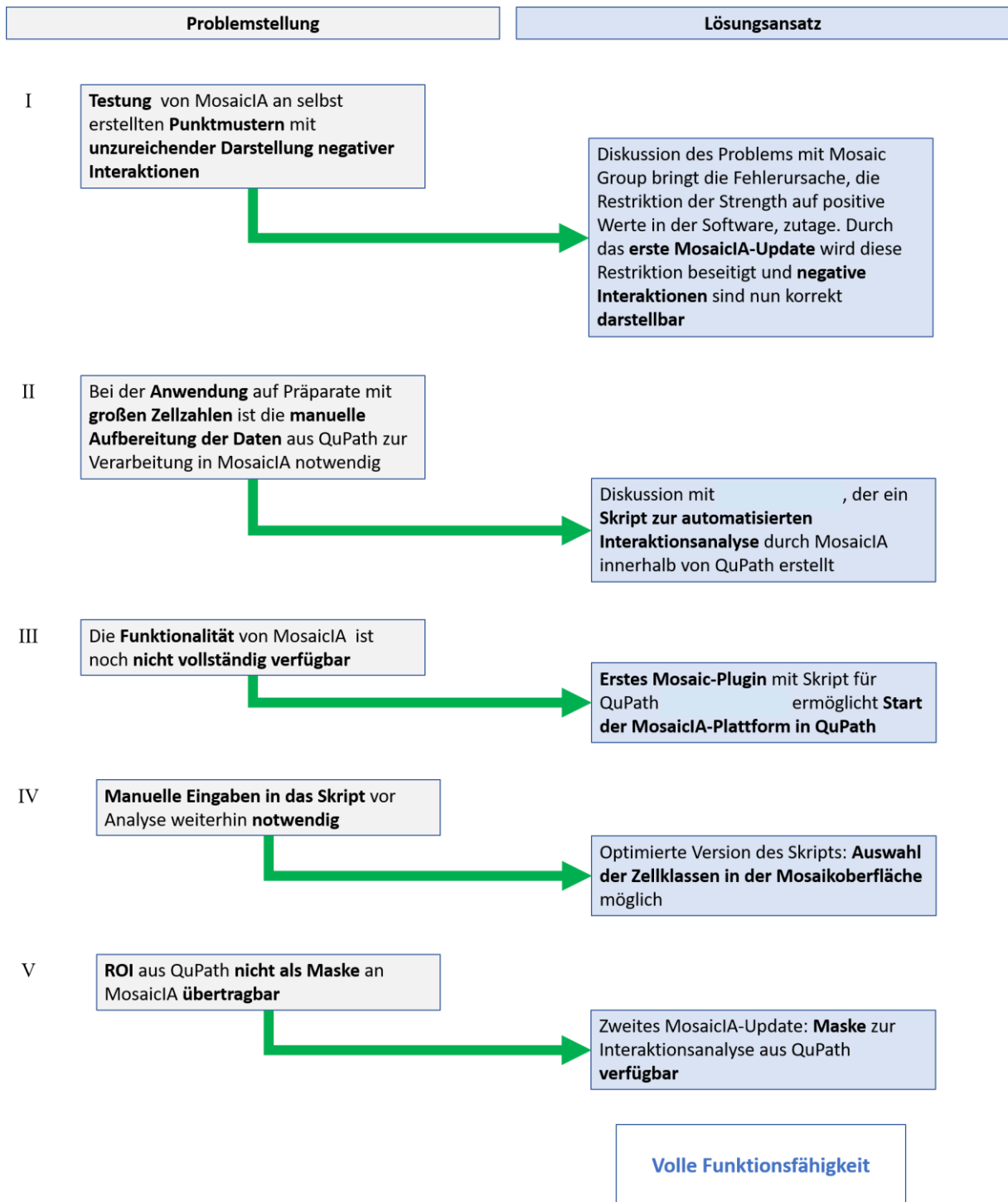


Abbildung 19 Vorgenommene Änderungen am ursprünglichen Workflow. Die Schritte I-V sind in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

### 6.2.2.1 Erstes MosaicIA-Update; Abbildung 19 - I

Zu Beginn der Arbeit mit MosaicIA wurden die Möglichkeiten der Auswertung mit diesem Programm an einigen kleinen Ausschnitten aus Präparaten sowie an selbst erstellten einfachen Punktmustern getestet.

Schon nach wenigen Versuchen wurde klar, dass die in dieser Arbeit betrachteten Zellformationen und Interaktionen (siehe Abbildung 20) zum Teil nicht adäquat von MosaicIA analysiert werden konnten.

Dargestellt ist ein kleiner, repräsentativer Ausschnitt aus dem Whole-Slide-Scan in Abbildung 14, anhand dessen zunächst nur die Funktionsweise von MosaicIA besser verstanden werden sollte. Es zeigte sich, dass in dem gezeigten Wahrscheinlichkeitsdichte-Distanz-Diagramm (Abbildung 21) das Model-fit die beobachtete Distanzverteilung nicht annähernd abbildete, wie es oben exemplarisch gezeigt wurde und wie es

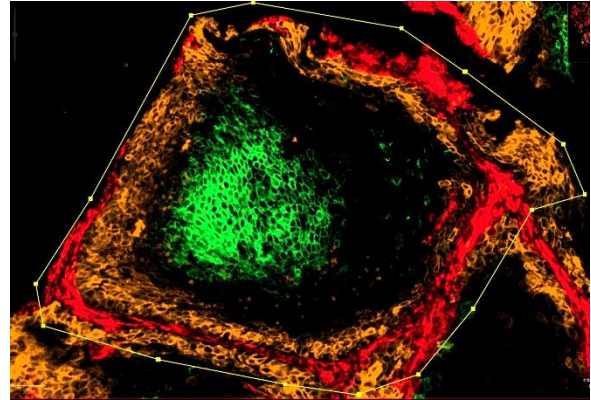


Abbildung 20 Ausschnitt aus dem Whole-Slide-Scan in Abbildung 14. In der Mitte ist CA9 (grün) angefärbt, mit etwas Abstand ist in ENT1 (orange) und außen CD73 (rot) zu erkennen.

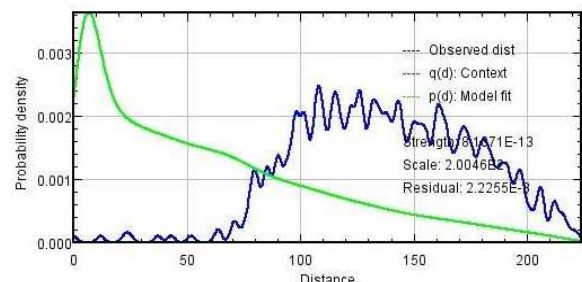


Abbildung 21 Wahrscheinlichkeitsdichte-Distanz-Diagramm zu der Zellverteilung in Abbildung 9. Das Model-fit (grün) gibt die beobachteten Distanzen (blau) nicht wieder.

eigentlich immer der Fall sein sollte. Das Model-fit lag exakt über der Contextkurve, sodass diese in der Abbildung nicht zu sehen ist. Entsprechend konnte in diesem Fall keine signifikante Interaktion gefunden werden, da sich Zufallsverteilung und Annäherung der beobachteten Distanzen exakt entsprachen.

Die Ursache des Problems wurde gemeinsam mit der MOSAIC Group, erörtert. Da dieser einen Fehler in der Software selbst vermutete, betraute er mit der Anpassung der Funktionalität. Nach einigen Tests konnte die Ursache in einer Beschränkung der Strength auf Werte über Null gefunden werden, was grundsätzlich eine negative Potentialkurve mit meist positiver Ableitung zur Folge hat. Das bedeutet, dass nur positive Interaktionen, also meist anziehende Kräfte zwischen Zellen dargestellt und

durch das Model-fit abgebildet werden konnten. Da sich in dem verwendeten Beispiel jedoch ein nicht markierter Bereich zwischen den CA9+ und CD73+ Zellen befindet, handelt es sich offensichtlich um ein Phänomen der Abstoßung. Das resultierende Potential muss also positiv und die daraus abgeleitete Strength negativ sein.

Eine derartige Zellformation war dem Team der MOSAIC Group bislang nicht begegnet und daher die Software nicht für die Auswertung eines solchen Phänomens vorbereitet. Es wurde klar, dass die Strength nicht auf positive Werte beschränkt sein darf, denn dies hätte eine Fülle von dadurch ausgeschlossenen biologischen Interaktionen zur Folge. Die gezeigte Zellverteilung mit eindeutig abstoßender Anordnung war für die Softwareentwickler die erste Interaktion mit positiver Potentialkurve und negativer Strength.

In der Konsequenz wurde vom MosaicSuite-Team ein Update veröffentlicht, was die Limitation auf positive Strength-Werte nicht mehr enthielt. Somit war die Auswertung des gezeigten Präparates nun problemlos möglich (Abbildung 22).

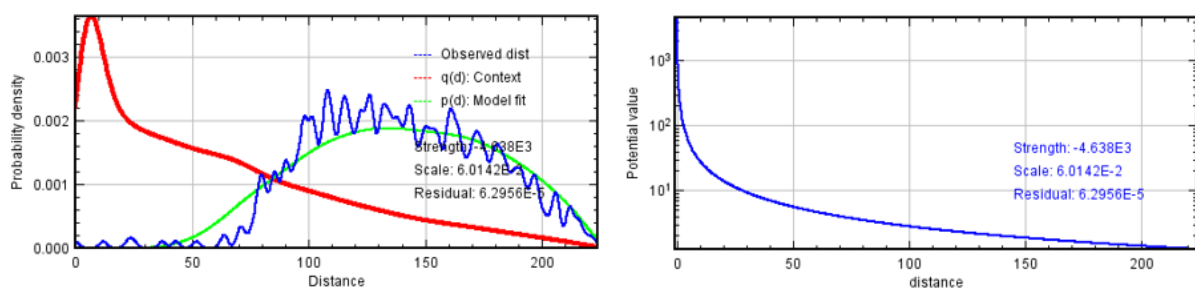


Abbildung 22 Interaktionsanalyse zwischen CD73 und CA9 in dem Ausschnitt aus Abbildung 9. Links das Wahrscheinlichkeitsdichte-Distanz-Diagramm, rechts das Potential-Distanz-Diagramm, das nun ein positives Potential mit negativer Ableitung zeigt.

Wie in Abbildung 22 dargestellt, findet sich nun ein gutes Model-fit und es können aussagekräftige Werte für die Strength berechnet werden. Der Signifikanztest bestätigt die Interaktion durch Ablehnung der Nullhypothese mit 1000 von 1000 Monte-Carlo-Läufen und einem p-Wert von  $<0,001$ .

Wie oben beschrieben, war die Strength vor dem ersten Softwareupdate auf positive Werte beschränkt. Interaktionen mit negativen Werten der Strength, also abstoßende Interaktionen, konnten nicht dargestellt werden.

Die Strength enthält zwei Informationen in Form von Betrag und Vorzeichen. Die Höhe des Betrags gibt, wie in 4.2.4.1.1 näher erläutert, Auskunft über die Höhe der

Potentialkurve und somit über die Stärke der Interaktion zwischen den Punktgruppen. Das Vorzeichen der Strength bestimmt die Richtung des Potentials und kann unter den hier vorgefundenen Umständen vereinfachend als Richtung der Interaktion zwischen den Zellen betrachtet werden. Ist die Strength positiv, so ist die Ableitung der Potentialkurve ebenfalls positiv und es wirkt auf die benachbarten Zellen eine positive Kraft, also eine Anziehung. Die Zellen sind nah beieinander zu finden. Ist die Strength hingegen negativ, ist auch die Ableitung der Potentialkurve und somit die Kraft, die auf die Nachbarzelle wirkt, negativ und die Zellen stoßen sich voneinander ab. Sie werden im Präparat also einen entsprechenden Abstand zueinander aufweisen. Wie in 4.2.4.1.1 erläutert, muss eine negative Strength nicht in allen Fällen mit einer abstoßenden Kraft zwischen den Zellen einhergehen. In der vorliegenden Arbeit trifft diese vereinfachende Ansicht allerdings auf alle untersuchten Präparate zu.

*6.2.2.2 Verknüpfung von QuPath und MosaicSuite - Erstes Skript - Abbildung 19 - II*  
Im Laufe der Arbeit mit QuPath und MosaicIA wurde klar, dass der Aufwand der Anwendung der zwei ursprünglich noch völlig getrennten Programme nicht für große Zahlen von Präparaten wie beispielsweise auf einem Microarray geeignet war. Die Übertragung der Zellkoordinaten aus QuPath in MosaicIA musste für jedes Präparat einzeln und manuell durchgeführt werden und zusätzlich musste eine Umformung der Daten erfolgen. Dies bedeutete viele Einzelschritte und aufwendige Formatierungsarbeiten in zusätzlichen externen Programmen, die jeweils arbeits- und zeitintensiv waren und somit auch eine potenzielle Fehlerquelle darstellten. Insbesondere die manuelle Extraktion der Detection-Measurements aus QuPath und die darauffolgende Selektion und Speicherung der verschiedenen Koordinatensätze erwies sich als umständlich. Es musste ein Weg gefunden werden, die Auswertung der Daten zu automatisieren, um repetitive Arbeitsschritte als Fehlerquelle bei der Anwendung auszuschließen und den Arbeitsablauf zu beschleunigen. Daher war es das Ziel der wissenschaftlichen Kooperation mit den Autoren der jeweiligen Software, eine Form der Implementierung der Interaktionsanalyse durch MosaicIA in QuPath zu erreichen.

Da der Entwickler von QuPath, [C. Schindler](#), Fiji ImageJ intensiv nutzt, hat er in QuPath bereits verschiedene ImageJ-Plugins implementiert. Es ist möglich, ausgewählte Regionen oder Annotationen aus QuPath an ImageJ zu senden und dort weiter zu bearbeiten oder Daten auszulesen. Unter anderem ist in diesem Rahmen

der ROI-Manager einsehbar, der alle für die Analyse relevanten Daten, nämlich Zellklasse sowie X- und Y-Koordinaten jeder Zelle, beinhaltet. schrieb ein Skript für QuPath, das nach Einfügen der auf Interaktion zu prüfenden Klassen direkt die Grafik „Distance distribution“, also das Wahrscheinlichkeitsdichte-Distanz-Diagramm, produzierte. Es handelte sich hierbei jedoch lediglich um einen Versuch, der belegen sollte, dass die Verbindung QuPath und Mosaic prinzipiell möglich ist. Der weitere Ablauf der Interaktionsanalyse wie Model-fit und Signifikanztestung war hierbei noch nicht verfügbar.

#### *6.2.2.3 Erste funktionale Plugin-Version; Abbildung 19 - III*

erstellte ein QuPath-Plugin, das mithilfe eines zusätzlichen QuPath-Skriptes in der Lage war, nach Eingabe der zwei zu untersuchenden Zellklassen eine Interaktionsanalyse zu starten, wie sie im ImageJ-Plugin MosaicIA zu finden ist. Die Software wurde erweitert und der Import der Daten und der Koordinaten direkt aus der Bilddatei von QuPath ermöglicht. Nun waren alle Analyseparameter einstellbar und sowohl die Distanzberechnung als auch die Potentialabschätzung konnten bereits durchgeführt werden. Die Darstellung von „Suggested Kernel“, „Results“, „Observed Distances“ und die Hypothesentestung, die für die vollständige Analyse der Interaktionen erforderlich ist, waren jedoch weiterhin abhängig von ImageJ und in diesem Plugin noch nicht verfügbar.

#### *6.2.2.4 Optimierte Version des Skripts; Abbildung 19 - IV*

Nach gezielter Diskussion dieser Problematik entwickelte eine optimierte Version von Skript, wodurch es nun möglich wurde, nicht nur zwei, sondern alle Zellklassen zu importieren und dort dann zwei gewünschte Klassen direkt für eine Analyse auszuwählen. Damit wurde eine Eingabe der gewünschten Klassen erstmalig überflüssig. Zudem wurde durch die Veränderung des Skripts versucht, die Annotation aus QuPath als Maske für die Analyse an Mosaic zu senden. Dies gelang jedoch zu diesem Zeitpunkt noch nicht.

#### *6.2.2.5 Zweites MosaicIA-Update; Abbildung 19 - V*

Aus der Kooperation resultierte letztlich ein zweites Update der MosaicSuite, sodass die gemeinsam erarbeiteten Funktionen nun unter Verwendung des Skripts in der Standardversion des Programms verfügbar waren und veröffentlicht wurden. Zudem war nun die Übernahme der ausgewählten Annotationen als Maske in die Interaktionsanalyse möglich.

### 6.2.3 Ergebnis der Kooperation

Ergebnis der Kooperation mit der MOSAIC Group und war ein Plugin für QuPath, das unter Zuhilfenahme des im Anhang dargelegten Skripts für die freie Nutzung zugänglich ist und eine verbesserte, anwendungsfreundliche und vollständige Funktionalität bietet. Der Arbeitsaufwand in der Verwendung des Plugins von MosaicIA und QuPath ist um ein Vielfaches geringer als bei der Verwendung der einzelnen Programme und ermöglicht ein zeitsparendes Vorgehen, um komplexe spatiale Interaktionen auf histologischen Präparaten detailliert zu untersuchen. Für QuPath bedeutet das Plugin eine deutliche Erweiterung der Funktionalität, da die Messdaten der Zellen durch die spatiale Interaktionsanalyse in einem sinnvollen räumlichen Kontext betrachtet werden können. MosaicIA ist durch das Plugin nun direkt an ein Programm angebunden, das die einfache und schnelle Verarbeitung großer Zelldatensätze ermöglicht und mittlerweile in der Auswertung von Whole-Slide-Scans zu einem Standard geworden ist. Die Zahl der potenziellen Nutzer von MosaicIA erhöht sich hierdurch deutlich.

## 6.3 Proof-of-Concept-Analyse der HNO-Präparate

### 6.3.1 Verteilung der Marker in den HNO-Präparaten

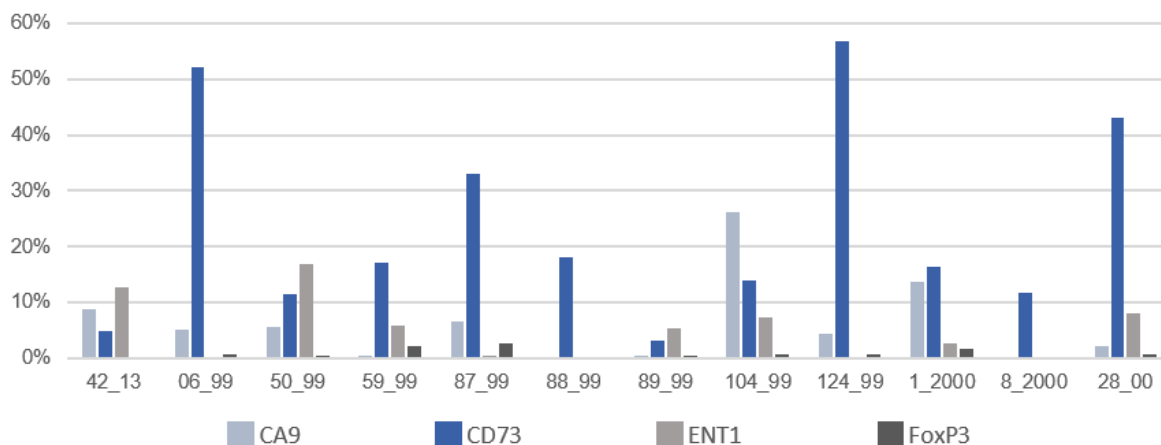


Abbildung 23 Anteil klassifizierter Zellen an der Gesamtheit der Zellen auf dem jeweiligen Präparat. Die Differenz zu 100% entspricht dem Anteil nicht markierter Zellen.

Abbildung 23 zeigt die Anzahl der Zellen, die nach Markierung der 4 molekularen Marker CA9, CD73, ENT1 und FoxP3 und nachfolgender Klassifikation in den 12 untersuchten Whole-Slide-Präparaten der HNO-Serie positiv waren. CD73 war in der

Mehrzahl der Fälle am häufigsten vorhanden, während nur eine geringe Zellzahl FoxP3+ war. Zudem waren in vielen Fällen die meisten Zellen keiner Klasse zuzuordnen.

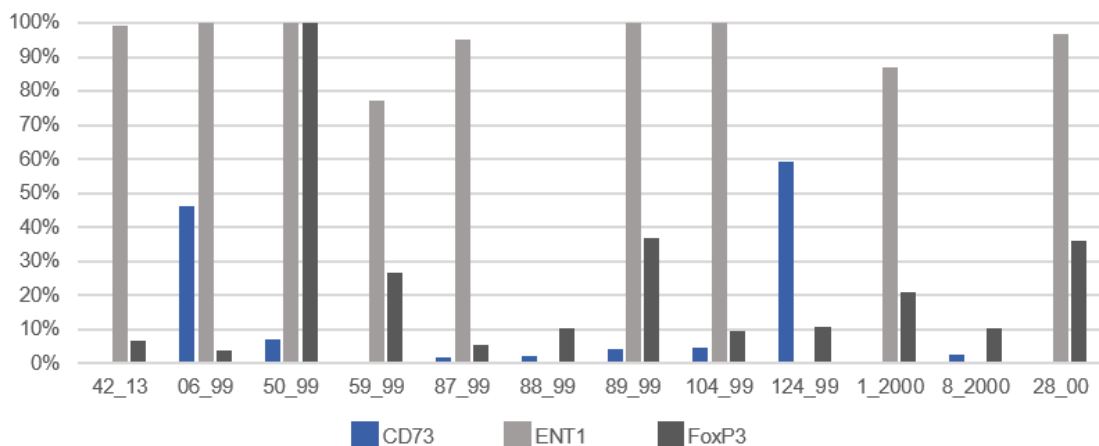


Abbildung 24 Im Tumor lokalisierter Anteil markierter Zellen.

Aus Abbildung 24 wird ersichtlich, wie hoch der Anteil aller markierter Zellen eines Präparates im Tumor ist. CA9 ist grundsätzlich nur, also zu 100%, im Tumor positiv, was die Qualität von CA9 als Marker hypoxischer Tumoreareale in Plattenepithelkarzinomen unterstreicht. Da die Balken von CA9 in jedem Präparat 100% anzeigen, sind sie zugunsten der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. CD73 ist in der Mehrzahl der Fälle nur zu einem kleinen Anteil im Tumorgewebe und somit überwiegend im Stroma nachzuweisen. ENT1 wiederum ist, sofern es in den Präparaten ausgeprägt wird, hauptsächlich im Tumor anzutreffen. FoxP3+ Zellen sind eher im Stroma als im Tumor zu finden. Hierbei zeigt sich Präparat 50\_99 als eine markante Ausnahme, wo alle FoxP3+ Zellen im Tumorgewebe zu finden waren.

### 6.3.2 Interaktionsanalyse: hypoxievermittelte Adenosinproduktion

Im Rahmen der Proof-of-Concept-Analyse wurden in der ersten Färbeserie die Interaktionen zwischen CD73 bzw. ENT1 und Hypoxie (CA9) untersucht. Hierbei sollte geprüft werden, inwiefern die Marker ENT1 und CD73, denen eine wichtige Rolle im Adenosinmetabolismus zugeschrieben wird, untereinander und in Bezug auf Hypoxie räumlich interagieren. In 88\_99, 124\_89 sowie 8\_2000 waren keine ENT1+ Zellen nachweisbar und somit keine Interaktionsanalyse für ENT1 möglich.



In allen folgenden Übersichten über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse erfolgt die Darstellung der Strength der beobachteten Interaktion logarithmisch, um auch eine Strength mit kleinem Betrag deutlich abzubilden. Bei den negativen Interaktionen – hier ist die Strength immer negativ – wurden die Beträge der negativen Werte der Strength logarithmisch aufgetragen. Diese Logarithmen wurden als Negativskala und somit nach links aufgetragen. Signifikante Interaktionen sind durch die schwarze Farbe der Balken gekennzeichnet, während rote Balken nicht signifikante Interaktionen darstellen. Weitere Details der Ergebnisse der Interaktionsanalyse gehen aus den Tabellen im Anhang (Seite 106 ff.) hervor.

### 6.3.2.1 Interaktionsanalyse CD73 – CA9

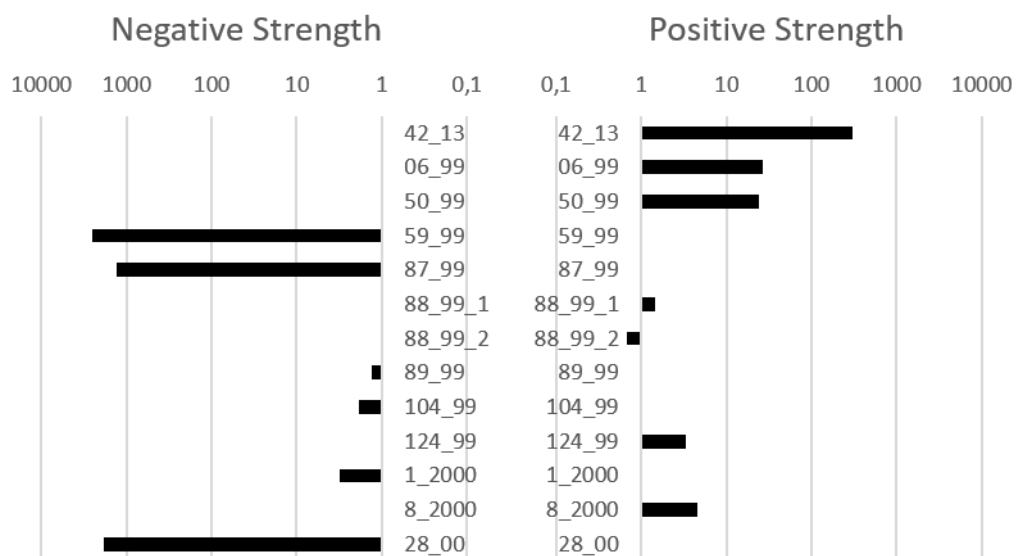


Abbildung 25 Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen CD73 und CA9.

CD73 zeigt in 6 Präparaten einen positiven und in 6 Präparaten einen negativen Bezug zu CA9. Der Schnitt 88\_99 wurde für den Scan in zwei Bereiche aufgeteilt und die Ergebnisse werden gemeinsam betrachtet. Alle Interaktionen waren signifikant.

### 6.3.2.2 Interaktionsanalyse ENT1 – CA9

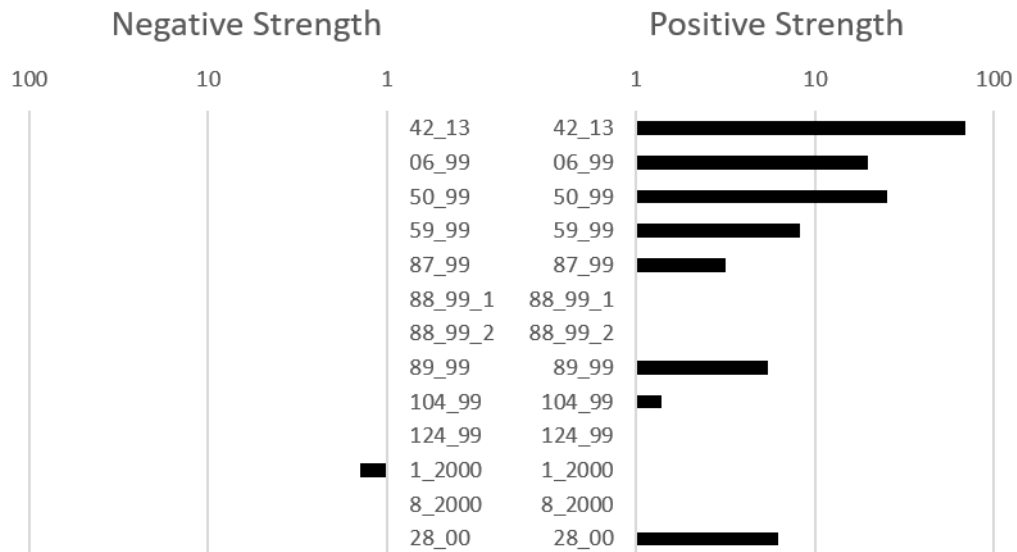


Abbildung 26 Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen ENT1 und CA9.

ENT1 zeigt in 8 Fällen eine positive, in nur einem Fall eine negative Interaktion mit CA9 und somit überwiegend positive Interaktionen. Alle Interaktionen waren signifikant.

### 6.3.2.3 Interaktionsanalyse ENT1 – CD73

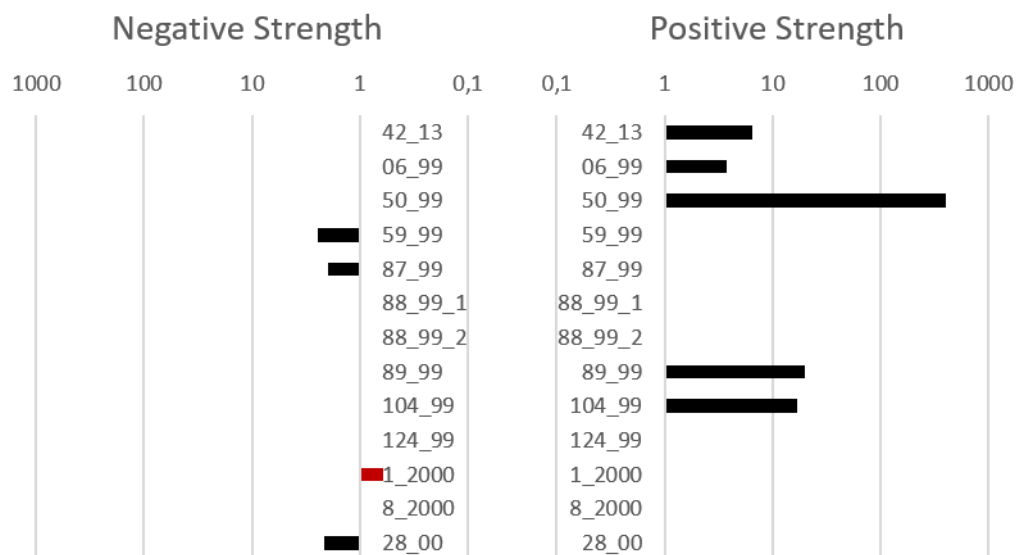


Abbildung 27 Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen ENT1 und CD73.

ENT1 interagiert in 5 Fällen positiv und in 3 Fällen negativ mit CD73, eine negative Interaktion war nicht signifikant.

### 6.3.3 Interaktionsanalyse FoxP3

Da FoxP3 simultan mit CA9 und Pan-Zytokeratin, einem Marker des Zytoskeletts der Tumorzellen, gefärbt war, erfolgte nur in den Präparaten eine Analyse, in denen die jeweiligen Marker positiv waren.

#### 6.3.3.1 Interaktionsanalyse FoxP3 – CA9

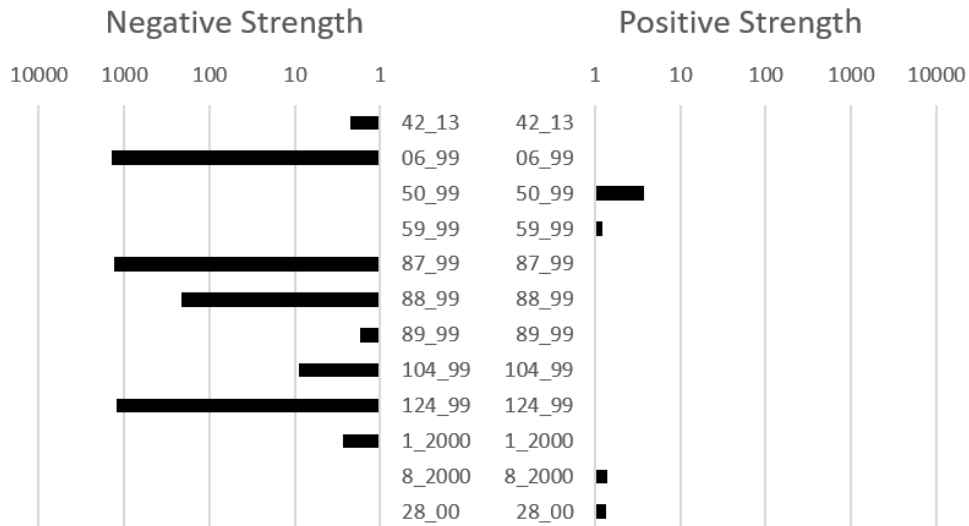


Abbildung 28 Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen FoxP3 und CA9.

Auf 8 Präparaten war eine negative bzw. abstoßende Interaktion, auf 4 eine positive bzw. anziehende Interaktion zwischen FoxP3 und CA9 nachweisbar. Alle nachgewiesenen Interaktionen waren signifikant.

#### 6.3.3.2 Interaktionsanalyse FoxP3 – Tumor

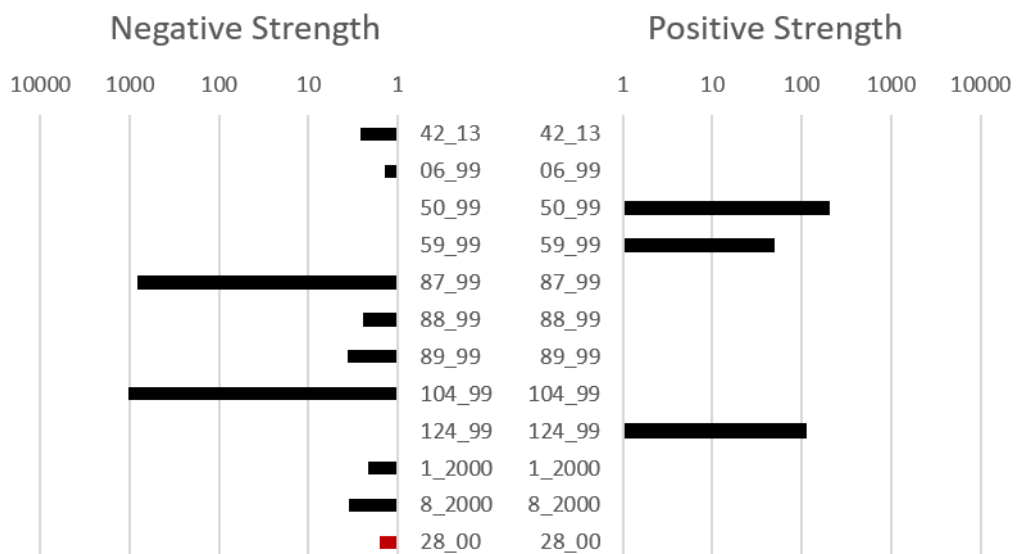


Abbildung 29 Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen FoxP3 und Tumor.

Die Untersuchung der Interaktion von FoxP3 und Tumorzellen ergab in 8 Fällen eine abstoßende Interaktion und in 3 Fällen eine anziehende Interaktion. Auf dem Präparat 28\_00 war die Interaktion nicht signifikant.

### 6.3.3.3 Interaktionsanalyse FoxP3 – Stroma

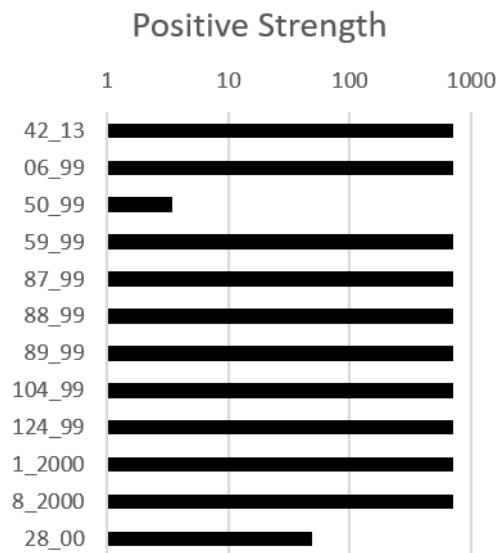


Abbildung 30 Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen FoxP3 und Stroma.

Eine positive Interaktion der FoxP3+ Zellen mit den Zellen des Stromas konnte in allen 12 Präparaten signifikant nachgewiesen werden.

## 6.4 Proof-of-Concept-Analyse des Microarrays

Um die Anwendbarkeit der entwickelten Software an einer größeren Zahl von Präparaten zu überprüfen, wurde die Auswertung eines Tissue-Microarrays vorgenommen. Es handelte sich um 60 Tumorausschnitte, wobei jeweils 2 vom gleichen Tumor stammten. Insgesamt enthält der Microarray also Präparate von 30 verschiedenen Tumoren. 16 waren Larynx-, 5 Nasen-, und 9 Zungenkarzinome. Aufgrund der begrenzten Anzahl in der jeweiligen Entität und fehlender klinischer Daten ist nur eine Beschreibung der Befunde, nicht aber ihre statistische und klinische Interpretation sinnvoll bzw. möglich. Es wird daher hier nur auf die im Rahmen der Proof-of-Concept-Analyse entstandenen Ergebnisse der Interaktionsanalyse eingegangen.

### 6.4.1 Interaktionsanalyse FoxP3 – CA9

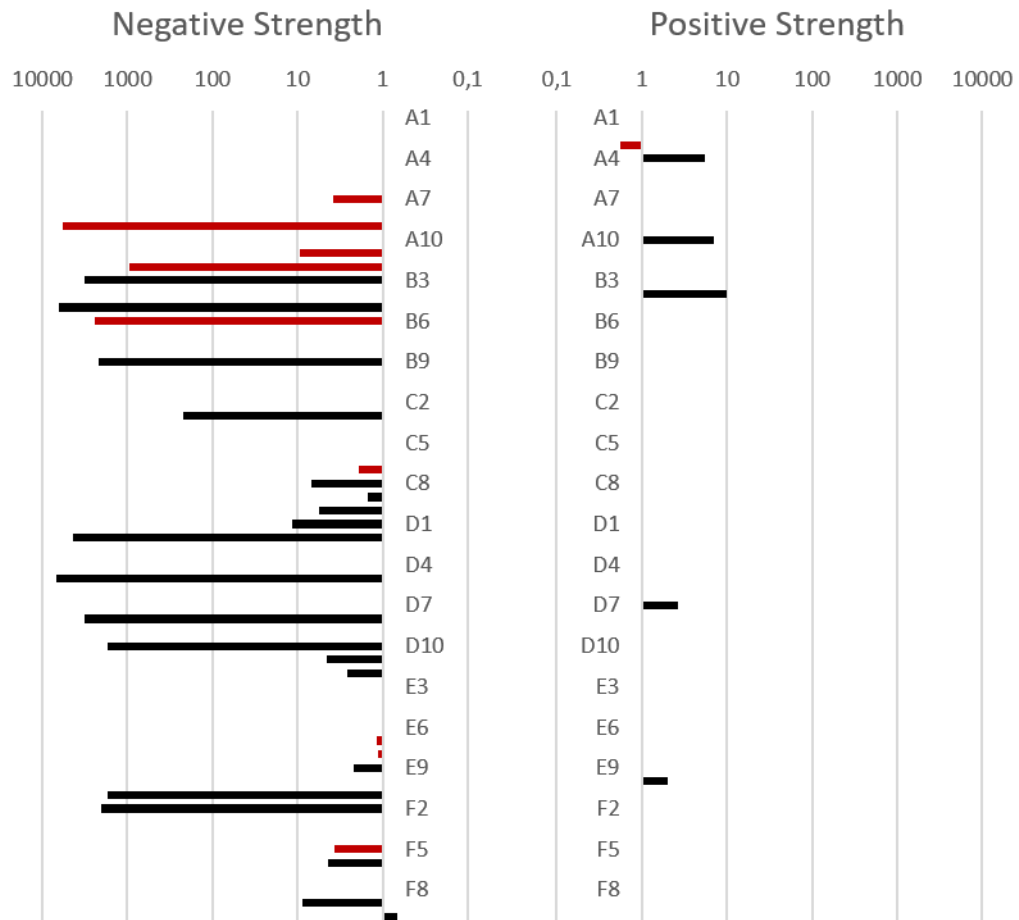


Abbildung 31 Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen FoxP3 und CA9 im Microarray.

Es zeigten sich 5 signifikante positive und 20 signifikante negative sowie 10 nicht signifikante Interaktionen zwischen FoxP3+ Zellen und CA9+ Zellen auf dem Microarray. In den verbleibenden Präparaten konnte aufgrund fehlender FoxP3+ bzw. CA9+ Zellen oder schlechter Qualität der Präparate keine Interaktionsanalyse durchgeführt werden.

### 6.4.2 Interaktionsanalyse FoxP3 – Tumor

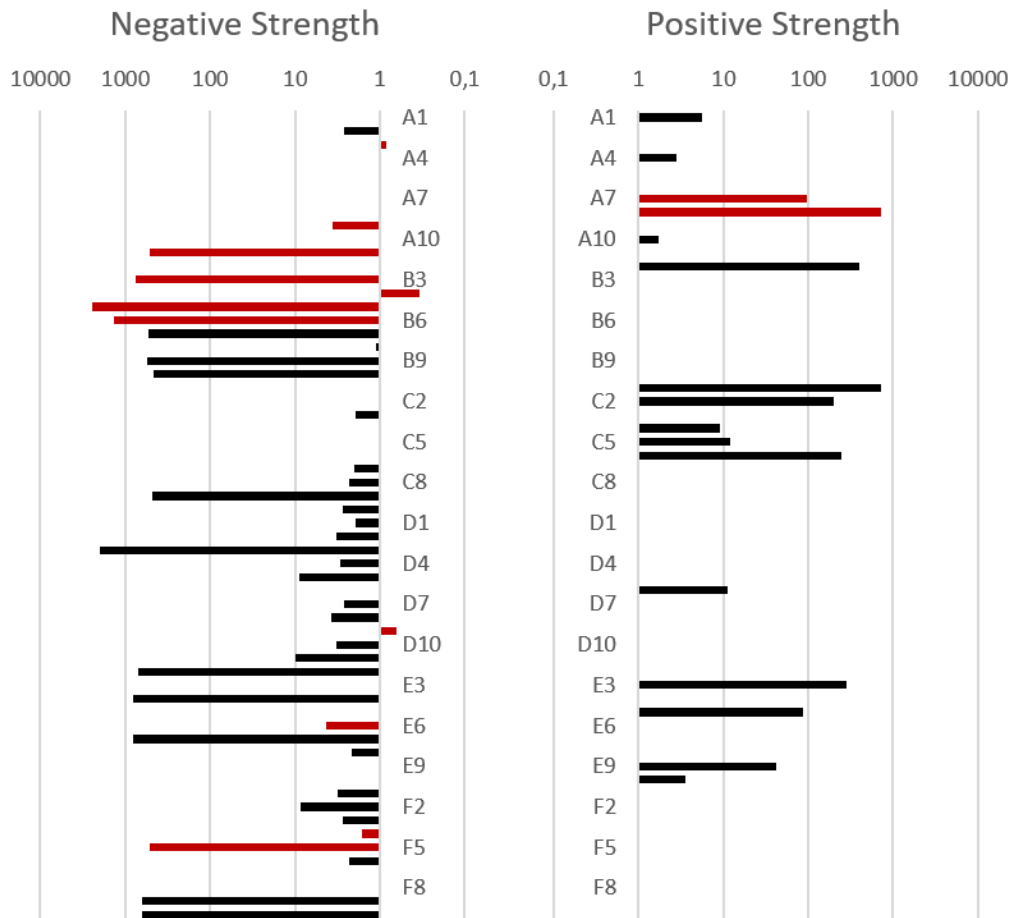


Abbildung 32 Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen FoxP3 und Tumor im Microarray.

Zwischen FoxP3+ Zellen und Tumorzellen konnten in 14 Präparaten signifikante positive Interaktionen festgestellt werden. In 29 Präparaten konnten signifikante negative Interaktionen festgestellt werden. In 13 Fällen waren Interaktionen nicht signifikant, die restlichen Präparate waren wegen fehlendem FoxP3 nicht auswertbar.

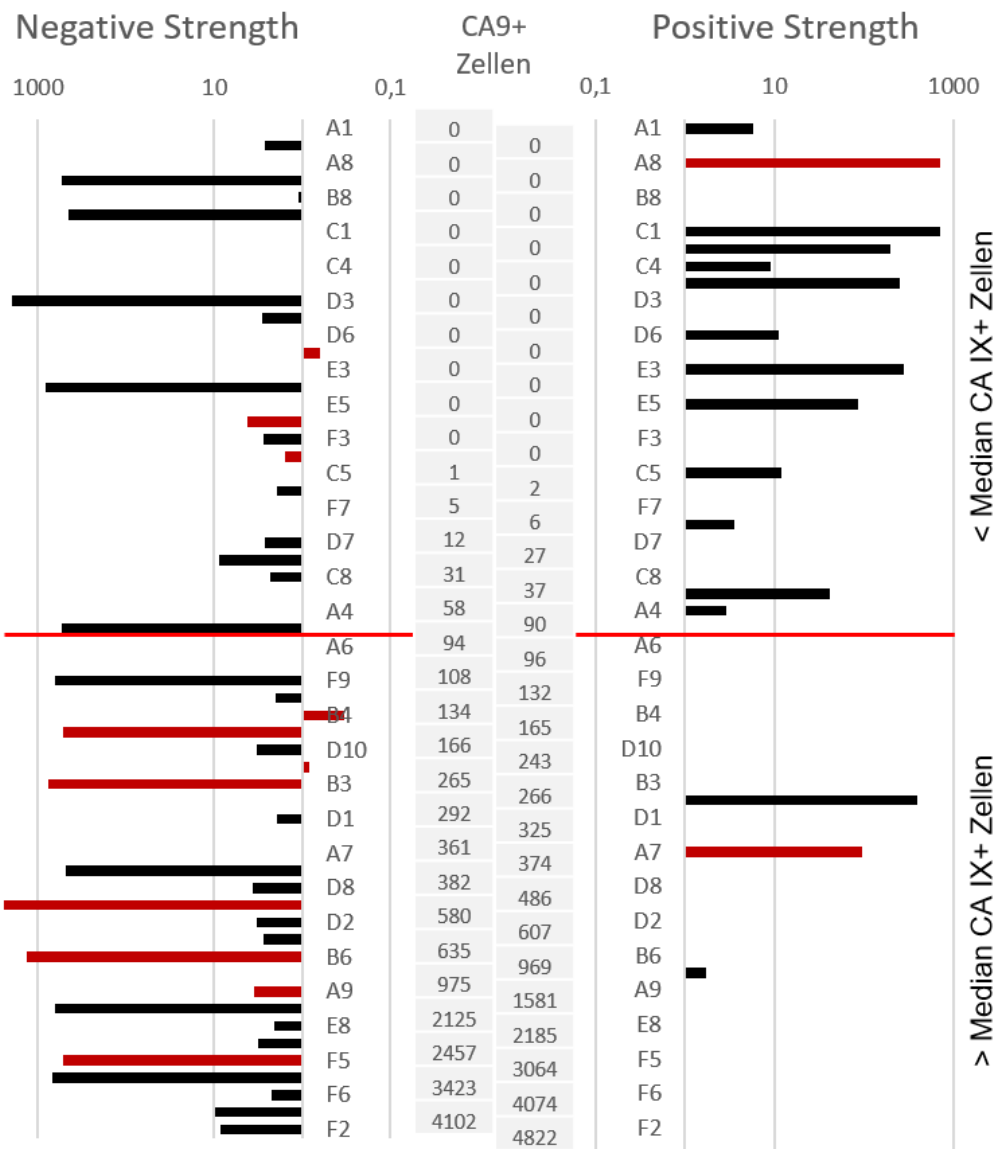


Abbildung 33 Darstellung der Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen FoxP3 und Tumor, aufsteigend geordnet nach Zahl an CA9+ Zellen. Signifikante Interaktionen sind in Schwarz, nicht signifikante Interaktionen in Dunkelrot dargestellt. Die Zahl der CA9+ Zellen in den jeweiligen Spots ist in der Mitte aufgetragen, die rote Linie markiert den Median (92) der CA9+ Zellen.

Abbildung 33 zeigt die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen FoxP3+ Zellen und Tumorzellen, geordnet in aufsteigender Reihenfolge nach Zahl der CA9+ Zellen in den jeweiligen Spots. Die Zahl der CA9+ Zellen ist in der Mitte dargestellt. Da die Anzahl der CA9+ Zellen als verlässlicher Marker des Grades der Hypoxie gilt, wurden die Tumoren in 2 Gruppen unterteilt, je nachdem, ob die Zahl der CA9+ Zellen oberhalb oder unterhalb des Medians lag. In stärker hypoxischen Tumoren zeigen sich fast ausschließlich negative Interaktionen, während in weniger hypoxischen Tumoren die

Interaktionen keine klare Tendenz zeigen (Chi<sup>2</sup>-Test: p=0,011). Für den Chi<sup>2</sup>-Test wurden nur signifikante Ergebnisse der Interaktionsanalyse berücksichtigt.

#### 6.4.3 Interaktionsanalyse FoxP3 – Stroma

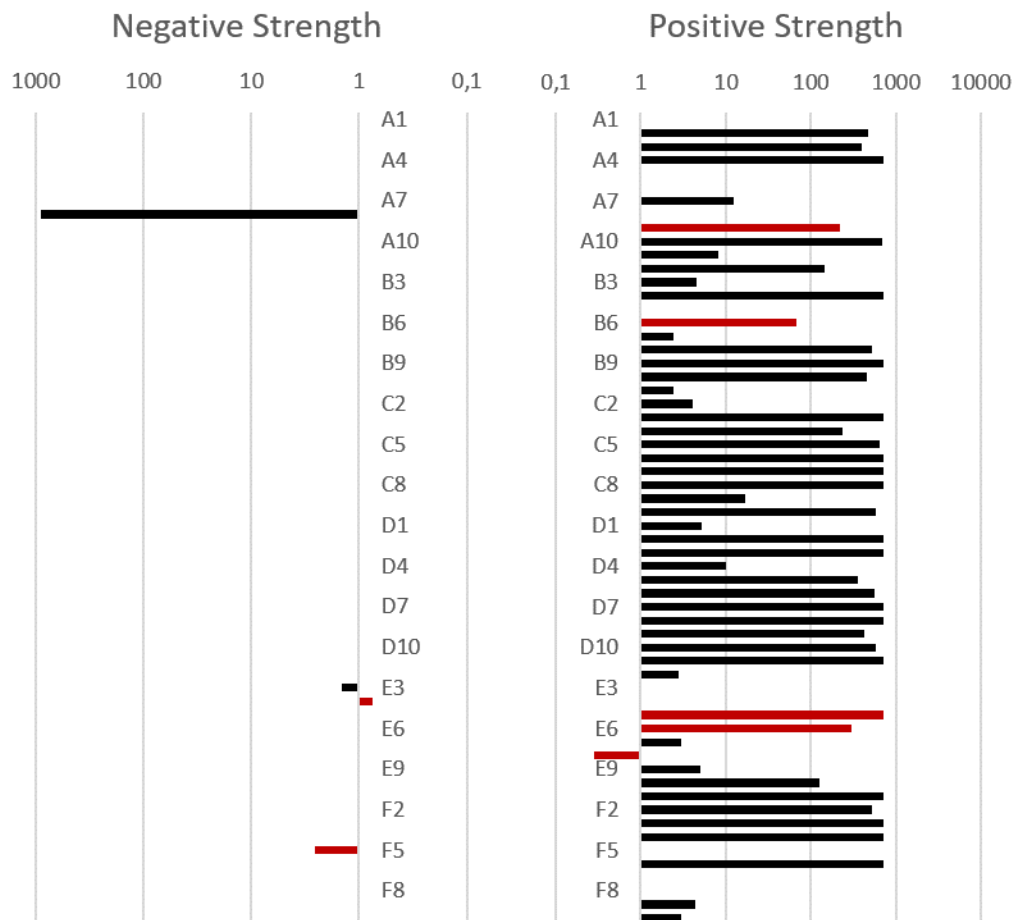


Abbildung 34 Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zwischen FoxP3 und Stroma im Microarray.

In 45 Präparaten konnte zwischen FoxP3+ Zellen und Zellen des Stromas eine signifikante, positive Interaktion festgestellt werden. In 2 Präparaten ließ sich eine signifikante negative Interaktion nachweisen. In 7 Fällen waren die beobachteten Interaktionen nicht signifikant. In den übrigen Spots war aufgrund fehlender FoxP3+ Zellen keine Interaktionsanalyse möglich.



## 7 Diskussion

### 7.1 Färbung

#### 7.1.1 Färbequalität

Unzureichende Qualität der Färbung bedingt fehlerhafte und teilweise unmögliche Auswertung der Präparate. Insbesondere die Zellkernfärbung des Microarrays führte nicht immer zu befriedigenden Ergebnissen. Einige Spots des Microarray sind aufgrund fehlender DAPI-Färbung nicht auswertbar. Es handelt sich hierbei um Präparate gesunden Gewebes, die in der Interaktionsanalyse ohnehin nicht berücksichtigt wurden. Die Ursache für die schlechte Qualität der Färbung liegt wahrscheinlich in der Vorbereitung der Präparate für den Microarray, da die Bedingungen während der Färbung für alle Spots identisch waren und auf allen anderen Bereichen des Tissue-Microarrays die Zellkernfärbung einwandfrei war. Sie stellte den Ausgangspunkt für die Segmentierung der Zellkerne und Zellen dar. Die anderen Marker lieferten gute Färbeergebnisse. Auf die Bedeutung von Artefakten und auf spezifische Aspekte der Färbung der Marker wird nachfolgend in Verbindung mit der Diskussion der Softwarelösung detailliert eingegangen.

Abbildung 35 zeigt eine Zusammenstellung von Besonderheiten und Artefakten, die sich in den Färbungen gezeigt haben, bzw. die durch technische Unzulänglichkeiten entstanden sind. In a ist die Färbung von CD73 in Gefäßwänden zu sehen, die auf vielen Präparaten zu beobachten war. Die Färbung von Erythrozyten war ein häufiges Artefakt, was sowohl in der ENT1-Färbung (b), als auch in der FoxP3-Färbung (c) auftrat. In der FoxP3-Färbung lassen sich Tregs von Erythrozyten durch zusätzliche Darstellung des DAPI-Kanals identifizieren (d), da FoxP3 in Tregs nur im Zellkern exprimiert wird, den Erythrozyten nicht besitzen.

### 7.1.2 Spezifität der Marker

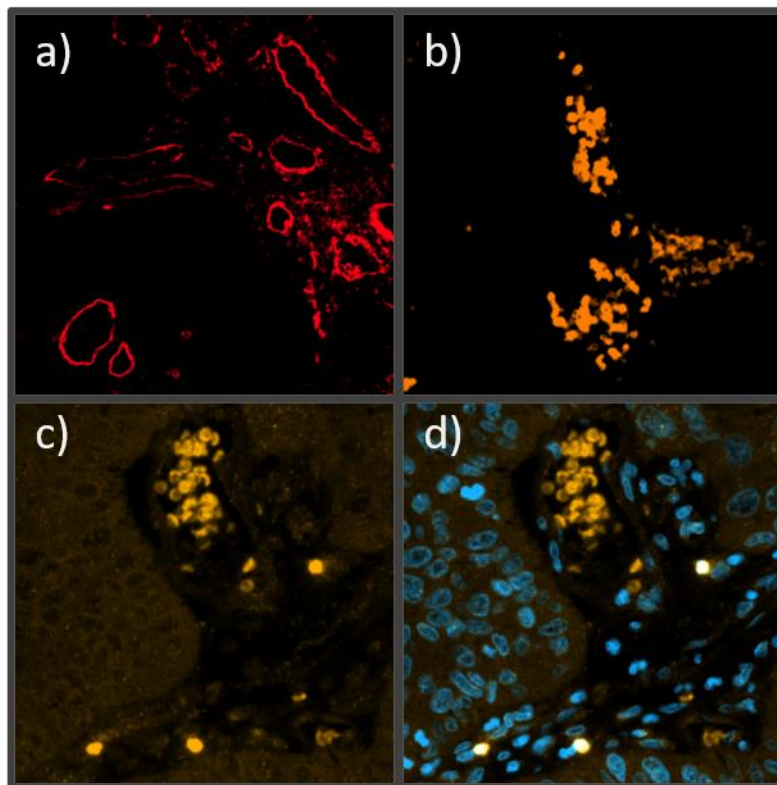


Abbildung 35 Artefakte und Besonderheiten der Färbungen. a) CD73-Färbung; b) ENT1-Färbung; c) FoxP3-Färbung; d) identischer Bildausschnitt zu c) mit zusätzlicher Darstellung des DAPI-Kanals zur Identifikation von realen FoxP3+ Zellen.

#### 7.1.2.1 CA9

CA9 wird auf Zellmembranen von Tumorzellen exprimiert (Abbildung 13, b). Sowohl das Expressionsmuster als auch das inselförmige Auftreten der hypoxischen Zellgruppen im Tumor und die Entfernung der CA9+ Zellen von umliegenden Gefäßen sprechen für eine plausible Färbung hypoxischer Bereiche. CA9 ist somit als Hypoxiemarker geeignet und wird ausschließlich in Tumoren exprimiert.

#### 7.1.2.2 ENT1

Die ENT1-Färbung führte zu einer Markierung der Zellmembranen, was der Beschreibung als Nukleosid-Transporter auf der Zelloberfläche in verschiedenen Geweben entspricht. Die Färbung von Erythrozyten war hierbei ein häufiges Artefakt (siehe Abbildung 35, b), das sich nur durch manuelle Entfernung der falsch erkannten Zellen beheben ließ.

### 7.1.2.3 CD73

CD73 wird laut Literatur ebenfalls auf Zelloberflächen exprimiert [99]. In nicht allen der hier gefärbten Präparate hat sich eine so deutliche Färbung der Zellmembran gezeigt wie bei CA9 oder ENT1. In einigen Fällen war das Ergebnis der Färbung sehr gut (siehe Abbildung 13, c), jedoch gab es auch Bereiche, in denen CD73 nicht klar entlang der Zellmembran nachzuweisen war. Dies könnte auf eine Expression von nicht zellgebundenem CD73 zurückzuführen sein [100]. Zudem war in der Mehrzahl der Präparate CD73 auch in Gefäßen exprimiert (siehe Abbildung 35, a).

### 7.1.2.4 Pan-Zytokeratin

Pan-Zytokeratin färbt alle Anteile des Zytoskeletts der Zellen, sodass jede einzelne epithelartige Zelle gefärbt ist (Abbildung 13, f). Diese Erwartung deckt sich exakt mit den Ergebnissen der Färbung.

### 7.1.2.5 FoxP3

FoxP3 ist in Tregs als Transkriptionsfaktor nur in den Zellkernen zu erwarten. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Färbung (Abbildung 13, e). Allerdings ist die Färbung nicht spezifisch für FoxP3 und verlangt eine nachträgliche Bearbeitung zum Ausschluss von Artefakten, wie zum Beispiel von angefärbten Erythrozyten (Abbildung 35, c und d). Dies kann zum Großteil durch Erhöhung des Thresholds für den Kanal geschehen, da Tregs meist wesentlich stärkere Signalintensitäten für FoxP3 aufweisen als Erythrozyten. Vor allem auf dem Microarray war jedoch eine zusätzliche manuelle Überprüfung der Klassifikation der Zellen erforderlich.

## 7.2 Proof-of-Concept der Softwarelösung

### 7.2.1 Präparatbedingte Probleme

#### 7.2.1.1 Tumorerogenität

Der Primärtumor und seine Metastasen können sich molekularbiologisch sowie morphologisch erheblich unterscheiden [132]. Diese Unterschiede sind das Ergebnis verschiedener Umgebungseinflüsse des Tumormikromilieus auf den Tumor und dessen Anpassungsmechanismen. Ein vielfältiges Mutationsmuster erhöht das maligne Potential des Tumors [133]. Folglich sind klinische Fächer, die auf einzelne Biopsien von Tumoren angewiesen sind, mit dem Problem konfrontiert, nicht mit Sicherheit das volle Maß der Tumoreigenschaften beurteilen zu können. Demzufolge

sind für jede Untersuchung, die nicht auf vollständige Tumorpräparate zurückgreifen kann, die Schwierigkeiten der Tumorheterogenität relevant, so auch für die Arbeit mit Tissue-Microarrays.

Auch Präparate aus dieser Arbeit, zum Beispiel ein Larynxkarzinom (Abbildung 36) unterstreichen die mögliche morphologische Vielfalt innerhalb eines Tumors. Wenn verschiedene Ausprägungsformen auf einem Präparat gemeinsam auftreten, wird ein Charakteristikum eines Abschnittes möglicherweise durch ein Charakteristikum eines anderen maskiert, sodass prägnante Ergebnisse in der Interaktionsanalyse nicht erkennbar sind.

Ein weiteres Problem stellt die unterschiedliche Ausprägung eines Markers innerhalb eines Präparates dar. Die Schwierigkeit bei ungleicher Verteilung der Marker besteht darin, dass stoffwechselaktivere Bereiche, in denen alle Marker vermehrt auftreten, den Anschein einer Co-Lokalisation erwecken. Die Ursache dafür liegt in dem durch das Präparat vorgegebenen größeren Analysebereich, innerhalb dessen die Marker im stoffwechselaktiven Bereich scheinbar ein Cluster bilden.

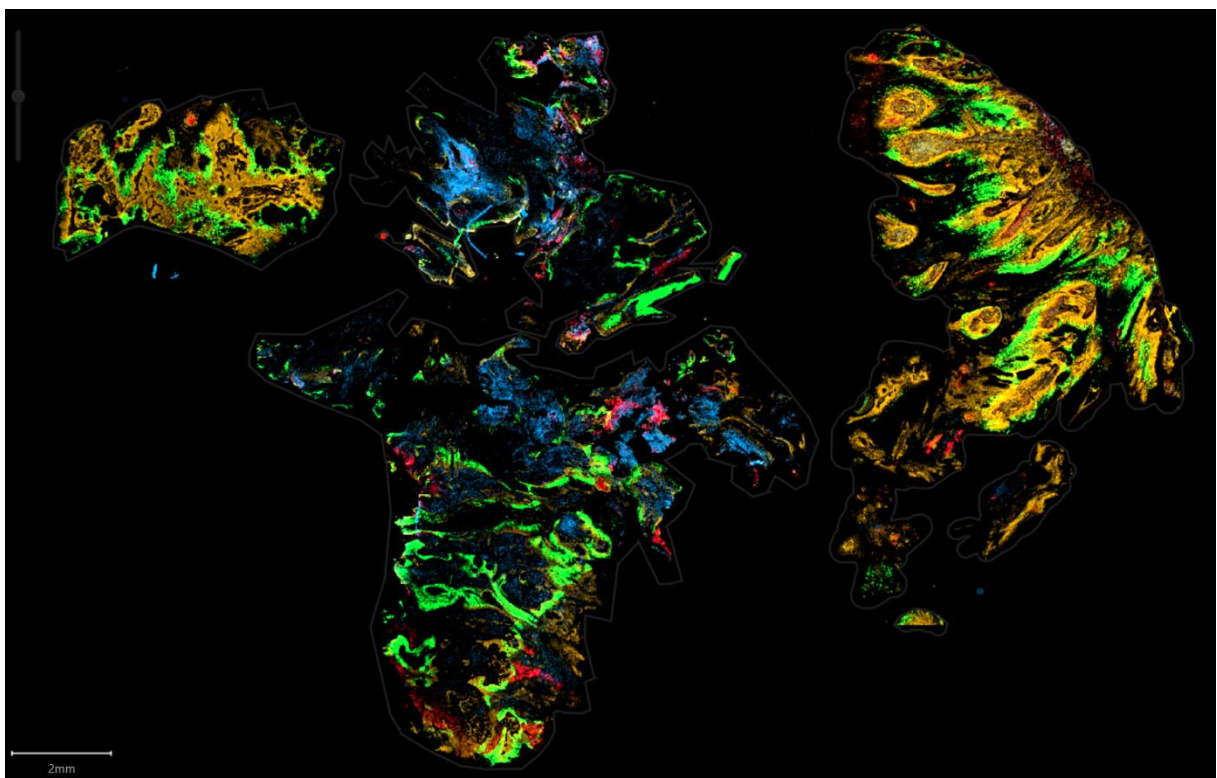


Abbildung 36 Whole-Slide-Scan eines Larynxkarzinoms. Es sind verschiedene Bereiche des Tumors zu erkennen, die sehr unterschiedliche Expressionsmuster der Marker zeigen.

Bei der Auswertung des Microarrays muss in Betracht gezogen werden, dass Strukturen, die für die Beurteilung des Präparates relevant sind, aufgrund der geringen Größe auf dem Ausschnitt fehlen können und dadurch möglicherweise Information verloren geht.

Auf der anderen Seite ist durch den kleineren Ausschnitt und die klare randbildende Form des Präparates eine erhöhte Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Interaktionsanalysen gegeben, da Verzerrungen durch die Maske oder unterschiedlich große Präparate eine weit geringere Rolle spielen als auf großen Tumorpräparaten mit verschiedenen Phänotypen auf dem gleichen Scan.

Es existieren Arbeiten, die eine Co-Lokalisationsanalyse auf Pixelbasis vorstellen, bei der die Co-Lokalisationen in Abhängigkeit von dem Bereich des Präparates ermittelt werden [50]. Somit werden die Interaktionen nicht vor dem Hintergrund des gesamten Präparates untersucht und die Tumorerogenität hat einen geringeren Einfluss auf die Analyse. Die Ergebnisse dieser Technik sind dabei jedoch nur auf die einzelnen Bereiche des Präparates bezogen und die Bewertung dieser Ergebnisse ist fraglich. Zudem ist eine pixelbasierte Auswertungstechnik zur Anwendung an Zellverbänden nicht zielführend.

Alternativ kann aus einem Whole-Slide-Scan eine auffällige oder repräsentative Region für die Analyse ausgewählt werden. Das letztendliche Vorgehen ist nur vor dem Hintergrund des klinischen Kontexts festzulegen und die Sinnhaftigkeit der verschiedenen Ansätze muss individuell beurteilt werden. Vonseiten der Softwarelösungen sind verschiedene Ansätze möglich, eine Überlegenheit eines bestimmten Ansatzes ergibt sich hierbei jedoch nicht.

#### *7.2.1.2 Färbeintensitäten*

Proteine sind nicht in jedem Präparat in der gleichen Menge exprimiert. Neben der Tumorbiologie, die die Expressionsstärke einer Zielstruktur bestimmt, beeinflussen weitere Faktoren das Ergebnis der Multikanal-Immunfluoreszenzfärbung. Die Konzentrationen der Antikörper und der Fluoreszenzfarbstoffe während der verschiedenen Phasen des Färbevorgangs sind wesentlich für das Ergebnis und variieren trotz des einheitlichen Färbungsablaufs zwischen den verschiedenen Präparaten. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Färbeergebnisse ist die Fixierung der Präparate. Die Umstände, unter denen die Fixierung stattgefunden hat, also Dauer, Temperatur und weitere Faktoren, beeinflussen die Intensitäten von Markern, können

allerdings nachträglich nicht mehr korrigiert werden. Dies wird vor allem bei der Betrachtung der Färbung des Mikroarrays deutlich, auf dem die Thresholds für ein biologisch sinnvoll erscheinendes Ergebnis immer wieder unterschiedliche Werte annehmen, obwohl hier die Konzentrationen der Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe identisch waren. Eine Erklärung hierfür wäre eine unterschiedliche Verarbeitung der einzelnen Tumorpräparate bei der Herstellung des Mikroarrays, sodass eine Färbung bei einer bestimmten Inkubationszeit und Konzentration von Reagenzien unterschiedlich starke Fluoreszenzintensitäten zur Folge hat. Eine weitere Ursache für die unterschiedlichen Signalintensitäten könnte im Scan der Präparate liegen, indem die Fluoreszenzsignale verschiedener Spots oder Präparate mit unterschiedlichen Intensitäten angeregt werden.

Diese Problematik ist bei der Betrachtung der Ergebnisse zu berücksichtigen, denn durch die unterschiedlichen Intensitäten ist kein absoluter Vergleich der verschiedenen Präparate möglich. Eine bestimmte Signalstärke auf dem einen Präparat kann bei gleicher Darstellung der Strukturen einer anderen Signalstärke auf einem anderen Präparat entsprechen. So variieren die Thresholds zur Klassifikation der Zellen mitunter um ein Vielfaches zwischen den verschiedenen Präparaten.

### *7.2.1.3 Zellklassifikation*

#### *7.2.1.3.1 Thresholdbestimmung*

Für die Auswertung der Zellverbände mittels Software wie MosaicIA ist es notwendig, die gefärbten Zellen vorher bestimmten Klassen zuzuordnen. Danach beinhaltet jeder weitere Schritt der Analyse keine Information mehr über die Intensität, mit der der Marker auf der jeweiligen Zelle ausgeprägt ist. Es könnte der Eindruck entstehen, dass alle Zellen einer Klasse den betreffenden Marker mit der exakt gleichen Intensität exprimieren, was nicht der Fall ist. Für die objektbasierte Analyse spatialer Interaktionen ist diese binäre Klassifikation jedoch bislang unumgänglich.

Es existieren in der ICCB als mögliche Lösung für dieses Problem verschiedene Interaktionskoeffizienten wie zum Beispiel der Manders Overlap-Coefficient, der die Signalintensitäten unterschiedlich in der Interaktion gewichtet [24]. Techniken der ICCB sind jedoch für die vorliegende Arbeit nicht anwendbar, da eine koordinatenbasierte Auswertung für Zellinteraktionen unumgänglich ist. Zudem sind auch derartige Koeffizienten anfällig für Artefakte und versagen bei technisch schlecht aufgenommenen Bildern mit überhöhten Signalstärken. Weiterhin wird die

Abhängigkeit des Ergebnisses von der Signalstärke mitunter als Schwachpunkt des Manders Overlap-Coefficient angesehen, gerade weil die Intensität von Fluoreszenzmarkern zwischen Präparaten oft nicht ausreichend reproduzierbar ist [4].

Oftmals ist es notwendig, durch Erhöhung des Thresholds Färbeartefakte bei der Klassifikation von der Auswertung auszuschließen. Hintergrundfärbungen und unspezifische Anfärbungen anderer Strukturen, wie zum Beispiel Erythrozyten bei der Färbung von ENT1 und insbesondere FoxP3, müssen ausgeschlossen werden, um die Ergebnisse der Interaktionsanalyse nicht zu beeinträchtigen. Das hat jedoch mitunter zur Folge, dass Zellen, deren Färbeintensität unter dem Threshold zum Ausschluss dieser Artefakte liegen, ebenfalls von der Analyse ausgeschlossen werden. Dieses Problem kann durch manuelle Entfernung von Bereichen, die Artefakte enthalten, gelöst werden, jedoch reduziert dies nur die Menge an Artefakten und ist keine praktikable Lösung für große Zahlen von Präparaten.

Pan-Zytokeratin und FoxP3 lassen durch ihre typische Erscheinung und die leichte Abgrenzung gegen Artefakte eine klare Klassifikation der gefärbten Zellen zu. Zudem ist die Expression dieser Marker meist von hoher Intensität und die Färbung weist geringe Unterschiede zwischen den Präparaten auf.

Bei Markern wie ENT1, CD73 und CA9 hingegen stellt sich das Problem, dass die Expression der gefärbten Proteine in einer weniger klar abgrenzbaren Weise erfolgt. Die Ausprägung dieser Marker erfolgt innerhalb eines Präparates in einem breiten Spektrum von schwach bis stark (siehe 7.2.1.2), sodass es nach der Färbung nicht ohne Weiteres möglich ist, die Zellen dichotom in positiv und negativ aufzuteilen. Die Entscheidung, ob eine Färbung als positiv oder negativ klassifiziert wird, erfolgt dann im Kontext anderer Marker und der Tumorarchitektur. Medianwerte erscheinen auf den ersten Blick als eine gute Möglichkeit, die ansonsten mehr oder weniger willkürliche Bestimmung des Thresholds durch Untersuchende zu objektivieren. Jedoch sind auch diese durch unterschiedliche Gesamtintensitäten auf einem Präparat, aufgrund unterschiedlicher Mengen an Antikörpern, Antigenen oder Fluoreszenzfarbstoff oder durch überdurchschnittlich viele oder wenige Artefakte von Präparat zu Präparat verschieden. Beispielsweise werden Präparate mit viel CA9 einen viel höheren Median oder Mittelwert in dem betreffenden Kanal aufweisen als Präparate mit weniger CA9. Der mathematisch entsprechende Wert als Entscheidungsgrenze kann somit von

Präparat zu Präparat eine biologisch unterschiedliche Grenzwertsetzung zur Folge haben.

Es ist entscheidend, die Thresholds trotz der oben genannten Unterschiede zwischen den Präparaten möglichst gleich auszuwerten. Vor dem Kontext der Untersuchung biologischer Zusammenhänge hat sich in der vorliegenden Arbeit die manuelle Grenzwertsetzung anhand der biologischen Sinnhaftigkeit für jedes einzelne Präparat als am reproduzierbarsten und am praktikabelsten herausgestellt.

Ein negativer Aspekt dieser Technik ist eine geringere Objektivität durch leicht variierende Grenzwerte von Präparat zu Präparat und die menschliche Einschätzung der biologischen Zusammenhänge.

Der Vorteil dieser Methode ist hingegen eine Festlegung der Grenzwerte nächstmöglich dem biologischen Kontext und weitgehend unabhängig von Schwankungen in Intensitäten von Präparat zu Präparat, da sich der Grenzwert an dem resultierenden Erscheinungsbild orientiert. Es wurde so gearbeitet, dass die resultierende Darstellung der Marker in einem biologischen Kontext zwischen den verschiedenen Präparaten möglichst vergleichbar war.

Im Vergleich der Interaktionsanalysen CA9 – FoxP3 und ENT1 – CA9 wird deutlich, dass sich die etablierte Methodik gut für die Untersuchung von dichotom klassifizierbaren Markern (z.B. FoxP3), und somit beispielsweise von Immunzellen, eignet. Bei der Analyse von Markern, die in einem breiten Intensitätsspektrum exprimiert werden (z.B. ENT1), stößt die Methodik jedoch an ihre Grenzen. Hier geht durch die Aufteilung der Zellen, in denen die Färbung der Marker unterschiedlich intensiv sein kann, in nur zwei Klassen (positiv bzw. negativ) ein großer Teil der Information verloren. Dieses Problem wird im folgenden Absatz näher erörtert.

#### *7.2.1.3.2 Reihenfolge der Klassifikation*

Es ist in QuPath bislang nicht möglich, eine Zelle mehreren Klassen zuzuordnen. Ist also eine Zelle durch die Klassifikation einer Klasse zugeteilt, steht sie für weitere Klassifikationen bei einem zweiten gleichzeitig positiven Marker nicht mehr zu Verfügung, ohne die Klasse, in die sie eingeteilt wurde, wieder zu verlassen. Dies ist problematisch, da die Reihenfolge der Klassifikation in Bereichen der Überschneidung von Markern entscheidend für die Einteilung der Zellen in die jeweiligen Klassen ist. Durch diesen Effekt geht der Anteil der für beide Klassen positiven Zellen für eine der



beiden Klassen verloren, nämlich für die zuletzt klassifizierte. Je größer der Anteil der zweifach positiven Zellen, desto größer ist auch dieser Effekt.

Ein Bereich, in dem viele Zellen den Threshold für CA9, aber auch für ENT1 überschreiten, ist in Abbildung 37 dargestellt. Es ist hier nur von der Reihenfolge der Arbeitsschritte abhängig, in welche Klasse diese Zellen eingeteilt werden, da sie sich durch die Zuteilung in eine Klasse nicht mehr im Pool für die Einteilung in weitere Klassen befinden.

In Abbildung 37 c und d sind die Ergebnisse der unterschiedlichen Klassifikationsreihenfolgen gegenübergestellt. Vor allem im linken oberen Bildbereich ist der Effekt deutlich zu erkennen.

Es existieren auch viele Bereiche auf den Präparaten, in denen jede Zelle nur für einen Marker positiv ist, sodass die Marker nicht überlappen (Abbildung 38). Durch die Unterschiede in der Überschneidung der Marker wirkt sich das Problem der Mehrfachklassifikation auf jedes Präparat in unterschiedlichem Maße aus.

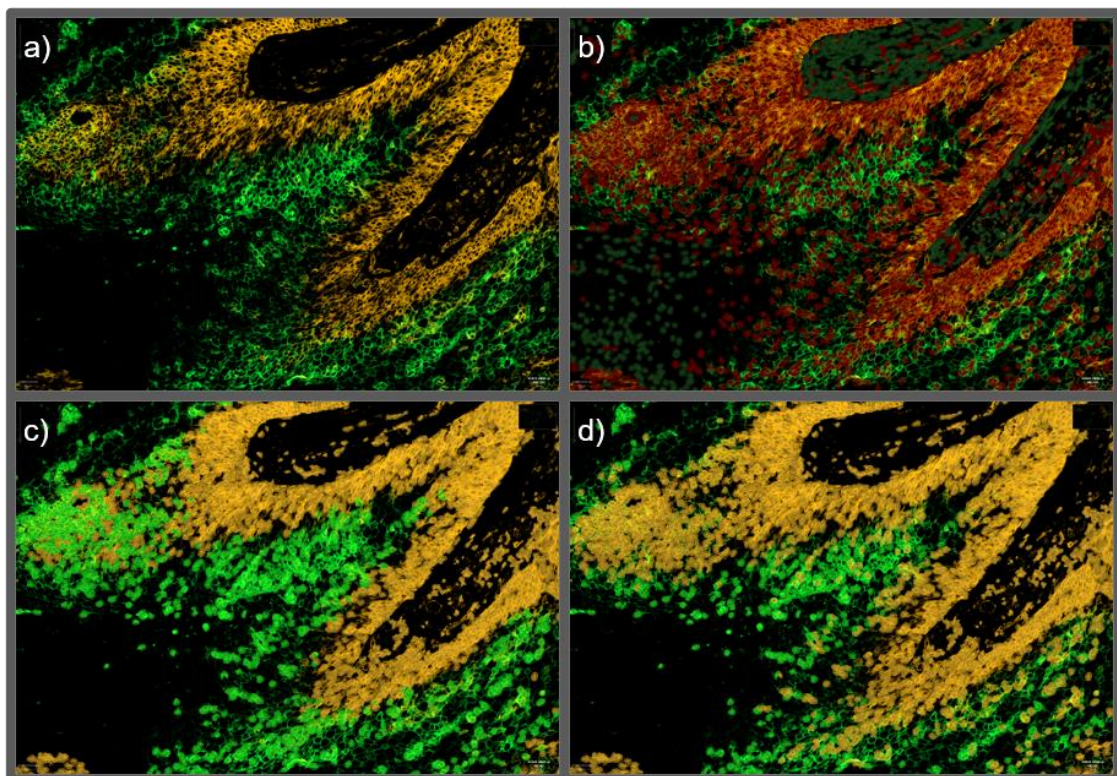


Abbildung 37 Ablauf der Klassifikation der Zellen. a) Darstellung von CA9 (grün) und ENT1 (gelb) ohne Overlay; b) Tumor-Stroma-Klassifikation durch Machine-Learning-Algorithmus, Tumorzellen mit dunkelrotem Overlay, Stromazellen mit dunkelgrünem Overlay; c) Klassifikation der Zellen anhand eines Thresholds, CA9 wurde vor ENT1 klassifiziert; d) Klassifikation in umgekehrter Reihenfolge, ENT1 wurde vor CA9 klassifiziert.

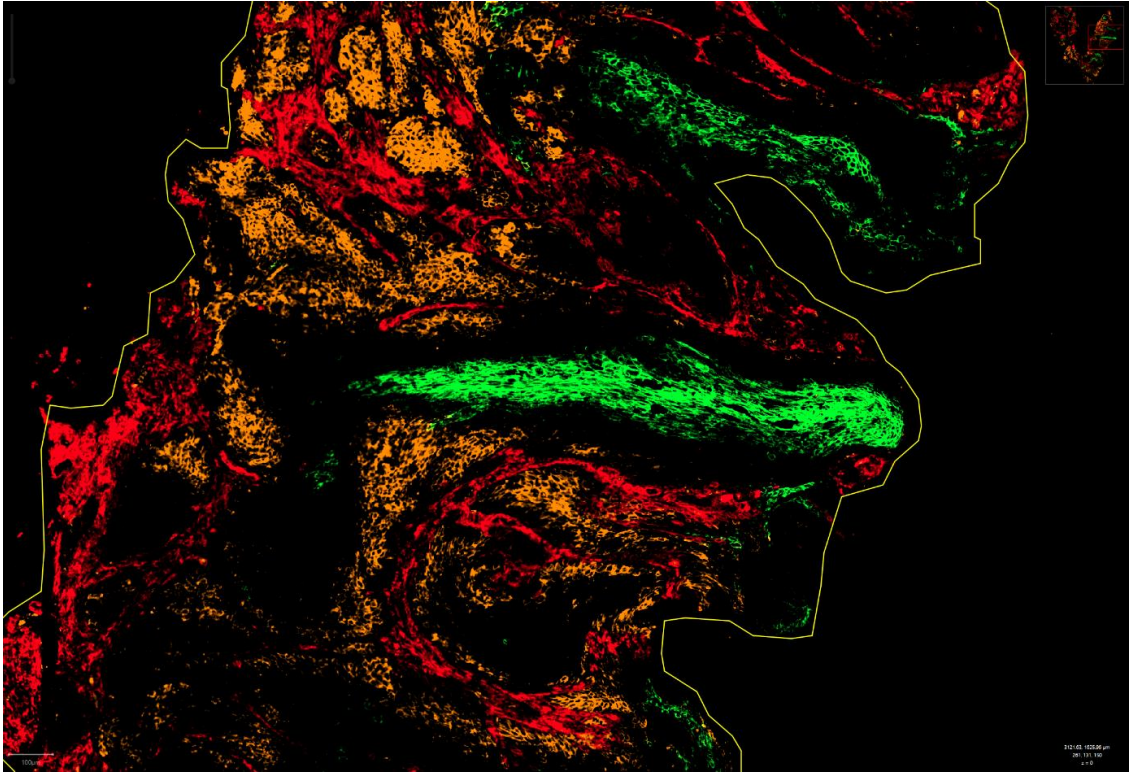


Abbildung 38 Ausschnitt aus dem Whole-Slide-Scan des Pharynxkarzinoms in Abbildung 14. Dargestellt sind CA9 (grün), ENT1 (orange) und CD73 (rot). Die Marker zeigen keine räumliche Überschneidung.

Durch eine gleichbleibende Reihenfolge bei der Klassifikation und durch möglichst identische, anhand der Biologie auf dem Präparat festgelegte Thresholds sollte die Einteilung so unabhängig von allen genannten Klassifikationsproblemen wie möglich erfolgen. Zumindest jedoch sollten die Auswirkungen dieser Probleme durch gleiches Vorgehen auf allen Schnitten ähnlich sein.

## 7.2.2 Softwarebedingte Probleme

### 7.2.2.1 Potentiale

Das Ergebnis der Berechnung des Model-fit wird, wie in 4.2.4.1.1 detailliert dargelegt, von der Form des Ausgangspotentials bestimmt, das für den betrachteten Zusammenhang angenommen wird. Für die Anwendung an den untersuchten Präparaten hat sich das Plummer-Potential als geeignet erwiesen, die beobachteten Wahrscheinlichkeitsdichtekurven möglichst gut anzunähern. Dies ist wichtig, da durch eine unpassende Potentialform, welche nur eine schlechte Annäherung zulässt, die Stärke der Interaktion unterschätzt wird [28].

In einigen Fällen der Auswertung kann es zu augenscheinlich schlechten Model-fits kommen, obwohl das Plummer-Potential als eine adäquate Potentialform für die

Auswertung verwendet wurde. Das ist durch die Diskrepanz zwischen Potentialform und tatsächlichen Faktoren der Interaktion zu erklären. Die mathematische Modulation des Potentials lässt in diesem Fall keine weitere Annäherung an die beobachtete Kurve zu. Dabei ist jedoch ausgeschlossen, dass es sich bei der beobachteten um eine zufällige Verteilung handelt. Die statistischen Testungen zeigen in diesen Fällen, wie erwartet, eindeutige Ergebnisse.

#### 7.2.2.2 Auswahl der Maske

Wie anfangs schon erläutert, erfolgt die Auswertung der Interaktionen durch MosaicIA in einem bestimmten Bereich und die Interaktionen werden im Kontext dieses Bereichs betrachtet. Eine Aussage bezüglich einer Interaktion ist immer relativ und beinhaltet nicht nur Informationen über die Verteilung der Objekte, sondern auch über den Bereich, in dem ausgewertet wurde. Somit kann das berechnete Ergebnis durch eine zusätzlich vorgegebene Maske beeinflusst werden. Der Bereich, der analysiert werden soll, wird durch die Maske genauer eingegrenzt. Um die Effekte der Verwendung der Maske zu veranschaulichen, wurden einige Tests an artifiziellen Szenarien durchgeführt (Abbildung 39).

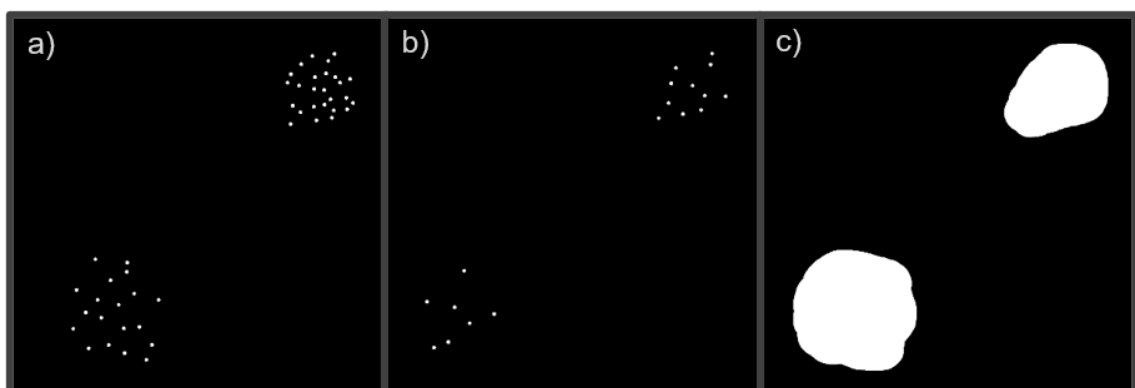


Abbildung 39 Beispielhafte Anwendung einer Maske in der Interaktionsanalyse. a) Punktverteilung 1; b) Punktverteilung 2; c) Maske, die die Interaktionsanalyse auf den weißen Bereich eingrenzt und auf die Punktverteilungen beschränkt.

Die Punktgruppen in Abbildung 39 a und b wurden mittels MosaicIA auf Interaktionen untersucht. Abbildung 40 links zeigt die Interaktionsanalyse zwischen den Punktgruppen in Abbildung 39 a und b ohne Maske. Hier ist zu erkennen, dass die Zellen sich viel näher beieinander befinden, als es für eine zufällige Verteilung in einem solchen Bereich zu erwarten wäre. Es zeigt sich eine sehr starke Konzentration der Punkte auf zwei kleine Bereiche und daraus resultierende geringe Abstände. Das

errechnete Model-fit unterscheidet sich eindeutig von der Zufallsverteilung und eine positive Interaktion wird nachgewiesen.

Im zweiten Versuch (Abbildung 40, rechts) wurde die Analyse an den gleichen Punktgruppen wiederholt, diesmal wurde jedoch der Auswertungsbereich durch Verwendung einer Maske (Abbildung 39, c) eingegrenzt. Innerhalb des nun untersuchten Bereichs sind die Punkte der Gruppen a und b zueinander zufällig verteilt. Die Signifikanzprüfung akzeptiert die Nullhypothese, findet also keine signifikante Interaktion.

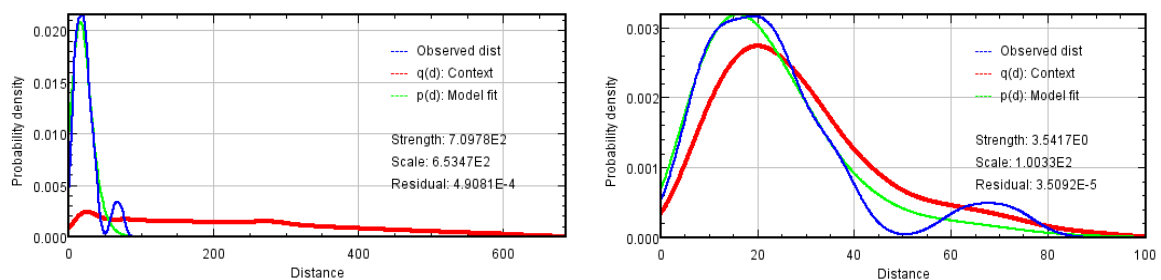


Abbildung 40 Ergebnisse der Interaktionsanalysen. Links Analyse ohne Maske; rechts Analyse unter Eingrenzung des Untersuchungsbereiches durch die Maske.

Sollte die Interaktion der Zellen allerdings über eine größere Distanz bestehen und die Anordnung der Punkte in diesem kleinen Bereich nicht zufällig zustande gekommen sein, was dem Ergebnis der Analyse ohne Maske entspricht, ist dies nun nicht mehr durch die Interaktionsanalyse zu erkennen. Folglich ist in jeder Situation kritisch abzuwägen, ob die Verwendung der Maske die auszuwertenden Zusammenhänge klarer darstellt oder ob im Gegenteil die Interaktionen durch die Maske verschleiert werden, was, wie eben gezeigt, durchaus möglich ist.

Allgemein kann eine zu große Maske die Erkennung von Co-Lokalisationen befördern, die in Wahrheit nicht bestehen. Im Extremfall können abstoßende Interaktionen sogar als Co-Lokalisation erkannt werden. Auf der anderen Seite kann eine zu kleine Maske dazu führen, dass Co-Lokalisationen nicht mehr als solche identifiziert werden.

Der Einfluss der Maske auf das Ergebnis der Analyse ist auch von der Form des Präparates abhängig. Kreisförmige Präparate, wie sie in den Microarrays Anwendung finden, werden durch Verwendung einer Maske kaum im Ergebnis der Analyse beeinflusst. Analysen von Präparaten, die viele Septen und Risse aufweisen oder inselartige Formen zeigen, werden unter Verwendung einer Maske vermutlich unterschiedliche Ergebnisse zeigen.



Die letzte Version des Analyse-Skripts enthält eine Funktion, die für den Bereich, innerhalb dessen die Zellen detektiert wurden, auch eine Maske erstellt, sodass die Analyse der Präparate mit Maske erfolgen konnte.

### 7.2.2.3 Hierarchie der Interaktion

Ausgangspunkt der Auswertung in MosaicIA sind die eingegebenen Koordinaten der Zellen. Der erste eingegebene Datensatz wird mit dem zweiten als Referenz verglichen. Das heißt konkret: Zu jeder Zelle aus Satz 1 wird die nächste Zelle aus Satz 2 gesucht. Vertauscht man die Datensätze, bedeutet das, dass zu jeder Zelle aus Satz 2 die nächste Zelle aus Satz 1 gesucht wird. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 41 die Wahrscheinlichkeitsdichtediagramme für den Bereich in Abbildung 20 gezeigt. Dabei wird deutlich, dass ein Vertauschen der Ausgangskordinaten zu verschiedenen Ergebnissen führen kann. So werden in diesem Beispiel die Abstände von CA9 zu CD73 im Durchschnitt größer sein als die Abstände von CD73 zu CA9. Hierdurch können sich auch unterschiedliche Ergebnisse in der Interaktionsanalyse ergeben. Es ist also möglich, dass CA9 von CD73 abhängt, CD73 jedoch nicht von CA9. Eine solche Interaktion, die nur einseitig besteht, wird als hierarchisch bezeichnet und ist in den Biowissenschaften bekannt [134]. Dieser Umstand erlaubt es uns, die Richtung der Abhängigkeit zu analysieren, erfordert aber auch eine genaue Überlegung, in welche Richtung die Interaktion vermutet wird.

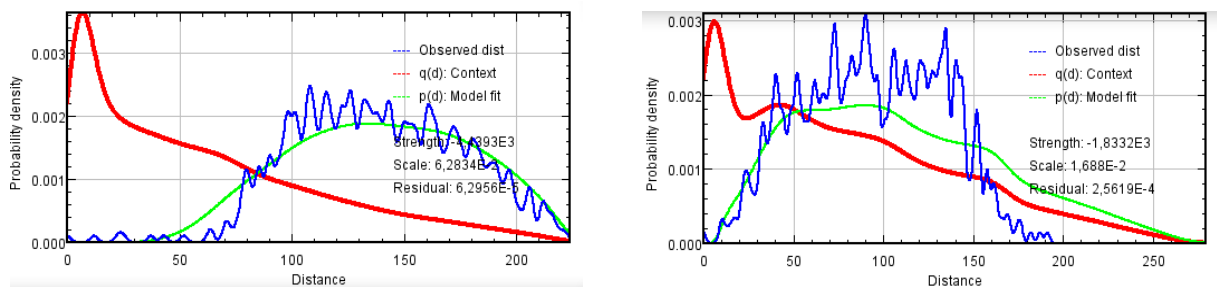


Abbildung 41 Ergebnisse der Interaktionsanalysen. Links: Interaktion von CA9 mit CD73; rechts Interaktion von CD73 mit CA9.

## 7.3 Pathophysiologie der Interaktionen in Tumoren

### 7.3.1 Hypoxievermittelte Adenosinproduktion

Vor der Diskussion der Interaktionen markierter Tumorbestandteile und Proteine ist nochmals zu betonen, dass keine der aufgeführten Methoden zur Interaktionsanalyse tatsächliche biologische Interaktionen nachweisen kann. Alle Ergebnisse sollten vor

diesem Hintergrund betrachtet werden. Allerdings ermöglichen diese Methoden Einblicke in das räumliche Verhalten von Zellen und Markern zueinander, die sich ohne diese Interaktionsanalyse der Beobachtung entziehen. Sie können bekannten pathophysiologischen Zusammenhängen gegenübergestellt werden und im Kontext mit klinischen Parametern grundlegende Mechanismen aufdecken.

#### *7.3.1.1 Verteilung der Marker*

Die Pan-Zytokeratin-Färbung eignet sich sehr gut, um eine Tumor-Stroma-Klassifikation anzuwenden. Sie markiert das Zytoskelett von Epithelzellen und ist somit besonders gut geeignet, Plattenepithelkarzinome automatisiert erkennen zu können. Selbst kleine Stromasepten im Tumorgewebe können mithilfe dieser Färbung erkannt werden.

CA9-Färbungen sind in allen Präparaten ausschließlich in Tumorgewebe zu finden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen verschiedener Arbeiten [95, 135, 136], die CA9 als weitgehend tumorspezifischen Hypoxiemarker bezeichnen.

CD73 ist nur in 2 Präparaten in relevantem Maße in Tumorgewebe exprimiert. Vor dem Hintergrund der Literatur, die eine Hochregulation von CD73 durch Hypoxie [76, 103, 106, 107] im Tumor postuliert, ist das überraschend. Möglicherweise wird der überwiegende Anteil des im Stroma gemessenen CD73 in Gefäßen exprimiert, wodurch der Tumor-Anteil des CD73 unterschätzt würde. In jedem Fall fällt auf, dass CD73 in Bereichen der Hypoxie nicht hochreguliert wird.

Im Gegensatz hierzu ist ENT1 in allen Präparaten zum überwiegenden Teil im Tumor exprimiert, was vor dem Hintergrund der Literatur plausibel ist, da ENT1 auch in Tumorgeweben exprimiert wird [137].

#### *7.3.1.2 Interaktionsanalyse CA9 - CD73 - ENT1*

CD73 zeigt in 6 Fällen einen positiven und in 6 Fällen einen negativen Bezug zu CA9 (Abbildung 25), was keine klare Tendenz der Interaktionen für ein allgemeingültiges Verhalten der Marker zueinander erkennen lässt. Dies ist vor dem Hintergrund der Literatur, die CD73 eine Schlüsselrolle in der hypoxieinduzierten Adenosinproduktion zuschreibt [98], ein unerwartetes Ergebnis. Insbesondere in den Tumorarealen, die fern von Gefäßen liegen, wäre eine besonders starke Ausprägung von CD73 anzunehmen. Insofern wäre eine klare positive Interaktion zu erwarten, die sich nicht

gezeigt hat. Das Ergebnis der Interaktionsanalyse deckt sich jedoch mit dem visuellen Eindruck auf den Präparaten, der ebenso ein gemischtes Bild ergibt.

Ein Erklärungsansatz für die beobachtete Verteilung von CD73 ist seine fördernde Wirkung auf die Angiogenese [102, 138, 139]. Aufgrund der Induktion der Angiogenese durch Hypoxie ist CD73 somit möglicherweise auch als ihr funktioneller Gegenspieler zu verstehen, in dessen Nähe nach Induktion des Gefäßwachstums keine Hypoxie mehr auftritt. Dies könnte ein ambivalentes Verhältnis zwischen CD73 und CA9 erklären.

Es erscheint unwahrscheinlich, dass die geringe Menge an im Tumor vorgefundenem CD73 für eine relevante Produktion von Adenosin verantwortlich sein kann. Ob CA9+ Areale wirklich auch einem Gebiet mit hohen Adenosinkonzentrationen entsprechen, wäre eine grundsätzliche Fragestellung und damit sehr interessant, kann jedoch nicht beurteilt werden, da kein direkter Adenosinmarker verfügbar ist.

Im Gegensatz zur Interaktion CA9 – CD73 wäre eine negative Interaktion zwischen ENT1 und CA9 durch eine mutmaßliche Herunterregulation von ENT1 durch Hypoxie zu erwarten [77, 105, 111]. Diese Regulation sollte innerhalb eines Zeitraums von Stunden erfolgen [105]. Die Analyse der Interaktion zwischen ENT1 und CA9 ergab allerdings in 8 Fällen positive und nur in einem Fall eine negative Interaktion. In großen Bereichen mancher Präparate sind sowohl CA9 als auch ENT1 intensiv und plausibel angefärbt (siehe Abbildung 42). In den Färbungen zeigen sich jedoch auch einige Areale, die der Literatur entsprechend eine klare Meidung der ENT1+ Zellen gegenüber den CA9+ Zellen zeigen. In Abbildung 42 wird bei Darstellung von CA9+ Zellen (a) und ENT1+ Zellen (b) im jeweiligen rechten unteren Bildbereich eine pallisadenartige Positionierung beider Populationen deutlich. In c ist bei gleichzeitiger Darstellung der Marker die pallisadenartige Anordnung besonders deutlich (weißer Pfeil).

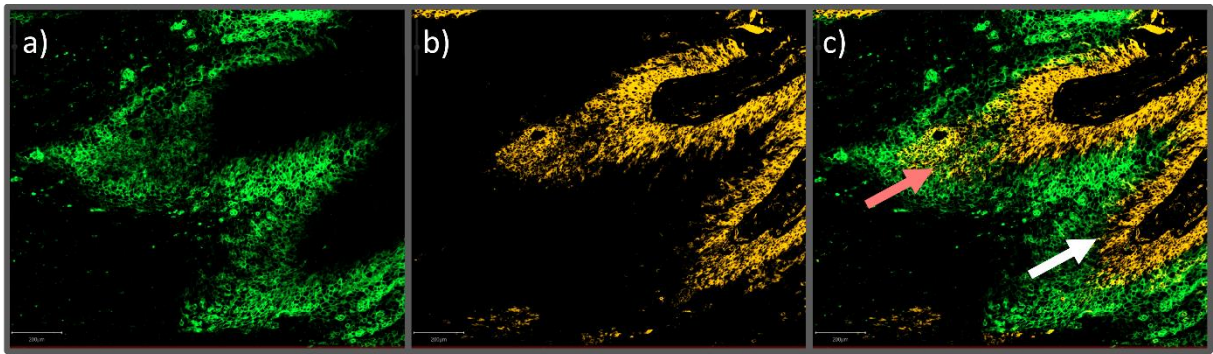


Abbildung 42 Ausschnitt aus dem Whole-Slide-Scan des Larynxkarzinoms aus Abbildung 36. Dargestellt ist dreimal der gleiche Bildausschnitt mit unterschiedlicher Darstellung der Marker. a) CA9-Färbung (grün); b) ENT1-Färbung (gelb); c) CA9- und ENT1-Färbung. Im rechten unteren Bildbereich stehen sich CA9 und ENT1 pallisadenartig gegenüber (weißer Pfeil), im mittleren und linken Bereich sind beide Marker gleichermaßen am gleichen Ort exprimiert (roter Pfeil).

Es finden sich allerdings auch Zellverbände, die sowohl ENT1 als auch CA9 mit hoher Intensität simultan ausdrücken (siehe Abbildung 42 c, roter Pfeil). Beide beschriebenen Phänotypen (ENT1 getrennt von CA9 gegenüber simultaner Ausprägung von ENT1 und CA9) können auf demselben Präparat nebeneinander auftreten, wie in Abbildung 42 deutlich wird.

Vor dem Hintergrund der Theorien zur Entstehung von ADO ist die Beobachtung von 5 positiven und 4 negativen Interaktionen zwischen ENT1 und CD73 unerwartet, da ENT1 durch Hypoxie herunterreguliert wird. Somit wäre ENT1 in hypoxischen Fällen entfernt von CD73 zu erwarten. Daher kann der positiven Interaktion von ENT1 und CD73 in einigen Präparaten nur in weiteren Untersuchungen nachgegangen werden.

### 7.3.2 Hypoxievermittelte Immunsuppression – Tregs

#### 7.3.2.1 Interaktionsanalyse FoxP3 – CA9

Auf die kontroverse Diskussion zur Aktivitätssteigerung und Destabilisierung von Tregs über FoxP3 soll hier noch einmal verwiesen werden [63, 115, 118, 120, 122], da die Multikanal-Immunfluoreszenzfärbung zur Klärung dieser Problematik beitragen könnte.

Eine positive Interaktion zwischen FoxP3 und CA9 war in der vorliegenden Arbeit in der HNO-Serie in 4 Präparaten und im Microarray in 5 Spots nachzuweisen. Eine negative Interaktion wurde in der HNO-Serie in 8 Präparaten, im Microarray in 20 Spots festgestellt. Im Microarray waren 10 weitere Interaktionen nicht signifikant. Die verbleibenden Spots wiesen entweder keine CA9+ oder FoxP3+ Zellen auf, sodass keine Interaktionsanalyse möglich war. Diese Ergebnisse zeigen eine Tendenz der



FoxP3+ Zellen, hypoxische Areale zu meiden. Die Ergebnisse würden, wenn man nur die hier durch CA9 dargestellte Hypoxie in Betracht zieht, darauf hindeuten, dass Gebiete mit erniedrigten O<sub>2</sub>-Spiegeln keine günstigen Verhältnisse für Tregs bieten und unterstützen Hypothesen, die einen negativen Einfluss des HIF-Systems auf die Aktivität der Tregs postulieren. Das impliziert, dass die Theorie, wonach Tregs durch Adenosin über ihre A2AR und A2BR in ihrer Aktivität angeregt werden [65, 78], hier nicht bestätigt wird.

Wie oben diskutiert, konnte kaum eine relevante CD73-Färbung in stark hypoxischen Arealen nachgewiesen werden, jedoch sehr deutlich im Stroma. Die spärliche Invasion der Tregs in hypoxischen Bereichen ist gut mit der fehlenden Expression von CD73 in diesen Arealen zu vereinbaren. Wenn nämlich durch CD73 kein Adenosin entsteht, fehlt auch der Anreiz für die Tregs, in diese Bereiche einzuwandern.

Wie in 7.3.1.2 erläutert, stellt diese Hypothese einen Widerspruch zu der bisherigen Annahme dar, dass Adenosin, welches für immunmodulatorische Funktionen verantwortlich ist, aus dem Tumorgewebe selbst stammt. Die hier vorliegenden Präparate legen jedoch nahe, dass, sofern die CD73-Färbung im Stroma auch tatsächlich mit erhöhten Adenosinspiegeln verbunden ist, der weitaus größte Anteil des Adenosins tatsächlich im Stromagewebe entsteht. Das gehäufte Vorkommen von Tregs (Abbildung 24 zeigt, dass sich bis auf eine Ausnahme nur ein geringer Anteil von Tregs im Tumorgewebe befindet) wäre durch diese hohen Adenosinvorkommen im Stroma plausibel zu erklären. Diese Beobachtungen sind damit im Einklang mit Arbeiten, die FoxP3+ Zellen vor allem im Stroma- und kaum im Tumorgewebe beschreiben [10, 11].

#### *7.3.2.2 Interaktionsanalyse FoxP3 – Tumor*

Die exakte Lokalisation der Tregs in Verbindung mit dem Wachstum von Tumoren wurde bislang nicht häufig untersucht und Techniken der direkten Darstellung von Tregs, wie z.B. Immunfluoreszenzfärbungen, wurden nur selten angewandt. In Arbeiten, in denen solche Methoden zum Einsatz kamen, konnte jedoch immer wieder beobachtet werden, dass sich FoxP3+ Zellen vor allem im Stroma befinden [10, 11]. Badoual et al. sprechen hierbei von peritumoralem Gewebe [10]. Bron et al. untersuchten die Anzahl der FoxP3+ Zellen. Hierbei ergab sich im Durchschnitt ein Verhältnis von ca. 5:1 zwischen Stroma und Tumor, die Schwankungen zwischen den einzelnen Präparaten waren jedoch groß. Letztendlich konnte in dieser Studie trotz der

Untersuchung der Zellverteilung in Tumor und Stroma nur ein Zusammenhang zwischen gesamtter FoxP3-Infiltration und verbessertem Overall-Survival bei 35 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region festgestellt werden [11]. Hsu et al. beschreiben im Gegensatz hierzu ein vermehrtes Vorkommen von Tregs in Tumorgeweben [63].

Die Untersuchung der Interaktion von FoxP3 und Tumorzellen ergab in der HNO-Serie in 3 Präparaten und im Microarray in 14 Spots eine positive Interaktion. Eine negative Interaktion konnte in 8 Präparaten der HNO-Serie und in 29 Spots des Microarrays festgestellt werden. Auf einem weiteren Präparat der HNO-Serie und in 13 weiteren Spots des Microarrays waren die Interaktionen nicht signifikant. Diese Ergebnisse zeigen keine klare allgemeine Tendenz bezüglich der Position der FoxP3+ Zellen zum Tumorgewebe und spiegeln zum Teil die Kontroverse in der Literatur wider.

Abbildung 33 zeigt, dass das Verhalten von Tregs zum Tumorgewebe von der Intensität der Hypoxie des Tumors abhängig ist. Stark hypoxische Tumoren, ausgezeichnet durch höhere Zahlen von CA9+ Zellen, weisen fast ausschließlich negative Interaktionen zwischen Tregs und Tumorzellen auf, während dieser Zusammenhang für Tumoren mit geringerer Hypoxie nicht zu erkennen ist. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist im Chi<sup>2</sup>-Test signifikant ( $p = 0,011$ ). Dies erlaubt den Rückschluss, dass die räumliche Verteilung von Tregs vom Grad der Hypoxie des Tumors abhängt. Hypoxie ist offenbar ein negativer Faktor für die Infiltration des Tumors durch Tregs. Die klinische Bedeutung dieser Beobachtung ist nicht Gegenstand dieser Arbeit.

### 7.3.2.3 Interaktionsanalyse FoxP3 – Stroma

In der Literatur ist das Vorkommen von Tregs vor allem in Stromagewebe beschrieben [10, 11]. Damit übereinstimmend konnte eine positive Interaktion der FoxP3+ Zellen mit den Stromazellen in der HNO-Serie in allen 12 Präparaten und auf dem Microarray in 45 Spots nachgewiesen werden. Nur in 2 Spots des Microarrays war eine signifikante negative Interaktion nachweisbar und 7 weitere Spots zeigten keine signifikante Interaktion.

Es fällt auf, dass die Tregs in beinahe jedem Präparat eine positive Interaktion mit dem Stroma aufwiesen und auch in einem Großteil der Fälle die Mehrheit der Tregs im Stroma lokalisiert war. Es ist möglich, dass das vermehrte Vorkommen der Tregs im Stroma auf den Weg zurückzuführen ist, den jede Treg ins Tumorgewebe nehmen

muss, wodurch eine Anhäufung zustande kommen könnte. Somit sind Tregs im Stroma zu erwarten. Es zeigten sich jedoch auch einzelne Präparate, in denen fast alle Tregs im Tumor lokalisiert sind, sodass der Befund von vielen Tregs im Stroma wahrscheinlich nicht zufällig entstanden ist. Zwei Umstände sprechen für Mechanismen, die den Aufenthalt von Tregs im Stroma begünstigen. Erstens ist CD73 in hohem Maße im Stroma der meisten Präparate nachzuweisen. Ausgehend von der Annahme, dass CD73 diese Adenosinproduktion vermittelt, wäre hier von hohen Adenosinkonzentrationen auszugehen, was in Einklang mit der Literatur zu starker Treg-Induktion und somit zu hohem Treg-Aufkommen führen würde [65, 78]. Zweitens meiden Tregs, wie oben erläutert, hypoxische Areale (siehe 6.3.3.1). Im Stroma verlaufen viele Gefäße, was hypoxische Verhältnisse unwahrscheinlich macht und somit die Ansammlung von Tregs im Stroma fördert.

#### **7.4 Diskussion der verschiedenen Interaktionsanalysetechniken**

Für die von menschlichen Einflüssen unabhängige, schnelle, zuverlässige und genaue Analyse von spatialen Interaktionen ist eine robuste Methodik notwendig. In der Vergangenheit haben sich zwei Klassen von Analysetechniken herausgebildet. Die ICCB und die CBC. Es konnte gezeigt werden, dass signalstärkebasierte Verfahren spatiale Interaktionen nicht so präzise wiedergeben können wie koordinatenbasierte Verfahren [15]. Diese Diskrepanz ist auf den Umstand zurückzuführen, dass die räumliche Komponente des Signals nicht in Betracht gezogen wird [20]. Signale, die nah beieinander, jedoch nicht übereinander liegen, können in diesen Methoden nicht korrelieren. Eine solche Situation kann auch unwillentlich durch Verschiebung bei Ungenauigkeit während der Aufnahme der Bilddaten entstehen. Moderne hochauflösende Techniken produzieren mitunter so scharfe Aufnahmen der Untersuchungsobjekte, dass sich auch die Signalintensitäten der Interaktionspartner nicht mehr überschneiden und eine Co-Lokalisationsanalyse auf Basis der Signalstärke nicht mehr anwendbar ist. Zudem sind derartige Techniken, wie oben beschrieben, anfällig für verschiedene Bildartefakte. Ein Vorteil der signalstärkebasierten Verfahren ist jedoch das Einbeziehen der Höhe der Signalstärke in die Interaktionsanalyse.

Für die Anwendung von objektbasierten Auswertungsmethoden sind Untersuchungsobjekte notwendig, die für eine Segmentierung zu punktförmigen

Untersuchungsgegenständen geeignet sind. Diese Voraussetzung erfüllen Zellen in Gewebeschnitten. Innerhalb der objektbasierten Auswertungsmethoden gibt es verschiedene Ansätze zur Auswertung von spatialen Interaktionen. Häufig verwendete Methoden sind Ripleys K-Funktion und Nearest-Neighbor-Technik sowie die neuere auf Tesselation beruhende Technik.

Die Analyse auf Grundlage der Ripleys K-Funktion erzielt übersichtliche Ergebnisse, die leicht zu verstehen und zu beurteilen sind und ermöglicht Hypothesentestung an der Punktverteilung [33]. Die Analyse beinhaltet unter anderem verschiedene Korrekturmöglichkeiten für systematische Analysefehler am Rand des Untersuchungsbereichs, die durch die geringere Zahl an möglichen Interaktionspartnern aus Sicht eines am Rand der Verteilung befindlichen Punktes entstehen. Korrekturen für dieses Problem finden bei den Nearest-Neighbor-Techniken keine Anwendung [15].

Auf der anderen Seite zeichnen sich Techniken auf Basis der Nearest-Neighbor-Analyse, insbesondere MosaicIA, durch die besondere Fähigkeit aus, Interaktionen zwischen Objekten durch Potentialmodelle anzunähern, die für die Beschreibung physikalischer Interaktionen entwickelt wurden. Die Auswahl einer für die Anwendung geeigneten Potentialform erlaubt es, Interaktionen auf unterschiedlich komplexen Ebenen (siehe oben) zu untersuchen. Die Ergebnisse sind hierdurch jedoch weniger übersichtlich und nur vor dem theoretischen Hintergrund der Interaktionsanalyse zu verstehen. Eine solche Analysetechnik bietet die Ripleys K-Funktion nicht. Da das Paar-Potential auf einer physikalischen Annäherung der räumlichen Verteilungen basiert und hieraus nur im Kontext mit klinischen Daten auf biologische Interaktionen geschlossen werden kann, sind die gefundenen Interaktionen nicht mit biologischen gleichzusetzen. Die Verteilungen von Zellen lassen sich mittels dieser Methodik sehr gut beschreiben, doch die Faktoren, die zu dieser Verteilung führen, werden durch physikalische Kräfte beschrieben und sind nicht beispielsweise Wachstums- oder Transkriptionsfaktoren.

Techniken der Tesselation haben besondere Stärken in der Erkennung von Clustern. Sie ermöglichen die Analyse von Zelldichten mittels klassischer Korrelationskoeffizienten wie z.B. nach Spearman, ohne dabei die typischen Nachteile dieser Techniken wie z.B. der fehlenden räumlichen Einordnung zu beinhalten. Eine Co-Lokalisationsanalyse ist anhand der Dichte der Objekte möglich. Ein weiterer

Vorteil ist der geringe Bedarf an Rechenleistung, was die Verarbeitung großer Untersuchungsobjekte möglich macht. Hervorzuheben ist, dass keine weiteren Eingaben von Parametern benötigt werden, die bei vielen anderen Co-Lokalisationsanalysen notwendig sind. Durch die Unabhängigkeit der Analyse von externen Eingaben ist eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erwarten [18].

Durch die verschiedenen theoretischen Grundlagen der Ansätze ist es möglich, dass Untersuchungen der gleichen Verteilungen zu verschiedenen Ergebnissen in den Analysen führen. Beispielsweise ist es möglich, dass Ripleys K-Funktion eine überzufällig hohe Zahl an anderen Objekten in einer bestimmten Distanz feststellt, MosiacIA unter Anwendung eines Paar-Potentials jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der gesamten Verteilung und einer zufälligen Verteilung findet. Diese Ergebnisse widersprechen sich nicht zwangsläufig, denn sie beschreiben verschiedene Aspekte der betrachteten Interaktion. Je eindeutiger allerdings der Zusammenhang in den untersuchten Punkten, desto sicherer werden die verschiedenen Techniken auch zu konkordanten Ergebnissen führen.

## **7.5 Ausblick**

Die Weiterentwicklung der Co-Lokalisationsanalyse zur Interaktionsanalyse und der damit verbundene Informationsgewinn eröffnet ein großes Potential für den Erkenntnisgewinn im Bereich der interzellularen Zusammenhänge und die Möglichkeiten der hier entwickelten und angewandten Techniken sind vielfältig. Sie ermöglichen einen detaillierten tiefreichenden Einblick in die räumliche Verteilung von Markern im Tumorgewebe. Die Anwendung der etablierten Methodik auf Präparate mit klinischen Daten könnte in zukünftigen Arbeiten das Erkennen von Zusammenhängen zwischen spatialen Verteilungen von Markern und klinischen Parametern, wie z.B. Prognose und Gesamtüberleben, ermöglichen. Die Mehrkanal-Immunfluoreszenz-technik bietet hierbei ein potentes Werkzeug für die Untersuchung bislang vermuteter Pathomechanismen in der Tumor- und Zellphysiologie. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist es möglich, theoretische Thesen an realen Präparaten zu überprüfen, um dann in weiterführenden Untersuchungen auf funktionelle Zusammenhänge schließen zu können.

Auch eine vergleichende Untersuchung mittels verschiedener Techniken der Co-Lokalisationsanalyse an Präparaten mit klinischen Daten wäre sinnvoll, um die Stärken und Schwächen sowie die Aussagekraft der Methoden im direkten Vergleich zu evaluieren.

## 8 Zusammenfassung

Untersuchungen von zellulären und subzellulären Interaktionen versprechen ein besseres Verständnis tumorbiologischer Zusammenhänge und neue therapeutische Ansätze. Obwohl die Beschreibung der räumlichen Anordnung von Zellen unterschiedlicher Funktion für sich allein nicht mit funktioneller Wechselwirkung gleichzusetzen ist, kann sie die Grundlage für Rückschlüsse auf funktionelle biologische Interaktionen im Kontext von klinischen Daten bilden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine verbesserte Methodik zur Analyse solcher spatialer Interaktionen für eine einfache und schnelle Anwendung an Whole-Slide-Gewebeschnitten sowie an Tissue-Microarray-Präparaten entwickelt. Im Mittelpunkt dieser Entwicklung steht die Zusammenführung zweier vorbestehender Softwarekomponenten, MosaicIA und QuPath, und deren Adaptation für die oben genannte Problemstellung. In Kooperation mit den Entwicklern der jeweiligen Software (

) wurde durch schrittweise Problemlösung ein Plugin erstellt, das die Funktionen beider Softwarekomponenten zusammenführt. Es ermöglicht eine vollumfängliche Analyse spatialer Interaktionen in einem Arbeitsgang. Die resultierende Interaktionsanalyse bietet einen erhöhten Informationsgehalt durch Signifikanztestung und Quantifizierung der Interaktion. Der spezielle theoretische Ansatz dieser Interaktionsanalyse erlaubt die Erfassung von Informationen über die räumliche Anordnung von Untersuchungsobjekten, die anderen Analysetechniken nicht zugänglich sind. Das entstandene Plugin stellt somit eine Erweiterung des Portfolios spatialer Interaktionsanalysen dar.

Die Funktionalität der erarbeiteten Analysetechnik wurde im Rahmen einer Proof-of-Concept-Analyse an Whole-Slide-Scans und einem Tissue-Microarray von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region gezeigt. Die Multikanal-Immunfluoreszenzfärbung dieser Präparate stellte die Basis der Auswertung dar und erwies sich als zuverlässige Methode zur Visualisierung mehrerer Marker in einem Präparat. Dabei ließen sich Interaktionen zwischen den für die Proof-of-Concept-Analyse eingesetzten Markern (CA9, CD73, ENT1, FoxP3, Pan-Zytokeratin und DAPI)

zur Untersuchung der hypoxievermittelten Mechanismen in Tumoren der Kopf-Hals-Region erkennen. CA9 erwies sich als plausibler Hypoxiemarker mit ausschließlicher Expression in Tumorgewebe. Die spatiale Anordnung von CD73 und ENT1 zu hypoxischen Arealen ist schwer mit den Erwartungen aus der Literatur zu vereinbaren. FoxP3 zeigte eine signifikante Meidung hypoxischer Tumorareale. Diesen Ergebnissen sollte in weiteren Untersuchungen auf diesem Gebiet der Tumor-Pathophysiologie nachgegangen werden.

Die durch das Plugin vereinfachte Auswertung erlaubt die Anwendung an einer Vielzahl von Gewebeschnitten und kann in zukünftigen Arbeiten im Kontext von klinischen Daten Rückschlüsse auf biologische funktionelle Zusammenhänge und hieraus abgeleitete therapeutische Konsequenzen ermöglichen. Fragestellungen zu solchen biologischen Interaktionen bestehen in allen klinischen Fachdisziplinen und können unter Verwendung entsprechender Antikörper mit der hier entwickelten Methodik untersucht werden. Zudem wäre es sinnvoll, verschiedene Techniken zur Interaktions- und Co-Lokalisationsanalyse zu vergleichen, jeweilige Stärken und Schwächen weiter zu spezifizieren, die Ergebnisse auf Reproduzierbarkeit zu prüfen und so ein valides Vokabular zur routinemäßigen Anwendung in der klinischen Praxis zu generieren.



## 9 Literaturverzeichnis

1. Peng, H., et al., Bioimage informatics: a new category in Bioinformatics. *Bioinformatics*, 2012. 28(8): p. 1057.
2. Toth, Z.E. and E. Mezey, Simultaneous visualization of multiple antigens with tyramide signal amplification using antibodies from the same species. *J Histochem Cytochem*, 2007. 55(6): p. 545-54.
3. Feller, W., *An Introduction to Probability Theory and its Applications*. 2 ed. Vol. I. 1957.
4. Lachmanovich, E., et al., Co-localization analysis of complex formation among membrane proteins by computerized fluorescence microscopy: application to immunofluorescence co-patching studies. *J Microsc*, 2003. 212(Pt 2): p. 122-31.
5. Fandel, T.M., et al., Do we truly see what we think we see? The role of cognitive bias in pathological interpretation. *J Pathol*, 2008. 216(2): p. 193-200.
6. Hamilton, P.W., et al., Do we see what we think we see? The complexities of morphological assessment. *J Pathol*, 2009. 218(3): p. 285-91.
7. Wu, Y., et al., Critical evaluation of quantitative colocalization analysis in confocal fluorescence microscopy. *Interdiscip Sci*, 2012. 4(1): p. 27-37.
8. Dalla Palma, P., et al., The reproducibility of CIN diagnoses among different pathologists: data from histology reviews from a multicenter randomized study. *Am J Clin Pathol*, 2009. 132(1): p. 125-32.
9. Ji, R.R., et al., An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother*, 2012. 61(7): p. 1019-31.
10. Badoual, C., et al., Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(2): p. 465-72.
11. Bron, L., et al., Prognostic value of arginase-II expression and regulatory T-cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 2013. 132(3): p. E85-93.

12. Stoyan, D. and A. Penttinen, Recent applications of point process methods in forestry statistics. *Statist. Sci.*, 2000. 15(1): p. 61-78.
13. Kanaroglou, P., E. Delmelle, and A. Páez, *Spatial Analysis in Health Geography*, ed. A. Williams and S. Elliott. 2015: Ashgate Publishing. 344.
14. Shivanandan, A., A. Radenovic, and I.F. Sbalzarini, MosaicIA: an ImageJ/Fiji plugin for spatial pattern and interaction analysis. *BMC Bioinformatics*, 2013. 14(1): p. 349.
15. Lagache, T., et al., Statistical analysis of molecule colocalization in bioimaging. *Cytometry A*, 2015. 87(6): p. 568-79.
16. Farsani, Z.A. and V.J. Schmid, Co-localization analysis in fluorescence microscopy via maximum entropy copula. *Int J Biostat*, 2020.
17. Diggle, P.J., J. Besag, and J.T. Gleaves, Statistical Analysis of Spatial Point Patterns by Means of Distance Methods. *Biometrics*, 1976. 32(3): p. 659-667.
18. Levet, F., et al., A tessellation-based colocalization analysis approach for single-molecule localization microscopy. *Nat Commun*, 2019. 10(1): p. 2379.
19. Aaron, J.S., A.B. Taylor, and T.L. Chew, Image co-localization - co-occurrence versus correlation. *J Cell Sci*, 2018. 131(3).
20. Bolte, S. and F.P. Cordelieres, A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*, 2006. 224(Pt 3): p. 213-32.
21. Zinchuk, V., O. Zinchuk, and T. Okada, Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochem Cytochem*, 2007. 40(4): p. 101-11.
22. Dunn, K.W., M.M. Kamocka, and J.H. McDonald, A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011. 300(4): p. C723-42.
23. Herce, H.D., C.S. Casas-Delucchi, and M.C. Cardoso, New image colocalization coefficient for fluorescence microscopy to quantify (bio-)molecular interactions. *J Microsc*, 2013. 249(3): p. 184-94.
24. Manders, E.M.M., F.J. Verbeek, and J.A. Aten, Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy*, 1993. 169(3): p. 375-382.

25. Adler, J. and I. Parmryd, Quantifying colocalization: the MOC is a hybrid coefficient - an uninformative mix of co-occurrence and correlation. *J Cell Sci*, 2019. 132(1).
26. Comeau, J.W., S. Costantino, and P.W. Wiseman, A guide to accurate fluorescence microscopy colocalization measurements. *Biophys J*, 2006. 91(12): p. 4611-22.
27. Moser, B., et al., Fluorescence colocalization microscopy analysis can be improved by combining object-recognition with pixel-intensity-correlation. *Biotechnol J*, 2017. 12(1).
28. Helmuth, J.A., G. Paul, and I.F. Sbalzarini, Beyond co-localization: inferring spatial interactions between sub-cellular structures from microscopy images. *BMC Bioinformatics*, 2010. 11: p. 372.
29. Ester, M., et al., A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise, in *Proceedings of the Second International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*. 1996, AAAI Press: Portland, Oregon. p. 226–231.
30. Nicovich, P.R., D.M. Owen, and K. Gaus, Turning single-molecule localization microscopy into a quantitative bioanalytical tool. *Nat Protoc*, 2017. 12(3): p. 453-460.
31. Baddeley, D., M.B. Cannell, and C. Soeller, Visualization of localization microscopy data. *Microsc Microanal*, 2010. 16(1): p. 64-72.
32. Andronov, L., et al., ClusterViSu, a method for clustering of protein complexes by Voronoi tessellation in super-resolution microscopy. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 24084.
33. Dixon, P.M., Ripley's K function. *Encyclopedia of Environmetrics*. Vol. 3. 2002: John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
34. Ripley, B.D., Tests of 'Randomness' for Spatial Point Patterns. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 1979. 41(3): p. 368-374.
35. Barua, S., et al., Spatial interaction of tumor cells and regulatory T cells correlates with survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2018. 117: p. 73-79.
36. Clark, P.J. and F.C. Evans, Distance to Nearest Neighbor as a Measure of Spatial Relationships in Populations. *Ecology*, 1954. 35(4): p. 445-453.

37. Heikkinen, J. and A. Penttinen, Bayesian Smoothing in the Estimation of the Pair Potential Function of Gibbs Point Processes. *Bernoulli*, 1999. 5(6): p. 1119-1136.
38. Hamilton, P.W., et al., Digital pathology and image analysis in tissue biomarker research. *Methods*, 2014. 70(1): p. 59-73.
39. Shimahara, Y., et al., IMACEL: A cloud-based bioimage analysis platform for morphological analysis and image classification. *PLoS One*, 2019. 14(2): p. e0212619.
40. Eliceiri, K.W., et al., Biological imaging software tools. *Nat Methods*, 2012. 9(7): p. 697-710.
41. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 2012. 9(7): p. 671-5.
42. Lamprecht, M.R., D.M. Sabatini, and A.E. Carpenter, CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. *Biotechniques*, 2007. 42(1): p. 71-5.
43. Kankaanpaa, P., et al., BioImageXD: an open, general-purpose and high-throughput image-processing platform. *Nat Methods*, 2012. 9(7): p. 683-9.
44. Bankhead, P., et al., QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 16878.
45. Caicedo, J.C., et al., Data-analysis strategies for image-based cell profiling. *Nat Methods*, 2017. 14(9): p. 849-863.
46. Sauvat, A., et al., ColocalizR: An open-source application for cell-based high-throughput colocalization analysis. *Comput Biol Med*, 2019. 107: p. 227-234.
47. Pagoon, S.V., et al., Clus-DoC: a combined cluster detection and colocalization analysis for single-molecule localization microscopy data. *Mol Biol Cell*, 2016. 27(22): p. 3627-3636.
48. Mardakheh, F.K., et al., Proteomics profiling of interactome dynamics by colocalisation analysis (COLA). *Mol Biosyst*, 2016. 13(1): p. 92-105.
49. Ryder, P.V. and D.A. Lerit, Quantitative analysis of subcellular distributions with an open-source, object-based tool. *Biol Open*, 2020.
50. Wang, S., et al., Spatially Adaptive Colocalization Analysis in Dual-Color Fluorescence Microscopy. *IEEE Trans Image Process*, 2019.
51. Schindelin, J., et al., Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 2012. 9(7): p. 676-82.

52. Shivanandan, A., A. Radenovic, and I.F. Sbalzarini, MosaicIA: an ImageJ/Fiji plugin for spatial pattern and interaction analysis. *BMC Bioinformatics*, 2013. 14: p. 349.
53. Plummer, H.C., On the Problem of Distribution in Globular Star Clusters: (Plate 8.). *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 1911. 71(5): p. 460-470.
54. Gatrell, A.C., et al., Spatial Point Pattern Analysis and Its Application in Geographical Epidemiology. *Transactions of the Institute of British Geographers*, 1996. 21(1): p. 256-274.
55. Openshaw, S., The modifiable areal unit problem. *Quantitative geography: A British view*, 1981: p. 60-69.
56. Anselin, L., The Future of Spatial Analysis in the Social Sciences. *Geographic Information Sciences*, 1999. 5(2): p. 67-76.
57. Neumann, A.K., et al., Hypoxia inducible factor 1 alpha regulates T cell receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(47): p. 17071-6.
58. Tafreshi, N.K., et al., Carbonic anhydrase IX as an imaging and therapeutic target for tumors and metastases. *Subcell Biochem*, 2014. 75: p. 221-54.
59. Vaupel, P. and A. Mayer, Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev*, 2007. 26(2): p. 225-39.
60. Vaupel, P., Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol*, 2004. 14(3): p. 198-206.
61. Vaupel, P., F. Kallinowski, and P. Okunieff, Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res*, 1989. 49(23): p. 6449-65.
62. Bostrom, P.J., et al., Hypoxia Marker GLUT-1 (Glucose Transporter 1) is an Independent Prognostic Factor for Survival in Bladder Cancer Patients Treated with Radical Cystectomy. *Bladder Cancer*, 2016. 2(1): p. 101-109.
63. Hsu, T.S. and M.Z. Lai, Hypoxia-inducible factor 1alpha plays a predominantly negative role in regulatory T cell functions. *J Leukoc Biol*, 2018. 104(5): p. 911-918.
64. Phan, A.T. and A.W. Goldrath, Hypoxia-inducible factors regulate T cell metabolism and function. *Mol Immunol*, 2015. 68(2 Pt C): p. 527-35.

65. Ohta, A., A Metabolic Immune Checkpoint: Adenosine in Tumor Microenvironment. *Front Immunol*, 2016. 7(MAR): p. 109.
66. Hatfield, S.M., et al., Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation. *Sci Transl Med*, 2015. 7(277): p. 277ra30.
67. Gilkes, D.M., G.L. Semenza, and D. Wirtz, Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2014. 14(6): p. 430-9.
68. Radvak, P., et al., Suppression of carbonic anhydrase IX leads to aberrant focal adhesion and decreased invasion of tumor cells. *Oncol Rep*, 2013. 29(3): p. 1147-53.
69. Semenza, G.L., HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest*, 2013. 123(9): p. 3664-71.
70. Trastour, C., et al., HIF-1alpha and CA IX staining in invasive breast carcinomas: prognosis and treatment outcome. *Int J Cancer*, 2007. 120(7): p. 1451-8.
71. Rudat, V., et al., Predictive value of the tumor oxygenation by means of pO<sub>2</sub> histography in patients with advanced head and neck cancer. *Strahlenther Onkol*, 2001. 177(9): p. 462-8.
72. Mujcic, H., et al., Hypoxia signaling and the metastatic phenotype. *Curr Mol Med*, 2014. 14(5): p. 565-79.
73. Liao, D., et al., Hypoxia-inducible factor-1alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res*, 2007. 67(2): p. 563-72.
74. Sasabe, E., et al., Mechanism of HIF-1alpha-dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci*, 2005. 96(7): p. 394-402.
75. Sitkovsky, M.V., et al., Hostile, hypoxia-A2-adenosinergic tumor biology as the next barrier to overcome for tumor immunologists. *Cancer Immunol Res*, 2014. 2(7): p. 598-605.
76. Synnestvedt, K., et al., Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest*, 2002. 110(7): p. 993-1002.
77. Kobayashi, S., H. Zimmermann, and D.E. Millhorn, Chronic hypoxia enhances adenosine release in rat PC12 cells by altering adenosine metabolism and membrane transport. *J Neurochem*, 2000. 74(2): p. 621-32.

78. Ohta, A. and M. Sitkovsky, Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. *Front Immunol*, 2014. 5(JUL): p. 304.
79. Ohta, A. and M. Sitkovsky, Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*, 2001. 414(6866): p. 916-20.
80. Driver, A.G., et al., Adenosine in bronchoalveolar lavage fluid in asthma. *Am Rev Respir Dis*, 1993. 148(1): p. 91-7.
81. Blay, J., T.D. White, and D.W. Hoskin, The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res*, 1997. 57(13): p. 2602-5.
82. Zarek, P.E., 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): p. 251-9.
83. Ohta, A., et al., 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: p. 190.
84. Allard, B., et al., Targeting CD73 enhances the antitumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs. *Clin Cancer Res*, 2013. 19(20): p. 5626-35.
85. Ohta, A., et al., A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(35): p. 13132-7.
86. Thiel, M., et al., Oxygenation inhibits the physiological tissue-protecting mechanism and thereby exacerbates acute inflammatory lung injury. *PLoS Biol*, 2005. 3(6): p. e174.
87. Vaupel, P. and A. Mayer, Can respiratory hyperoxia mitigate adenosine-driven suppression of antitumor immunity? *Ann Transl Med*, 2015. 3(19): p. 292.
88. Mediavilla-Varela, M., 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): p. 860-8.
89. Montesinos, M.C., et al., Wound healing is accelerated by agonists of adenosine A2 (G alpha s-linked) receptors. *J Exp Med*, 1997. 186(9): p. 1615-20.
90. Montesinos, M.C., et al., Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors. *Am J Pathol*, 2002. 160(6): p. 2009-18.

91. Zeng, D., et al., Expression and function of A2B adenosine receptors in the U87MG tumor cells. *Drug Development Research*, 2003. 58(4): p. 405-411.
92. Ryzhov, S., et al., Host A(2B) adenosine receptors promote carcinoma growth. *Neoplasia*, 2008. 10(9): p. 987-95.
93. Potter, C. and A.L. Harris, Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumor hypoxia, survival pathway and therapy target. *Cell Cycle*, 2004. 3(2): p. 164-7.
94. Chiche, J., J.E. Ricci, and J. Pouyssegur, Tumor hypoxia and metabolism -- towards novel anticancer approaches. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2013. 74(2): p. 111-4.
95. Bao, B., et al., In vivo imaging and quantification of carbonic anhydrase IX expression as an endogenous biomarker of tumor hypoxia. *PLoS One*, 2012. 7(11): p. e50860.
96. Adams, A., et al., The potential of hypoxia markers as target for breast molecular imaging--a systematic review and meta-analysis of human marker expression. *BMC Cancer*, 2013. 13: p. 538.
97. Huang, W.J., et al., Expression of hypoxic marker carbonic anhydrase IX predicts poor prognosis in resectable hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2015. 10(3): p. e0119181.
98. Knapp, K., et al., Crystal structure of the human ecto-5'-nucleotidase (CD73): insights into the regulation of purinergic signaling. *Structure*, 2012. 20(12): p. 2161-73.
99. Ledoux, S., et al., Hypoxia enhances Ecto-5'-Nucleotidase activity and cell surface expression in endothelial cells: role of membrane lipids. *Circ Res*, 2003. 92(8): p. 848-55.
100. Schneider, E., et al., Generation and Function of Non-cell-bound CD73 in Inflammation. *Front Immunol*, 2019. 10: p. 1729.
101. Turcotte, M., et al., CD73 Promotes Resistance to HER2/ErbB2 Antibody Therapy. *Cancer Res*, 2017. 77(20): p. 5652-5663.
102. Koszalka, P., et al., CD73 on B16F10 melanoma cells in CD73-deficient mice promotes tumor growth, angiogenesis, neovascularization, macrophage infiltration and metastasis. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015. 69: p. 1-10.



103. Li, X., et al., Effect of hypoxia/reoxygenation on CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in mouse microvessel endothelial cell lines. *Microvasc Res*, 2006. 72(1-2): p. 48-53.
104. Ohta, A., et al., Hypoxia-induced and A2A adenosine receptor-independent T-cell suppression is short lived and easily reversible. *Int Immunol*, 2014. 26(2): p. 83-91.
105. Eltzschig, H.K., et al., HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia. *J Exp Med*, 2005. 202(11): p. 1493-505.
106. Li, J., et al., CD39/CD73 upregulation on myeloid-derived suppressor cells via TGF-beta-mTOR-HIF-1 signaling in patients with non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*, 2017. 6(6): p. e1320011.
107. Tak, E., et al., Protective role of hypoxia-inducible factor-1alpha-dependent CD39 and CD73 in fulminant acute liver failure. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017. 314: p. 72-81.
108. Rose, J.B., et al., Absence of equilibrative nucleoside transporter 1 in ENT1 knockout mice leads to altered nucleoside levels following hypoxic challenge. *Life Sci*, 2011. 89(17-18): p. 621-30.
109. Chaudary, N., et al., The adenosine transporter, mENT1, is a target for adenosine receptor signaling and protein kinase Cepsilon in hypoxic and pharmacological preconditioning in the mouse cardiomyocyte cell line, HL-1. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004. 310(3): p. 1190-8.
110. Zimmerman, M.A., et al., Equilibrative nucleoside transporter (ENT)-1-dependent elevation of extracellular adenosine protects the liver during ischemia and reperfusion. *Hepatology*, 2013. 58(5): p. 1766-78.
111. Casanello, P., et al., Equilibrative nucleoside transporter 1 expression is downregulated by hypoxia in human umbilical vein endothelium. *Circ Res*, 2005. 97(1): p. 16-24.
112. Sakaguchi, S., T. Takahashi, and Y. Nishizuka, Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer. *J Exp Med*, 1982. 156(6): p. 1565-76.
113. Gambineri, E., T.R. Torgerson, and H.D. Ochs, Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a

- syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol*, 2003. 15(4): p. 430-5.
114. Bergmann, C., [Regulatory T cells and NK cells in cancer patients]. *HNO*, 2014. 62(6): p. 406-14.
  115. Ben-Shoshan, J., et al., Hypoxia controls CD4+CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1alpha. *Eur J Immunol*, 2008. 38(9): p. 2412-8.
  116. Shang, B., et al., Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, 2015. 5(October): p. 15179.
  117. Sitkovsky, M.V., T regulatory cells: hypoxia-adenosinergic suppression and re-direction of the immune response. *Trends Immunol*, 2009. 30(3): p. 102-8.
  118. Jie, H.B., et al., Intratumoral regulatory T cells upregulate immunosuppressive molecules in head and neck cancer patients. *Br J Cancer*, 2013. 109(10): p. 2629-35.
  119. Antonioli, L., et al., CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*, 2013. 19(6): p. 355-67.
  120. Clambey, E.T., et al., Hypoxia-inducible factor-1 alpha-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(41): p. E2784-93.
  121. Kumar, V. and D.I. Gabrilovich, Hypoxia-inducible factors in regulation of immune responses in tumour microenvironment. *Immunology*, 2014. 143(4): p. 512-9.
  122. Tao, J.H., J. Barbi, and F. Pan, Hypoxia-inducible factors in T lymphocyte differentiation and function. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015. 309(9): p. C580-9.
  123. de Ruiter, E.J., et al., The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*, 2017. 6(11): p. e1356148.
  124. Shah, W., et al., A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cell Mol Immunol*, 2011. 8(1): p. 59-66.

125. Weed, D.T., et al., Tadalafil reduces myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells and promotes tumor immunity in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2015. 21(1): p. 39-48.
126. Mohr, A., et al., Human FOXP3(+) T regulatory cell heterogeneity. *Clin Transl Immunology*, 2018. 7(1): p. e1005.
127. deLeeuw, R.J., et al., The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. *Clin Cancer Res*, 2012. 18(11): p. 3022-9.
128. Kapuscinski, J., DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem*, 1995. 70(5): p. 220-33.
129. Portugal, J. and M.J. Waring, Assignment of DNA binding sites for 4',6-diamidino-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A comparative footprinting study. *Biochim Biophys Acta*, 1988. 949(2): p. 158-68.
130. Ferro, A., et al., Blue intensity matters for cell cycle profiling in fluorescence DAPI-stained images. *Lab Invest*, 2017. 97(5): p. 615-625.
131. Malpica, N., et al., Applying watershed algorithms to the segmentation of clustered nuclei. *Cytometry*, 1997. 28(4): p. 289-97.
132. Gerlinger, M., et al., Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*, 2012. 366(10): p. 883-892.
133. Gerashchenko, T.S., et al., Intratumor heterogeneity: nature and biological significance. *Biochemistry (Mosc)*, 2013. 78(11): p. 1201-15.
134. Hogmander, H., Multitype spatial point patterns with hierarchical interactions. *Biometrics*, 1999. 55(4): p. 1051-8.
135. Rami, M., et al., Hypoxia-targeting carbonic anhydrase IX inhibitors by a new series of nitroimidazole-sulfonamides/sulfamides/sulfamates. *J Med Chem*, 2013. 56(21): p. 8512-20.
136. Monti, S.M., C.T. Supuran, and G. De Simone, Carbonic anhydrase IX as a target for designing novel anticancer drugs. *Curr Med Chem*, 2012. 19(6): p. 821-30.
137. Pennycooke, M., et al., Differential expression of human nucleoside transporters in normal and tumor tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 280(3): p. 951-9.
138. Yang, J., et al., Role of CD73 in Disease: Promising Prognostic Indicator and Therapeutic Target. *Curr Med Chem*, 2018. 25(19): p. 2260-2271.

139. Allard, B., et al., Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. *Int J Cancer*, 2014. 134(6): p. 1466-73.
140. Otto, M., et al., Analyzing spatial interactions in multiplex immunofluorescence whole slide tissue specimens of cancers of the head and neck region. Abstracts DEGRO 2018. *Strahlenther Onkol*, 2018. 194(Suppl 1): p. 51-52.

# 10 Anhang

## 10.1 Tabelle Verteilung der Marker in den HNO-Präparaten

Tabelle 5 Verteilung der Marker in den HNO-Präparaten

Schnitt	Zellzahl	CA9 Zellen im Schnitt	CD73 Zellen im Schnitt	ENT1 Zellen im Schnitt	FoxP3 Zellen im Schnitt
		Anteil CA9 im Tumor	Anteil CD73 im Tumor	Anteil ENT1 im Tumor	Anteil FoxP3 im Tumor
42_13	439155	38608	21388	55630	757
		100%	0,3%	99,1%	6,9%
06_99	231964	11732	120670	291	1465
		100%	46,2%	100%	4%
50_99	67393	3700	7805	11355	259
		100%	7,3%	100%	100%
59_99	100628	418	17221	5855	2095
		100%	0,1%	77%	26,7%
87_99	110632	7299	36481	413	2904
		100%	1,8%	94,9%	5,3%
88_99	627516	826	113364	0	2126
		100%	2,1%		10,2%
89_99	105785	508	3313	5576	511
		100%	4,3%	100%	37%
104_99	104521	27278	14514	7582	671
		100%	4,5%	100%	9,5%
124_99	72178	3125	40960	0	603
		100%	59,1%		10,9%
1_2000	96660	13195	15797	2471	1633
		100%	0%	87,1%	21,1%

Schnitt	Zellzahl	CA9 Zellen im Schnitt	CD73 Zellen im Schnitt	ENT1 Zellen im Schnitt	FoxP3 Zellen im Schnitt
		Anteil CA9 im Tumor	Anteil CD73 im Tumor	Anteil ENT1 im Tumor	Anteil FoxP3 im Tumor
8_2000	376699	281	44340	0	560
		100%	2,7%		10,2%
28_00	154732	3235	66743	12538	1060
		100%	0%	96,9%	36,1%

## 10.2 Tabelle Interaktionsanalyse zur hypoxievermittelten Adenosinproduktion in HNO-Präparaten

Tabelle 6 Ergebnisse der Interaktionsanalyse zur hypoxievermittelten Adenosinproduktion in den HNO-Präparaten. Aufgeführt ist neben der Strength auch der jeweilige P-Wert aus der Signifikanztestung.

Präparat	CD73 – CA9		ENT1 – CA9		ENT1 – CD73	
	P-Wert	Strength	P-Wert	Strength	P-Wert	Strength
42_13	<0,001	306,17	<0,001	69,57	<0,001	6,53
06_99	<0,001	27,17	<0,001	19,84	<0,001	3,8
50_99	<0,001	24,46	<0,001	25,44	<0,001	401,61
59_99	<0,001	-2479,3	<0,001	8,18	<0,001	-2,43
87_99	<0,001	-1299,7	<0,001	3,15	<0,001	-1,95
88_99_1	<0,001	1,46		Ø ENT1		Ø ENT1
88_99_2	<0,001	0,68		Ø ENT1		Ø ENT1
89_99	<0,001	-1,29	<0,001	5,49	<0,001	20,06
104_99	<0,001	-1,83	<0,001	1,38	<0,001	16,75
124_99	<0,001	3,3		Ø ENT1		Ø ENT1
1_2000	<0,001	-3,17	0,011	-1,42	1,0	-0,61

Präparat	CD73 – CA9		ENT1 – CA9		ENT1 – CD73	
	P-Wert	Strength	P-Wert	Strength	P-Wert	Strength
8_2000	<0,001	4,58		Ø ENT1		Ø ENT1
28_00	<0,001	-1844,2	<0,001	6,26	<0,001	-2,12

### 10.3 Tabelle Interaktionsanalyse zur hypoxieinduzierten Immunsuppression in den HNO-Präparaten

Tabelle 7 Interaktionsanalyse zur hypoxieinduzierten Immunsuppression in den HNO-Präparaten. Aufgeführt ist neben der Strength auch der jeweilige P-Wert aus der Signifikanztestung.

Präparat	FoxP3 – CA9		FoxP3 – Tumor		FoxP3 – Stroma	
	P-Wert	Strength	P-Wert	Strength	P-Wert	Strength
42_13	<0,001	-2,264	<0,001	-2,592	<0,001	709,77
06_99	<0,001	-1384,4	<0,001	-1,3831	<0,001	709,77
50_99	<0,001	3,7424	<0,001	204,82	<0,001	3,4483
59_99	<0,001	1,2366	<0,001	49,407	<0,001	708,74
87_99	<0,001	-1295,3	<0,001	-808,22	<0,001	709,73
88_99	<0,001	-212,8	<0,001	-2,4283	<0,001	708,51
89_99	<0,001	-1,7045	<0,001	-3,6568	<0,001	708,57
104_99	<0,001	-9,0228	<0,001	-1043,7	<0,001	709,72
124_99	<0,001	-1230,8	<0,001	115,03	<0,001	709,54
1_2000	<0,001	-2,724	<0,001	-2,1191	<0,001	709,07
8_2000	<0,001	1,4028	<0,001	-3,5089	<0,001	709,75
28_00	<0,001	1,3621	1	-1,5858	<0,001	49,111

## 10.4 Tabelle Interaktionsanalyse FoxP3 im Microarray

Tabelle 8 Interaktionsanalyse zur hypoxieinduzierten Immunsuppression im Microarray. Aufgeführt ist neben der Strength auch der jeweilige P-Wert aus der Signifikanztestung.

Position	FoxP3 – CA9		FoxP3 - Tumor		FoxP3 - Stroma	
	P-Wert	Strength	P-Wert	Strength	P-Wert	Strength
A1	-	-	<0,001	5,7	<0,001	17,9
A2			<0,001	-2,67	<0,001	478
A3	0,574	0,549	0,078	-0,85	<0,001	399
A4	<0,001	5,58	<0,001	2,85	<0,001	710
A5	-	-	-	-	-	-
A6	-	-	-	-	-	-
A7	0,474	-3,753	0,137	97,7	0,029	12,2
A8	-	-	0,084	710	0,004	-904
A9	0,073	-5750	0,104	-3,568	0,102	223,8
A10	0,006	7,01	0,001	1,75	<0,001	703
B1	0,191	-9,38	0,377	-516,15	0,02	8,06
B2	0,284	-929,77	0,037	399,24	0,015	145,98
B3	0,044	-3226,9	0,402	-759,11	0,002	4,5
B4	0,003	9,787	0,685	-0,33958	0,001	709,67
B5	0,04	-6308,1	0,15	-2402		
B6	0,169	-2408,8	0,208	-1350,4	0,092	66,737
B7	-	-	<0,001	-530,05	<0,001	2,439
B8	-	-	<0,001	-1,125	<0,001	523,42
B9	<0,001	-2159,7	0,016	-541,7	<0,001	709,74
B10	-	-	<0,001	-456,83	<0,001	454,44



Position	FoxP3 – CA9		FoxP3 - Tumor		FoxP3 - Stroma	
	P-Wert	Strength	P-Wert	Strength	P-Wert	Strength
C1	-	-	<0,001	709,61	<0,001	2,39
C2	-	-	<0,001	199,75	<0,001	4,15
C3	<0,001	-219,55	<0,001	-1,93	<0,001	709,76
C4	-	-	<0,001	9,13	<0,001	236,85
C5			<0,001	11,92	<0,001	646,83
C6	-	-	<0,001	249,47	<0,001	709,69
C7	0,178	-1,92	0,007	-2,03	<0,001	709,77
C8	<0,001	-6,98	<0,001	-2,3	<0,001	709,69
C9	0,011	-1,48	0,025	-484,97	<0,001	17,1
C10	<0,001	-5,65	0,003	-2,77	<0,001	587,15
D1	<0,001	-11,56	0,015	-1,93	<0,001	5,17
D2	<0,001	-4377,5	<0,001	-3,3	<0,001	707,76
D3	-	-	<0,001	-2001,7	<0,001	709,48
D4	-	-	0,001	-2,9	<0,001	9,92
D5	0,001	-6746,4	0,001	-8,76	0,002	363,6
D6	-	-	<0,001	11,06	<0,001	553,08
D7	0,044	2,62	0,002	-2,68	<0,001	709,66
D8	<0,001	-3236,9	<0,001	-3,68	<0,001	709,71
D9	-	-	0,878	-0,63	<0,001	422,78
D10	<0,001	-1716,6	<0,001	-3,26	<0,001	589,27
E1	<0,001	-4,55	<0,001	-9,94	<0,001	709,21
E2	<0,001	-2,58	<0,001	-696,42	<0,001	2,82

Position	FoxP3 – CA9		FoxP3 - Tumor		FoxP3 - Stroma	
	P-Wert	Strength	P-Wert	Strength	P-Wert	Strength
E3	-	-	<0,001	282,98	0,026	-1,45
E4	-	-	<0,001	-816,04	0,561	-0,74
E5	-	-	0,045	86,43	0,055	709,56
E6	-	-	0,063	-4,23	0,067	297,55
E7	0,157	-1,17	0,007	-803,86	0,009	2,98
E8	0,104	-1,12	0,019	-2,11	0,102	0,28
E9	<0,001	-2,15	<0,001	41,66	<0,001	4,97
E10	0,002	1,99	<0,001	3,52	<0,001	127,87
F1	<0,001	-1726,7	<0,001	-3,18	<0,001	709,77
F2	<0,001	-2052,8	<0,001	-8,42	<0,001	523,13
F3	-	-	<0,001	-2,74	<0,001	709,23
F4	-	-	0,181	-1,6	<0,001	709,67
F5	0,221	-3,63	0,396	-510,22	0,228	-2,55
F6	<0,001	-4,35	<0,001	-2,27	<0,001	709,01
F7	-	-	-	-	-	-
F8	-	-	-	-	-	-
F9	<0,001	-8,73	<0,001	-639,69	<0,001	4,35
F10	0,034	-0,68	<0,001	-629,32	<0,001	3,03

## 10.5 Praktische Anwendung und Skript

Für die Anwendung der Interaktionsanalyse müssen Fiji ImageJ mit dem Plugin „MOSAIC ToolSuite“, QuPath und Java installiert werden. Bevor die Analyse in QuPath erfolgen kann, ist es notwendig, zunächst die Mosaic Toolsuite in QuPath zu importieren. Diese ist unter folgendem Link zu finden:

[http://mosaic.mpi-cbg.de/Downloads/gonciarz/MosaicSuite-1.0.9\\_Full.jar](http://mosaic.mpi-cbg.de/Downloads/gonciarz/MosaicSuite-1.0.9_Full.jar)

Nachdem QuPath gestartet wurde, kann diese JAR-Datei auf das Fenster von QuPath gezogen und dadurch importiert werden.

Das nachfolgende Skript zur Ausführung der Interaktionsanalyse ist mit QuPath 0.2.3 kompatibel. Für die Ausführung muss es in den „Script Editor“ von QuPath eingegeben werden.

```
import ij.ImagePlus
import mosaic.ia.gui.InteractionAnalysisGui
import qupath.lib.objects.PathDetectionObject
import qupath.lib.objects.PathObject
import qupath.lib.objects.PathObjectTools
import qupath.lib.regions.RegionRequest

import org.scijava.vecmath.Point3d

import java.awt.Color
import java.awt.image.BufferedImage

/*
 * -----
 */

// Resolution at which to send coordinates/mask
// (Set <= 0 to turn off & use full resolution)
```

```

double requestedPixelSize = 0

// Use the base classification, in the event that we have sub-
classifications
// (e.g. by staining intensity)
boolean useBaseClassification = false

// Note: different z-planes not really supported here!

/*
 * -----
 */

// Check if we have a selected annotation or TMA core
def imageData = getCurrentImageData()
def server = imageData.getServer()
def hierarchy = imageData.getHierarchy()
def selected = hierarchy.getSelectionModel().getSelectedObject()

// Figure out downsample factor
double downsample = 1
if (requestedPixelSize > 0) {
    if (requestedPixelSize <
server.getPixelCalibration().getAveragedPixelSizeMicrons()) {
        print 'Requested pixel size lower than current pixel size -
will use ' + server.getAveragedPixelSizeMicrons()
    } else
        downsample = requestedPixelSize /
server.getPixelCalibration().getAveragedPixelSizeMicrons()
}

// Get the selected detections within the ROI, if available - otherwise
get them all
List<PathObject> detections
if (selected == null) {
    detections = hierarchy.getObjects(null,
PathDetectionObject.class)
}

```

```

        println 'Using all ' + detections.size() + ' detections'
    }
else {
    detections = PathObjectTools.getDescendantObjects(selected, null,
PathDetectionObject.class)

    println 'Using ' + detections.size() + ' detections below ' +
selected
}

// Put the detection centroids into a map, with classifications as key
def map = [:]
for (detection in detections) {
    // Get classification
    def pathClass = detection.getPathClass()
    if (pathClass == null)
        continue
    // Take the base classification if necessary
    if (useBaseClassification)
        pathClass = pathClass.getBaseClass()
    // Use toString() to encode all elements in the (possibly derived)
classification
    def pathClassName = pathClass.toString()
    def pointList = map.get(pathClassName)
    if (pointList == null) {
        pointList = []
        map.put(pathClassName, pointList)
    }
    // If we have a cell, prefer to request the nucleus centroid
    def roi = PathObjectTools.getROI(detection, true)
    // Add point, downsampling as required
    pointList << new Point3d(
        roi.getCentroidX() / downsample,
        roi.getCentroidY() / downsample, roi.getZ())
}

// Convert lists to arrays

```

```

data = [:]
for (name in map.keySet())
    data.put(name, map.get(name) as Point3d[])

// If we have a selected object, create a ROI
def mask
if (selected != null) {
    def roi = selected.getROI()
    def region = RegionRequest.createInstance(server.getPath(),
downsample, roi)
    int w = Math.round(region.getWidth()/downsample) as int
    int h = Math.round(region.getHeight()/downsample) as int
    def img = new BufferedImage(w, h, BufferedImage.TYPE_BYTE_GRAY)
    def g2d = img.createGraphics()
    g2d.scale(1.0/downsample, 1.0/downsample)
    g2d.translate(-region.getX(), -region.getY())
    g2d.setColor(Color.WHITE)
    def shape = roi.getShape()
    g2d.fill(shape)
    g2d.dispose()
    // Could create a mask... but how to set it?
    mask = new ImagePlus("I would like to set this mask somehow...",
img)
}

/*
 * -----
 * Run IA GUI and provide ROI data
 * -----
 */

println 'Running IA...'

def iaGui = new InteractionAnalysisGui()
iaGui.initRoi(data)

```

```
if (mask != null) {
    mask.show()
    iaGui.setMask(mask)
}
else
    print("No mask!")

println 'Done!'
```

## 10.6 Wissenschaftliche Beiträge

Vortrag auf der 24. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie in Leipzig am 23.06.2018: *Analyzing spatial interactions in multiplex immunofluorescence whole slide tissue specimens of cancers of the head and neck region* [140].

Poster auf der Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung in Frankfurt a.M. 17. bis 19.09.2018: *Spatial interaction analysis in QuPath using MOSAICsuite*

## 11 Danksagung

Ich danke \_\_\_\_\_ für die Vergabe der Dissertation.

\_\_\_\_\_ und \_\_\_\_\_ aus der MOSAIC Group

\_\_\_\_\_ danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit, in der alle Anliegen stets schnell und konstruktiv bearbeitet wurden. Auf offene Fragen erhielt ich detaillierte und sehr hilfreiche Antworten.

\_\_\_\_\_, danke ich für seine hohe Flexibilität im Umgang mit den individuellen Anforderungen an seine Software. Hierbei zeigte er beeindruckende Fähigkeiten bei der Programmierung und hohe Motivation zur Verbesserung der Anwendungen sowie eine freundliche und offene Einstellung im persönlichen Kontakt. \_\_\_\_\_ danke ich für ihre freundliche und hilfreiche Unterstützung in der Laborarbeit bei der Färbung der Präparate. Insbesondere möchte ich \_\_\_\_\_ für seine motivierende Betreuung und seine Bereitschaft, stets zeitnahe und oft umfangreiche Besprechungen zu ermöglichen, danken. Ich bin ihm für die Unterstützung bei der Kommunikation mit den Softwareentwicklern, die Möglichkeit, Labor und computertechnische Ausstattung zur Bearbeitung der Präparate und der Datensätze zu nutzen, sowie die Initiierung der wissenschaftlichen Beiträge auf zwei Kongressen zu Dank verpflichtet. Besonders danke ich meinen Freundinnen und Freunden sowie meiner Familie für die herzliche emotionale Unterstützung während der Arbeit.