

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

Die Rolle von Adenosin in der hypoxievermittelten  
Hemmung der antitumoralen Immunabwehr

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

Vorgelegt von  
Justus Kaufmann  
aus Köln

Mainz, 2021

Tag der Promotion: 06.12.2022

*"So haben wir es immer gemacht, bringt den Fortschritt nicht voran."*

*- Aus Afrika, Sprichwort der Ewe*

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	4
Abbildungsverzeichnis .....	7
Tabellenverzeichnis.....	8
1. Einleitung .....	9
2. Literaturdiskussion .....	11
2.1 Prognoserelevante Faktoren bei Kopf-Hals-Karzinomen.....	11
2.2 Tumorhypoxie.....	12
2.3 Das Hellström-Paradox und die Suppression des antitumoralen Immunsystems .	17
2.3.1 Das Hellström-Paradox, oder auch Immunsuppression durch Hypoxie .....	17
2.3.2 Die Rolle von CD73 im Tumormikromilieu von Kopf-Hals-Karzinomen.....	19
2.3.3 Weitere Faktoren in der antitumoralen Immunsuppression.....	20
2.4 Exkurs: Anwendungen und Einfluss der Spatialstatistik .....	21
3. Material und Methoden .....	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 Geräte.....	23
3.1.2 Chemikalien .....	24
3.1.3 Puffer .....	24
3.1.4 Antikörper .....	25
3.1.5 Fluorochrome .....	25
3.1.6 Gewebe .....	25
3.2 Methoden .....	26
3.2.1 Immunfluoreszenz .....	26
3.2.1.1 Vorbereitung der Schnitte .....	26
3.2.1.2 Antigendemaskierung.....	26

3.2.1.3	Fluoreszenzlöschung .....	26
3.2.1.4	Primärantikörper .....	27
3.2.1.5	Sekundärantikörper .....	27
3.2.1.6	Vorbereitung und Reaktion des Fluorochroms .....	27
3.2.1.7	Änderungen in weiteren Durchgängen .....	27
3.2.1.8	Kernfärbung und Eindecken .....	28
3.2.2	Whole slide-Scan .....	28
3.2.3	Auswertung .....	28
3.2.3.2	Auswertung mit dem „R“-package „Spatstat“ .....	29
3.2.3.2.1	"planar point pattern" .....	30
3.2.3.2.2	K-Funktion .....	30
3.2.3.2.3	Loh's Bootstrap .....	32
3.2.3.2.4	Pair correlation function .....	34
3.2.3.2.5	G-Funktion .....	35
3.2.3.2.6	Inhomogene ppp .....	36
3.2.3.2.7	Kombinierte ppp .....	37
3.2.3.2.8	Cross-Funktionen .....	38
4.	Ergebnisse .....	40
4.1	Clustern CTL? .....	40
4.2	Der Einfluss von Tumorhypoxie auf CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten .....	41
4.3	Der Einfluss von CD73 auf CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten .....	43
4.3.1	Im Tumor .....	43
4.3.2	Im Stroma .....	44
5.	Diskussion .....	46
5.1	Diskussion der Methodik .....	46
5.1.1	Immunfluoreszenzfärbung .....	46
5.1.2	QuPath .....	48

5.1.3 Spatstat.....	51
5.2 Diskussion der Ergebnisse .....	53
5.2.1 Anwendung der spatialstatistischen Funktionen .....	54
5.2.2 Clustern CTL? .....	67
5.2.3 Der Einfluss von Tumorhypoxie auf CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten .....	71
5.2.4 Der Einfluss von CD73 auf CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten.....	73
5.2.4.1 Im Tumor .....	73
5.2.4.2 Im Stroma.....	74
5.2.5 Kommentar zur G-Funktion .....	75
6. Zusammenfassung .....	76
7. Literaturverzeichnis.....	79
8. Anhang.....	92
8.1 R-Skript.....	92
9. Danksagung.....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
10. Tabellarischer Lebenslauf.....	99

## Abbildungsverzeichnis

DARSTELLUNG VERSCHIEDENER KONFIDENZINTERVALLE DURCH DIE "LOHBOOT"-FUNKTION ANHAND EINES REPRÄSENTATIVEN AUSSCHNITTES EINES PLATTENEPITHELKARZINOMS DES HYPOPHARYNX, 10X VERGRÖßERUNG.	34
BILD DER JUNGEN/ALTEN FRAU .....	46
ADELSONS "SCHACHBRETT-SCHATTEN-ILLUSION UND DER BEWEIS DER ILLUSION. ....	48
10X VERGRÖßERUNG EINES PLATTENEPITHELKARZINOMS DER NASE. ....	51
REPRÄSENTATIVER AUSSCHNITT EINES PLATTENEPITHELKARZINOMS DES HYPOPHARYNX, 10X VERGRÖßERUNG .....	53
BERECHNUNG DER G-FUNKTION EINES REPRÄSENTATIVEN AUSSCHNITTES EINES PLATTENEPITHELKARZINOMS DES HYPOPHARYNX, 10X VERGRÖßERUNG.....	55
BERECHNUNG DER K-FUNKTION EINES REPRÄSENTATIVEN AUSSCHNITTES EINES PLATTENEPITHELKARZINOMS DES HYPOPHARYNX, 10X VERGRÖßERUNG.....	57
BERECHNUNG DER PAIR CORRELATION FUNCTION (PCF) EINES REPRÄSENTATIVEN AUSSCHNITTES EINES PLATTENEPITHELKARZINOMS DES HYPOPHARYNX, 10X VERGRÖßERUNG.....	59
VERGLEICH DER GCROSS-FUNKTIONEN VON CTL UND NORMOXISCHEN (C+D) ODER HYPOXISCHEN (E+F) TUMORZELLEN EINES REPRÄSENTATIVEN AUSSCHNITTES EINES PLATTENEPITHELKARZINOMS DES HYPOPHARYNX. 10X VERGRÖßERUNG .....	61
VERGLEICH DER KCROSS- UND PCF.CROSS-FUNKTIONEN VON CTL UND NORMOXISCHEN (C+D) ODER HYPOXISCHEN (E+F) TUMORZELLEN EINES REPRÄSENTATIVEN AUSSCHNITTES EINES PLATTENEPITHELKARZINOMS DES HYPOPHARYNX. 10X VERGRÖßERUNG.....	63
BEISPIEL FÜR DIE VISUELLE SIGNIFIKANZTESTUNG BEIM VERGLEICH VON KCROSS.INHOM-FUNKTIONEN. ....	65
UMGEBUNG DES AUSSCHNITTES EINES PLATTENEPITHELKARZINOMS DES HYPOPHARYNX, ANHAND DESSEN DIE BEISPIELANALYSE DURCHGEFÜHRT WURDE. 5X VERGRÖßERUNG.....	66
EXEMPLARISCHE UND REPRÄSENTATIVE DARSTELLUNG DER INHOMOGENEN K-FUNKTION UND DER INHOMOGENEN PCF EINES MICROARRAY-SPOTS. ....	67
EXEMPLARISCHE UND REPRÄSENTATIVE G-FUNKTION EINES MICROARRAY-SPOTS. ....	68
VERGLEICH DER TUMOR-STROMA-ARCHITEKTUR VERSCHIEDENER KOPF-HALS-KARZINOME IN JEWEILS 3X VERGRÖßERUNG. ....	70
PLATTENEPITHELKARZINOM DER NASE IN 3X VERGRÖßERUNG. ....	72

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ERGEBNISSE DER SPATSTAT-FUNKTIONEN BEZÜGLICH DES CLUSTERS VON CTL IN "WHOLE SLIDE"-PRÄPARATEN.....	40
TABELLE 2: ERGEBNISSE DER SPATSTAT-FUNKTIONEN BEZÜGLICH DES CLUSTERS VON CTL IN MICROARRAY-SPOTS.....	40
TABELLE 3: ERGEBNISSE DER SPATSTAT-FUNKTIONEN BEZÜGLICH HYPOXIEINDUZIERTER IMMUNSUPPRESSION IN "WHOLE SLIDE"PRÄPARATEN.....	42
TABELLE 4: ERGEBNISSE DER SPATSTAT-FUNKTIONEN BEZÜGLICH HYPOXIEINDUZIERTER IMMUNSUPPRESSION IN MICROARRAY-SPOTS. ....	42
TABELLE 5: ERGEBNISSE DER SPATSTAT-FUNKTIONEN BEZÜGLICH TUMORALER CD73-INDUZIERTER IMMUNSUPPRESSION IN "WHOLE SLIDE"-PRÄPARATEN. ....	43
TABELLE 6: ERGEBNISSE DER SPATSTAT-FUNKTIONEN BEZÜGLICH TUMORALER CD73-INDUZIERTER IMMUNSUPPRESSION IN MICROARRAY-SPOTS.....	44
TABELLE 7: ERGEBNISSE DER SPATSTAT-FUNKTIONEN BEZÜGLICH STROMALER CD73-INDUZIERTER IMMUNSUPPRESSION IN "WHOLE SLIDE"-PRÄPARATEN .....	45
TABELLE 8: ERGEBNISSE DER SPATSTAT-FUNKTIONEN BEZÜGLICH STROMALER CD73-INDUZIERTER IMMUNSUPPRESSION IN MICROARRAY-SPOTS. ....	45



## 1. Einleitung

Aufgrund des schnellen Wachstums der neoplastischen Zellen in Relation zur Proliferation der versorgenden Gefäße sind hypoxische Gewebeareale ein typisches Merkmal von soliden malignen Tumoren (1, 2). Die aktuelle Forschung beschäftigt sich dabei mit der Frage, ob Hypoxie eine hemmende Wirkung auf die antitumorale Immunantwort hat und durch welche Mechanismen ein solcher Effekt vermittelt werden könnte. Die Existenz einer Hypoxie-vermittelten Immunsuppression konnte unter anderem durch eine wegweisende Arbeit von Hatfield et al. (3) untermauert werden, in der anhand eines Tumormodells der Maus gezeigt wurde, dass eine inspiratorische Hyperoxie der Versuchstiere die Immunsuppression im Tumormikromilieu teilweise aufheben konnte.

Im Folgenden wird ein möglicher Mechanismus für dieses Phänomen erklärt. Als Teil der Antwortreaktion des Tumors auf die Hypoxie werden, vermittelt durch den Hypoxie-induzierten-Faktor (HIF)-1, auf Tumorzellen vermehrt die Ektonukleotidasen CD39 und CD73 exprimiert. Diese Ektonukleotidasen metabolisieren im hypoxischen Milieu ATP zu Adenosin, wobei CD73 den entscheidenden Schritt von AMP zu Adenosin katalysiert. Freies Adenosin wirkt unter anderem vasodilatativ und soll so die Durchblutung des Gewebes - und damit die Versorgung mit Sauerstoff - verbessern (4). Gleichzeitig steigt die extrazelluläre Konzentration von Adenosin, welches über verschiedene Rezeptoren (vor allem A2a) einen direkten inhibitorischen Einfluss auf verschiedene Zellen des Immunsystems hat (5).

Eine Methode, mit der verschiedene Zellen (Immunzellen) und/oder Gewebezustände (Hypoxie) gleichzeitig in einem Tumorpräparat dargestellt werden können, ist die Immunfluoreszenz. Dabei werden mithilfe von Antikörpern bestimmte Oberflächenproteine angefärbt, die als Marker für verschiedene Zellen und funktionelle Zustände des Gewebes fungieren. So weist CD8 zuverlässig zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) nach, während eine hohe Dichte an CD73 nach weit verbreiteter Ansicht indirekt eine hohe Adenosinkonzentration nachweist. Ein direkter Nachweis von Adenosin ist in archiviertem Gewebematerial menschlicher Tumoren mit derzeitigen Methoden nicht möglich. In der vorliegenden Arbeit wurden mithilfe der Multikanal-Immunfluoreszenz vier Antigene gleichzeitig dargestellt. In der Zukunft werden immer weiter entwickelte

Techniken zur Verfügung stehen, die die Anzahl der gleichzeitig detektierbaren Antigene deutlich erhöhen werden. Dadurch wird es möglich sein, Zellpopulationen innerhalb eines Präparates deutlich genauer zu definieren (6).

Problematisch ist hierbei jedoch, dass beim bloßen Mikroskopieren des Präparates zwar viele qualitative Aussagen getroffen werden können, diese jedoch einer subjektiven Wertung unterliegen. Im Gegensatz dazu ist es mithilfe der Durchflusszytometrie zwar möglich, quantitative Aussagen zu treffen, jedoch geht hierbei methodenbedingt der räumliche Bezug verschiedener Zellen zueinander verloren. Die Entwicklung von Möglichkeiten, aus den qualitativen Vermutungen der Mikroskopie belastbare quantitative Aussagen zu erstellen, steht derzeit noch ganz am Anfang. Standardisierte Algorithmen fehlen.

Ziel dieser Arbeit war ursprünglich die Überprüfung des pathophysiologischen Mechanismus einer hypoxieinduzierten und durch Adenosin vermittelten Immunreaktion. Im frühen Verlauf der Arbeit zeigte sich jedoch, dass eine rein visuelle Auswertung nicht ausreicht und zuverlässige Methoden für eine quantitative Auswertung noch fehlen. Es wurde daher weiterhin zum Ziel dieser Arbeit, eine Methode zu etablieren, die es ermöglicht, statt qualitativer Eindrücke beim Mikroskopieren eines Tumorpräparates, mithilfe validierter spatialstatistischer Methoden quantitative Aussagen zu treffen, die keinem subjektiven Bias unterliegen.

Zu diesem Zweck wurden hier CD8-positive Immunzellen (zytotoxische T-Lymphozyten), ein Marker für Adenosin, CD73, sowie ein Marker für Hypoxie, Carboanhydrase (CA) IX in einem Präparat gleichzeitig untersucht. Dabei kann zunächst eine biologische Plausibilitätskontrolle der Methodik anhand des Verhältnisses von Immunzellen und Hypoxie erfolgen. Bezüglich der Inhibition von CTL liegen bereits Daten aus *in vitro* Experimenten und aus Tiermodellen vor, die mit der hier bestimmten Antigenkonstellation übereinstimmen (3, 7). Anschließend kann die Methodik auf die eigentliche Fragestellung angewendet werden, nämlich die Rolle von Adenosin in der Vermittlung der hypoxieinduzierten Immunsuppression.

## 2. Literaturdiskussion

### 2.1 Prognoserelevante Faktoren bei Kopf-Hals-Karzinomen

Mit insgesamt 4,9% aller neu aufgetretenen Krebserkrankungen und 4,8% aller durch Krebs verursachten Todesfälle weltweit im Jahr 2018 stellt die Gesamtheit der Kopf-Hals-Tumore eine wichtige Gruppe der Krebserkrankungen dar (8). Die Prognose der Erkrankung ist dabei abhängig von einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren (9).

Einige Faktoren, wie Tumorgröße oder lokaler Lymphknotenbefall, sind durch das Fortschreiten der Erkrankung bedingt (10). Sie erlauben eine erste Einschätzung der Prognose. Sie bestimmen zudem maßgeblich das Ausmaß und die Intensität der Therapie (11). Andere Faktoren, so zum Beispiel das Resektionsausmaß, können naturgemäß erst nach der operativen Resektion des Primarius bestimmt werden und sind ebenfalls ausschlaggebend für Aspekte der Therapie (z.B. simultane Gabe einer Chemotherapie mit einer adjuvanten Radiotherapie), sowie die weitere Prognose (12).

Auch Komorbiditäten tragen entscheidend zur Prognose des Patienten bei, da Patienten mit einem schlechteren Allgemeinzustand (bspw. ECOG oder Karnofsky-Index) eine vermehrte Anfälligkeit für Komplikationen haben, die dann auch häufig schwerwiegender sind (13).

Ein Gegenstand aktueller Diskussionen und nicht nur entscheidend für die Prognose, sondern auch für die Therapie, sind Infektionen mit High-Risk-Genotypen des Humanen Papillomavirus (HPV) (14-16). Diese Viren können Teile ihrer DNA in das menschliche Genom integrieren und haben aufgrund mehrerer Mechanismen (Inaktivierung von Tumorsuppressor-Proteinen wie p53 oder Rb, Aktivierung von PIK3CA und dadurch auch der mTOR-Signalkaskade, epigenetische Faktoren, gesteigerte Genominstabilität, sowie eine Hochregulation des APOBEC-Systems) ein hohes karzinogenes Potential (17, 18). Es konnte gezeigt werden, dass ein Kopf-Hals-Karzinom des Oropharynx, das auf der Basis einer Infektion mit high-risk HPV entstanden ist, eine deutlich bessere Prognose als ein HPV-negatives Karzinom des Oropharynx hat (19). Dies konnte jedoch lediglich für Karzinome im Bereich des Oropharynx nachgewiesen werden, während Kopf-Hals-Tumore anderer Bereiche keine Prognoseverbesserung durch die Assoziation mit den Viren zeigten (20-23). Auch das Therapieansprechen HPV-positiver Karzinome

ist besser als das Ansprechen von HPV-negativen Karzinomen (24). Ein wichtiger Einwand ist jedoch, dass viele Studien wichtige Confounder außer Acht ließen, wie zum Beispiel die Tatsache, dass aufgrund der Epidemiologie und Verbreitung von HPV eine Häufung von HPV-assoziierten Karzinomen bei jüngeren, und somit bei weniger kranken Patienten zu beobachten ist (25, 26).

Neben der Lokalisation eines Karzinoms spielen auch weitere Faktoren, wie Geschlecht, Raucheranamnese, Alkoholkonsum oder der Sozialstatus (z.B. Einkommen) eine wichtige Rolle für die Prognose (27).

Weitere, vorwiegend für die Forschung interessante Faktoren, die die Prognose entscheidend beeinflussen können, sind molekulare Marker. Deren Bedeutung liegt vor allem darin, dass sie die Basis für neue Therapieansätze darstellen und zum Beispiel im Rahmen eines individualisierten Therapiekonzeptes zum Einsatz kommen können. So verdoppelt sich das Risiko, an einem Kopf-Hals-Karzinom zu sterben, wenn das Karzinom den Angiogenese-stimulierenden Faktor "vascular endothelial growth factor" (VEGF) exprimiert (28). Als Resultat wurden zwar verschiedene Antikörpertherapien für die Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren etabliert, diese haben jedoch, bis auf die Therapie mit Cetuximab, in der klinischen Arbeit bisher jedoch noch wenig Relevanz (29-32).

Ein weiterer Faktor, der mit einer deutlich verschlechterten Prognose einhergeht und daher eine wichtige Grundlage dieser Arbeit ist, ist die Tumorhypoxie (2, 33, 34).

## **2.2 Tumorhypoxie**

Um zu verstehen, warum Tumorhypoxie mit einer schlechteren Prognose assoziiert wird, ist es wichtig, die Pathogenese und die Folgen der Hypoxie zu kennen.

Hypoxische Gewebeareale werden als Bereiche definiert, in denen der Sauerstoffdruckpartialdruck unter 10 mmHg liegt. Abweichend davon liegt der mittlere physiologische Sauerstoffpartialdruck in den meisten Geweben zwischen 25 mmHg bis hin zu über 50 mmHg (33, 35). Hypoxie ist also eine Mangelversorgung des Gewebes mit Sauerstoff.

In einem Review von 2004 zum Thema Hypoxie beschreiben Vaupel et al. drei grundsätzliche Mechanismen, die zur Entwicklung von Tumorhypoxie führen können (36):

1. Eine perfusionslimitierte Sauerstoffversorgung aufgrund der strukturellen und funktionellen Abnormalitäten der das Tumorgewebe versorgenden Kapillargefäße.
2. Eine diffusionslimitierte Sauerstoffversorgung durch die gestörte Struktur der Tumor-/Stromamatrix, die aufgrund der Größe der Tumorzellaggregate in erhöhten Diffusionsdistanzen resultiert.
3. Eine Tumor- und/oder mit der Therapie assoziierte Anämie, die mit einer verringerten Sauerstofftransportkapazität des Blutes einhergeht.

Diese Mechanismen können gleichzeitig vorliegen und wirken synergistisch. Weiterhin liegen jedem dieser drei Mechanismen mehrere Ursachen zugrunde.

So resultiert die Einschränkung der Perfusion eines Tumors und die damit zusammenhängende Einschränkung der Sauerstoffversorgung einerseits aus der gestörten Struktur der den Tumor versorgenden Gefäße (37) und andererseits aus der gestörten Funktion dieser Gefäße (38).

Die Struktur der Tumorgefäße unterscheidet sich maßgeblich von der Struktur normaler Blutgefäße. Während das normale Gefäßsystem in einer geordneten Hierarchie (Arterien -> Arteriolen -> Kapillargefäße etc.) angeordnet und gleichmäßig verteilt ist, zeigen Tumorgefäße ein geschlungenes Wachstumsmuster, irreguläre Aufzweigungen, arteriovenöse Shunt-Formationen und eine generell ungleichmäßige Verteilung unter Missachtung der physiologischen Hierarchie oder enden sogar blind (36, 37, 39). Abgesehen von der makroskopischen Struktur zeigen diese Tumorgefäße auch eine gestörte mikroskopische Struktur (40).

So zeigen Tumorgefäße vergrößerte Fenestrations zwischen Endothelzellen. Dies kann so weit gehen, dass Tumorzellen sogar einen Teil des Endothels bilden (41). Während eine Basalmembran zwar in den meisten Fällen vorhanden ist, ist diese in vielen Regionen fehlerhaft ausgebildet, da mindestens eine Komponente fehlt. Zusätzlich ist die Expression von für die Endothelfunktion wichtigen Proteinen, wie z.B. Endoglin, eingeschränkt (42, 43).

Aus dieser gestörten Struktur resultiert auch eine gestörte Funktion. So werden diese Gefäße zum Teil nur durch Plasma perfundiert, da die Gefäße zu klein für Erythrozyten sind (38). Zusätzlich sind nicht alle offenen Gefäße dauerhaft perfundiert, so dass der Blutfluss in einem Gebiet innerhalb von wenigen Minuten nicht nur einen unterschiedlichen Verlauf nehmen, sondern auch unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann (44).

Aufgrund des veränderten Aufbaus der Gefäßwand ist die vaskuläre Permeabilität deutlich erhöht, woraus eine Erhöhung des interstitiellen Drucks resultiert, der wiederum mit einer Komprimierung der Tumorgefäße und damit einer Verminderung der Perfusion einhergeht (40).

Abgesehen von der Einschränkung der Perfusion des Tumorgewebes aufgrund der gestörten Architektur der Tumorgefäße resultiert aus der gestörten Architektur des Tumorgewebes auch eine Limitierung der Diffusion. So ergeben sich aus einer ungleichmäßigen Verteilung der Gefäße im Gewebe zum Teil stark erhöhte Diffusionsdistanzen, so dass manche Tumorzellen weit über 70  $\mu\text{m}$  von einem Kapillargefäß entfernt liegen. Vaupel et al stellen diese Entfernung auf der Basis von berechneten Diffusionsdistanzen in dem oben erwähnten Review von 2004 als kritische Grenze für die zuverlässige Aufrechterhaltung eines physiologischen Mikromilieus dar (36, 45). Dies konnte größenordnungsmäßig anhand von *in vivo* Daten von Hirntumoren bestätigt werden (46). Die Folge dieser großen Entfernung ist nicht nur eine Minderversorgung mit Sauerstoff, und damit die Entwicklung eines hypoxischen Gewebeszustandes, sondern auch ein Mangel an weiteren Nährstoffen, wie zum Beispiel Glukose und ein fehlender Abtransport von Abbauprodukten (36).

Abgesehen von der Verteilung der Kapillaren wird diese Einschränkung der Diffusion weiter verstärkt durch die Struktur mancher Kapillaren. Hier spielen die sogenannten "Haarnadel"-Kapillaren eine wichtige Rolle, verlängerte Kapillaren mit einer 180°-Wende an der Spitze, aufgrund derer zuführender und abfließender Teil des Gefäßes nah beieinander liegen (39, 47). Daraus resultiert ein longitudinaler Diffusionsgradient, ähnlich des Gegenstromprinzips der Niere. So konnte gezeigt werden, dass Zellen am Ende solcher Kapillaren ebenfalls Hypoxie-typische Marker wie Carbonic anhydrase IX

(CA IX) exprimieren, obwohl diese Zellen direkt an das Kapillargefäß angrenzen und die Diffusionsdistanz nur wenige  $\mu\text{m}$  beträgt (45).

Die durch Einschränkung von Perfusion und Diffusion entstandene Hypoxie wird weiter verstärkt durch die Tumor-assoziierte Anämie. Hierunter versteht man einerseits die Tumor- und andererseits die Therapie-induzierte Anämie (36). So sind über 40% aller Karzinomkrankungen vor Therapie bereits mit einer Anämie assoziiert (48). Patienten, die eine zytostatische Therapie erhalten haben, leiden sogar in über 90% der Fälle an einer Anämie (49).

Die Mechanismen, mit denen ein Karzinom zu einer Anämie beitragen kann, sind dabei vielfältig (50). Abgesehen von einer mechanischen Komponente, die über eine Störung des Blutflusses zu Knochenmarksnekrosen (durch Metastasen) oder einer mechanischen Hämolyse führen kann, sowie einem Blutverlust durch chronische Blutungen, ist der bedeutendste Faktor eine Aktivierung des Immunsystems und die damit einhergehende Steigerung der Zytokinproduktion. Durch diese Zytokine wird unter anderem die Produktion von Erythropoietin in der Niere gehemmt, so dass es zu einer Suppression der Hämatopoese auf humoraler, zellulärer und renaler Ebene kommt (50, 51). Zusätzlich kommt es aufgrund des erhöhten Energie- und Ressourcenverbrauchs des Tumors zu einer mangelhaften Neubildung von Erythrozyten, auch bedingt durch eine Reduktion der erythropoetischen Stammzellen im Rahmen von Knochenmarkskarzinosen und -metastasen (51, 52). Dies wird zusätzlich durch einen veränderten Eisenstoffwechsel im Rahmen der Akut-Phase-Reaktion verstärkt (53).

Wenn man nun von diesen Ursachen für die Entstehung der Tumorphypoxie auf die Mechanismen schließen will, aufgrund derer sich Tumorphypoxie negativ auf die Prognose eines Patienten auswirkt, so kann man zwei zugrunde liegende Mechanismen unterscheiden, die im Folgenden erklärt werden: Erstens die Auswirkungen auf das Verhalten der Tumorzellen selbst und zweitens die Auswirkungen auf äußere Einflüsse, wie zum Beispiel Strahlen- und Chemotherapie (36).

Ein hypoxisches Tumormikromilieu führt zu verschiedenen Veränderungen innerhalb einer Tumorzelle. So kommt es zu Veränderungen des Proteoms, die einerseits zu einem Zellzyklusarrest oder einer Differenzierung führen können. „Dies würde Phänomene wie

verzögerte Rezidive, inaktive Mikrometastasen oder ein verlangsamtes Wachstum von großen Tumoren erklären.“ (1)

Andererseits kann eine solche Proteomveränderung auch zu einem klinisch aggressiveren Phänotypen führen, in dem vor allem die Zellen selektiert werden, die in der Lage sind, sich trotz schlechter Bedingungen und Nährstoffmangel uneingeschränkt zu vermehren (54-56).

Gleichzeitig versuchen Tumorzellen dieser unvorteilhaften Umgebung zu entkommen, was sich ebenfalls in einem Fortschreiten der Malignität äußert (36). So scheinen hypoxische Karzinome ein erhöhtes Potential für lokalinvasive Wachstumsmuster zu haben (57). Zusätzlich weisen diese Karzinome eine verstärkte perifokale Tumorzellausbreitung (54, 58) und eine erhöhte regionale sowie globale Metastasierungsrate (59-61) auf.

Als weitere Reaktion von Tumorzellen auf den Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen im hypoxischen Milieu kommt es zu einer generellen Verlangsamung des Stoffwechsels und einer reduzierten Zellteilung (1, 62). Diese Reaktion ist gleichzeitig ein wichtiger Grund, um die Auswirkungen von Hypoxie auf äußere Einflüsse zu erklären. Zytostatische Therapien zielen auf sich rapide vermehrende Zellen ab. Sich aufgrund von hypoxischen Bedingungen verlangsamt teilende Tumorzellen weisen daher eine erhöhte Therapieresistenz auf (63).

Weiterhin führt Hypoxie zu einer Erhöhung der Strahlenresistenz. Der größte Teil der DNA-Schäden, die durch Röntgenstrahlung erzeugt werden, ist indirekt durch freie Radikale vermittelt. Unter normoxischen Bedingungen entstehen bei diesen Reaktionsketten Endprodukte, die nicht mehr repariert werden können. Unter hypoxischen Bedingungen entstehen ebenfalls Radikal-bedingte Veränderungen der DNA, diese sind jedoch anderer chemischer Natur und können repariert werden. Man spricht deshalb von einer Fixierung des Strahlenschadens in Anwesenheit von Sauerstoff (64, 65). In hypoxischen Gewebearealen fehlen diese Effekte, so dass die Strahlendosis, die benötigt wird, um *in vitro* bei hyp- oder anoxischen Tumoren den gleichen Effekt zu erreichen wie bei einem normoxischen Tumor, bis zu Zwölf-mal höher sein kann (66, 67). Wahrscheinlich ist die oben erklärte Sauerstoff-Fixationshypothese jedoch nicht der einzige Grund für diesen Effekt (68).



Zudem wird durch die ungünstigen Bedingungen eines hypoxischen Areal die Produktion von Stoffen und Proteinen, die einer Zelle helfen, extreme Situationen zu überstehen, erhöht (z.B. Glutathion oder Hitzeschockproteine). Diese erhöhen die Strahlenresistenz ebenfalls, wenn auch über unterschiedliche Mechanismen. Während Glutathion als Radikalfänger fungiert und statt DNA mit Alkylantien reagieren kann (63, 69), sind Hitzeschockproteine wie Hsp70 ebenfalls mit einer erhöhten Strahlenresistenz verbunden (70-73).

Ebenso findet, wie bereits oben beschrieben, eine Selektion von Zellen statt, die ein vermindertes apoptotisches Potential haben und so ebenfalls eine erhöhte Resistenz gegenüber Strahlenschäden haben (71).

Eine weitere Ursache für ein schlechteres Outcome ist, dass hypoxische Areale zu einem großen Teil aufgrund einer verminderten Perfusion und Diffusion entstehen, so dass eine systemische Chemotherapie in diesen Bereichen häufig ebenfalls keine ausreichende Konzentration erreichen kann (74, 75). Dies konnte unter anderem anhand des Beispiels von Cisplatin sehr anschaulich demonstriert werden (76).

## **2.3 Das Hellström-Paradox und die Suppression des antitumoralen Immunsystems**

### **2.3.1 Das Hellström-Paradox, oder auch Immunsuppression durch Hypoxie**

Weiterhin scheint Hypoxie zu einem großen Teil für das sogenannte "Hellström-Paradox" verantwortlich zu sein. Hier ist es wichtig zu verstehen, dass das Immunsystem einen der zentralen körpereigenen Schutzmechanismen gegen die Entwicklung entarteter Zellen darstellt. So sind langfristig immunsupprimierte Patienten überdurchschnittlich häufig von Karzinomerkkrankungen betroffen (77). Daher kam es entsprechend überraschend, als Hellström et al. (78) bei Karzinompatienten die Existenz von gegen den Tumor gerichteten Lymphozyten nachweisen konnten. Diese waren in der Lage, neoplastische Zellen des jeweiligen Patienten *in vitro* zu zerstören, konnten selbiges jedoch nicht *in vivo*.

Hellström et al. (78) propagierten zum Zeitpunkt der Veröffentlichung ihrer Publikation zwei mögliche Begründungen für dieses Paradoxon:

1. Die Anti-Tumor-Reaktion der CTL findet auch im Patienten statt, jedoch ist das Wachstum des Karzinoms insgesamt so stark ausgeprägt, dass es den destruktiven Prozess der Tumorzellen durch CTL übersteigt.
2. Es existiert ein anderer Effekt, der die Destruktivität der CTL herabsetzt (78).

Lange Zeit war unklar, welcher dieser Umstände für diesen Effekt verantwortlich ist und über welchen Mechanismus dies vermittelt wird. Inzwischen konnte jedoch gezeigt werden, dass in vielen Fällen vor allem die zweite Begründung, also die Hemmung des antitumoralen Immunsystems, ursächlich ist. Vor allem Hypoxie spielt über den im Folgenden dargestellten Mechanismus eine wichtige Rolle für dieses Phänomen (79, 80). Dabei ist jedoch zuerst wichtig zu verstehen, wie Hypoxie in ein biochemisches Signal umgewandelt wird. Der wichtigste Signalweg hierfür ist der Hypoxie-induzierbare-Faktor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ )-Signalweg (81).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass dieser Signalweg auch für Wachstum und Vaskularisation, sowie Hypoxie-induzierte Apoptose eines Tumors verantwortlich ist (82).

Der HIF1 $\alpha$  wird unter normoxischen Bedingungen durch Prolyl-Hydroxylase-Domäne-enthaltende Proteine (PHD1, PHD2, PHD3) an einem Prolinrest hydroxyliert (83-85) und bindet daraufhin das von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor-Protein. Über mehrere Schritte kommt es nun zur Ubiquitinisierung und anschließend zur proteasomalen Degradation (86). Zusätzlich wird die Interaktion von HIF1 $\alpha$  mit Co-Aktivatoren wie p300 oder cAMP-responsive-binding (CREB)-binding-protein (CBP) durch den Factor inhibiting HIF1 $\alpha$  (FIH1) verhindert, indem dieser einen Asparaginrest des HIF1 $\alpha$  hydroxyliert (87). Im Gegensatz dazu werden PHD1&PHD3 unter hypoxischen Bedingungen durch die Ubiquitin-Ligasen seven in absentia homologue 1A (SIAH1A) und 2 nicht nur für den proteasomalen Abbau markiert, unter hypoxischen Bedingungen sind sie zusätzlich in ihrer Funktion eingeschränkt (88, 89). Dadurch wird HIF1 $\alpha$  stabilisiert und kann so die Expression von einer Reihe an Genen aktivieren, die unter anderem für Proteine der Glykolyse, Erythropoietin, Adrenomedullin und VEGF kodieren (90, 91). Diese Expression ist unter anderem verantwortlich für den Progress der malignen Erkrankung durch eine vermehrte Expression von VEGF, wie bereits in der

ersten Version von Hanahan & Weinbergs "Hallmarks of cancer" beschrieben wurde (92, 93). Außerdem kommt es durch die Aktivierung des HIF-Systems zu einer Erhöhung der Endonukleotidasen CD73 und CD39 (79). Bei einem Energiemangel werden diese Enzyme vermehrt exprimiert und katalysieren den Abbau von ATP und ADP zu AMP (CD39) und anschließend zu extrazellulärem Adenosin (CD73). Dieses führt über Bindung an den von diversen Immunzellen exprimierten Adenosin-Rezeptor A2a zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP der Zielzelle (5). Ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel führt bei CTL wiederum zu einer Herabregulation der Zellaktivität und somit zu einer Immunsuppression.

Der physiologische Zweck dieses Mechanismus ist es, gesunde Zellen bei einer Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes vor der Lyse durch Immunzellen zu schützen (94-96). Bei einer malignen Erkrankung hat dies jedoch den unerwünschten Nebeneffekt des Schutzes maligner Zellen. Wie stark der immunsuppressive Effekt durch Hypoxie sein kann, konnten Hatfield et al. durch die Experimente an Mäusen zeigen. Karzinome dieser Tiere zeigten unter Beatmung mit einem hyperoxischen Gasgemisch mit einem  $pO_2$  von 60% zunächst eine deutliche Zunahme der Immuninfiltration und anschließend eine deutliche Regredienz (3).

### **2.3.2 Die Rolle von CD73 im Tumormikromilieu von Kopf-Hals-Karzinomen**

Neben der oben beschriebenen direkten Inhibition von CTL scheint CD73 dabei jedoch noch weitere, bis jetzt noch nicht vollständig geklärte Funktionen zu haben, die für den Progress und damit auch die Prognose einer Karzinomerkrankung von großer Relevanz sind. So ist eine höhere Expression von sowohl CD39 als auch CD73 mit einer schlechteren Prognose assoziiert (97).

CD73 wird dabei sowohl von Immun- (98) als auch von Tumor- und Stromazellen (z.B. Tumor-assoziierte Fibroblasten) sowie gesundem Gewebe (z.B. Endothelzellen) exprimiert und spielt dabei je nach Lokalisation unterschiedliche Rollen.

So konnte gezeigt werden, dass von Endothelzellen exprimiertes CD73 dafür sorgt, nach der Durchwanderung von neutrophilen Leukozyten entstandene Lücken im Gefäßendothel wieder zu verschließen (99). Eine Hochregulation in Tumorgefäßen

könnte so möglicherweise die Infiltration durch Leukozyten bremsen. Gleichzeitig kann durch eine erhöhte Expression bereits die Adhäsion der Leukozyten an das Endothel gehemmt werden (100). Eine pharmakologische Blockade von CD73 mit “ $\alpha,\beta$ -methylenadenosine 5'-diphosphate” (APCP) reduzierte einerseits das Tumorstadium und erhöhte gleichzeitig die Effektivität einer adaptiven T-Zell-Therapie in Mäusen (100).

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Adenosinkonzentration eine treibende Rolle in der Metastasierung von Mammakarzinomen spielt. So metastasierten Mammakarzinome von Mäusen deutlich seltener bei einer Blockade von CD73, beispielsweise mit einem monoklonalen Anti-CD73-Antikörper oder mit APCP.

### **2.3.3 Weitere Faktoren in der antitumoralen Immunsuppression**

Solche immunsuppressiven Effekte werden weiter verstärkt durch eine Herabregulation von MHC-Molekülen auf der Oberfläche der Tumorzellen, die dadurch deutlich schlechter von CTL erkannt und zerstört werden können (101, 102).

Ein weiterer wichtiger Faktor, der es Karzinomen erlaubt dem Immunsystem zu entkommen, ist die Fähigkeit, in CTL eine Apoptose zu induzieren. Dies kann über mehrere Mechanismen geschehen, allen voran eine Hochregulation z.B. des Fas-Liganden oder TNF- $\alpha$  (101, 103, 104).

Diese Entwicklungen in der Forschung haben weitreichende klinische Folgen. So konnten auf Basis dieser Thesen mehrere Therapien mit verschiedenen Ansätzen zugelassen werden. Auf der einen Seite die Checkpoint-Inhibitoren, die über eine Blockade von z.B. PD-1 oder CTLA-4 eine direkte und relevante Disinhibition des Immunsystems bewirken (105, 106). Auf der anderen Seite die A2a-Rezeptorantagonisten, die den oben beschriebenen Mechanismus der Immunsuppression durch das Tumormikromilieu blockieren und so durch eine “lokale” Wirkung möglicherweise eine komplikationsärmere Alternative darstellen oder in Kombination die Wirkung der Checkpoint-Inhibitoren sogar weiter verstärken könnten (79).

## 2.4 Exkurs: Anwendungen und Einfluss der Spatialstatistik

Die Entwicklung der spatialen Statistik reicht weit in die Vergangenheit und ist von vielen verschiedenen Fachrichtungen adaptiert und zuweilen auch parallel vorangetrieben worden, woraus sich eine äußerst komplexe Historie ergibt. Einige interessante Aspekte dieser Historie, die unter anderem ausführlich in dem Buch „Statistics for spatial data“ von Cressie dargestellt wird, werden hier dennoch aufgeführt (107).

Bereits 1686 schilderte Halley der Royal Society of London seine Versuche mithilfe einer Landkarte physikalische Gründe für Änderungen der Passat- und Monsunwinde in den Tropen zu ergründen (108).

Eine der ersten Erwähnungen einer räumlichen Komponente in der statistischen Literatur kommt 1935 von R. A. Fisher, der in seinem Werk “The design of experiments” anmerkt, dass sich Flächen eines Feldes, gemessen am Ausmaß der Ernte, wahrscheinlicher ähneln, wenn sie näher beieinander liegen. Davon ausgehend versuchte Fisher Methoden zu entwickeln, um diese Komponente auszugleichen, ein Vorhaben, welches letztendlich in der Methodik der randomisierten Studie gipfelte (109).

Fishers Methoden wurden im Lauf der nächsten Jahre stetig verfeinert und ausgebaut. Exemplarisch soll hier Papadakis erwähnt werden, der ausgehend von Fisher bereits 1937 eine Nearest-neighbor-Methodik entwickelte, um örtliche Gegebenheiten wie Bodenbeschaffenheit bei der Analyse von Ernteerträgen auszuschließen, in dem die Erträge in Relation zu den Erträgen benachbarter Parzellen gesetzt wurden (110).

Parallel zu biologischen Fragestellungen wuchs auch in anderen Fachbereichen, wie beispielsweise der Geologie, bereits in den 1950er-Jahren das Bedürfnis nach soliden statistischen Methoden. Krige setzte sich bereits 1951 mit dem Problem auseinander, die Reserven von Erzvorkommen zu schätzen. Ein Problem, für das er zusammen mit Sichel 1952 ein Verfahren entwickelte, um, ausgehend von mehreren Stichproben, die zwischen diesen liegenden Werte möglichst genau zu interpolieren (111, 112). Dieses Verfahren wurde unter anderem 1962 von Matheron weiterentwickelt und nach seinem Erfinder als “Kriging” benannt (113). Es wird bis heute in den verschiedensten Bereichen (bspw. Bergbau oder Ölindustrie) zur Reservoirschätzung benutzt (114, 115).

Der Zusammenhang zwischen räumlichen Gegebenheiten und dem Auftreten von Krankheiten ist auch in der Medizin bereits seit langem bekannt. So konnte John Snow, ein englischer Arzt, bereits 1854 zeigen, dass der Ausbruch einer Choleraepidemie in London auf die Kontamination einer Wasserpumpe in Soho zurückzuführen war (116).

Und auch in der Onkologie wird immer wieder auf spatialstatistische Methoden zurückgegriffen. Beispielsweise bei der Frage nach lokalen Tumorclustern im Zusammenhang mit Umweltfaktoren wie Luftverschmutzung oder Fabriken (117). Doch auch bei der Erforschung der Tumorpathophysiologie wird seit neuestem auf die Verwendung der Spatialstatistik gesetzt. So wurden während der Erstellung der vorliegenden Arbeit bereits erste Studien veröffentlicht, die spatialstatistische Funktionen nutzen, um prädiktive Aussagen über die Prognose von Pankreasläsionen zu tätigen (118, 119).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Firma</u>	<u>Modell</u>	<u>Modell-/ Katalognummer</u>
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

### 3.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Katalognummer
PBS Dulbecco ohne Mg <sup>2+</sup> /Ca <sup>2+</sup>	Biochrom GmbH, Berlin	L182-50
Aqua Dest.	Braun	0082479E
Tween 20	Carl-Roth GmbH + Co. KG	9127.1
Tris Pufferan, >99,9% p.a.	Carl-Roth GmbH + Co. KG	4855.2
NaCl>99,8%	Carl-Roth GmbH + Co. KG	9265.2
Ammoniumacetat, >97% p.a., ACS	Carl-Roth GmbH + Co. KG	7869.2
EDTA >99%	Carl-Roth GmbH + Co. KG	CN06.2
Citronensäure-Monohydrat, >99,5%, Ph. Eur.	Carl-Roth GmbH + Co. KG	5110.1
Kupfer-(II)-Sulfat, >98%, p.a., wasserfrei	Carl-Roth GmbH + Co. KG	P023.1
Tris-HCl, >99%, p.a.	Carl-Roth GmbH + Co. KG	9090.3
Wasserstoffperoxid, 30%, p.a., ISO, stabilisiert	Carl-Roth GmbH + Co. KG	8070.2
DAKO Antibody Diluent (Blocking Medium)	DAKO North America Inc.	S0809
DAKO Fluorescent Mounting Medium	DAKO North America Inc.	S3023
Dulbecco Phosphate buffered Saline	Sigma-Aldrich	D8537
AVS Titrimorph pH 4	VWR Chemicals	32095.264
AVS Titrimorph pH 7	VWR Chemicals	32096.267
AVS Titrimorph pH 9	VWR Chemicals	32039.261
DAPI	Thermo Fisher Scientific	D1306

### 3.1.3 Puffer

Der Tris/EDTA-Puffer wurde mit einer Konzentration von 10 mmol Tris Base und 1 mmol EDTA pro Liter angesetzt, der pH-Wert wurde mithilfe von 4 molarer Natronlauge oder 1 molarer Salzsäure auf 9,0 korrigiert.



Der PBS-Puffer wurde mit 9,55g PBS Dulbecco ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> angesetzt.

Für den Citratpuffer wurden 4,5 ml einer 0,1 molaren Zitronensäure mit 20,5 ml einer 0,1 molaren Natriumcitratlösung vermischt, und mit 250 ml Aqua dest. aufgefüllt. Der pH-Wert lag bei 6,0.

Der TBS-T-Puffer wurde mit 10 ml Tween 20, 175,3 g NaCl, 65,7 g Tris-HCl und 10,1 g Tris-Base pro Liter Aqua dest. angesetzt. Der pH-Wert betrug 7,6. Hiervon wurden vor Verwendung 100 ml mit 900 ml Aqua dest. gemischt.

### **3.1.4 Antikörper**

Es wurden folgende Antikörper in den angegebenen Konzentrationen benutzt:

- Anti-Humanes CD73 (Cell Signaling Technology, Kat.-Nr.: 13160, Klon: D7F9A, Spezies: Kaninchen, Konzentration: 1 : 100)
- Anti-Humanes CA IX (Abcam, Kat.-Nr.: ab108351, Klon: EPR4151[2], Spezies: Kaninchen, Konzentration: 1 : 200)
- Anti-Humanes CD8 (DAKO, Kat.-Nr.: M7103, Klon: 144B, Spezies: Maus, Konzentration: 1 : 50)

Als Anti-Maus Sekundärantikörper wurde das „SuperPicture Polymer Detection Kit“ (Artikel-Nr.: 879163) verwendet, als Anti-Kaninchen Sekundärantikörper „SuperPicture HRP Polymer Conjugate Rabbit Primary“ (Artikel-Nr.: 879263). Beide Artikel stammen von der Firma „Thermo Fisher Scientific“.

### **3.1.5 Fluorochrome**

Folgende Fluorochrome wurden in den angegebenen Konzentrationen verwendet:

- Cy3+ (PerkinElmer, Inc; Kat.-Nr.: NEL744001KT, Konzentration: 1 : 50)
- Cy5+ (PerkinElmer, Inc; Kat.-Nr.: NEL745E001KT, Konzentration: 1 : 50)
- FITC (Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr.: 46410, Konzentration: 1 : 250)

### **3.1.6 Gewebe**

Es wurden 11 "whole slide" Präparate von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region, sowie 1 Microarray mit 80 Spots gefärbt. Auf dem Microarray waren je 2 Proben

von 30 Kopf-Hals-Tumoren, sowie je 2 Proben von 5 Schnitten eines gesunden Gewebe. Von den 60 Tumorproben konnten aufgrund der Präparatqualität jedoch nur 57 analysiert werden. Weitere Einschränkungen bei der Analyse waren teilweise aufgrund einer fehlenden Antigenexpression notwendig. Da diese Arbeit sich primär mit einer einzelnen wissenschaftlichen Hypothese und der Erarbeitung einer neuen Methodik befasst, wurde auf den Einschluss klinischer Daten verzichtet.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Immunfluoreszenz**

Das im Folgenden geschilderte Färbeprotokoll ist eine Variation des von Tóth und Mezey dargestellten Prinzips der Tyramid-basierten Signalverstärkung ([120](#)).

#### **3.2.1.1 Vorbereitung der Schnitte**

Um die in Paraffin fixierten Schnitte für die Färbung nutzbar zu machen, wurden diese zuerst für eine Stunde im Wärmeschrank bei 60°C erhitzt und dann dreimal 10 Minuten in Xylol entparaffiniert, bevor sie in einer absteigenden Ethanolreihe in ein wässriges Milieu überführt wurden. Dabei wurden die Schnitte 5 Minuten in 99,8-prozentigem und 96-prozentigem Ethanol und 2 Minuten in 70-prozentigem Ethanol inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte nacheinander je 2 Minuten mit Aqua dest. und einem TBS-T Puffer gespült.

#### **3.2.1.2 Antigendemaskierung**

Um die volle Immunreaktivität wiederherzustellen ([121](#)) wurden die Schnitte im ersten Durchgang in einem Citrat-Puffer bei pH 6,0 zuerst auf 100°C erhitzt, 90 Sekunden gekocht und dann für weitere 15 Minuten bei 180W in der Mikrowelle behandelt und anschließend eine halbe Stunde bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Dann wurde der Schnitt mit einem speziell für die Immunhistochemie konzipierten Fettstift umrandet. Die hierdurch erzeugte hydrophobe Barriere reduziert die Menge an benötigten Antikörpern und Fluorochromen. Fertig vorbereitete Schnitte wurden in einem PBS-Puffer gesammelt.

#### **3.2.1.3 Fluoreszenzlöschung**

Um die Autofluoreszenz auf ein möglichst niedriges Niveau zu senken, wurden nun alle Schnitte zuerst zweimal für 10 Minuten in einem PBS-Puffer gewaschen, dann 5 Minuten in Aqua dest. gespült und anschließend 10 Minuten mit einer 10-millimolaren

Kupfersulfat-Ammoniumacetat Lösung behandelt (122). Um späteren Verunreinigungen vorzubeugen, wurden die Schnitte danach 5 Minuten in Aqua Dest. und zweimal 10 Minuten in PBS-Puffer gesäubert.

#### **3.2.1.4 Primärantikörper**

Anschließend wurde 2 Minuten mit einem TBS-T-Puffer behandelt, um spätere unspezifische Wechselwirkungen der Antikörper zu vermeiden. Dann wurde für 10 Minuten ein Blocking-Medium aufpipettiert.

Parallel zur oben beschriebenen Fluoreszenzlöschung wurde der Kaninchen Anti-Humanes-CD73 Antikörper mit sterilem PBS 1:200 verdünnt und für mindestens eine halbe Stunde bei 27°C im Thermomixer inkubiert, bevor circa 100-150 µl pro Schnitt aufpipettiert wurde. Dann wurden die Schnitte für eine Stunde in einer Dunkelkammer im feuchten Milieu bei 22°C Raumtemperatur gelagert.

#### **3.2.1.5 Sekundärantikörper**

Danach wurden die Schnitte dreimal für 2 Minuten in TBS-T-Puffer bei ständiger Bewegung gewaschen. Auch die folgenden Waschschrte bei denen dreimal 2 Minuten in TBS-T gewaschen wird, erfolgen unter ständiger Bewegung. Anschließend wurde ein Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper aufpipettiert und 10 Minuten inkubiert, bevor die Schnitte erneut dreimal 2 Minuten in TBS-T gewaschen wurden.

#### **3.2.1.6 Vorbereitung und Reaktion des Fluorochroms**

Während der Sekundärantikörper einwirkte, wurde Cy5+ mit einem sogenannten Amplification Buffer 1:50 verdünnt. Dann wurden circa 100-150 µl des Fluorochroms auf jeden der Schnitte aufpipettiert und für 10 Minuten in einer Dunkelkammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte wieder dreimal 2 Minuten in TBS-T-Puffer gewaschen, bevor mit der Antigenmaskierung des nächsten Durchgangs begonnen wurde.

#### **3.2.1.7 Änderungen in weiteren Durchgängen**

In allen der drei folgenden Durchgänge wurde die Antigendemaskierung in einem Tris/EDTA-Puffer bei pH 9,0 durchgeführt. Außerdem wurde keine weitere Fluoreszenzlöschung durchgeführt. Stattdessen wurde nach der Antigendemaskierung direkt mit der Primärantikörperinkubation begonnen. Der Anti-Humanes CD8

Antikörper wurde bei 4°C über Nacht im Kühlschrank inkubiert, während Anti-Humanes CA IX Antikörper wie oben beschrieben inkubiert wurde. Da es sich bei den Anti-Humanes CD8 Antikörpern um Mausantikörper handelt, wurden diese mit einem Anti-Maus-Sekundärantikörper behandelt. Die Antikörper wurden letztendlich mittels einer Tyraminamplifikation durch die folgenden Fluorochrome dargestellt:

- Maus Anti-Humanes CD8 wurde mit Cy3+ gekoppelt
- Kaninchen Anti-Humanes CA IX wurde mit FITC gekoppelt

### **3.2.1.8 Kernfärbung und Eindecken**

Nach dem letzten Waschgang des letzten Durchgangs wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Dafür wurde die 300 nm DAPI-Stammlösung zuerst 1:2000 mit Aqua dest. verdünnt, bevor den Schnitten ca. 100-150 dieser Lösung aufpipettiert wurde. DAPI wurde 5 Minuten in einer Dunkelkammer bei feuchtem Milieu einwirken gelassen, bevor die Schnitte zweimal 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen wurden.

Abschließend wurden die Schnitte mithilfe eines einen Ausbleichschutz enthaltenden Mounting Mediums eingedeckt, wobei besonders darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen eingeschlossen wurden.

### **3.2.2 Whole slide-Scan**

Die Schnitte wurden mithilfe des Zeiss AxioScan.Z1 als ".czi"-Datei digitalisiert. Dafür wurden angemessene "Single-Bandpassfiltersets für die Fluorochrome "DAPI", "FITC", "Cy3+" und "Cy5+" gewählt.

### **3.2.3 Auswertung**

#### *3.2.2.1 Digitale Auswertung mit „QuPath“*

Die eingescannten Schnitte wurden in „QuPath“ unter Zuhilfenahme der Bioformats-Erweiterung analysiert. Als erstes wurde eine visuelle Analyse durchgeführt, dabei wurden Interaktionen zwischen den verschiedenen Populationen eingeteilt in positive, negative und keine Interaktion.

Positive Interaktion bedeutete dabei, dass sich Zellen einer Population gehäuft in der Nähe der einer anderen aufhalten, während eine negative Interaktion das Fehlen von Zellen einer Population in der Nähe einer anderen Populationen beschreibt. Wurde

keine Interaktion gesehen, sind zwei Populationen unabhängig voneinander durch den Tumor verteilt.

Anschließend wurde für die quantitative Analyse zunächst eine Zellerkennung mithilfe eines "watershed"-Algorithmus anhand des DAPI-Signals durchgeführt. Die Intensitätsgrenze wurde dabei von Schnitt zu Schnitt aufgrund von Unterschieden in der Hintergrund- und Kernintensität angepasst. Die Notwendigkeit solcher Unterschiede resultiert aus der Behandlung der Schnitte im Labor (unterschiedliche Fixierungs- und Lagerungszeiten).

Bereits bei dieser Zellerkennung wurden in „QuPath“ sämtliche Daten für jede Zelle einzeln generiert (sog. "single-cell-Daten"). Unter anderem sind darin inbegriffen: Koordinaten, Fläche des Kerns, Fläche der Zelle, morphometrische Daten zur Form von Kern und Zelle, die Kern-Plasma-Relation, sowie die minimale, maximale und durchschnittliche Intensität der verschiedenen Fluoreszenzkanäle.

Anhand der Intensität wurden Zellen oberhalb eines Grenzwertes als CD8-positiv klassifiziert. Alle verbliebenen Zellen wurden mithilfe des in „QuPath“ integrierten „Random-Forest“-Classifiers in Tumor- und Stromazellen unterteilt.

Tumor- und Stromazellen wurden anhand der CD73 und CA IX-Intensitäten in jeweils vier Subklassifikationen eingeteilt, sodass am Ende jede Zelle einer von insgesamt neun Subpopulationen (CD8-positive Zellen, Tumor: CD73-positiv, Tumor: CA IX-positiv, Tumor: doppelt positiv, Tumor: doppelt negativ, Stroma: CD73-positiv, Stroma: CA IX-positiv, Stroma: doppelt positiv und Stroma: doppelt negativ) zugeteilt werden konnte. Dies ist sinnvoll, da die CD8-positiven Zellen prinzipiell frei zwischen den Kompartimenten „Tumor“ und „Stroma“ wechseln können und deshalb keinem der beiden Kompartimente zugehörig sind.

### **3.2.3.2 Auswertung mit dem „R“-package „Spatstat“**

Im Folgenden werden die benutzten Befehle des „Spatstat“-package dargestellt. Außerdem wird auf einige Grundlagen der Spatialstatistik eingegangen, um die Auswahl benutzter Befehle verständlicher zu machen. Auf die Interpretation der Kurven wird hauptsächlich in der Diskussion eingegangen. Um die Vor- und Nachteile der verschiedenen Funktionen, sowie die Aussagen, die anhand dieser getroffen werden

können, zu verstehen ist eine gewisses Verständnis der zugrundeliegenden Mathematik jedoch unabdingbar. Das vollständige R-Skript mit dem die Auswertung in Spatstat erfolgte, ist im Anhang mit kurzen Erläuterungen dargestellt.

#### 3.2.3.2.1 "planar point pattern"

Die in "QuPath" generierten Single-cell-Daten wurden in „R“ importiert. Mithilfe des „Spatstat“-Package wurde nun ein Objekt der Klasse „planar point pattern“ (ppp) erstellt. Um statistische Berechnungen durchführen zu können, wird dabei jede Zelle als ein Punkt betrachtet. Dafür werden alle Zellen anhand ihrer in QuPath erstellten Koordinaten in ein kartesisches Koordinatensystem eingeordnet. Anschließend wird jedem Punkt die Klassifizierung der repräsentierten Zelle als Markierung zugewiesen wird.

Wichtig hierbei ist die Angabe eines sog. "observation window" oder Beobachtungsfensters, also des Bereiches des zweidimensionalen Raums, in dem die Daten erhoben wurden. Bei Ausschnitten aus den "whole slide"-Bildern wurden dafür jeweils die Minima und Maxima der dargestellten Punkte gewählt, da die Ausschnitte in einer rechteckigen Form gewählt wurden. Bei den Microarray-Spots wurde ein Kreis mit einem Radius von 1000  $\mu\text{m}$  mit dem Mittelpunkt ins Zentrum des Spots gelegt und als Beobachtungsfenster deklariert.

Zur Validierung sowohl des Imports der Daten als auch der Erstellung des ppp, wurden das gesamte ppp sowie jede Subpopulation einzeln bildlich dargestellt.

#### 3.2.3.2.2 K-Funktion

Alle Berechnungen, die im Folgenden mithilfe von Spatstat durchgeführt wurden, basieren auf Ripley's "K-Funktion" ([123](#)). Die K-Funktion berechnet die durchschnittliche Anzahl der Punkte einer Population, die innerhalb der Distanz  $r$  eines zufälligen Punktes des ppp liegen. Sie wird genutzt, um Abweichungen von "Kompletter spatialer Zufälligkeit" (Complete Spatial Randomness; CSR) in einem homogenen ppp nachzuweisen. Dafür wird, ausgehend von jedem einzelnen Punkt, ein Kreis in regelmäßigen Schritten ausgedehnt, angefangen mit dem Radius  $r = 0$ . Für jede Vergrößerung des Radius werden für jeden Kreis sämtliche Punkte gezählt, die innerhalb des Kreises liegen, wobei der ursprüngliche Punkt nicht gezählt wird. Anschließend wird für diese Distanz der Durchschnitt aller Kreise berechnet und für

diesen Radius gespeichert. Der Radius wird anschließend für die nächste Iteration des Prozesses um ein vorgegebenes Inkrement vergrößert.

Die durchschnittliche Anzahl der Punkte in einem bestimmten Gebiet ist abhängig von der Intensität  $\lambda = n/W$  des ppp, wobei "n" der Gesamtzahl der Punkte und "W" der Fläche des Beobachtungsfensters entspricht. Um nun verschiedene Datensätze miteinander vergleichen zu können, müssen deren K-Funktionen standardisiert werden. Dafür werden die Ergebnisse der K-Funktion durch die Intensität des ppp dividiert. Da jedoch stets der Punkt, der den Mittelpunkt eines Kreises darstellt, nicht gezählt wird, wird hier eine leicht modifizierte Intensität  $\lambda_1 = (n-1)/W$  genutzt.

Um einordnen zu können, ob die so bestimmte Funktion für ein Clustern, gegen ein solches oder für eine rein zufällige Verteilung spricht, vergleicht man das Resultat der K-Funktion mit der K-Funktion eines komplett zufälligen ppp mit einer sogenannten Poisson-Verteilung. Eine solche Verteilung ist definiert durch Unabhängigkeit und Homogenität. Unabhängigkeit bedeutet hier, dass Informationen über Punkte in einem Teil der beobachteten Region keinen Einfluss auf Punkte in einem anderen Teil der beobachteten Region haben, während Homogenität bedeutet, dass die Punkte keine Präferenz für ein bestimmtes Gebiet innerhalb der beobachteten Region zeigen. Die K-Funktion eines ppp mit Poisson-Verteilung entspricht demnach  $\lambda \cdot \pi r^2$ , also der Anzahl der Punkte in einem Kreis mit der Fläche  $\pi r^2$ . Da die K-Funktion jedoch standardisiert wird, ist die theoretische K-Funktion definiert als

$$K_{\text{PoiSS}}(r) = \lambda \pi r^2.$$

Da Daten außerhalb des Beobachtungsfensters nicht bekannt sind, ist die Anzahl der Punkte innerhalb eines Kreises unbekannt, wenn Teile des Kreises außerhalb des Fensters liegen. Diese sogenannten Randeffekte können und sollen in der Berechnung berücksichtigt werden. Dafür gibt es verschiedene Methoden, von denen jedoch nur eine für unsere Fragestellung realistisch nutzbar ist, da die anderen Methoden aufgrund der großen Stichprobengröße von vielen tausend Zellen pro Schnitt mit einer unverhältnismäßig hohen Steigerung der benötigten Computerleistung einhergehen. Die von uns genutzte Korrekturmethode ist die sogenannte "border"-Korrektur, bei der nur die Punkte in die Berechnung mit einfließen, die einen Abstand zur Grenze des

Beobachtungsfensters haben, der größer ist als der untersuchte Radius. Die statistische Effizienz ist bei großen Stichproben ausreichend, obwohl es einen Datenverlust für hohe Werte von  $r$  gibt.

Baddeley et al. (124) definieren die K-Funktion dabei als *"die kumulative durchschnittliche Anzahl der Punkte, die innerhalb der Distanz  $r$  eines typischen Punktes liegen, korrigiert für Randeffekte und standardisiert indem durch die Intensität dividiert wurde."*

#### 3.2.3.2.3 Loh's Bootstrap

In einem nächsten Schritt wird ein Konfidenzintervall für die K-Funktion berechnet, also ein Bereich, in dem die wahre K-Funktion mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit liegt. Dies hat mehrere Gründe: Zum einen ist die von Spatstat berechnete K-Funktion eine geschätzte Funktion, also eine Annäherung an die wahre Funktion des zugrundeliegenden Punktmusters. Der Grund dafür ist, dass Faktoren wie Randeffekte, die Reduktion der Zellen auf Punkte sowie Ungenauigkeiten bei der Übertragung analoger Beobachtungen in digitale Werte es sehr schwierig machen, die wahre Funktion eines ppp zu bestimmen. Zum anderen ist ein Konfidenzintervall wichtig, da CSR für Distanzen, bei denen das Konfidenzintervall die K-Funktion eines zufälligen ppp einschließt, nicht ausgeschlossen werden kann, auch wenn die K-Funktion selbst diese Linie nicht berührt.

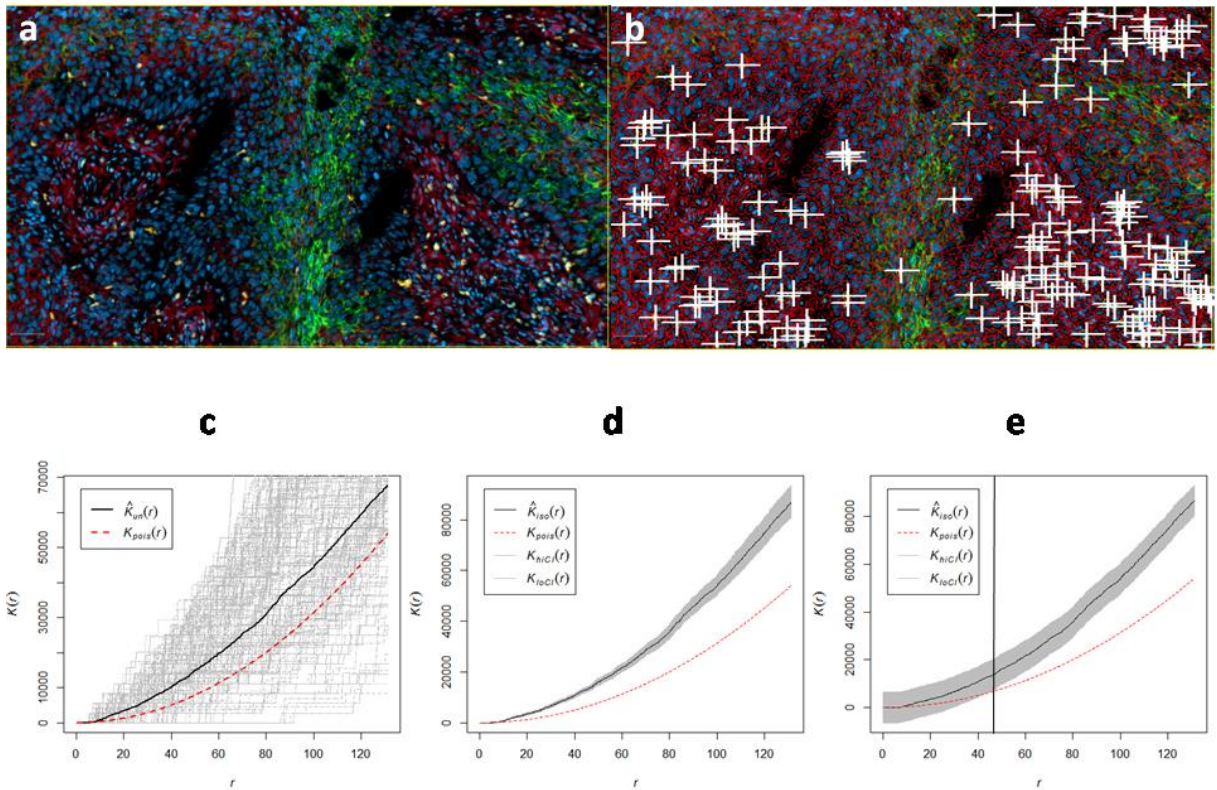
Die K-Funktion ist eine relativ komplexe Funktion, die sich aus den durchschnittlichen Werten einer Vielzahl von Punkten und einer große Breite an Distanzen zusammensetzt. Daher ist es anspruchsvoll, ein valides Konfidenzintervall für die K-Funktion zu bestimmen. Spatstat enthält bereits einen Befehl, der zur Lösung dieses Problems benutzt werden kann.

Der Spatstat-Befehl "lohboot" basiert auf der Herangehensweise von Loh (125). Bei diesem Ansatz werden lokale K-Funktionen genutzt, um die wahre K-Funktion zu schätzen. Eine lokale K-Funktion ist dabei eine K-Funktion, die die Situation eines einzelnen bestimmten Punktes im ppp widerspiegelt. Jeder Punkt hat dabei seine eigene lokale K-Funktion.



Um ein Konfidenzintervall zu berechnen, wird nun eine zufällige Anzahl an zufälligen lokalen K-Funktionen, „mit Zurücklegen“, ausgewählt und die durchschnittliche K-Funktion dieser Stichprobe berechnet. „Mit Zurücklegen“ bedeutet, dass eine einzelne lokale K-Funktion nach ihrer zufälligen Auswahl wieder in den virtuellen Lostopf zurückgelegt wird, und somit mehrfach ausgewählt werden kann. Durch eine häufige Wiederholung dieses Vorganges, bei dem eine K-Funktion anhand von zufälligen lokalen K-Funktionen "mit Zurücklegen" berechnet wird, erhält man eine gewisse Verteilungsbreite der K-Funktion. Hiervon ausgehend wird ein punktuelles Konfidenzintervall berechnet. Stellt man dieses Konfidenzintervall grafisch dar, so spricht man von einem Konfidenzband.

Auch die Berechnung eines robusteren, globalen Konfidenzintervalles ist mithilfe der "lohboot"-Funktion in Spatstat problemlos möglich. Dafür wird die Maximale Absolute Abweichung (maximum absolute deviation, MAD) aller aus den verschiedenen Stichproben berechneten K-Funktionen von der ursprünglichen K-Funktion bestimmt. Für ein Konfidenzband von beispielsweise 95 % wird nun die 95. Perzentile dieser Abweichungswerte bestimmt und einmal sowohl mit der K-Funktion addiert als auch von der K-Funktion subtrahiert. Daraus resultiert ein globales 95%-iges Konfidenzband mit den Grenzen  $K \pm$  dem Abweichungswert.



**Abbildung 1:** Darstellung verschiedener Konfidenzintervalle durch die "lohboot"-Funktion anhand eines repräsentativen Ausschnittes eines Plattenepithelkarzinoms des Hypopharynx, 10x Vergrößerung.

(a) Histologischer Schnitt nach 4-fach Färbung und Digitalisierung im Slidescanner AxioScanZ1. In dieser Aufnahme ist der DAPI-Kanal in blau, CA IX in grün, CD8 in gelb und CD73 in rot dargestellt. (b) Einzelzellerkennung in QuPath, die berechneten Zellgrenzen sind in rot eingezeichnet, zusätzlich ist das in Spatstat generierte ppp der CTL eingezeichnet. Jeder CD8<sup>+</sup>-CTL wird dabei durch ein weißes Kreuz repräsentiert. (c) Darstellung aller lokalen K-Funktionen in grau. Man erkennt eine erhebliche Heterogenität der Kurvenverläufe. Die gemittelte K-Funktion des gesamten Ausschnittes (siehe Text) ist in schwarz dargestellt, während die theoretische K-Funktion einer CSR rot gestrichelt dargestellt ist. (d) Darstellung eines mit der "lohboot"-Funktion berechneten PUNKTUELLEN Konfidenzbandes um die K-Funktion in grau. Aufgrund der exponentiellen Natur der K-Funktion nimmt die Breite des Konfidenzbandes mit steigendem  $r$  exponentiell zu. (e) Darstellung eines mit der "lohboot"-Funktion berechneten GLOBALEN Konfidenzbandes um die K-Funktion in grau. Ab einer Distanz von ca. 50  $\mu\text{m}$  weist die Kurve samt Konfidenzband eine signifikante Abweichung von CSR auf (s. schwarze Linie).

#### 3.2.3.2.4 Pair correlation function

Da die K-Funktion alle Punkte innerhalb einer Distanz  $\leq r$  berücksichtigt, muss man beachten, dass sie kumulativ ist, also starke Effekte auf kurzer Distanz einen Effekt über eine deutlich größere Strecke vortäuschen können. Sie ist also gut geeignet, um eine

Übersicht zu erhalten, wie ein ppp insgesamt verteilt ist, jedoch fehlen Daten zum tatsächlichen Auftreten von Punkten auf einer gewissen Distanz. Um also genauere Aussagen zur Richtung und Ausprägung der Verteilung einer Population auf verschiedenen Distanzen treffen zu können, muss daher eine Variation der K-Funktion verwendet werden.

Die pair correlation function (pcf) (126, 127) betrachtet dabei im Gegensatz zur K-Funktion nicht alle Punkte, die in die Fläche eines Kreises fallen, sondern lediglich die Punkte, die die Distanz  $r$  zum Mittelpunkt des Kreises haben, also auf die Kreislinie fallen<sup>1</sup>. Aus mathematischer Sicht ist die pcf die erste Ableitung der K-Funktion, dividiert durch  $2\pi r$ . Die Division von  $2\pi r$  dient dabei ebenfalls der Standardisierung, da ein größerer Kreis natürlich einen größeren Umfang hat, woraus eine größere Chance resultiert, dass ein Punkt auf der Kreislinie liegt. Alternativ kann die pcf allerdings auch direkt aus dem ppp berechnet werden. Dabei erfolgt die Berechnung ähnlich wie bei der K-Funktion, jedoch werden, wie bereits beschrieben, nur die Punkte, die auf die Kreislinie fallen, gezählt. Auch für die pcf kann ein Konfidenzintervall berechnet und als Konfidenzband dargestellt werden. Wie bei der K-Funktion werden die Werte auch hier mit der pcf eines ppp mit Poisson-Verteilung verglichen, wobei die pcf eines solchen zufällig verteilten ppp gleich "1" gesetzt wird, da die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Punkt auf einer bestimmten Distanz eines zufälligen Punktes befindet, für jede Distanz gleich sein sollte.

#### 3.2.3.2.5 G-Funktion

Die G-Funktion (128) ist analog zur K-Funktion eine kumulative Funktion. Sie gibt die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit an, mit der ein beliebiger Punkt eines ppp einen "Nächsten Nachbar" innerhalb der Distanz  $r$  hat. Da es sich um eine kumulative Wahrscheinlichkeitsfunktion handelt, sind die Werte der G-Funktion als Wahrscheinlichkeiten zu verstehen und nehmen im Verlauf nicht ab. Um eine Aussage über das Verteilungsmuster treffen zu können, wird die G-Funktion, ähnlich der K-Funktion, mit der theoretischen G-Funktion bei CSR verglichen. Diese entspricht

---

<sup>1</sup> Da eine Linie streng betrachtet keine Fläche haben kann, wird die Kreislinie genau genommen als eine Fläche zwischen der Linie eines Kreises mit dem Radius  $r$ , sowie der Linie eines Kreises mit dem Radius  $r + h$  definiert. "h" ist dabei eine gegen Null gehende Zahl. Die pcf nutzt also eher einen Ring statt eines Kreises.

$$G_{PoisS}(r) = 1 - e^{(-\lambda \pi r^2)} .$$

Hierbei entspricht  $e^{(-\lambda \pi r^2)}$  der Wahrscheinlichkeit dafür, dass bei einer Intensität  $\lambda$  null Punkte des ppp in einen Kreis mit der Fläche  $\pi r^2$  fallen.

Ein wichtiger Unterschied zur K-Funktion ist hierbei, dass die theoretische G-Funktion von der Intensität des ppp abhängig ist. Zur Erinnerung: Dies ist bei der theoretischen K-Funktion  $K_{PoisS}(r) = \lambda \pi r^2$  nicht der Fall. Da die G-Funktion nicht standardisiert wird, ist es nicht möglich, die G-Funktionen verschiedener ppp miteinander zu vergleichen.

#### 3.2.3.2.6 Inhomogene ppp

Da CTL einerseits in der Lage sind, peripheres Gewebe an jeder Stelle zu infiltrieren (129, 130) und andererseits die Verteilung von CTL innerhalb eines Tumors relativ gleichmäßig ist (131), wurde für die Analyse der Verteilung der CTL zunächst ein homogenes Verteilungsmuster angenommen. Im Verlauf der Arbeit zeigte sich jedoch, dass CTL im Tumor tatsächlich inhomogen verteilt sind, weswegen die K-Funktion angepasst werden musste (132). Auch Tumorgewebe an sich ist aufgrund der unterschiedlichen histologischen Varianten mit verschiedenen Zelltypen und Zellgrößen sehr inhomogen. So kann die Zell- und damit die Punktdichte zwischen zwei verschiedenen Regionen stark schwanken. Diese Unterschiede können zu Veränderungen der berechneten Funktionen führen und fälschlicherweise einen Effekt vortäuschen oder unterdrücken. Daher ist es wichtig, diese Unterschiede bei der Analyse eines inhomogenen ppp zu berücksichtigen. Dies ist relativ komplex, jedoch sind in der Spatialstatistik auch hier bereits einige Ansätze etabliert und daher auch in Spatstat implementiert.

Bevor eine solche Korrektur für Inhomogenität durchgeführt wird, muss überprüft werden, ob das Gewebe tatsächlich inhomogen ist. Dafür wird der Spatstat-Befehl "quadrat.test" (133) genutzt. Hierbei wird das gesamte ppp in viele kleinere Rechtecke geteilt, und deren Intensität berechnet. Anschließend werden die einzelnen Intensitätswerte mit Hilfe eines Chi-Squared-Testes verglichen. Die Überlegung hinter diesem Vorgehen ist, dass bei einem homogen verteilten ppp in jedem Rechteck in etwa die gleiche Anzahl an Punkten zu erwarten wäre. An dieser Stelle ist es sinnvoll, auf den

Unterschied zwischen Clustering und Inhomogenität einzugehen. So resultieren beide Vorgänge in ähnlich verteilten Punktmustern und sind anhand eines einzelnen Punktmusters quasi nicht zu unterscheiden. Der Unterschied liegt dabei jedoch in der Ursache für diese Verteilung. Bei einem inhomogen verteilten Punktmuster sind die Punkte in bestimmten Bereichen gehäuft, weil Umgebungsbedingungen dazu führen. Bei einem Punktmuster, das Clustering zeigt, treten Punkte in bestimmten Bereichen gehäuft auf, weil sie sich gegenseitig anziehen. Auf diese Arbeit bezogen wäre der Unterschied, ob die CTL zum Beispiel aufgrund bestimmter Bedingungen an bestimmten Orten innerhalb des Tumorgewebes gehäuft auftreten, oder ob sie sich durch Zell-Zell-Interaktionen gegenseitig anziehen.

Sollte der Test die Nullhypothese einer homogenen Verteilung ablehnen, so werden die folgenden Schritte vor und während der Berechnungen durchgeführt, um die Inhomogenität des Gewebes auszugleichen und verzerrte Ergebnisse zu vermeiden.

Als erstes wird durch den Spatstat-Befehl "density.ppp" eine Kernel-geglättete Intensitätsfunktion berechnet, die lokale Intensitätswerte  $\lambda_x$  für jede Stelle der untersuchten Region beinhaltet. Dafür wird die Region wieder in viele kleinere Areale unterteilt. Die Intensität dieser Areale wird berechnet und anschließend werden diese Intensitäten über die gesamte beobachtete Region geglättet.

Spatstat stellt Funktionen zur Verfügung, die in der Lage sind, inhomogene ppp zu handhaben, indem sie den Einfluss jedes einzelnen Punktes auf die gesamte Funktion modifizieren. Der Einfluss, den ein Punkt auf die Funktion hat, wird dabei korrigiert, indem der Punkt mit dem Gewicht  $w = 1 / \lambda_x$  modifiziert wird. Dies bedeutet für die Funktion, dass Punkte in einem Bereich mit hoher Intensität einen kleineren Einfluss auf die Kurve haben, da das ansonsten beobachtete Cluster an dieser Stelle nicht das Ergebnis eines Effektes wäre, sondern lediglich aus der erhöhten Punktdichte an dieser Stelle resultieren würde.

#### 3.2.3.2.7 Kombinierte ppp

Bis zu diesem Schritt der Analyse wurden immer nur Zellen einer einzelnen Population (CTL) untersucht. Die Funktionen, die im nächsten Kapitel behandelt werden, sind in der Lage, zwei verschiedene Populationen eines ppp in Abhängigkeit voneinander zu untersuchen, um so die Natur - oder das Fehlen - von Interaktionen nachweisen zu

können. Voraussetzung für diesen Befehl ist ein ppp mit zwei Populationen. Dafür müssen die benötigten Populationen jedoch zuerst erstellt und zusammengebracht werden. Möchte man zum Beispiel die Interaktion von CTL und hypoxischem Gewebe untersuchen, so ist die erste Population klar definiert. Die zweite Gruppe ist jedoch etwas schwieriger zu beschreiben, da insgesamt vier Subpopulationen CA IX-positive, und damit hypoxische Zellen beinhalten. Mithilfe des Befehls "superimpose" kann Spatstat diese vier Subpopulationen jedoch in einem neuen ppp als eine Population zusammenfassen. Außerdem kann man den Befehl "superimpose" nutzen, um zwei unterschiedliche Populationen in einem neuen ppp übereinanderzulegen, sodass diese dann mithilfe der oben genannten Funktionen zusammengefasst werden können.

#### 3.2.3.2.8 Cross-Funktionen

Wenn sich die Frage von Effekten, die innerhalb einer Population stattfinden, ändert hin zu Effekten, die zwischen zwei verschiedenen Populationen stattfinden, dann sind die K-Funktion und die pcf, wie sie oben beschrieben wurden, nicht mehr geeignet, um diese Fragen zu beantworten. Die Prinzipien bleiben jedoch bestehen, die Funktionen müssen nur an die veränderte Fragestellung angepasst werden ([134](#), [135](#)). Wo die K-Funktion die durchschnittliche Anzahl der Zellen innerhalb einer bestimmten Distanz von einer repräsentativen Zelle der Population berechnet hat, errechnet die sogenannte "Kcross"-Funktion die durchschnittliche Anzahl der Zellen einer Population, die innerhalb einer bestimmten Distanz von einer repräsentativen Zelle einer zweiten Population liegen. Im gleichen Sinn untersucht die Funktion "pcf.cross" die durchschnittliche Anzahl der Zellen einer Population, die die exakte Distanz von einer repräsentativen Zelle einer zweiten Population haben.

In diesem Sinne kann man die Ergebnisse der Cross-Funktionen natürlich nicht mit der Kurve einer zufällig verteilten Population vergleichen. Stattdessen wird das Ergebnis mit der Kurve verglichen, die aus der Analyse von zwei zufällig, beziehungsweise unabhängig voneinander verteilten Populationen resultiert.

Da diese Funktionen in dieser Arbeit auf inhomogene ppp angewendet werden, wurden die dafür modifizierten "Cross.inhom"-Funktionen verwendet. Genau wie bei den Ausgangsfunktionen wurde mithilfe des "lohboot"-Befehles ebenfalls ein Konfidenzintervall berechnet.

Mithilfe von Ripley's K-Funktion, der pcf und der G-Funktion wurden CTL auf ein internes Clustering, also das Bilden von Clustern innerhalb der eigenen Population untersucht.

Mithilfe der Gcross, sowie der inhomogenen Kcross, und pcf.cross-Funktionen wurden die Beziehungen zwischen den folgenden Populationen untersucht:

- CTL und hyp-/normoxische Tumorzellen
- CTL und CD73-positive/CD73-negative Tumorzellen
- CTL und CD73-positives/CD73-negatives Stroma

Dafür wurden die Kurven der Funktionen visuell verglichen und interpretiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Clustern CTL?

Zunächst wurden für die Beantwortung dieser Frage alle gefärbten Schnitte betrachtet und die Verteilung von CTL interpretiert. Dabei entstand in 46 der 57 (80%) Microarray-Spots der Eindruck, dass CTL in Clustern vorliegen. Dieser Eindruck entstand auch in allen "whole slide"-Schnitten.

Um die Frage nach einer intrapopulären Clusterbildung mithilfe der beschriebenen statistischen Methoden zu beantworten, wurden die G-Funktion, die K-Funktion sowie die "pair correlation function" verwendet. Dabei zeigten alle Funktionen bei allen "whole slide"-Präparaten eine signifikante positive Abweichung von "Complete Spatial Randomness" (CSR), die mit der Hypothese einer Clusterbildung vereinbar wäre. Bei den 57 untersuchten Microarray-Spots sprach die K-Funktion in 54 von 57 Fällen (95%), die pcf in 55 von 57 Fällen (96%) und die G-Funktion in allen Fällen für eine signifikante Abweichung von CSR im Sinne einer Clusterbildung.

Implizierte Verteilung der CTL	Clustern	Zufällig	Inhibierung
K-Funktion	11/11	0/11	0/11
Pcf	11/11	0/11	0/11
G-Funktion	11/11	0/11	0/11

**Tabelle 1:** Ergebnisse der Spatstat-Funktionen bezüglich des Clusters von CTL in "whole slide"-Präparaten.

Implizierte Verteilung der CTL	Clustern	Zufällig	Inhibierung
K-Funktion	54/57	3/57	0/57
Pcf	55/57	2/57	0/57
G-Funktion	57/57	0/57	0/57

**Tabelle 2:** Ergebnisse der Spatstat-Funktionen bezüglich des Clusters von CTL in Microarray-Spots.

Bei den "whole slide"-Präparaten zeigte sich dabei ein durchschnittlicher Gipfel der pcf von 5,7 bei einer durchschnittlichen Entfernung von ca. 59  $\mu\text{m}$ . Dies bedeutet, dass ca. 5,7-mal mehr T-Lymphozyten eine Distanz von 59  $\mu\text{m}$  zueinander haben, als man dies bei einer zufälligen Verteilung erwarten würde. Die G-Funktion zeigte im Schnitt bereits



ab ca. 21  $\mu\text{m}$  eine im Vergleich mit CSR deutlich erhöhte Wahrscheinlichkeit, einen weiteren CTL anzutreffen.

Bei den Microarray-Spots zeigte sich ein durchschnittlicher Gipfel der pcf von 4,75 bei einer durchschnittlichen Entfernung von ca. 21  $\mu\text{m}$ . Gleiches gilt für die G-Funktion, hier zeigte sich ein drastischer Sprung der nearest-neighbor-Wahrscheinlichkeit auf ca. 70% zwischen ca. 6  $\mu\text{m}$  und 12  $\mu\text{m}$ .

Die Distanzen fallen bei den Ergebnissen Microarray-Spots aufgrund der deutlich kleineren Größe des beobachteten Feldes etwas geringer aus. So wäre es zwar auch möglich gewesen, den maximalen Radius für die Untersuchung der „whole slide“-Schnitte zu begrenzen, jedoch handelt es sich hier um eine neue Methodik, und mögliche Fehlerquellen und Verfälschungen sollten möglichst geringgehalten werden. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit wird man  $r_{\text{max}}$  jedoch in zukünftigen Arbeiten auch auf Distanzen von bspw. 150 bis 200  $\mu\text{m}$  festlegen können.

#### **4.2 Der Einfluss von Tumorhypoxie auf CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten**

Für diese Fragestellung wurden 51 von 57 Spots des Microarrays ausgewertet. 6 Spots zeigten keine Hypoxie und konnten daher für diese Fragestellung nicht berücksichtigt werden. Außerdem wurden aus dem gleichen Grund nur 7 der 11 "whole slide"-Präparate ausgewertet.

Ähnlich wie in Kapitel 4.1. wurden die Schnitte auch hier zunächst visuell betrachtet. Dabei zeigte sich in 16 von 51 (31%) ausgewerteten Microarray-Spots der Verdacht, dass CTL hypoxische Areale meiden. Der gleiche Verdacht zeigte sich in 5 der 7 (71%) ausgewerteten "whole slide"-Präparate.

Um die Frage nach dem Einfluss der Tumorhypoxie auf die Verteilung von CTL statistisch beantworten zu können, wurden zwei Varianten von zwei Tests durchgeführt. Einerseits wurden die inhomogene Kcross-Funktion und die inhomogene pcf.cross-Funktion von CTL und normoxischem Tumorgewebe bestimmt. Andererseits wurden die inhomogene Kcross-Funktion und die inhomogene pcf.cross-Funktion von CTL und hypoxischem Tumorgewebe bestimmt. In einem nächsten Schritt wurden diese Kurven miteinander verglichen. Da dies zu einem Problem der Testung multipler Hypothesen

führt, wurde für eine endgültige Konfidenz von 99% für beide Tests ein Konfidenzintervall von  $\sqrt{99\%}$  festgelegt.

Bei den "whole slide"-Präparaten zeigte sich dabei in 6 von 7 Fällen (85%) ein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven der Kcross-Funktionen. In 7 von 7 Fällen war ein signifikanter Unterschied zwischen den pcf.cross-Funktionen der Schnitte detektierbar. In allen Fällen, in denen ein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven vorlag, zeigten die Kurvenverläufe für das Verhältnis zwischen CTL und hypoxischen Tumorzellen eine stärkere Abstoßung als für CTL und normoxische Tumorzellen. Visuell äußert sich die Abstoßung in einer stärkeren Abweichung des Kurvenverlaufs von der Poisson-Verteilung nach unten. Ein Beispiel solcher Kurven ist in Abbildung 10, Seite 63, sowie Abbildung 11, Seite 65 dargestellt.

Hypoxie vs Immuninfiltrat	Inhibition	Neutral	Kolokalisation
Kcross-Funktion	6/7	1/7	0/7
Pcf.cross	7/7	0/7	0/7

**Table 3:** Ergebnisse der Spatstat-Funktionen bezüglich hypoxieinduzierter Immunsuppression in "whole slide"-Präparaten.

19 der 51 Spots (37%) zeigten dabei eine signifikante Abweichung der Kcross-Funktionen voneinander. In 27 von 51 Fällen (53%) zeigten die pcf.cross-Funktionen eine signifikante Unterscheidung. Wie bei den "whole slide"-Präparaten war auch hier bei jeder der signifikanten Abweichungen voneinander die Kurve von CTL und normoxischem Tumor höher als die Kurve von CTL und hypoxischem Tumor.

Hypoxie vs Immuninfiltrat	Inhibition	Neutral	Kolokalisation
Kcross-Funktion	19/51	32/51	0/51
Pcf.cross	27/51	24/51	0/51

**Table 4:** Ergebnisse der Spatstat-Funktionen bezüglich hypoxieinduzierter Immunsuppression in Microarray-Spots.

Ob die weniger eindeutigen Ergebnisse der Microarray-Spots dabei in einer biologischen Realität begründet sind oder aber aus dem deutlich kleineren Beobachtungsgebiet resultieren, kann dabei nicht klar beantwortet werden. Jedoch zeigt sich auch bei den nicht-signifikanten Spots die deutliche Tendenz, dass die Kurve von CTL und normoxischem Tumor höher verläuft als die Kurve von CTL und hypoxischem Tumor.

### 4.3 Der Einfluss von CD73 auf CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten

Um den Einfluss von CD73 auf CTL zu untersuchen, wurde zwischen dem Einfluss von im Stroma exprimierten CD73 und dem Einfluss von in Tumor exprimiertem CD73 unterschieden. Analog zu Kapitel 4.2. wurde auch hier das Konfidenzniveau aufgrund eines "Multiple Hypothesen Test"-Problems auf  $\sqrt{99\%}$  festgelegt.

#### 4.3.1 Im Tumor

Für diese Fragestellung wurden 33 von 57 Spots des Microarray ausgewertet. In 24 Spots zeigten Tumorzellen keine CD73-Expression und wurden daher für diese Fragestellung nicht berücksichtigt. Außerdem wurden aus dem gleichen Grund nur 3 der 11 "whole slide"-Präparate ausgewertet.

Visuell entstand bei 2 von 3 "whole slide"-Präparaten der Eindruck, dass CTL sich unabhängig von CD73 im Tumor verteilen, während in einem der Präparate der Eindruck entstand, dass CTL CD73-positive Tumoreale meiden. Bei 2 der 33 Microarray-Spots entstand dabei der Eindruck, dass CTL CD73-positive Tumoreale meiden, während bei 8 der 33 Spots der Eindruck entstand, CTL würden gehäuft in CD73-positiven Tumorealen vorkommen. In den restlichen 23 Spots blieb unsicher, wie den Tumor infiltrierende CTL durch CD73 beeinflusst wurden.

In der statistischen Auswertung zeigte sich bei den "whole slide"-Präparaten in zwei der 3 Fälle (66%) ein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven der Kcross.inhom-Funktionen. Ebenfalls in 2 von 3 Fällen (66%) war ein signifikanter Unterschied zwischen den pcf.cross-Funktionen der Schnitte detektierbar. In je einem der zwei Fälle (je 50%) in denen ein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven sichtbar war, war die Kurve von CTL und CD73-positivem Tumor höher, beziehungsweise niedriger als die Kurve von CTL und CD73-negativem Tumor.

CD73 im Tumor vs Immuninfiltrat	Inhibition	Neutral	Kolokalisation
Kcross-Funktion	1/3	1/3	1/3
Pcf.cross	1/3	1/3	1/3

**Table 5:** Ergebnisse der Spatstat-Funktionen bezüglich tumoraler CD73-induzierter Immunsuppression in "whole slide"-Präparaten.

Der Vergleich der Gcross-Funktionen zeigte in 2 von 3 Fällen (66%) einen deutlichen Unterschied der Kurven. Jedoch sprach dieser Unterschied in allen Fällen dafür, dass CTL bereits auf kürzeren Distanzen eine höhere Wahrscheinlichkeit dafür besitzen, auf eine CD73-negative statt auf eine CD73-positive Tumorzelle zu stoßen.

In den Microarray-Spots zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Kcross.inhom- und pcf.cross-Funktionen bei 12 der 33 Spots (36%). Bei 7 dieser 12 Spots (58%) lag die Kurve von CTL und CD73-positivem Tumor über der Kurve von CTL und CD73-negativem Tumor.

CD73 im Tumor vs Immuninfiltrat	Inhibition	Neutral	Kolokalisation
Kcross-Funktion	5/33	21/33	7/33
Pcf.cross	5/33	21/33	7/33

**Tabelle 6:** Ergebnisse der Spatstat-Funktionen bezüglich tumoraler CD73-induzierter Immunsuppression in Microarray-Spots.

Insgesamt zeigt sich bezüglich des Verhältnisses zwischen CTL und CD73-positiven Tumorzellen ein gemischtes und nicht klar einzuordnendes Bild. Es scheint keinen klaren Zusammenhang zwischen CD73-positivem Tumor und CTL zu geben. Ursache dafür können sowohl nicht getestete Confounder als auch, bei insgesamt wenig CD73-positivem Tumornachweis, Zufälle sein. Es wäre jedoch auch möglich, dass hier zwei verschiedene biologische Varianten vorliegen, die sich bspw. bei der Prognose unterscheiden. Weiterführende Untersuchungen, sowie die Korrelation mit Überlebensdaten zur Überprüfung eines solchen Szenarios wären sicherlich sinnvoll.

#### 4.3.2 Im Stroma

Für diese Fragestellung wurden alle 57 Spots des Microarray ausgewertet. Es wurden ebenfalls alle 11 "whole slide"-Präparate ausgewertet.

Visuell entstand bei 4 der 11 "whole slide"-Präparate (37%) der Eindruck, dass CTL sich unabhängig von CD73 im Stroma verteilen. Bei den restlichen 7 Präparaten (63%) entstand der Eindruck, dass CTL sich hauptsächlich in CD73-positiven Arealen des Stromas aufhalten. Bei 16 der 57 Spots (28%) entstand der Eindruck, dass CTL CD73-positive Stromaareale bevorzugen, während bei 3 der 57 Spots (5%) der Eindruck entstand, CTL würden seltener in CD73-positiven Stromaarealen vorkommen. In den restlichen 41 Spots blieb unsicher, wie im Stroma befindliche CTL durch CD73 beeinflusst wurden.

In der statistischen Auswertung zeigte sich bei den "whole slide"-Präparaten in 4 der 11 Fälle (36%) ein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven der Kcross.inhom und pcf.cross-Funktionen. In allen Fällen, in denen ein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven sichtbar war, war die Kurve von CTL und CD73-positivem Stroma höher als die Kurve von CTL und CD73-negativem Stroma.

CD73 im Stroma vs Immuninfiltrat	Inhibition	Neutral	Kolokalisation
Kcross-Funktion	0/11	7/11	4/11
Pcf.cross	0/11	7/11	4/11

**Table 7: Ergebnisse der Spatstat-Funktionen bezüglich stromaler CD73-induzierter Immunsuppression in "whole slide"-Präparaten**

Der Vergleich der Gcross-Funktionen zeigte in 6 von 11 Fällen (54%) einen deutlichen Unterschied der Kurven. Jedoch sprach dieser Unterschied nur in 50% der Fälle dafür, dass CTL bereits auf kürzeren Distanzen eine höhere Wahrscheinlichkeit dafür besitzen, auf eine CD73-negative statt auf eine CD73-positive Stromazelle zu stoßen. In den anderen drei Fällen sprach dieser Unterschied wiederum dafür, dass ein typischer T-Lymphozyt eine höhere Wahrscheinlichkeit dafür hat, auf kurzen Strecken auf eine CD73-positive Stromazelle zu stoßen.

In den Microarray-Spots zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Kcross.inhom-Funktionen bei 7 der 57 Spots (12%). Bei allen Spots lag die Kurve von CTL und CD73-positivem Stroma über der Kurve von CTL und CD73-negativem Stroma.

Zusätzlich dazu zeigten sich in den pcf.cross-Funktionen in drei weiteren Fällen deutliche Hinweise darauf, dass CTL eher in CD73-positivem als in CD73-negativem Stromagewebe vorkommen.

CD73 im Stroma vs Immuninfiltrat	Inhibition	Neutral	Kolokalisation
Kcross-Funktion	0/57	50/57	7/57
Pcf.cross	0/57	47/57	10/57

**Table 8: Ergebnisse der Spatstat-Funktionen bezüglich stromaler CD73-induzierter Immunsuppression in Microarray-Spots.**

Zusammengenommen zeigen diese Daten für das Verhältnis zwischen CTL und CD73-positiven Stromazellen, dass es nur einen mäßigen Effekt von im Stroma exprimiertem CD73 auf CTL gibt. Dieser scheint jedoch eher einer anziehenden Effekt zu haben.

## 5. Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methodik

#### 5.1.1 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenz hat in der klinischen Arbeit, vor allem im Bereich der Autoimmunerkrankungen, eine hohe diagnostische Relevanz. Aber auch in der Forschung ist sie als Weiterentwicklung klassischer histologischer Methoden relevant. Die Schwächen der Immunfluoreszenz sind dabei unter anderem das Ausbleichen der Präparate, die Autofluoreszenz, sowie eine Limitierung der gleichzeitig detektierbaren Antigene.

Ersteres ist aufgrund der heute möglichen Digitalisierung der Schnitte kein allzu großes Problem, muss jedoch während der Färbung und Lagerung sowie beim Transport und während des Scanvorganges beachtet werden.

Auch die Autofluoreszenz ist ein Problem, das durch weiterentwickelte Labormethoden heutzutage keine relevante Rolle mehr spielt.

Die Anzahl der gleichzeitig darstellbaren Antigene ist im Vergleich mit anderen einzellbasierten Methoden wie der Durchflusszytometrie aufgrund der sich überschneidenden Fluoreszenzspektren jedoch begrenzt. Die Anzahl der anfärbbaren Antigene kann durch überlegte Auswahl von Fluorochromen und ein geschicktes Design der Anregungs- und Emissionsfilter soweit optimiert werden, dass in einem Gewebeschnitt bis zu 5 Antigene gleichzeitig dargestellt werden können ([136](#)). Mit der OPAL-Methode können sogar bis zu 7 verschiedene Antigene in einem Schnitt dargestellt werden ([137](#)). Das digitale Überlagern von Serienschnitten ist ebenfalls möglich ([138](#)). Dies ist jedoch mit einem ausgeprägten Maß an Mehrarbeit verbunden und die Anzahl der gleichzeitig darstellbaren Antigene liegt derzeit immer noch deutlich hinter anderen Methoden zurück. Durch neue Methoden wie das "multiplexed ion beam imaging" ([6](#)) wird sich diese Zahl jedoch deutlich vergrößern, so dass Zellpopulationen deutlich differenzierter als bisher unterschieden und definiert werden können.

Bisher fehlten weitgehend standardisierte Möglichkeiten, den in Immunfluoreszenzpräparaten vorhandenen räumlichen Bezug verschiedener

Zellpopulationen zueinander quantitativ auszuwerten. Daraus resultierte eine hohe Subjektivität der Analysen, welche die Formulierung belastbarer Aussagen über pathophysiologische Zusammenhänge erschwerte. Solche Aussagen sind aus verschiedenen Gründen kritisch zu werten. Die Leistungsfähigkeit des visuellen Systems des Menschen wird gegenwärtig von keinem Computeralgorithmus erreicht. Die für wissenschaftliche Fragestellungen notwendige Objektivität ist jedoch in einer Vielzahl von Situationen nicht gegeben. Dies zeigt sich eindrucksvoll am Beispiel der optischen Täuschungen. Ein Schwachpunkt des visuellen Systems liegt beispielsweise in der starken Tendenz Objekte in einem komplexen Kontext zu identifizieren, auch wenn diese tatsächlich nicht vorhanden sind. Dies kann mithin zur Identifikation von „Pseudoobjekten“ führen. Nicht nur das, es ist zusätzlich darauf ausgelegt Objekte in einem erwarteten Kontext zu interpretieren (139). Auf Basis dieses Prinzips existieren die verschiedensten optischen Täuschungen, wie beispielsweise die Illusion der



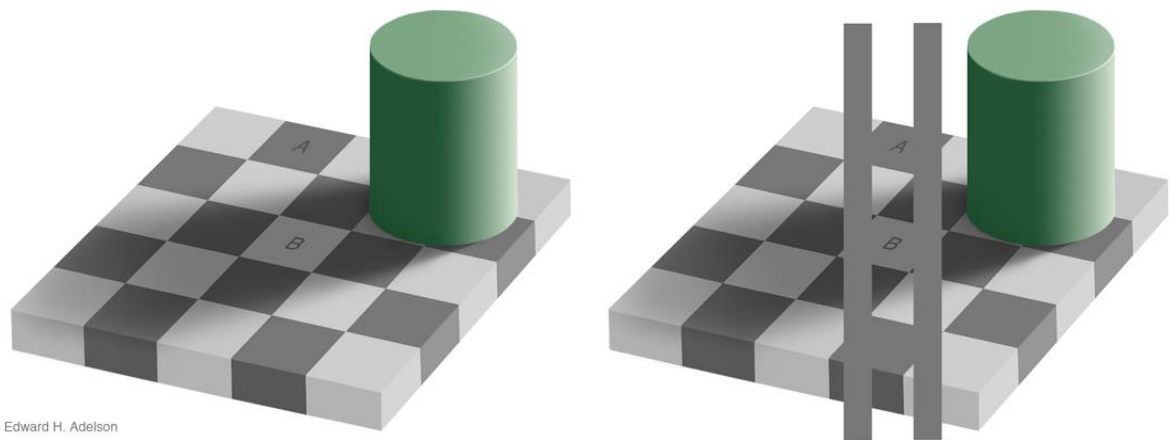
**Abbildung 2:** Bild der Jungen/Alten Frau.

"Jungen-Alten-Frau" von W.E. Hill (140).

In dieser Illusion haben verschiedene Betrachter abhängig von ihrem Alter einen unterschiedlichen Eindruck. So sehen ältere Menschen in dem in Abbildung 2 dargestellten Bild eher eine alte Frau die nach links unten schaut, während jüngere Betrachter in dem Bild eher eine junge Frau sehen, die nach links in die Ferne schaut (141).

Doch nicht nur in solch komplexen Fällen weist das visuelle System des Menschen Schwächen auf. Bereits bei einfachen Fragestellungen wie dem Grauwert bestimmter Felder lässt es sich durch die Umgebung eindrucksvoll täuschen. Eine von Adelson entwickelte Illusion, die sogenannte „Schachbrett-Schatten-Illusion“ macht dies deutlich. Diese Illusion zeigt wie das visuelle System des Menschen Objekte anhand der Umgebung beurteilt (142). Die im linken Teil von Abbildung 3 dargestellten Felder „A“ und „B“ wirken wie ein helles und ein dunkles Feld des Schachbrettes, haben jedoch die gleiche Farbe (143). Dies wird deutlich, wenn man die Felder isoliert betrachtet in dem

man beispielsweise ein Blatt mit zwei Löchern nutzt, um die restliche Abbildung abzudecken oder wie im rechten Teil der Abbildung beide Felder mit einem Balken in der gleichen Graufarbe verbindet.



**Abbildung 3:** Adelsons "Schachbrett-Schatten-Illusion und der Beweis der Illusion."

Durch die einzelzellbasierte Auswertung und der Nutzung von spatialstatistischen Methoden ist nun jedoch eine Objektivität in der Auswertung von histologischen „whole slide“-Immunfluoreszenzschnitten zuverlässig und reproduzierbar möglich. Dies ermöglicht eine Absicherung gegen eventuelle, die Ergebnisse verfälschenden, Illusionen.

Während zu Beginn dieser Arbeit weltweit keine Studien existierten, in denen Immunfluoreszenzschnitte mithilfe von etablierten und weitgängig angewandten spatialstatistischen Methoden ausgewertet wurden, zeigte sich im Verlauf ein beginnender Trend zur Nutzung dieser Methoden. Mit Zunahme der gleichzeitig darstellbaren Antigene und der Etablierung spatialstatistischer Methoden in der wissenschaftlichen Gemeinschaft könnte dies zu einer rasanten Entwicklung dieser Methodik führen. Es wird sich zeigen, welche pathophysiologischen Modelle diesen objektiven *in vivo* Studien standhalten können.

### 5.1.2 QuPath

Bei der Auswertung in QuPath zeigt sich, dass fast alle Probleme bei der einzelzellbasierten Analyse eines "whole slide"-Präparates letzten Endes auf ein



Problem reduziert werden können, nämlich der derzeit in der Immunfluoreszenz noch zu geringen Anzahl an gleichzeitig darstellbaren Antigenen.

Daraus resultiert, dass Teile der Auswertung in QuPath den subjektivsten, ungenauesten und am wenigsten reproduzierbaren Teil der gesamten Auswertung darstellen.

So müssen die Cut-Off-Werte für die verschiedenen Antigene von Schnitt zu Schnitt manuell neu bestimmt werden. Ob eine Zelle beispielsweise eine ausreichend hohe "CA IX" Expression zeigt, um als hypoxisch gewertet zu werden oder nicht, ist zum Teil eine subjektive Entscheidung des Untersuchers.

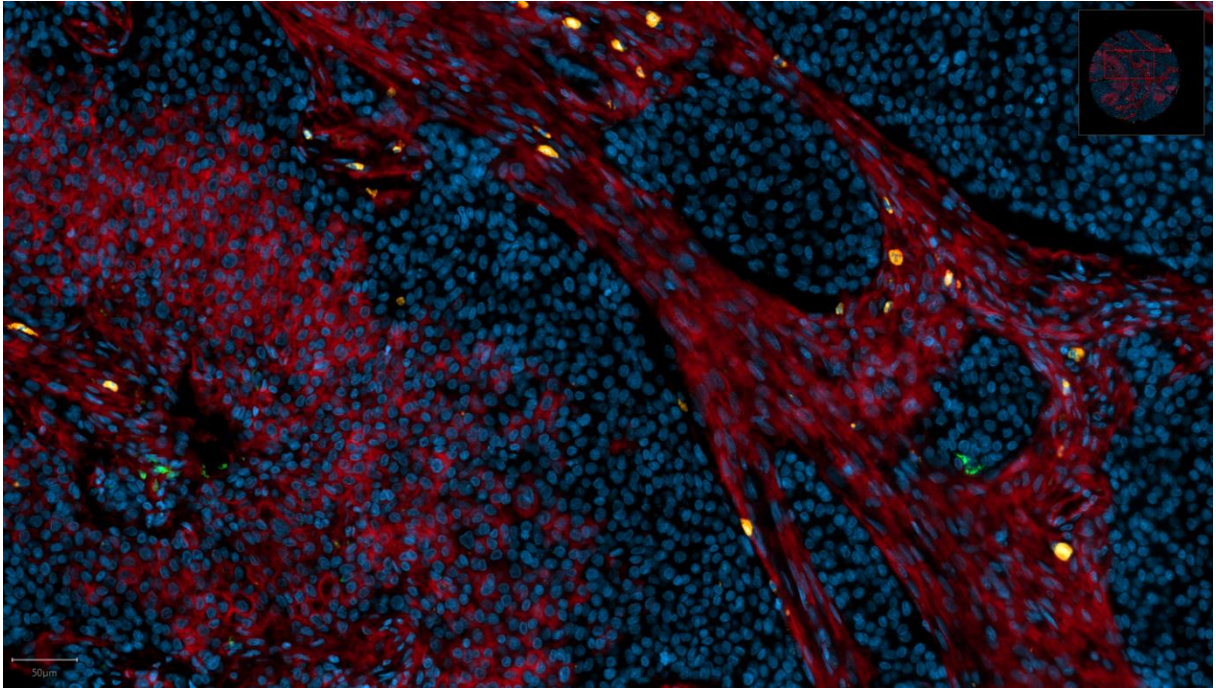
Weiterhin zeigen Erythrozyten eine sehr hohe Autofluoreszenz im FITC-Kanal im Sinne einer Pseudoexpression von "CA IX" , so dass besonders Zellen in unmittelbarer Nähe von größeren Gefäßen gelegentlich als hypoxisch gewertet wurden. Dies passiert, da die einzelnen Zellen nur anhand des Nukleus mithilfe der DAPI-Färbung bestimmt werden. Anschließend werden die Zellgrenzen mithilfe eines Algorithmus berechnet. Dabei werden die Zellgrenzen vom Nukleus ausgehend ausgedehnt, bis sie mit anderen Zellgrenzen zusammenstoßen oder eine vorher festgelegte maximale Ausdehnung erreichen. Da Erythrozyten keinen Zellkern besitzen, werden Gefäße bei der Berechnung häufig als ein "leerer Raum" gesehen, in den hinein sich die Zellgrenzen ausbreiten können. Zellen von Gefäßwänden werden daher häufig größer berechnet als sie sind und können Erythrozyten beinhalten. Eine so entstandene Fehlklassifizierung könnte die Ergebnisse relevant verfälschen, weswegen hier besondere Vorsicht an den Tag gelegt werden muss.

Ein universaler Marker für Zellmembranen - analog zu DAPI für den Nukleus - könnte helfen, genauere Bestimmungen der Zellmorphologie ermöglichen. Dadurch würde auch eine genauere Zuteilung von exprimierten Antigenen zu den entsprechenden Zellen ermöglicht werden. Eine Kombination mit weiteren - nicht auf Erythrozyten exprimierten-Hypoxiemarkern, wie beispielsweise HIF-1, oder VEGF ([144](#)) oder einem Marker für Erythrozyten könnte ebenfalls dazu beitragen, diese Fehlklassifizierung zu vermeiden. Da Erythrozyten kein CA IX exprimieren, scheint es sich hier um Autofluoreszenz zu handeln, so dass Methoden, wie zum Beispiel "imaging mass cytometry" oder "ion beam imaging", in denen Autofluoreszenz keine Rolle spielt, ebenfalls hilfreich sein könnte.

Zusätzlich ist auch der Algorithmus zur Tumor-Stroma-Klassifizierung nicht frei von Fehlern. Diese Fehlklassifikation von Stroma und Tumorzellen ist vor allem in den Randbereichen zwischen Tumor und Stroma präsent. Aufgrund der geringen Anzahl von fehlerklassifizierten Zellen bei insgesamt sehr hohen Zellzahlen sowie der Verlängerung der Distanzen um nur wenige  $\mu\text{m}$ , sollte dies jedoch nur minimal ins Gewicht fallen.

Mit Fortschreiten der Methodik der Immunfluoreszenz und mit steigender Anzahl an gleichzeitig färbbaren Antigenen wird diese "Unschärfe" in Zukunft erwartungsgemäß weiterhin abnehmen. So konnte die Genauigkeit dieser Tumor-Stroma-Klassifizierung in anderen Experimenten vor allem durch den Einsatz von Panzytokeratin, eines Markers epithelialer Zellen, deutlich verbessert werden. Komplementär hierzu kann das Stroma durch Marker wie Vimentin abgegrenzt werden. Auch das Fortschreiten der Algorithmen zur Tumor-Stroma-Klassifizierung wird dazu führen, eine solche Unschärfe zu reduzieren.

Zuletzt scheint "CA IX" prinzipiell zwar als Hypoxiemarker geeignet zu sein, wird jedoch nicht in jedem hypoxischen Areal und auch nicht von jedem hypoxischen Tumor exprimiert (s. Abbildung 4). Zusätzliche Hypoxiemarker, wie oben erwähnt, können auch hier helfen, alle hypoxischen Areale abzubilden, um so ein genaueres Bild des Tumormikromilieus zu zeichnen (145).



**Abbildung 4:** 10x Vergrößerung eines Plattenepithelkarzinoms der Nase.

Ausgeprägte CD73-Expression (rot) sowohl des Stromas in der rechten Hälfte des Bildes, sowie im Tumor in der linken Hälfte. Die CD73-Expression des Tumors ist dabei vor allem in den am weitesten vom Stroma entfernt liegenden Bereichen, in denen man auch den Hypoxiemarker CA IX erwarten würde, zu sehen. CA IX ist im gesamten Schnitt nur minimalst exprimiert und scheint daher nicht alle hypoxischen Areale von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region abzubilden. Zusätzlich muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass eine solche Verteilung von CD73 die Ausnahme in den untersuchten Tumoren darstellt.

### 5.1.3 Spatstat

Die Spatialstatistik ist ein äußerst divers einsetzbares Feld der Statistik, für das viele verschiedene Programme mit unterschiedlicher Funktionalität und wechselnder Qualität und Dokumentation zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund ist es wichtig, sich Gedanken bei der Wahl des Programms, mit dem die Auswertung vorgenommen werden soll, zu machen.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse machte dabei nur von einem Teil der in Spatstat verfügbaren Funktionalitäten Gebrauch. Die Zukunft der spatialstatistischen Auswertung von Immunfluoreszenz-Präparaten wird in der Entwicklung von neuen statistischen Modellen liegen, um so verschiedene Hypothesen und deren Effekte in einem hochkomplexen biologischen System zu überprüfen.

Das "R"-Package Spatstat besticht dabei aufgrund seiner Open-Source-Verfügbarkeit und der Möglichkeit, auch große Mengen an Daten (über eine Millionen verschiedener Punkte gleichzeitig) zu verarbeiten.

Vor allem die Open-Source-Verfügbarkeit, kombiniert mit einer ausführlichen Dokumentation, verbessert dabei die Transparenz und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse deutlich.

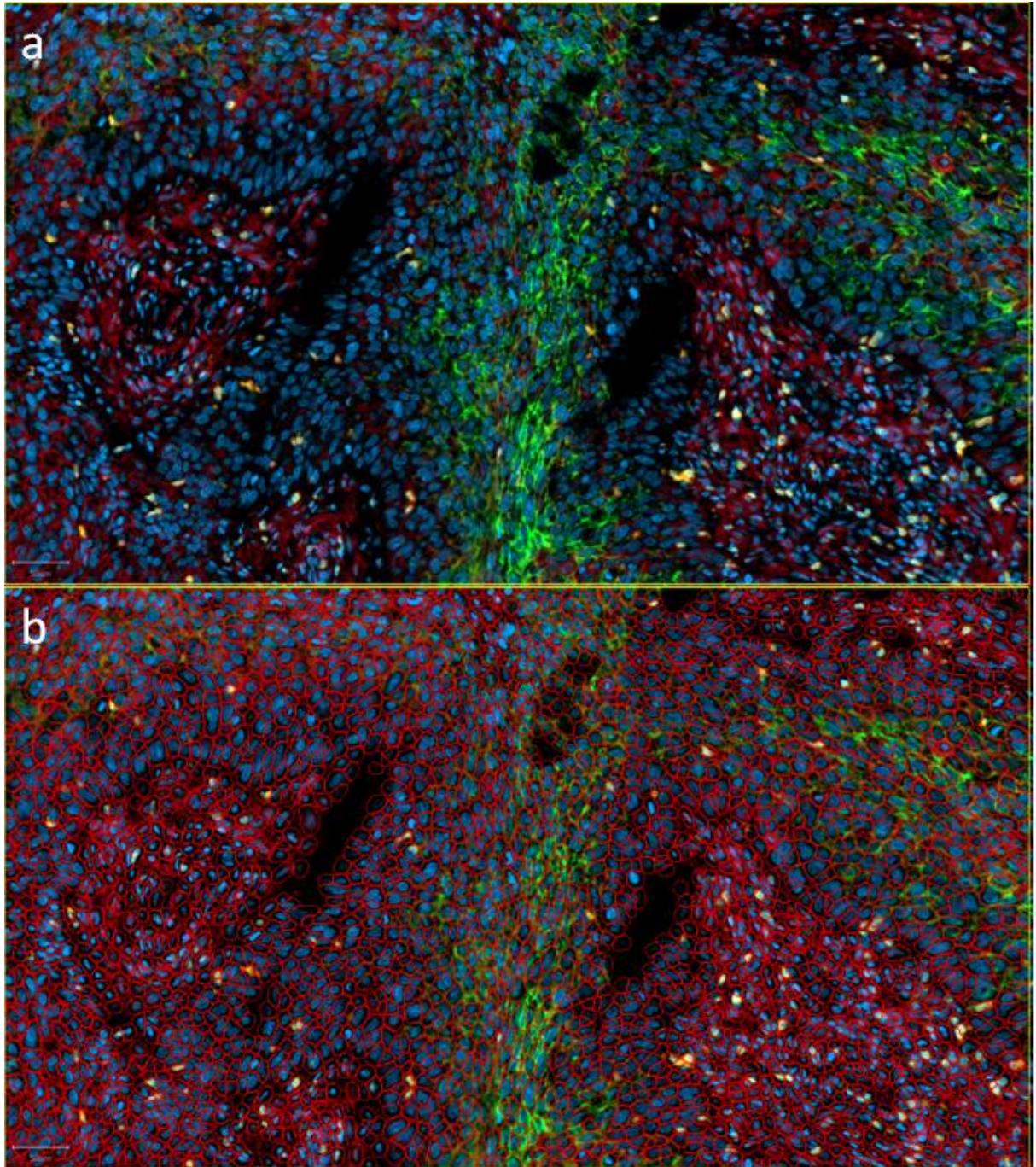
Durch die "R"-Umgebung ist außerdem eine hohe Reproduzierbarkeit und eine Verkürzung redundanter Aufgaben durch die Möglichkeit des Einsatzes komplexer Abfolgen von Befehlen („Skripte“) gegeben.

Die Wahl der richtigen Funktionen sowie die korrekte Einstellung der dazugehörigen Parameter sind bei der Analyse von elementarer Bedeutung. Dies ist vor allem dann relevant, wenn Parameter über die statistische Signifikanz der Ergebnisse entscheiden, bspw. im Rahmen der "lohboot"-Funktion.

Die Beratung durch einen Statistiker mit Erfahrung im Bereich der Spatialstatistik ist daher äußerst wichtig. Die Angabe der in Spatstat verwendeten Funktionen und Parameter in Publikationen ist unverzichtbar, um einerseits die Möglichkeit zur Reproduktion der Ergebnisse zu behalten und andererseits nachvollziehen zu können, dass Ergebnisse nicht aufgrund fehlerhafter Statistik eine Signifikanz zeigen, die so eventuell gar nicht existiert.

Das für diese Auswertung verwendete exemplarische R-Skript findet sich daher im Anhang.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse



**Abbildung 5:** Repräsentativer Ausschnitt eines Plattenepithelkarzinoms des Hypopharynx, 10x Vergrößerung

(a) In dieser Aufnahme ist der DAPI-Kanal in blau, CA IX in grün, CD8 in gelb und CD73 in rot dargestellt. Der graue Maßstabsbalken in der unteren linken Ecke definiert eine Distanz von 50 µm. (b) Einzelzellerkennung in QuPath, die berechneten Zellgrenzen sind in rot eingezeichnet.

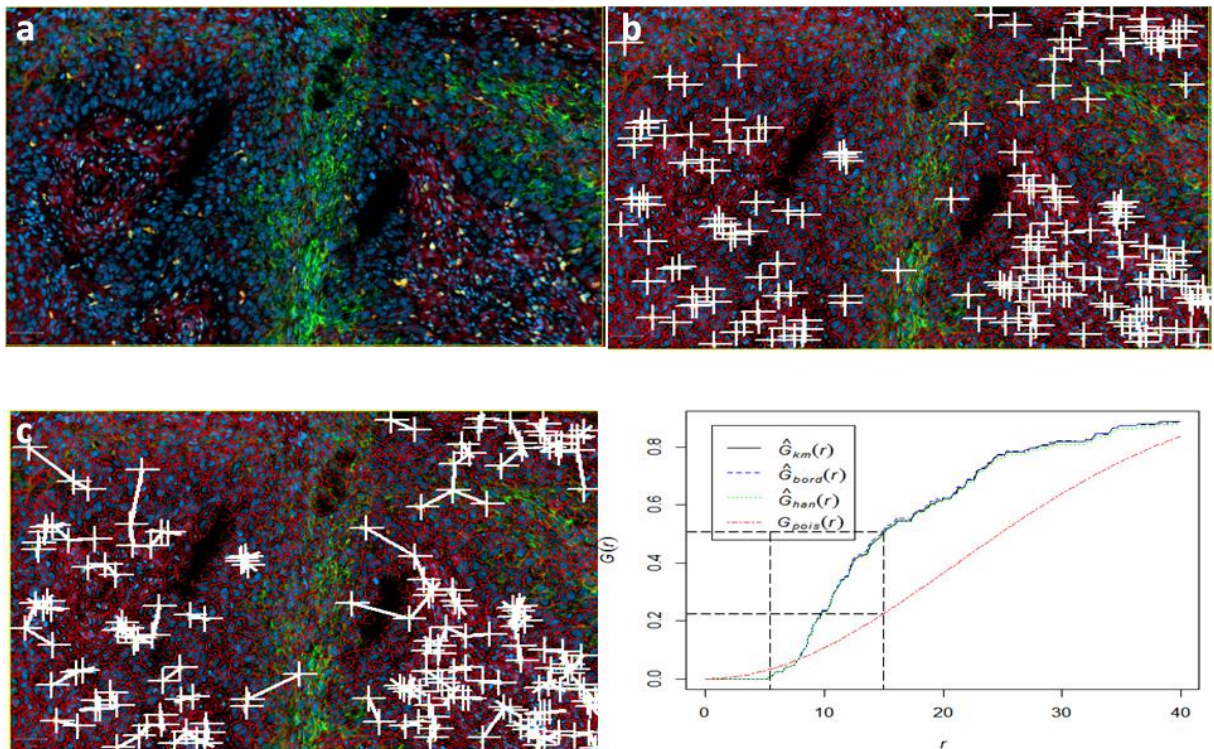
Zunächst erfolgt eine kurze Diskussion der Auswertung der verwendeten Funktionen anhand eines in Abbildung 5 dargestellten repräsentativen Beispielausschnittes.

Anschließend werden die in Kapitel 4 aufgeführten Ergebnisse anhand einiger Beispiele und unter dem Kontext der Literaturdiskussion diskutiert. Eine etwas tiefergehende Erklärung der Berechnung der verschiedenen Funktionen findet sich in Kapitel 3.2.3.. Eine detaillierte Beschreibung und Herleitung des mathematischen Hintergrundes ist in dem Buch "Spatial Point Patterns: Methodology and Applications with R" von Baddeley, Turner & Rubak ([124](#)) dargestellt.

### **5.2.1 Anwendung der spatialstatistischen Funktionen**

Das erste Ziel dieser Arbeit war, eine objektive Aussage über die räumliche Verteilung der Population von CTL treffen zu können. Wir stellten die Frage, ob das beobachtete Muster völlig zufällig ist oder ob es Anzeichen einer Clusterbildung oder einer regelmäßigen Verteilung zeigt.

Zunächst wurde mithilfe der G-Funktion die Wahrscheinlichkeit bestimmt, mit der ein weiterer CTL innerhalb einer Distanz  $r$  von einem beliebigen CTL liegt. Dies erlaubt bereits eine erste Aussage über die Verteilung einer Population. Dabei wird das Ergebnis mit einer theoretischen Kurve von CSR verglichen.



**Abbildung 6:** Berechnung der G-Funktion eines repräsentativen Ausschnittes eines Plattenepithelkarzinoms des Hypopharynx, 10x Vergrößerung

(a) In dieser Aufnahme ist der DAPI-Kanal in blau, CA IX in grün, CD8 in gelb und CD73 in rot dargestellt. (b) Einzellerkennung in QuPath, die berechneten Zellgrenzen sind in rot eingezeichnet, zusätzlich ist das in Spatstat generierte ppp der CTL eingezeichnet. Jede CD8+-Zelle wird dabei durch ein weißes Kreuz repräsentiert. (c) Die Verbindungen zwischen den jeweiligen "Nächsten Nachbarn" sind als weiße Linien dargestellt. (d) G-Funktion. die typische G-Funktion von CSR ist durch die rote Linie dargestellt, die berechnete G-Funktion durch die schwarze Linie. Die grüne und blaue Linie zeigen dabei zusätzliche Funktionen nach einer anderen "Randkorrektur" an. Wie man erkennt, verlaufen die Kurven fast deckungsgleich. Die Varianten der Randkorrektur haben in diesem konkreten Fall also keinen sehr starken Einfluss auf die Ergebnisse.

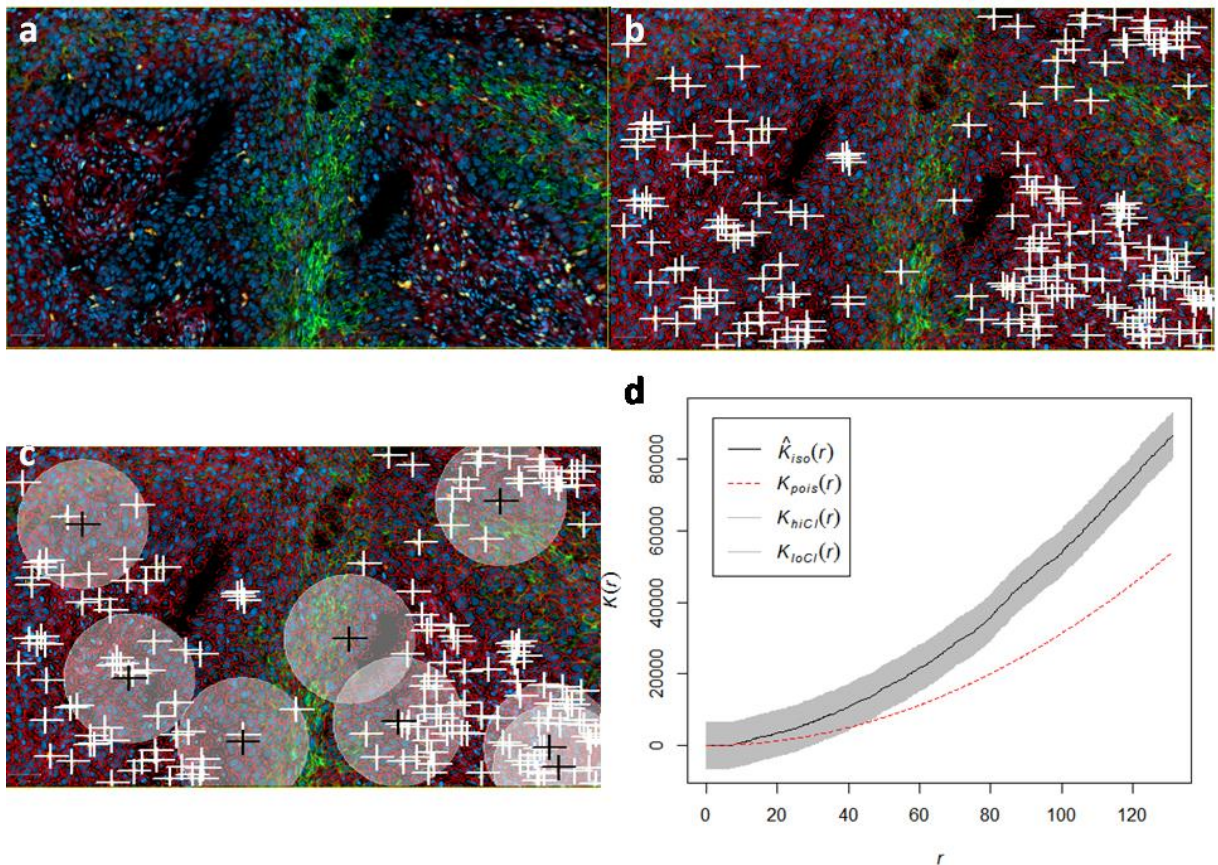
Bei der visuellen Auswertung der G-Funktion wird die berechnete Funktion (schwarz) in Bezug zur theoretischen Funktion von CSR (rot) gesetzt. Dabei kann die Linie ungefähr analog zur G-Funktion von CSR verlaufen, was dafür spräche, dass Zellen unabhängig voneinander verteilt sein könnten. Die Funktion könnte jedoch auch deutlich ober- oder unterhalb dieser roten Kurve verlaufen, was entsprechend dafür stünde, dass die Zellen eine Tendenz zur Abweichung von CSR zeigen im Sinne einer Anziehung (oberhalb) oder Abstoßung (unterhalb).

In dem in Abbildung 6 dargestellten Beispiel sieht man deutlich, dass die Wahrscheinlichkeit, dass ein zufälliger CTL einen Nachbarn innerhalb der ersten 5  $\mu\text{m}$  hat, gleich Null ist. Dies resultiert aus der Tatsache, dass die Zellen nur als Punkt dargestellt werden und diese Punkte aufgrund der Zellgröße nicht näher aneinander liegen können. Diesem Plateau folgt ein deutlicher Sprung innerhalb der Distanz von 5 - 15  $\mu\text{m}$  auf eine Wahrscheinlichkeit von ca. 50%. Dies bedeutet, dass der nächste Nachbar bei 5 von 10 CTL innerhalb von 15  $\mu\text{m}$  liegt. Bei CSR wäre die Wahrscheinlichkeit bei gleicher Intensität des ppp nur bei ca. 25%.

"Ripley's K-Funktion" ist die Grundlage für die weiteren statistischen Methoden, die zur Beantwortung dieser Frage eingesetzt werden. Die Ergebnisse der einzelnen Punktmuster werden dabei, wie bereits bei der G-Funktion, immer in Bezug zu einem komplett zufällig verteilten Punktmuster (CSR) gesetzt. Um einen validen Vergleich zwischen dem beobachteten Punktmuster und CSR zu ermöglichen, ist eine Standardisierung notwendig, da die Anzahl der gezählten Punkte innerhalb eines Bereiches, abhängig von der Dichte eines Punktmusters, unterschiedliche Bedeutungen haben kann. Wenn man beispielsweise die Punkte eines Musters mit sehr niedriger Dichte zählt, können vergleichsweise hohe Punktzahlen ein Clustering bedeuten. Umgekehrt würde in einem Muster mit einer deutlich höheren Punktdichte die gleiche Anzahl möglicherweise für eine zufällige oder sogar eine einander vermeidende Verteilung der Punkte sprechen. Die Dichte eines Punktmusters wird in Spatstat als "Intensität" bezeichnet. Nach der Standardisierung ihrer "Intensitätswerte" können zwei Punktmuster miteinander verglichen werden. Da vor allem bei den Microarray-Spots keine Daten außerhalb des untersuchten Spots existieren, muss dieser Mangel an Informationen in einem letzten Schritt der Berechnung der K-Funktion berücksichtigt werden. Da es verschiedene Möglichkeiten gibt, für diese sogenannten "Randeffekte" zu korrigieren, wurde ein Ansatz gewählt, der eine erhebliche Verlängerung der Rechenzeit vermeidet und dabei aufgrund der hohen Punktzahl nur mit einer geringen Minderung der statistischen Effizienz einhergeht. Eine so berechnete K-Funktion samt dem zugrunde liegenden Punktmuster ist in Abbildung 7 dargestellt.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt anschließend visuell und ist verhältnismäßig leicht, sind die Prinzipien einmal verstanden.





**Abbildung 7:** Berechnung der K-Funktion eines repräsentativen Ausschnittes eines Plattenepithelkarzinoms des Hypopharynx, 10x Vergrößerung

(a) In dieser Aufnahme ist der DAPI-Kanal in blau, CA IX in grün, CD8 in gelb und CD73 in rot dargestellt. (b) Einzelzellerkennung in QuPath, die berechneten Zellgrenzen sind in rot eingezeichnet, zusätzlich ist das in Spatstat generierte ppp der CTL eingezeichnet. Jede CD8<sup>+</sup>-Zelle wird dabei durch ein weißes Kreuz repräsentiert (c) Beispielhafter Zwischenschritt der Berechnung der K-Funktion für einige CTL mit  $r = 100 \mu\text{m}$ . Jeder Kreis wird von einem CTL aus ausgedehnt und alle weiteren CTL entsprechenden Punkte, die in die Kreisfläche fallen, werden für jedes  $r$  gezählt. Dies wird für alle CTL wiederholt. Dabei sind die CTL schwarz markiert, von denen in diesem Beispiel ein Kreis ausgeht. (d) K-Funktion, die typische K-Funktion von CSR ist durch die gestrichelte rote Linie dargestellt, die berechnete durch die schwarze Linie. Das mit "lohboot"-bestimmte 99%-ige globale Konfidenzintervall ist als graues Konfidenzband um die K-Funktion dargestellt.

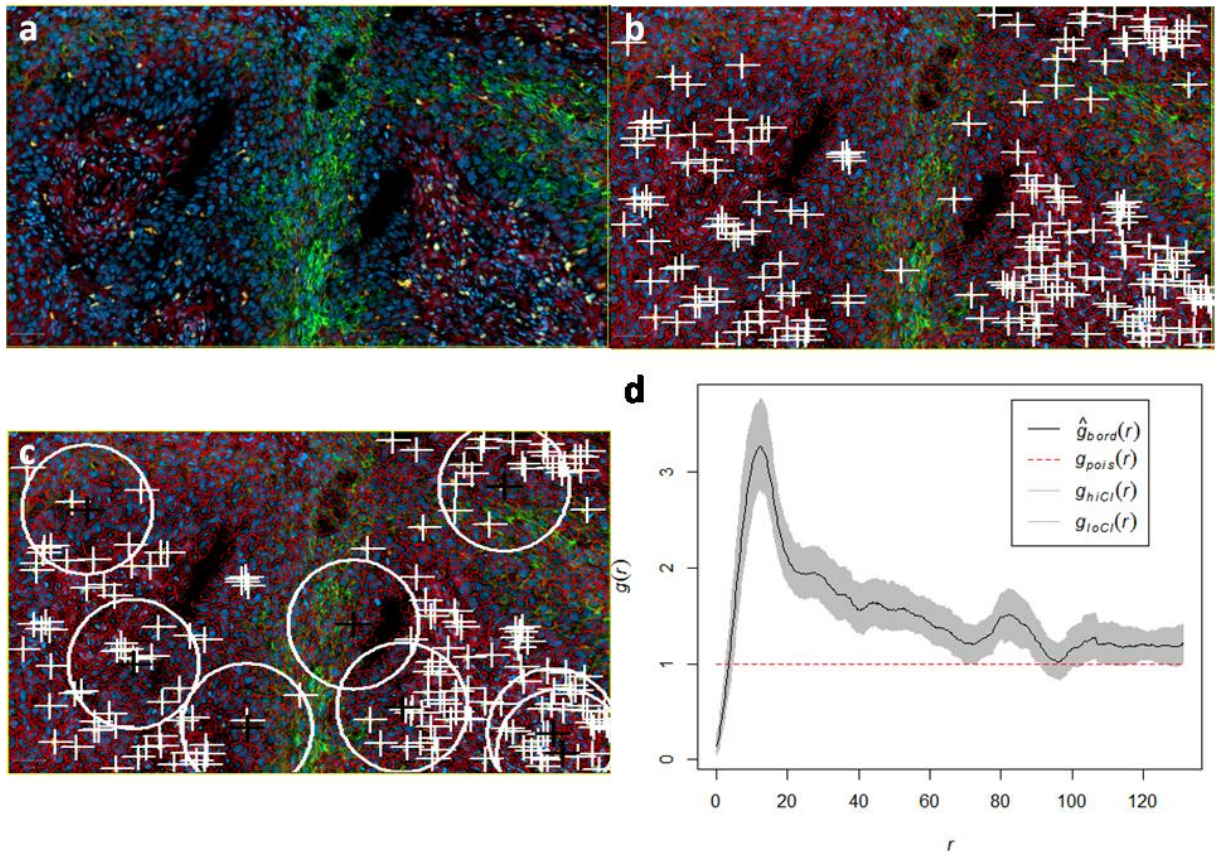
Analog zur G-Funktion sind auch bei der K-Funktion prinzipiell drei Verläufe denkbar. Einerseits kann das Konfidenzband die theoretische Kurve von CSR im gesamten Verlauf einschließen, was für ein zufällig verteiltes Muster sprechen würde. Andererseits kann die Kurve deutlich ober- oder unterhalb der theoretischen Kurve verlaufen, was für ein anziehendes oder ein vermeidendes Verhalten der Population sprechen kann.

Aus der in Abbildung 7 dargestellten K-Funktion kann man gut erkennen, dass CTL eine deutliche Abweichung von CSR mit der Tendenz einer Clusterbildung zeigen. Auch hier

zeigt sich analog zur G-Funktion ein Plateau innerhalb der ersten  $\mu\text{m}$ , begründet durch die Zellgröße. Anschließend zeigt die K-Funktion, verglichen mit CSR, einen deutlichen Anstieg, bis das Konfidenzband die K-Funktion einer theoretischen Poisson-Verteilung schließlich bei ca.  $50 \mu\text{m}$  verlässt. Dieser "verspäteten" Abweichung liegt einerseits die kumulative Natur der K-Funktion zugrunde. Die niedrige Punktdichte auf den ersten  $5 \mu\text{m}$  muss erst ausgeglichen werden, bevor die Kurve der berechneten K-Funktion über die theoretische Funktion von CSR steigen kann. Zusätzlich nimmt das Konfidenzband aufgrund der exponentiellen Natur der K-Funktion mit steigendem  $r$  exponentiell zu. Dies wirkt sich bei globalen Konfidenzbändern als verhältnismäßig großes Konfidenzband auf kurzen Distanzen aus. Da die K-Funktion jedoch eine kumulative Funktion ist, ist es trotzdem richtig, festzustellen, dass die Population der CTL eine Tendenz zur Clusterbildung innerhalb der Distanzen von  $0 - 50 \mu\text{m}$  zeigt.

Während die K-Funktion einen guten Überblick über ein bestimmtes Punktmuster erlaubt, gibt es Fragen, bei denen andere Funktionen eine bessere Aussagekraft haben. So ist die Verwendung der K-Funktion zwar sinnvoll, um zu beschreiben, wie ein Punktmuster verteilt ist. Sie ist jedoch weder geeignet, das Ausmaß des Effektes, den ein einzelner Punkt auf andere Punkte bei bestimmten Distanzen hat, zu beschreiben, noch kann sie die Tendenz dieses Effektes (positiv oder negativ) angeben.

Dies begründet sich aus der kumulativen Natur der K-Funktion, d.h. es werden alle Punkte mit einem Abstand unter oder gleich  $r$  berücksichtigt. Um das Verhalten eines ppp auf bestimmten Distanzen besser beschreiben zu können, muss also eine andere Funktion verwendet werden, die sogenannte "pair correlation function" (pcf). Die pcf zählt nur Punkte mit einem Abstand gleich  $r$  und erlaubt somit Aussagen über das Auftreten von Punkten in bestimmten Abständen. Dafür ist sie in statistischen Tests deutlich weniger robust. Bei der pcf handelt es sich um eine Abwandlung der K-Funktion, welche ebenfalls standardisiert und kantenkorrigiert ist.



**Abbildung 8:** Berechnung der pair correlation function (pcf) eines repräsentativen Ausschnittes eines Plattenepithelkarzinoms des Hypopharynx, 10x Vergrößerung

(a) In dieser Aufnahme ist der DAPI-Kanal in blau, CA IX in grün, CD8 in gelb und CD73 in rot dargestellt. (b) Einzelzellerkennung in QuPath, die berechneten Zellgrenzen sind in rot eingezeichnet, zusätzlich ist das in Spatstat generierte ppp der CTL eingezeichnet. Jede CD8+-Zelle wird dabei durch ein weißes Kreuz repräsentiert. (c) Beispielhafter Zwischenschritt der Berechnung der pcf für einige CTL mit  $r = 100 \mu\text{m}$ . Jeder Kreis wird von einem CTL aus ausgedehnt und alle Punkte, die auf die Kreislinie fallen, werden für jedes  $r$  gezählt. Dies wird für alle CTL wiederholt. Dabei sind die CTL, von denen in diesem Beispiel ein Kreis ausgeht, schwarz markiert. (d) Graphische Darstellung einer pcf. Die typische pcf von CSR ist durch die rote Linie dargestellt, die berechnete durch die schwarze Linie. Das mit "lohboot"-bestimmte 99%-ige globale Konfidenzintervall ist als graues Konfidenzband um die pcf dargestellt.

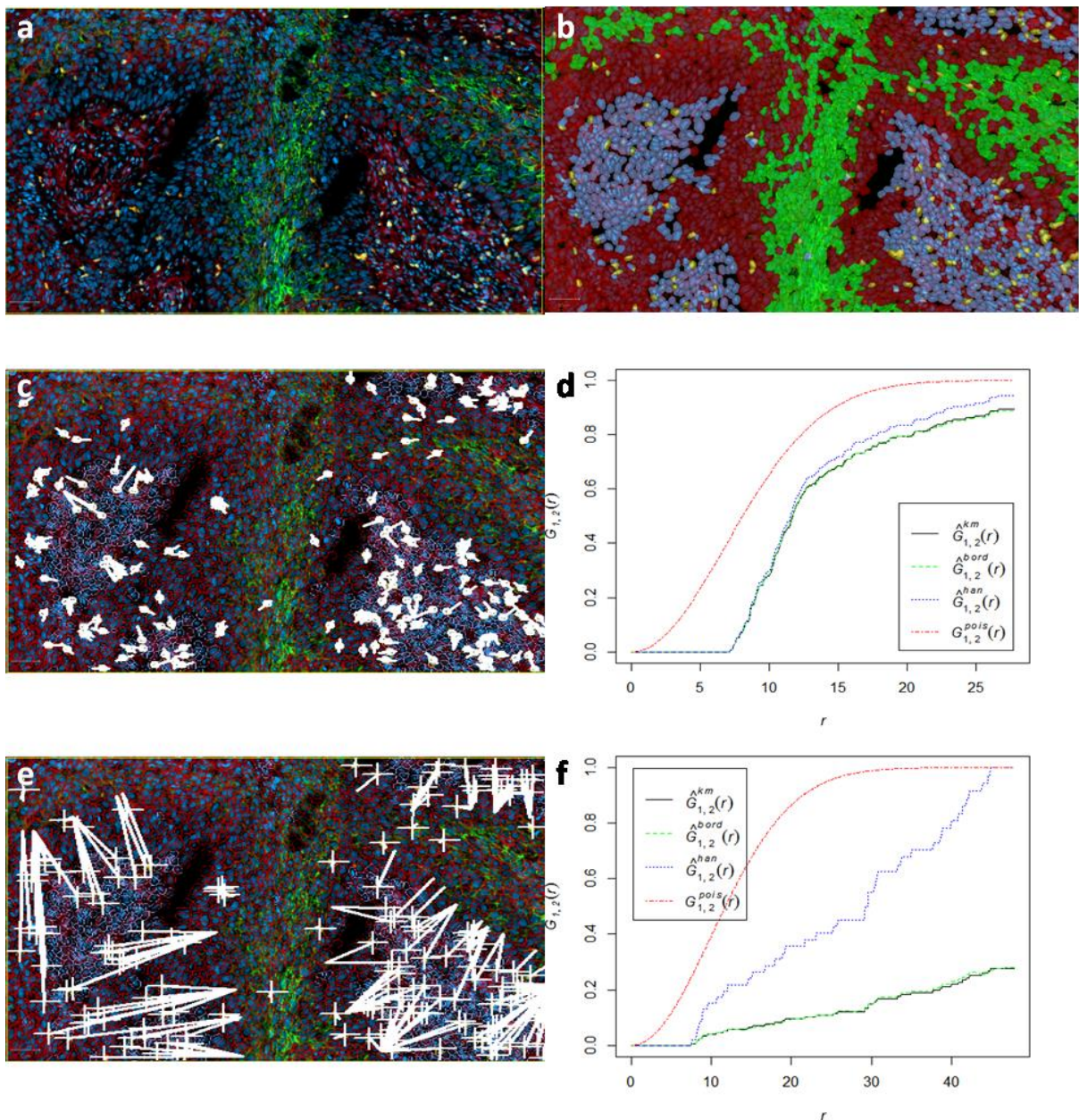
Auch die pcf wird im Vergleich mit CSR betrachtet. Liegt die Kurve oberhalb der Kurve von CSR, so spricht dies für eine Häufung von Punkten mit dieser Distanz zueinander. Liegt sie darunter, so spricht dies für eine geringere Anzahl von Punkten mit dieser Distanz zueinander als von einem zufällig verteilten Muster zu erwarten wäre. Das besondere an der pcf ist dabei, dass sie nicht kumulativ ist und daher Abweichungen von CSR entdecken kann, die mithilfe der K-Funktion nicht zu sehen gewesen wären. So könnte bei der Darstellung der K-Funktion einerseits ein ausgeprägtes Clustern von

Punkten innerhalb einer bestimmten Distanz durch eine spärliche Anzahl von Punkten auf kürzeren Distanzen unterdrückt werden. Andererseits könnte ein ausgeprägtes Clustern auf einer kurzen Distanzspanne sich über eine weitaus längere Distanzspanne darstellen. Solche Effekte würde man im Gegensatz dazu in der pcf deutlich erkennen können.

Die in Abbildung 8 dargestellte pcf zeigt einen deutlichen Peak innerhalb der ersten 20  $\mu\text{m}$ , hier scheint die Häufung von CTL also am stärksten ausgeprägt zu sein. Anschließend fällt die Kurve langsam ab, bis sie bei ca. 70  $\mu\text{m}$  die Kurve eines zufällig verteilten Musters berührt. Dies könnte beispielsweise bedeuten, dass die CTL in Ansammlungen vorliegen, die sich über eine größere Strecke als 20 $\mu\text{m}$  erstrecken. Die Tatsache, dass die K-Funktion in Abbildung 7 sich im Verlauf einer längeren Distanz ebenfalls immer weiter von CSR entfernt, könnte ebenfalls für diese Tatsache sprechen.

Die K-Funktion und die pcf können nur Muster innerhalb einer einzelnen Population beschreiben. Wenn es jedoch um die Wirkung von Hypoxie auf das Immunsystem geht, müssen jedoch zwei verschiedene Populationen miteinander verglichen werden. Die Kurve der beobachteten Punktmuster wird anschließend mit der Kurve von zwei zufälligen und unabhängig voneinander verteilten Mustern verglichen. Das Ergebnis wird also nicht mit CSR, sondern vielmehr mit Unabhängigkeit verglichen.

Auch hier wird zunächst die Gcross-Funktion genutzt, um die Verteilung der Distanzen von einem Punkt der ersten Population zum nächsten Punkt der zweiten Population zu schätzen.



**Abbildung 9:** Vergleich der G-cross-Funktionen von CTL und normoxischen (c+d) oder hypoxischen (e-f) Tumorzellen eines repräsentativen Ausschnittes eines Plattenepithelkarzinoms des Hypopharynx. 10x Vergrößerung

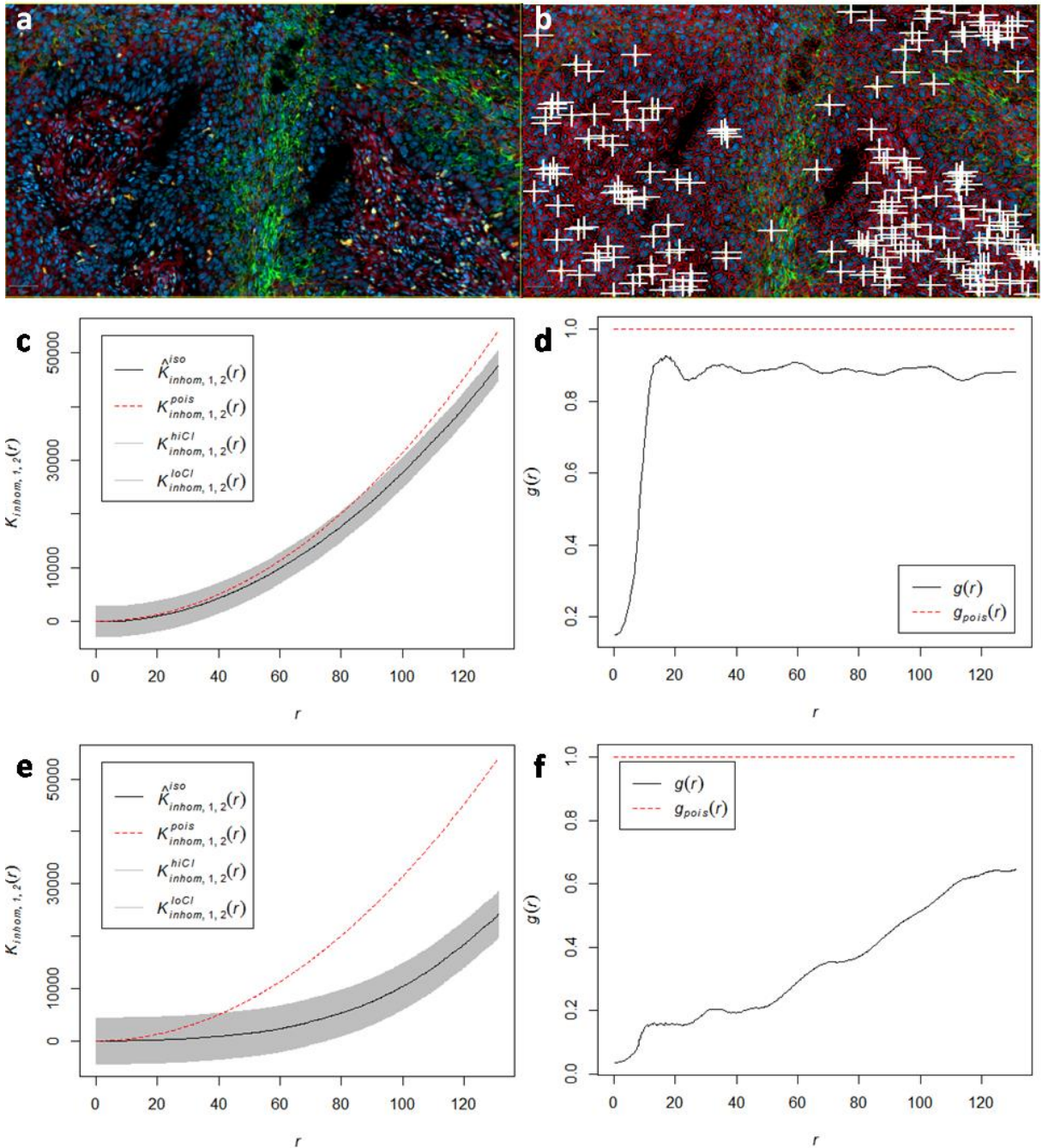
(a) In dieser Aufnahme ist der DAPI-Kanal in blau, CA IX in grün, CD8 in gelb und CD73 in rot dargestellt. (b) Tumor(rot)-Stroma(blau)-Klassifizierung mittels "machine-learning". Außerdem wurden hypoxische Tumorareale (grün) sowie CTL (gelb) anhand des Signals der zugehörigen Fluoreszenzkanäle dargestellt. (c) Berechnung der G-cross-Funktion von CTL und normoxischen Tumorzellen. Die Verbindungen zwischen den CTL und der jeweils nächsten normoxischen Tumorzelle sind als weiße Linien dargestellt. Aufgrund der teils sehr kurzen Distanzen wurde zur besseren Übersicht statt einem Kreuz ein kleinerer Kreis verwendet. (d) G-cross-Funktion. Die typische G-cross-Funktion von zwei unabhängig voneinander verteilten ppp ist durch die rote Linie dargestellt, die berechnete G-cross-Funktion durch die schwarze Linie. Die grüne und blaue Linie zeigen dabei zusätzliche Funktionen nach einer anderen "Randkorrektur" an. (e) Berechnung der G-cross-

**Funktion von CTL und hypoxischen Tumorzellen.** Die Verbindungen zwischen den CTL und der jeweils nächsten hypoxischen Tumorzelle sind als weiße Linien dargestellt. **(f) Gcross-Funktion.** Die typische Gcross-Funktion von zwei unabhängig voneinander verteilten ppp ist durch die rote Linie dargestellt, die berechnete Gcross-Funktion zwischen CTL und hypoxischen Tumorzellen durch die schwarze Linie. Die grüne und blaue Linie zeigen dabei zusätzliche Funktionen nach einer anderen "Randkorrektur" an.

In Abbildung 9 sieht man einen deutlichen Unterschied in den Gcross-Funktionen. So sind zwar beide Kurven unterhalb der Kurve zweier unabhängig voneinander verteilten Muster, jedoch ist die Kurve der CTL und normoxischen Zellen deutlich höher als die Kurve der CTL und hypoxischen Zellen. Die Bedeutung wird deutlicher beim Vergleich dieser Kurven mit den eingezeichneten Distanzen. So liegen viele CTL an der Grenze zwischen Tumor und Stroma, oder haben das Tumorgewebe bereits infiltriert. Im Gegensatz dazu haben es nur wenige Zellen geschafft, bis in den hypoxischen Bereich des Tumorgewebes vorzudringen. Dementsprechend niedriger ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine hypoxische Tumorzelle innerhalb einer kurzen Distanz eines CTL liegt.

Bei der Betrachtung der Skalen fällt auf, dass die Kurve von CTL und hypoxischer Region nicht nur visuell langsamer steigt, sondern dies zusätzlich über eine längere Distanz tut, also noch langsamer steigt als man visuell vermuten würde. Auch die Kurven zweier unabhängig voneinander verteilter Populationen unterscheiden sich dadurch. Dies resultiert aus der Tatsache, dass die G-Funktion und die Gcross-Funktion nicht standardisiert sind und die Intensität der ppp daher einen Einfluss auf die Funktionen hat. Daher ist die Gcross-Funktion auch nur in der Lage, einen ersten Überblick über das mögliche Verhalten zweier Punktmuster zueinander zu geben, nicht jedoch, um auf dieser Basis valide, in solider Statistik begründete Aussagen zu tätigen.

Aus diesem Grund werden anschließend die inhomogenen Kcross- und pcf.cross-Funktionen verwendet. Aufgrund der mathematischen Standardisierung der Kurven ist es hier möglich, Kurven verschiedener Populationen miteinander zu vergleichen, da hier die Intensität verschiedener Punktmuster keine Rolle spielt.



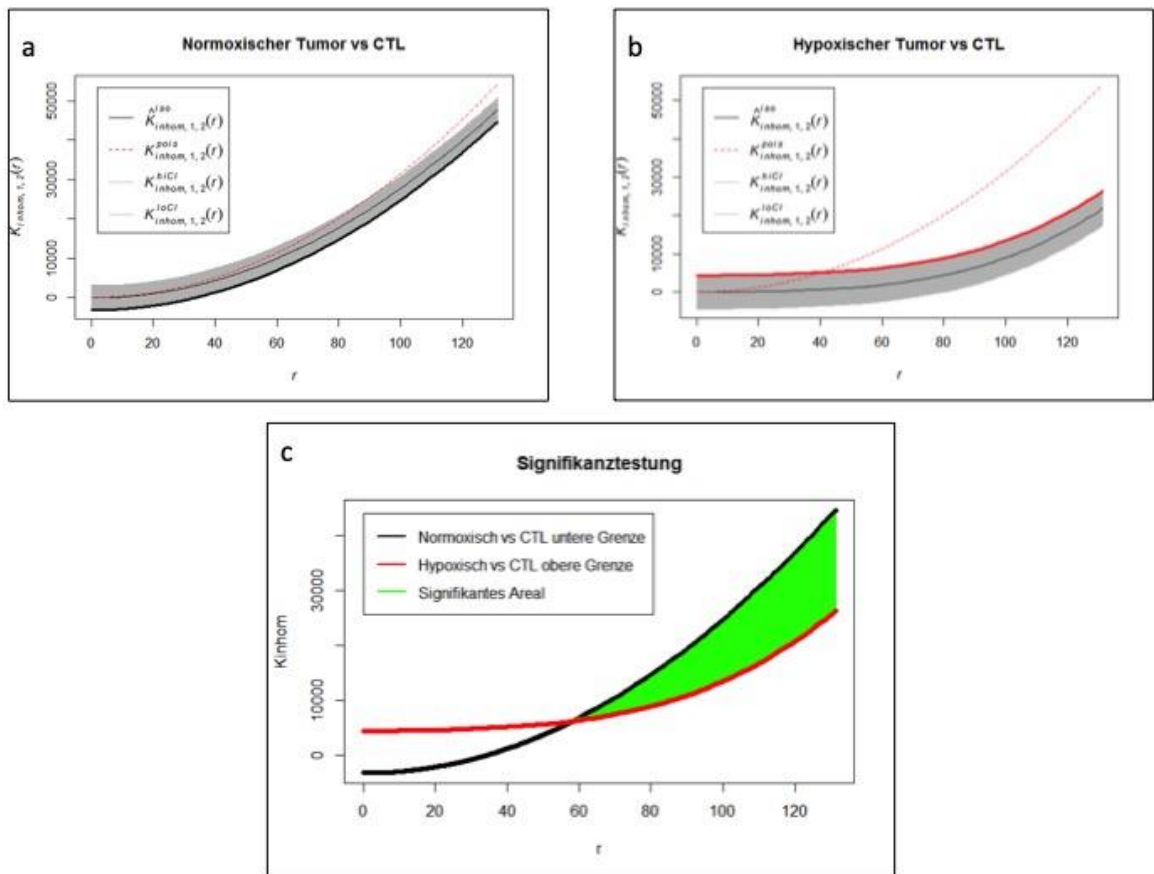
**Abbildung 10:** Vergleich der Kcross- und pcf.cross-Funktionen von CTL und normoxischen (c+d) oder hypoxischen (e-f) Tumorzellen eines repräsentativen Ausschnittes eines Plattenepithelkarzinoms des Hypopharynx. 10x Vergrößerung

(a) In dieser Aufnahme ist der DAPI-Kanal in blau, CA IX in grün, CD8 in gelb und CD73 in rot dargestellt. (b) Einzellerkennung in QuPath, die berechneten Zellgrenzen sind in rot eingezeichnet, zusätzlich ist das in Spatstat generierte ppp der CTL eingezeichnet. Jede CD8+-Zelle wird dabei durch ein weißes Kreuz repräsentiert. (c) Kcross-Funktion von CTL und normoxischen Tumorzellen, die typische Kcross-Funktion zweier unabhängig voneinander verteilter ppp ist durch die rote Linie dargestellt, die berechnete durch die schwarze Linie. Das mit "lohboot"-bestimmte 99%-ige globale Konfidenzintervall ist als graues Konfidenzband um die K-Funktion dargestellt. (d) pcf.cross-Funktion der gleichen Populationen wie in c, die

typische pcf.cross-Funktion zweier unabhängig voneinander verteilter ppp ist durch die rote Linie dargestellt, die berechnete durch die schwarze Linie. (e) Kcross-Funktion von CTL und hypoxischen Tumorzellen, die typische Kcross-Funktion zweier unabhängig voneinander verteilter ppp ist durch die rote Linie dargestellt, die berechnete durch die schwarze Linie. Das mit "lohboot"-bestimmte 99%-ige globale Konfidenzintervall ist als graues Konfidenzband um die K-Funktion dargestellt. (d) pcf.cross-Funktion der gleichen Populationen wie in e, die typische pcf.cross-Funktion zweier unabhängig voneinander verteilter ppp ist durch die rote Linie dargestellt, die berechnete durch die schwarze Linie.

In Abbildung 10 zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Kurven der CTL und der normoxischen Tumorzellen und den Kurven der CTL und der hypoxischen Tumorzellen. Obwohl letztendlich die Kurven beider Kcross-Funktion von der theoretischen Kurve von zwei unabhängig voneinander verteilten ppp abweichen, weicht die Kcross-Funktion von CTL und normoxischen Tumorzellen erst spät (bei ca. 80  $\mu\text{m}$ ) und nur minimal von dieser Kurve ab. Im Gegensatz dazu weicht die Kcross-Funktion von CTL und hypoxischen Tumorzellen, trotz eines deutlich breiteren Konfidenzbandes, bereits deutlich früher (bei ca. 40  $\mu\text{m}$ ) und stärker von der Kurve von zwei unabhängig voneinander verteilten ppp ab. Das breitere Konfidenzband resultiert dabei aus einer niedrigeren Anzahl an hypoxischen Tumorzellen verglichen mit den normoxischen Zellen. Eine detailliertere Erklärung zur Signifikanztestung ist im folgenden in Abbildung 11 dargestellt. Analog zu anderen medizinischen Fragestellungen werden Ergebnisse dabei als signifikant bezeichnet, wenn es zwischen zwei miteinander verglichenen Konfidenzintervallen keine Überschneidungen gibt.





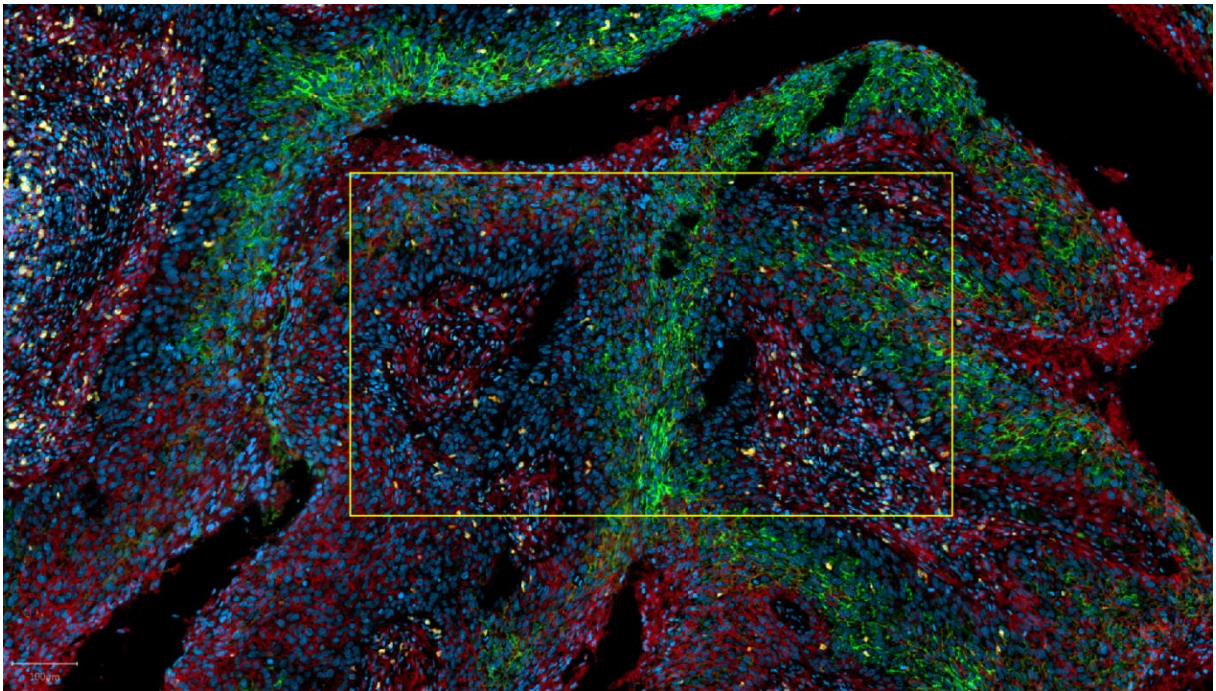
**Abbildung 11:** Beispiel für die visuelle Signifikanztestung beim Vergleich von  $K_{\text{cross.inhom}}$ -Funktionen.

(a)  $K_{\text{cross.inhom}}$ -Funktion von normoxischen Tumorzellen und CTL. Die untere Grenze des Konfidenzbandes ist hier mit einer schwarzen Linie hervorgehoben. (b)  $K_{\text{cross.inhom}}$ -Funktion von hypoxischen Tumorzellen und CTL. Die obere Grenze des Konfidenzbandes ist hier mit einer roten Linie hervorgehoben. (c) Signifikanztestung der Hypothese. Da erwartet wird, dass CTL häufiger in normoxischem Gewebe vorkommen als in hypoxischem, muss die untere Grenze des Konfidenzintervalles der  $K_{\text{cross.inhom}}$ -Funktion von normoxischen Tumorzellen und CTL (s. (a), schwarze Linie) über der oberen Grenze des Konfidenzintervalles der  $K_{\text{cross.inhom}}$ -Funktion von hypoxischen Tumorzellen und CTL (s. (b), rote Linie) liegen. Zur Verdeutlichung wurde der Bereich, in dem dies der Fall ist, grün markiert.

Auch die in Abbildung 10 dargestellten  $\text{pcf.cross}$ -Funktionen untermauern das Bild einer Inhibition von CTL durch Hypoxie. Während die  $\text{pcf.cross}$ -Funktion zwischen CTL und normoxischen Tumorzellen rasch auf ein Niveau knapp unterhalb von CSR ansteigt und dieses hält, steigt die  $\text{pcf.cross}$ -Funktion zwischen CTL und hypoxischem Tumor nur zögerlich an und erreicht auch nach 130  $\mu\text{m}$  noch nicht den Wert der anderen  $\text{pcf.cross}$ -Funktion.

Es fällt auf, dass das Fehlen der Informationen über die Umgebung der untersuchten Region sich besonders bei einer so kleinen Region wie in diesem Beispiel sehr stark

auswirkt. Dies begründet sich vor allem aus den Randeffekten, die mit zunehmender Größe der untersuchten Region zunehmend abgeschwächt werden. Besonders gilt dies für die G- und die Gcross-Funktionen, da diese nur die Strecke bis zum nächsten Punkt einer Population in die Berechnung mit einbeziehen. Womöglich sollten nachfolgende Studien daher, trotz des höheren Arbeitsaufwandes, mit "whole slide"-Schnitten statt mit Microarray-Spots durchgeführt werden, da die so erhaltenen Ergebnisse deutlich robuster sind.



**Abbildung 12:** Umgebung des Ausschnittes eines Plattenepithelkarzinoms des Hypopharynx, anhand dessen die Beispielanalyse durchgeführt wurde. 5x Vergrößerung

In Abbildung 12 ist die Region, anhand der die obige Beispielanalyse durchgeführt wurde, von einem gelben Rechteck umrahmt mit ihrer Umgebung abgebildet. Betrachtet man die Umgebung der Region in Abbildung 12, so sieht man in diesem Fall ein relativ ähnliches Bild des Tumorgewebes. Bei der in einem Tumor vorherrschenden Inhomogenität des Gewebes können sich jedoch auch Gebiete mit verschiedensten Expressionsmustern in einem Schnitt finden. Dies ist ein weiterer Grund, der für die Verwendung von "whole slide"-Schnitten spricht.

Jedoch zeigt sich beim Vergleich der resultierenden Kurven auch, dass die Tendenz der Microarray-Spots häufig der der "whole slide"-Schnitte ähnelt. Aufgrund der bei

kleineren Zellzahlen jedoch deutlich größeren Konfidenzbänder werden hier im Schnitt allerdings seltener signifikante Ergebnisse erreicht.

### **5.2.2 Clustern CTL?**

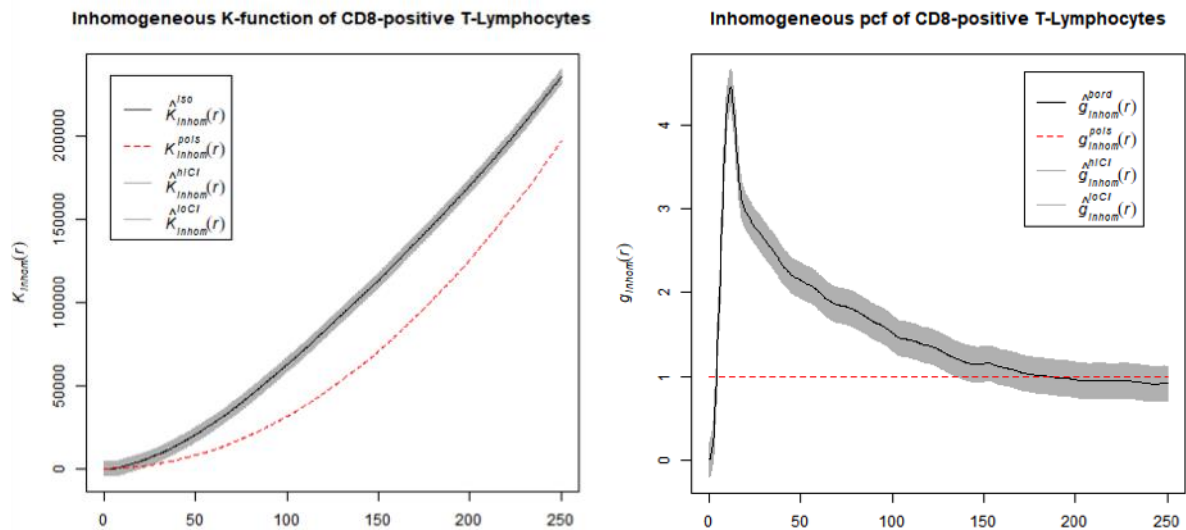
Um die Frage nach dem Clustern von CTL zu beantworten, ist es zunächst wichtig, sich den Unterschied zwischen Inhomogenität und Clustern vor Augen zu führen.

Während eine Inhomogenität in der Verteilung beispielsweise aufgrund von besseren Bedingungen an verschiedenen Stellen des Gewebes auftritt, ist das Clustern als ein Resultat aus der Anziehung zwischen einzelnen Punkten bedingt. Da das Ergebnis beider Vorgänge sowie eine eventuelle Kombination beider Effekte am Ende zu einem sehr ähnlichen Resultat führt, ist es schwierig, diese Ursachen zu differenzieren (146).

Im Kontext dieser Arbeit könnte eine inhomogene Verteilung beispielsweise bedingt sein durch eine bessere Sauerstoff- oder Energieversorgung im Stroma, während Clustern das Resultat von -von CTL ausgeschütteten- Zytokinen sein könnte.

Wie in Kapitel 3.2.3.2.7. beschrieben, ist es aus diesem Grund sinnvoll, die inhomogenen Versionen der K-Funktion und der pcf zu verwenden.

Für die Diskussion der Ergebnisse ist es sinnvoll, die Kurven der verschiedenen Funktionen noch einmal genauer zu betrachten. Um die Diskussion auf das Wesentliche zu reduzieren, werden im Folgenden noch einmal repräsentative Beispiele ausgewählt, die weitestgehend den durchschnittlichen Ergebnissen entsprechen.

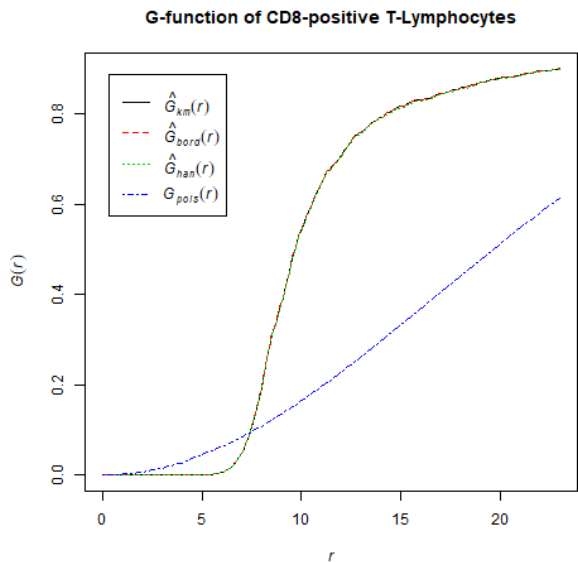


**Abbildung 13:** Exemplarische und repräsentative Darstellung der inhomogenen K-Funktion und der inhomogenen pcf eines Microarray-Spots.

Betrachtet man zunächst die K-Funktion in Abbildung 13, so wird deutlich, dass CTL sich deutlich häufiger in der Nähe voneinander befinden als dies bei CSR zu erwarten wäre.

In der dort dargestellten K-Funktion sieht man eine deutliche und signifikante Abweichung von CSR bereits ab einer Distanz von ca. 25  $\mu\text{m}$ . Diese Abweichung nimmt bis hin zu einer Distanz von ca. 150 - 200  $\mu\text{m}$  zu und bleibt dann ungefähr gleich. Untermalt wird dies durch die entsprechende, ebenfalls in Abbildung 13 abgebildete pcf, die bereits auf einer sehr kurzen Distanz ihren Peak bei ca. 4,5 erreicht und sich dann langsam wieder der mit CSR gleichzusetzenden Linie annähert.

Die Kurven der verschiedenen Spots sind sich in ihrer Form weitestgehend ähnlich und unterscheiden sich lediglich in der Höhe und der Distanz des Peaks. Hier ist es wichtig zu betonen, dass die Breite des Konfidenzintervalles maßgeblich durch die Anzahl der CTL bestimmt wird. Je mehr CTL in einem Spot vorhanden sind, desto genauer ist die Einschätzung durch Loh's Bootstrap-Methode.



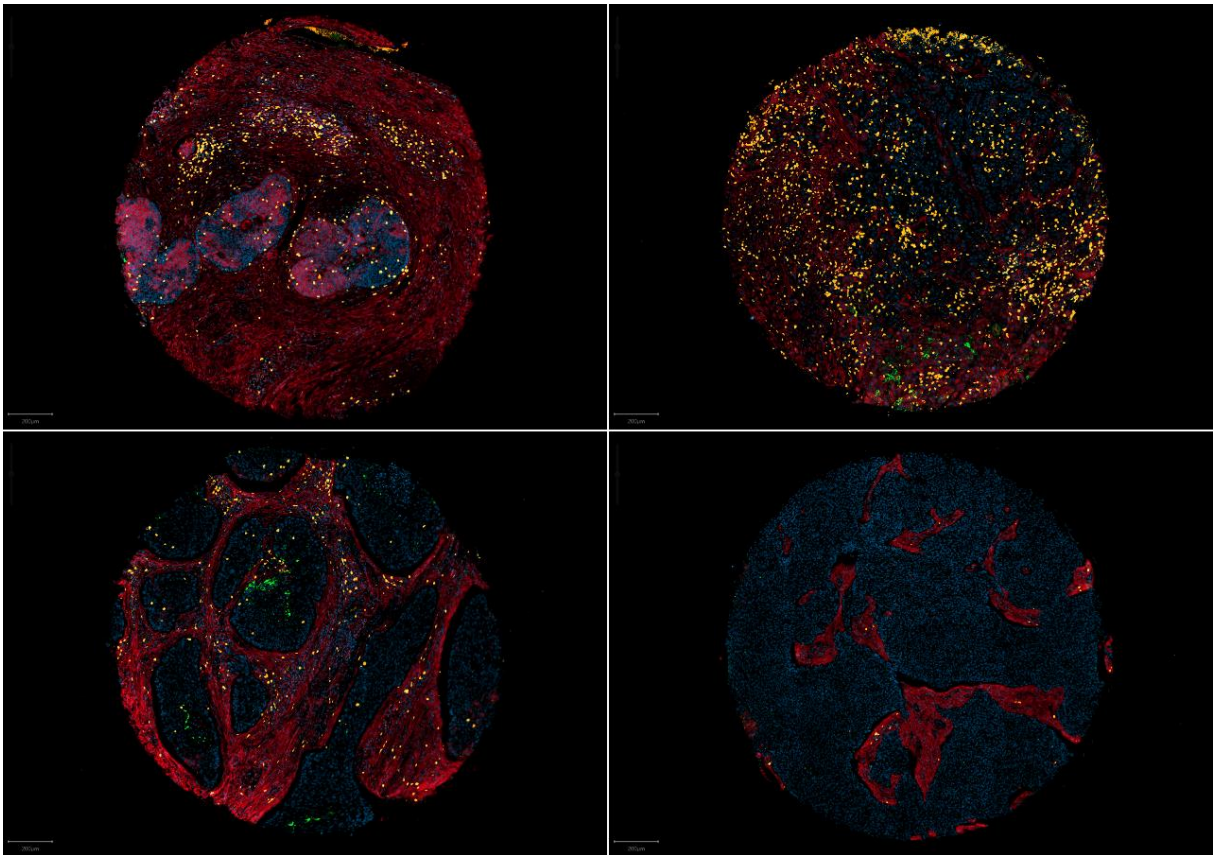
**Abbildung 14:** Exemplarische und repräsentative G-Funktion eines Microarray-Spots.

Auch die in Abbildung 14 dargestellte G-Funktion spricht deutlich für Ansammlungen von CTL. So ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein weiterer CTL innerhalb der ersten 15  $\mu\text{m}$  eines CTL liegt, bei über 80%.

Aus den oben gezeigten Abbildungen lassen sich klare Hinweise dafür ableiten, dass CTL gehäuft auftreten. Da sich ein ähnliches Muster in den verschiedenen Proben findet, spricht dies deutlich dafür, dass die Ergebnisse nicht zufällig bedingt

sind, sondern durch den gleichen zugrundeliegenden Effekt bedingt sind.

Da die verschiedenen Tumore jedoch unterschiedliche Ursprungsgewebe haben und auch die Architektur der verschiedenen Tumore sehr unterschiedlich ist, scheint der Effekt nicht ausschließlich durch bessere Bedingungen im Stroma bedingt zu sein (s. Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Vergleich der Tumor-Stroma-Architektur verschiedener Kopf-Hals-Karzinome in jeweils 3x Vergrößerung.

Oben links ist ein Plattenepithelkarzinom des Larynx mit ausgeprägter Stromakomponente und nur wenigen, deutlich abgegrenzten Tumorballen (hellblau mittig) dargestellt. Oben rechts ist ein Plattenepithelkarzinom der Nase abgebildet. Die Tumor-Stroma-Architektur ist ungeordnet und nur schwer zuzuweisen. Unten links ist ebenfalls ein Plattenepithelkarzinom des Larynx abgebildet, hier jedoch mit einer deutlich geringeren Stromakomponente (rot) und vermehrten Tumorballen. Unten rechts ist ein Plattenepithelkarzinom der Nase mit einer sehr geringen Stromakomponente (rot) und einer ausgeprägten Tumorzellkomponente. Aus allen Microarray-Spots (o.l. 12; o.r. 13; u.l. 26; u.r. 51) ergeben sich dabei ähnliche Kurven der K-Funktion und der pcf von CTL.

Ob dieser Effekt jedoch beispielsweise auch durch andere Immunzellen vermittelt wird, oder aber durch CTL selbst, ist in dieser Situation weiterhin schwer zu sagen. Nichtsdestotrotz gibt es jedoch starke und konsistente Hinweise dafür, dass CTL – wie erwartet – an einigen Stellen in Clustern auftreten. Zusätzlich scheint dieser Effekt nicht nur durch bessere Bedingungen im Stroma, sondern auch durch weitere immunologische Mechanismen bedingt zu sein.

Diese Ergebnisse zeigen damit klar, dass die Nutzung spatialstatistischer Methoden möglich und sinnvoll ist, um visuelle Eindrücke, die aus der mikroskopischen Betrachtung eines Präparates entstehen, statistisch zu belegen.

### 5.2.3 Der Einfluss von Tumorhypoxie auf CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten

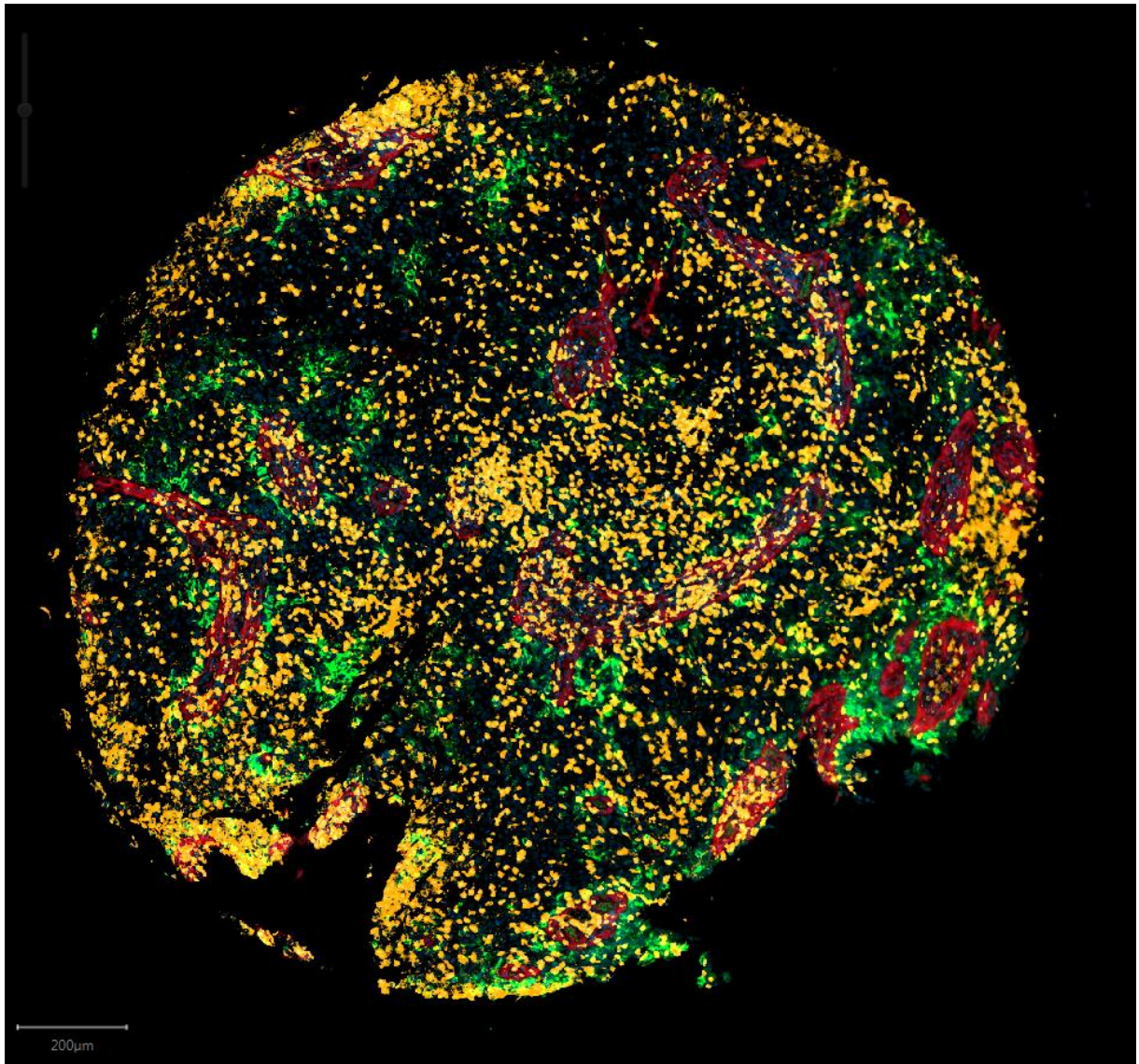
Um die Frage nach dem Einfluss einer durch die Tumorhypoxie bedingten Immunsuppression zu beantworten, ist hauptsächlich der Vergleich der Kurven der inhomogenen Kcross- und pcf.cross-Funktionen relevant. Wichtig ist hierbei erneut der Hinweis, dass die jeweiligen Kurven mit der roten Linie verglichen werden, die hier nicht mehr CSR repräsentiert, sondern Unabhängigkeit zweier Muster voneinander. Theoretisch könnten jedoch auch beide Kurven unter der Linie für Unabhängigkeit liegen und somit Anzeichen für ein Vermeidungsverhalten geben. Da eine Kurve allerdings eine deutlich stärkere Abweichung von der Linie der Unabhängigkeit zeigen könnte als die andere, werden die Kurven vor allem miteinander verglichen.

Hier zeigt sich, vor allem bei den „whole-slide“-Präparaten, aber auch bei den Microarray-Spots, ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Kcross-Funktionen. (Siehe auch Abbildung 11) Dieser Unterschied zeigt deutlich, dass CTL häufiger normoxische Tumorzellen in ihrer Umgebung haben als hypoxische Tumorzellen. Zudem liegen die meisten der Kcross-Funktionen von CTL und hypoxischen Tumorzellen unterhalb der Kurve für Unabhängigkeit, was den Verdacht einer hypoxiebedingten Immunsuppression weiter verstärkt.

Verglichen mit den visuellen Eindrücken fallen vor allem zwei relevante Dinge auf:

1. Mithilfe der Kcross-Funktionen kann deutlich öfter ein Effekt gezeigt werden, der auf eine Interaktion von hypoxischen Arealen und CTL hindeutet.
2. Sowohl visuell als auch spatialstatistisch scheint es, dass es einen – durch Hypoxie bedingten – inhibitorischen Einfluss des Tumormikromilieus auf CTL gibt.

Dies scheint jedoch kein universeller Effekt zu sein, denn es gibt auch einige Präparate, wie beispielsweise in Abbildung 16 dargestellt, aus denen klar ersichtlich ist, dass Tumorhypoxie nicht immer einen immunsuppressiven Effekt ausübt.



**Abbildung 16: Plattenepithelkarzinom der Nase in 3x Vergrößerung.**

Massive Infiltration von CTL (gelb) in das Tumorgewebe trotz vieler hypoxischer Areale (grün). Dabei werden die hypoxischen Areale von CTL nicht gemieden, sondern werden durch diese ebenfalls infiltriert. Analog zu dem in Abbildung 12 unten links dargestellten Tumor zeigt sich hier ebenfalls eine spärliche Stromakomponente (rot) bei ausgeprägter Tumorzellkomponente.

Ein möglicher Grund für dieses Phänomen könnte sein, dass die Hypoxie in diesen Präparaten nicht hinreichend durch CA IX charakterisiert und dargestellt wird, oder aber CA IX in diesen Fällen nicht aufgrund von Hypoxie, sondern aus einem anderen Grund vom Tumorgewebe exprimiert wird. Dies scheint zumindest in dem in Abbildung 16 dargestellten Präparat jedoch nicht der Fall zu sein, denn die Areale die erwartungsgemäß hypoxisch sein sollten weisen eine CA IX-Expression auf.

Ein weiterer Grund könnte sein, dass es dem Immunsystem dieser Patienten gelungen ist, eine gewisse Resistenz gegenüber Hypoxie zu entwickeln. Die Erforschung der



Ursache einer solchen Resistenz – falls vorhanden – könnte sowohl bei der Entwicklung neuer als auch bei der Verbesserung alter Therapieoptionen entscheidende Möglichkeiten aufdecken.

Die Tatsache, dass es, verglichen mit den „whole-slide“-Präparaten, vor allem bei den Microarray-Spots deutlich weniger signifikante Ergebnisse gibt, lässt sich wie folgt begründen: Auf der einen Seite kann es sein, dass hier eine biologische Realität gezeigt wird, eine Korrelation bspw. mit der Prognose könnte hier wichtige Erkenntnisse zu Tage fördern. Auf der anderen Seite kann dies auch durch die Größe des beobachteten Fensters und den damit verbundenen deutlich kleineren Zellzahlen zusammen hängen. Je mehr Zellen in die Berechnung der Konfidenzbänder einfließen, desto genauer und auch kleiner wird das Konfidenzintervall. Durch kleine Zellzahlen entstehen so zum Teil sehr große Konfidenzbänder, die es fast unmöglich machen, signifikante Unterschiede zu erreichen. Dennoch existiert auch bei diesen Fällen eine Tendenz, die auf eine hypoxievermittelte Immunsuppression hindeutet.

#### **5.2.4 Der Einfluss von CD73 auf CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten**

##### **5.2.4.1 Im Tumor**

In Zusammenschau der Ergebnisse wird deutlich, dass der aufgrund der Literatur erwartete immunsuppressive Effekt durch tumorexprimiertes CD73 nicht zuverlässig nachweisbar ist.

Dies beginnt mit den Unterschieden zwischen dem erwarteten und dem tatsächlich beobachteten Expressionsmuster von CD73. So würde man aufgrund der Literatur und der darauf aufbauenden pathophysiologischen Überlegungen eine Hochregulation von CD73 hauptsächlich in hypoxischen Bereichen erwarten. Dies wäre das Resultat einer unzureichenden Sauerstoffversorgung mit dem Resultat eines intrazellulären Energiemangels. Das durch die CD73-vermittelte Spaltung von AMP freigeordnete Adenosin dient unter anderem als Vasodilatator und soll so eine bessere Perfusion des Gewebes verursachen.

Tatsächlich fand sich jedoch nur selten eine relevante CD73-Expression des Tumorgewebes. Ist diese Expression jedoch vorhanden, so ist sie häufig in normoxischen oder, wie in Abbildung 4, zumindest in nicht CA IX exprimierenden

Bereichen des Tumors zu finden, jedoch wie erwartet mit einem membranösen Verteilungsmuster.

Weiterhin scheint die Verteilung von CTL in den meisten Fällen nicht durch das vom Tumor exprimierte CD73 beeinflusst zu werden. Dieser Eindruck besteht nicht nur visuell, sondern bestätigt sich auch in der statistischen Analyse. So gibt es in den meisten Fällen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kurven. In den statistisch signifikanten Fällen zeigt sich jedoch keine klare Tendenz der Ergebnisse, weder für eine immunsuppressive, noch für eine immunogene Wirkung des tumorexprimierten CD73.

Weitere Forschung hinsichtlich Verteilung und Funktion von CD73 scheint sinnvoll.

#### **5.2.4.2 Im Stroma**

In den meisten Fällen stellte sich CD73 entweder als Stroma- oder Gefäßmarker dar. Entweder kam es zu einem gleichmäßigen membranösen Expressionsmuster des gesamten Stromas oder die Endothelzellen von den Tumor durchziehenden Gefäßen wurden markiert.

Beide Varianten entsprachen nicht der - noch einmal in 5.2.4.1. zusammengefassten - aufgrund der Literatur erwarteten Expression von CD73. Einige Arbeiten schreiben CD73 eine wichtige Rolle in der Endothelfunktion zu (99). Während dies die Darstellung als Gefäßmarker erklärt, bleiben die Gründe für eine ausgeprägte stromale CD73-Expression zunächst unklar. Auffällig ist jedoch, dass es einen deutlichen Zusammenhang zwischen CD73-Expression und dem Auftreten von CTL gibt. Dies ist sowohl bei der visuellen Interpretation als auch in der statistischen Analyse nachweisbar. So befinden sich CTL gehäuft in CD73-positivem Stroma.

Es sind mehrere Gründe denkbar, die diesen Effekt erklären könnten. Einerseits könnten hier die Gegebenheiten besonders vorteilhaft für CTL sein, weswegen diese sich an diesen Orten sammeln. Andererseits könnte CD73 - entgegen der gegenwärtig vorherrschenden Meinung in der Literatur - jedoch auch einen immunstimulatorischen Effekt haben und so zu einer Anhäufung von CTL führen. Zuletzt könnte CD73 auch einen starken immunsuppressiven Effekt haben, der CTL in einen Ruhezustand versetzt.

Einmal in diesem CD73-positivem Gebiet gefangen, könnten CTL es nicht mehr verlassen: Es käme ebenfalls zu einer Anhäufung von CTL.

### **5.2.5 Kommentar zur G-Funktion**

Bei der Auswertung wurde deutlich, dass die Gcross-Funktion zwar helfen kann, einen ersten Überblick über ein ppp zu erhalten, aber mit Vorsicht genutzt werden muss. Im Gegensatz zur Kcross und pcf.cross-Funktion hat sie eine äußerst relevante Einschränkung. Die G- und Gcross-Funktionen sind nicht standardisiert. Das bedeutet, dass sie bei gleichem Beobachtungsfenster und unterschiedlicher Anzahl an Punkten auch andere Werte für die theoretische Funktion berechnet. So ist es natürlich wahrscheinlicher, ausgehend von einem CTL im gleichen Areal bereits auf kürzeren Distanzen auf eine normoxische Tumorzelle zu stoßen, wenn diese Population im besagten Areal deutlich größer ist als die Population der hypoxischen Tumorzellen.

Diese Abhängigkeit zwischen der Anzahl der Zellen einer Population und den Ergebnissen verbietet es, die Kurven der Gcross-Funktionen verschiedener Populationen miteinander zu vergleichen. Dies wurde als Demonstration für die Problematik der Ergebnisse für die Fragestellungen in Kapitel 5.2.3. und 5.2.4. dennoch getan und zeigt deutlich wie unzuverlässig die Gcross-Funktion bei einer solchen Fragestellung ist.

Dennoch sind die G- und die Gcross-Funktion bei anderen Fragestellungen, wie beispielsweise dem Clustern von CTL oder bei Studien, in denen die Abhängigkeit verschiedener Immunzellen voneinander erforscht werden soll, nützliche Werkzeuge.

## 6. Zusammenfassung

Ursprüngliches Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Einflusses der Tumorphypoxie auf die Verteilung von zytotoxischen T-Lymphozyten. Weiterhin sollte erarbeitet werden welche Rolle freies extrazelluläres Adenosin in der Vermittlung dieses Einflusses spielt. Auf Basis der Literatur war eine Hochregulation von CD73 in hypoxischen Mikroregionen der Tumoren zu erwarten. Es zeichnete sich früh im Verlauf der Experimente ab, dass eine rein visuelle Beantwortung dieser Fragen unzureichend ist und objektive quantitative Methoden bisher fehlen. Daher wurde erstmalig ein Arsenal von spatialstatistischen Methoden zur Auswertung von Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzt und systematisch evaluiert.

Bis heute werden Immunfluoreszenzfärbungen ähnlich der Immunhistochemie überwiegend mittels der Eindrücke, die beim Mikroskopieren entstehen, sowie mittels deskriptiver Statistik beschrieben. Diese Art der Auswertung reduziert ein solches Präparat jedoch auf subjektives Empfinden und darauf, wie viel Prozent des Gewebes sich für jeweilige Marker positiv anfärben lässt. Bis vor kurzem war diese Methode der Auswertung aufgrund von Einschränkungen im Bereich der Computertechnik, sowie fehlender Software, die einzig realistische, wenn auch unzufriedenstellende, Methode um solche histologische Färbungen auszuwerten. Durch rasante Entwicklungen sowohl von Soft- als auch Hardware in den letzten Jahrzehnten ist es heute jedoch möglich, jede Einzelne der Millionen Zellen eines solchen Präparates binnen Minuten zu erkennen und zu klassifizieren. Dies erlaubt den Einsatz von anspruchsvollen spatialstatistischen Funktionen. Beim Vergleich dieser Methoden wird deutlich, dass der spatialstatistische Ansatz der traditionellen, visuellen Auswertung systematisch überlegen ist.

Die folgenden pathophysiologischen Aussagen können dabei sowohl aufgrund der visuellen Auswertung, als auch auf Basis der in der vorliegenden Arbeit für den genannten Zweck etablierten spatialstatistischen Methoden getroffen werden:

1. CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region zeigen auf kurzen Distanzen eine ausgeprägte Anziehung zueinander. Sie entsprechen damit dem erwarteten Verhalten einer Clusterbildung.

2. Hypoxie spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der antitumoralen Immunsuppression, da hypoxische Bereiche von CTL in vielen Fällen statistisch signifikant gemieden werden.
3. In der untersuchten Kohorte von Kopf-Hals-Tumoren scheidet CD73 als Vermittler zwischen Hypoxie und antitumoraler Immunsuppression aus. Dies konnte – rein visuell – bereits in einer Studie an Melanomen gezeigt werden (147).

Anhand der ersten Aussage, einer verhältnismäßig einfachen Fragestellung mit einer logischen und gut überprüfbaren Antwort, konnten bereits große Teile der Methodik etabliert werden. Hier zeigte sich bereits, warum die Spatialstatistik eine wertvolle Hilfe bei der Interpretation komplexer Punktmuster darstellt. Sowohl der subjektive visuelle Eindruck als auch die aus der statistischen Analyse resultierenden Aussagen sprechen für eine Clusterbildung von CTL auf kurzen Distanzen. Jedoch ist die Möglichkeit, diese Aussagen durch eine objektive computeraugmentierte Analyse belegen und andererseits das Ausmaß einer solchen Clusterbildung quantifizieren zu können, ein erheblicher Vorteil der Spatialstatistik. Die eigentliche Stärke der Spatialstatistik kommt jedoch erst bei der Analyse komplexerer Vorgänge, wie beispielsweise dem Einfluss von Hypoxie auf das Immunsystem zu tragen.

So kommt es bei der Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen darauf an, die Ergebnisse frei von Vorurteilen und den eigenen Überzeugungen zu interpretieren. Die hohe Leistungsfähigkeit des visuellen Systems basiert aber auf der Fähigkeit, vorhandene Daten in einem Kontext zu betrachten. Es sind jedoch zahlreiche neurophysiologische Schwachstellen des visuellen Systems bekannt die aus der kontextabhängigen Interpretation von Bilddaten resultieren. Dies kann eindrucksvoll anhand von optischen Täuschungen, wie bereits in Abbildung 2 und Abbildung 3 dargestellt, demonstriert werden (148, 149). Die Stärke der spatialstatistischen Methodik liegt deshalb in Ihrer Objektivität, die eine, für wissenschaftliche Fragestellungen zwingend notwendige, Ergänzung der Intuition der kontextabhängigen menschlichen Interpretation darstellt.

Weitergehende Untersuchungen hinsichtlich der Stärke des hier nachgewiesenen immunsuppressiven Effektes der Tumorphoxie, sowie der prognostischen und therapeutischen Relevanz scheinen sinnvoll und dringend notwendig zu sein.

Zuletzt zeigt sich, dass mit den hier dargestellten Methoden keine Hinweise für eine Hochregulation von CD73 in hypoxischen Arealen gefunden werden konnten. Und auch wenn bereits visuell der Eindruck bestand, dass es keinen systematischen Einfluss von CD73 auf CTL gibt, so hilft die Spatialstatistik diesen Aussagen soviel Gewicht zu verleihen, dass ihnen Beachtung geschenkt werden muss.

Es wurde erstmals eine Methodik für eine objektive, valide, reproduzierbare und vor allem statistisch fundierte Auswertung von Immunfluoreszenzpräparaten entwickelt und damit eine Tür in die Welt der Spatialstatistik geöffnet. Die Etablierung und Verwendung weiterer spatialstatistischer Methoden kann und sollte maßgeblich dazu führen, die bisherige Methodik der subjektiven Betrachtungsweise mikroskopischer Präparate zu verlassen, um sie einem rasant voranschreitenden digitalen Zeitalter anzupassen und so zuverlässige Erkenntnisse zu erhalten, die für Patienten mit Tumorerkrankungen neue Möglichkeiten für Diagnose und individualisierte Therapie eröffnen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Hoeckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(4):266-76.
2. Bredell MG, Ernst J, El-Kochairi I, Dahlem Y, Ikenberg K, Schumann DM. Current relevance of hypoxia in head and neck cancer. *Oncotarget.* 2016;7(31):50781-804.
3. Hatfield SM, Kjaergaard J, Lukashev D, Schreiber TH, Belikoff B, Abbott R, et al. Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation. *Sci Transl Med.* 2015;7(277):277ra30.
4. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal.* 2006;2(2):351-60.
5. Lukashev D, Ohta A, Apasov S, Chen JF, Sitkovsky M. Cutting edge: Physiologic attenuation of proinflammatory transcription by the Gs protein-coupled A2A adenosine receptor in vivo. *J Immunol.* 2004;173(1):21-4.
6. Angelo M, Bendall SC, Finck R, Hale MB, Hitzman C, Borowsky AD, et al. Multiplexed ion beam imaging of human breast tumors. *Nat Med.* 2014;20(4):436-42.
7. Vuillefroy de Silly R, Dietrich PY, Walker PR. Hypoxia and antitumor CD8(+) T cells: An incompatible alliance? *Oncoimmunology.* 2016;5(12):e1232236.
8. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
9. Mehanna H, West CM, Nutting C, Paleri V. Head and neck cancer--Part 2: Treatment and prognostic factors. *BMJ.* 2010;341:c4690.
10. Rudolph E, Dyckhoff G, Becher H, Dietz A, Ramroth H. Effects of tumour stage, comorbidity and therapy on survival of laryngeal cancer patients: a systematic review and a meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2011;268(2):165-79.
11. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, et al. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2004;350(19):1937-44.
12. Mantravadi RVP, Haas RE, Skolnik EM, Liebner EJ, Applebaum EL. Postoperative Radiotherapy for Persistent Tumor at the Surgical Margin in Head and Neck Cancers. *The Laryngoscope.* 1983;93(10):1337-40.

13. Paleri V, Wight RG, Silver CE, Haigentz M, Jr., Takes RP, Bradley PJ, et al. Comorbidity in head and neck cancer: a critical appraisal and recommendations for practice. *Oral Oncol.* 2010;46(10):712-9.
14. Bourhis J, Overgaard J, Audry H, Ang KK, Saunders M, Bernier J, et al. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. *The Lancet.* 2006;368(9538):843-54.
15. Masterson L, Moualed D, Liu ZW, Howard JE, Dwivedi RC, Tysome JR, et al. De-escalation treatment protocols for human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis of current clinical trials. *Eur J Cancer.* 2014;50(15):2636-48.
16. Mirghani H, Blanchard P. Treatment de-escalation for HPV-driven oropharyngeal cancer: Where do we stand? *Clin Transl Radiat Oncol.* 2018;8:4-11.
17. Faraji F, Zaidi M, Fakhry C, Gaykalova DA. Molecular mechanisms of human papillomavirus-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Microbes Infect.* 2017;19(9-10):464-75.
18. Vieira VC, Leonard B, White EA, Starrett GJ, Temiz NA, Lorenz LD, et al. Human Papillomavirus E6 Triggers Upregulation of the Antiviral and Cancer Genomic DNA Deaminase APOBEC3B. *mBio.* 2014;5(6):e02234-14.
19. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(1):24-35.
20. Salazar CR, Anayannis N, Smith RV, Wang Y, Haigentz M, Jr., Garg M, et al. Combined P16 and human papillomavirus testing predicts head and neck cancer survival. *Int J Cancer.* 2014;135(10):2404-12.
21. Salazar CR, Smith RV, Garg MK, Haigentz M, Jr., Schiff BA, Kawachi N, et al. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma survival: a comparison by tumor site and initial treatment. *Head Neck Pathol.* 2014;8(1):77-87.
22. Sethi S, Ali-Fehmi R, Franceschi S, Struijk L, van Doorn LJ, Quint W, et al. Characteristics and survival of head and neck cancer by HPV status: a cancer registry-based study. *Int J Cancer.* 2012;131(5):1179-86.
23. Chakravarthy A, Henderson S, Thirdborough SM, Ottensmeier CH, Su X, Lechner M, et al. Human Papillomavirus Drives Tumor Development Throughout the Head and



Neck: Improved Prognosis Is Associated With an Immune Response Largely Restricted to the Oropharynx. *J Clin Oncol*. 2016;34(34):4132-41.

24. Fakhry C, Westra Wh Fau - Li S, Li S Fau - Cmelak A, Cmelak A Fau - Ridge JA, Ridge Ja Fau - Pinto H, Pinto H Fau - Forastiere A, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. 2008(1460-2105 (Electronic)).

25. Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*. 2015;33(29):3235-42.

26. Gotz C, Bischof C, Wolff KD, Kolk A. Detection of HPV infection in head and neck cancers: Promise and pitfalls in the last ten years: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol*. 2019;10(1):17-28.

27. Fakhry C, Westra WH, Wang SJ, van Zante A, Zhang Y, Rettig E, et al. The prognostic role of sex, race, and human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck squamous cell cancer. *Cancer*. 2017;123(9):1566-75.

28. Zhang LP, Chen HL. Increased vascular endothelial growth factor expression predicts a worse prognosis for laryngeal cancer patients: a meta-analysis. *J Laryngol Otol*. 2017;131(1):44-50.

29. Vassilakopoulou M, Psyrri A, Argiris A. Targeting angiogenesis in head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2015;51(5):409-15.

30. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2006;354(6):567-78.

31. Bonner JA, Harari Pm Fau - Giralt J, Giralt J Fau - Cohen RB, Cohen Rb Fau - Jones CU, Jones Cu Fau - Sur RK, Sur Rk Fau - Raben D, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. 2010(1474-5488 (Electronic)).

32. Vermorken JB, Mesia R Fau - Rivera F, Rivera F Fau - Remenar E, Remenar E Fau - Kawecki A, Kawecki A Fau - Rottey S, Rottey S Fau - Erfan J, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. (1533-4406 (Electronic)).

33. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(2):225-39.

34. Nordsmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, et al. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol.* 2005;77(1):18-24.
35. Vaupel P, Hoeckel M, Mayer A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO<sub>2</sub> histography. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(8):1221-35.
36. Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol.* 2004;14(3):198-206.
37. Nagy JA, Chang SH, Dvorak AM, Dvorak HF. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *British Journal of Cancer.* 2009;100(6):865-9.
38. Kimura H, Braun RD, Ong ET, Hsu R, Secomb TW, Papahadjopoulos D, et al. Fluctuations in red cell flux in tumor microvessels can lead to transient hypoxia and reoxygenation in tumor parenchyma. *Cancer Res.* 1996;56(23):5522-8.
39. Konerding MA, Fait E, Gaumann A. 3D microvascular architecture of pre-cancerous lesions and invasive carcinomas of the colon. *Br J Cancer.* 2001;84(10):1354-62.
40. Fukumura D, Jain RK. Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization. *Microvasc Res.* 2007;74(2-3):72-84.
41. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(26):14608-13.
42. di Tomaso E, Capen D, Haskell A, Hart J, Logie JJ, Jain RK, et al. Mosaic tumor vessels: cellular basis and ultrastructure of focal regions lacking endothelial cell markers. *Cancer Res.* 2005;65(13):5740-9.
43. Winkler F, Kozin SV, Tong RT, Chae SS, Booth MF, Garkavtsev I, et al. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell.* 2004;6(6):553-63.
44. Chaplin DJ, Olive PL, Durand RE. Intermittent blood flow in a murine tumor: radiobiological effects. *Cancer Res.* 1987;47(2):597-601.

45. Mayer A, Zahnreich S, Brieger J, Vaupel P, Schmidberger H. Downregulation of EGFR in hypoxic, diffusion-limited areas of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer*. 2016;115(11):1351-8.
46. Mayer A, Schneider F Fau - Vaupel P, Vaupel P Fau - Sommer C, Sommer C Fau - Schmidberger H, Schmidberger H. Differential expression of HIF-1 in glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. 2012(1791-2423 (Electronic)).
47. Kus J, Miodonski A, Olszewski E, Tyrankiewicz R. Morphology of arteries, veins, and capillaries in cancer of the larynx: scanning electron-microscopical study on microcorrosion casts. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1981;100(3):271-83.
48. Knight K, Wade S, Balducci L. Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature. *Am J Med*. 2004;116 Suppl 7A:11S-26S.
49. Tas F, Eralp Y, Basaran M, Sakar B, Alici S, Argon A, et al. Anemia in oncology practice - Relation to diseases and their therapies. *Am J Clin Oncol-Canc*. 2002;25(4):371-9.
50. Spivak JL. The anaemia of cancer: death by a thousand cuts. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(7):543-55.
51. Dicato M, Plawny L, Diederich M. Anemia in cancer. *Ann Oncol*. 2010;21 Suppl 7:vii167-72.
52. Kopp HG, Krauss K Fau - Fehm T, Fehm T Fau - Staebler A, Staebler A Fau - Zahm J, Zahm J Fau - Vogel W, Vogel W Fau - Kanz L, et al. Symptomatic bone marrow involvement in breast cancer--clinical presentation, treatment, and prognosis: a single institution review of 22 cases. 2011(1791-7530 (Electronic)).
53. Feelders RA, Vreugdenhil G Fau - Eggermont AM, Eggermont Am Fau - Kuiper-Kramer PA, Kuiper-Kramer Pa Fau - van Eijk HG, van Eijk Hg Fau - Swaak AJ, Swaak AJ. Regulation of iron metabolism in the acute-phase response: interferon gamma and tumour necrosis factor alpha induce hypoferraemia, ferritin production and a decrease in circulating transferrin receptors in cancer patients. 1998(0014-2972 (Print)).
54. Hoeckel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res*. 1996;56(19):4509-15.
55. Hoeckel M, Schlenger K, Hoeckel S, Aral B, Schaffer U, Vaupel P. Tumor hypoxia in pelvic recurrences of cervical cancer. *Int J Cancer*. 1998;79(4):365-9.

56. Axelson H, Fredlund E, Ovenberger M, Landberg G, Pahlman S. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells--a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Semin Cell Dev Biol.* 2005;16(4-5):554-63.
57. Cuvier C, Jang A, Hill RP. Exposure to hypoxia, glucose starvation and acidosis: effect on invasive capacity of murine tumor cells and correlation with cathepsin (L + B) secretion. *Clin Exp Metastasis.* 1997;15(1):19-25.
58. Hoeckel M, Schlenger K, Hoeckel S, Vaupel P. Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer Res.* 1999;59(18):4525-8.
59. Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, et al. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res.* 1996;56(5):941-3.
60. Rofstad EK. Microenvironment-induced cancer metastasis. *International Journal of Radiation Biology.* 2009;76(5):589-605.
61. Subarsky P, Hill RP. The hypoxic tumour microenvironment and metastatic progression. *Clin Exp Metastasis.* 2003;20(3):237-50.
62. Giaccia AJ. Hypoxic Stress Proteins: Survival of the Fittest. *Semin Radiat Oncol.* 1996;6(1):46-58.
63. Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol.* 2001;18(4):243-59.
64. Hall EJ. *Radiobiology for the radiologist.* 7th ed. Philadelphia: J.B. Lippincott; 2011. xii, 478 p. p.
65. Tannock I, Hill RP. *The Basic science of oncology.* 2nd ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division; 1992. ix, 420 p. p.
66. Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol.* 1953;26(312):638-48.
67. Horsman MR, Overgaard J. The impact of hypoxia and its modification of the outcome of radiotherapy. *J Radiat Res.* 2016;57 Suppl 1:i90-i8.
68. Ewing D. The oxygen fixation hypothesis: a reevaluation. *Am J Clin Oncol.* 1998;21(4):355-61.
69. Walker LJ, Craig RB, Harris AL, Hickson ID. A role for the human DNA repair enzyme HAP1 in cellular protection against DNA damaging agents and hypoxic stress. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(23):4884-9.

70. Samali A, Cotter TG. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp Cell Res.* 1996;223(1):163-70.
71. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature.* 1996;379(6560):88-91.
72. Kim CY, Tsai MH, Osmanian C, Graeber TG, Lee JE, Giffard RG, et al. Selection of human cervical epithelial cells that possess reduced apoptotic potential to low-oxygen conditions. *Cancer Res.* 1997;57(19):4200-4.
73. Zhivotovsky B, Joseph B, Orrenius S. Tumor radiosensitivity and apoptosis. *Exp Cell Res.* 1999;248(1):10-7.
74. Boucher Y, Baxter LT, Jain RK. Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors: implications for therapy. *Cancer Res.* 1990;50(15):4478-84.
75. Jain RK, Martin JD, Stylianopoulos T. The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. *Annu Rev Biomed Eng.* 2014;16:321-46.
76. Chang Q, Ornatsky OI, Siddiqui I, Straus R, Baranov VI, Hedley DW. Biodistribution of cisplatin revealed by imaging mass cytometry identifies extensive collagen binding in tumor and normal tissues. *Sci Rep.* 2016;6:36641.
77. Penn I, Starzl TE. Immunosuppression and cancer. *Transplant Proc.* 1973;5(1):943-7.
78. Hellstrom I, Hellstrom KE, Pierce GE, Yang JPS. Cellular and Humoral Immunity to Different Types of Human Neoplasms. *Nature.* 1968;220(5174):1352-+.
79. Hatfield SM, Sitkovsky M. A2A adenosine receptor antagonists to weaken the hypoxia-HIF-1alpha driven immunosuppression and improve immunotherapies of cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2016;29:90-6.
80. Lukashev D, Sitkovsky M, Ohta A. From "Hellstrom Paradox" to anti-adenosinergic cancer immunotherapy. *Purinergic Signal.* 2007;3(1-2):129-34.
81. Semenza GL. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:551-78.
82. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 1998;394(6692):485-90.

83. Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* 2004;279(37):38458-65.
84. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 2001;107(1):43-54.
85. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 2001;292(5516):468-72.
86. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* 1999;399(6733):271-5.
87. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 2002;16(12):1466-71.
88. Nakayama K, Frew IJ, Hagensen M, Skals M, Habelhah H, Bhoumik A, et al. Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1 $\alpha$  abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell.* 2004;117(7):941-52.
89. Jiang BH, Semenza GI, Bauer C, Bauer C, Marti HH, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. (0002-9513 (Print)).
90. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, et al. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(15):8104-9.
91. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J.* 2002;16(10):1151-62.
92. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
93. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol.* 1999;9(3):211-20.
94. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature.* 2001;414(6866):916-20.

95. Sitkovsky M, Lukashev D. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(9):712-21.
96. Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, Kojima H, Koshiba M, Caldwell C, et al. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:657-82.
97. Ren ZH, Lin CZ, Cao W, Yang R, Lu W, Liu ZQ, et al. CD73 is associated with poor prognosis in HNSCC. *Oncotarget*. 2016;7(38):61690-702.
98. Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF, Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene*. 2013;32(14):1743-51.
99. Lennon PF, Taylor CT, Stahl GL, Colgan SP. Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J Exp Med*. 1998;188(8):1433-43.
100. Wang L, Fan J, Thompson LF, Zhang Y, Shin T, Curiel TJ, et al. CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2371-82.
101. Duray A, Demoulin S, Hubert P, Delvenne P, Saussez S. Immune suppression in head and neck cancers: a review. *Clin Dev Immunol*. 2010;2010:701657.
102. Ogino T, Shigyo H, Ishii H, Katayama A, Miyokawa N, Harabuchi Y, et al. HLA class I antigen down-regulation in primary laryngeal squamous cell carcinoma lesions as a poor prognostic marker. *Cancer Res*. 2006;66(18):9281-9.
103. Hoffmann TK, Dworacki G, Tsukihiro T, Meidenbauer N, Gooding W, Johnson JT, et al. Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res*. 2002;8(8):2553-62.
104. Kassouf N, Thornhill MH. Oral cancer cell lines can use multiple ligands, including Fas-L, TRAIL and TNF-alpha, to induce apoptosis in Jurkat T cells: possible mechanisms for immune escape by head and neck cancers. *Oral Oncol*. 2008;44(7):672-82.
105. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12293-7.
106. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*. 1996;271(5256):1734-6.
107. Cressie N. *Statistics for Spatial Data*. 2015:1-26.

108. Halley E. An historical account of the trade winds, and monsoons, observable in the seas between and near the Tropicks, with an attempt to assign the physical cause of the said winds. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 1687;16(183):153-68.
109. Hall NS. R. A. Fisher and his advocacy of randomization. *J Hist Biol*. 2007;40(2):295-325.
110. Papadakis JS. Methode statistique pour des experiences sur champ. *Bull Inst Amel Plantes a Salonique*. 1937;23.
111. Krige DG. A Statistical Approaches to Some Basic Mine Valuation Problems on the Witwatersrand. *Journal of the Chemical, Metallurgical and Mining Society of South Africa*. 1951;52:119 - 39.
112. Sichel H. New Methods in the Statistical Evaluation of Mine Sampling Data. *Transactions of the Institution of Mining and Metallurgy*. 1952;Transactions of the Institution of Mining and Metallurgy(61 ):6.
113. Matheron G. *Traite de Geostatistique Appliquee*, tome 1: Paris : Technip; 1962.
114. Emery X. Simple and Ordinary Multigaussian Kriging for Estimating Recoverable Reserves. *Mathematical Geology*. 2005;37(3):295-319.
115. Richmond A. Financially Efficient Ore Selections Incorporating Grade Uncertainty. *Mathematical Geology*. 2003;35(2):195-215.
116. Vinten-Johansen P., Brody H., Paneth N., Rachman S., M. R. Cholera, Chloroform, and the Science of Medicine: a Life of John Snow. Oxford: Oxford University Press; 2003.
117. Musti M, Pollice A Fau - Cavone D, Cavone D Fau - Dragonieri S, Dragonieri S Fau - Bilancia M, Bilancia M. The relationship between malignant mesothelioma and an asbestos cement plant environmental risk: a spatial case-control study in the city of Bari (Italy). 2009(1432-1246 (Electronic)).
118. Barua S, Solis L, Parra ER, Uraoka N, Jiang M, Wang H, et al. A Functional Spatial Analysis Platform for Discovery of Immunological Interactions Predictive of Low-Grade to High-Grade Transition of Pancreatic Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. *Cancer Inform*. 2018;17:1176935118782880.
119. Carstens JL, Correa de Sampaio P, Yang D, Barua S, Wang H, Rao A, et al. Spatial computation of intratumoral T cells correlates with survival of patients with pancreatic cancer. *Nat Commun*. 2017;8:15095.



120. Tóth ZE, Mezey É. Simultaneous Visualization of Multiple Antigens with Tyramide Signal Amplification using Antibodies from the same Species. *J Histochem Cytochem.* 2007;55(6):545-54.
121. Cuevas EC, Bateman AC, Wilkins BS, Johnson PA, Williams JH, Lee AH, et al. Microwave antigen retrieval in immunocytochemistry: a study of 80 antibodies. *J Clin Pathol.* 1994;47(5):448-52.
122. Schnell SA, Staines WA, Wessendorf MW. Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J Histochem Cytochem.* 1999;47(6):719-30.
123. Ripley BD. Modeling Spatial Patterns. *J Roy Stat Soc B Met.* 1977;39(2):172-212.
124. Baddeley A, Rubak E, Turner R. Spatial point patterns : methodology and applications with R. Boca Raton ; London ; New York: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2016. xvii, 810 pages p.
125. Loh JM. A valid and fast spatial bootstrap for correlation functions. *Astrophys J.* 2008;681(1):726-34.
126. Glass L, Tobler WR. General: uniform distribution of objects in a homogeneous field: cities on a plain. *Nature.* 1971;233(5314):67-8.
127. Illian J. Statistical analysis and modelling of spatial point patterns. Chichester, England ; Hoboken, NJ: John Wiley; 2008. xix, 534 p. p.
128. Torquato S, Lu B, Rubinstein J. Nearest-Neighbor Distribution Function for Systems of Interacting Particles. *J Phys a-Math Gen.* 1990;23(3):L103-L7.
129. Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol.* 2011;89(2):207-15.
130. Nolz JC. Molecular mechanisms of CD8(+) T cell trafficking and localization. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(13):2461-73.
131. Ziai J, Gilbert HN, Foreman O, Eastham-Anderson J, Chu F, Huseni M, et al. CD8+ T cell infiltration in breast and colon cancer: A histologic and statistical analysis. *PLoS One.* 2018;13(1):e0190158.
132. Baddeley AJ, Møller J, Waagepetersen R. Non - and semi - parametric estimation of interaction in inhomogeneous point patterns. *Stat Neerl.* 2001;54(3):329-50.
133. Greigsmith P. The Use of Random and Contiguous Quadrats in the Study of the Structure of Plant Communities. *Ann Bot-London.* 1952;16(62):293-316.

134. Harkness RD, Isham V. A Bivariate Spatial Point Pattern of Ants Nests. *J R Stat Soc C-Appl.* 1983;32(3):293-303.
135. Lotwick HW, Silverman BW. Methods for Analyzing Spatial Processes of Several Types of Points. *J Roy Stat Soc B Met.* 1982;44(3):406-13.
136. Kijani S, Yrlid U, Heyden M, Levin M, Borén J, Fogelstrand P. Filter-Dense Multicolor Microscopy. *PLOS ONE.* 2015;10(3):e0119499.
137. Parra ER, Uraoka N, Jiang M, Cook P, Gibbons D, Forget M-A, et al. Validation of multiplex immunofluorescence panels using multispectral microscopy for immune-profiling of formalin-fixed and paraffin-embedded human tumor tissues. *Sci Rep.* 2017;7(1):13380.
138. Mayer A, Schmidt M, Seeger A, Serras AF, Vaupel P, Schmidberger H. GLUT-1 expression is largely unrelated to both hypoxia and the Warburg phenotype in squamous cell carcinomas of the vulva. *BMC Cancer.* 2014;14:760.
139. Carbon CC. Understanding human perception by human-made illusions. *Front Hum Neurosci.* 2014;8:566.
140. Boring EG. A New Ambiguous Figure. *The American Journal of Psychology.* 1930;42(3):444-5.
141. Nicholls MER, Churches O, Loetscher T. Perception of an ambiguous figure is affected by own-age social biases. *Sci Rep.* 2018;8(1):12661.
142. Adelson E. Lightness Perception and Lightness Illusions. In: Gazzaniga M, editor. *The New Cognitive Neurosciences.* 2nd ed. Cambridge MA: MIT Press; 2000. p. 339-51.
143. Adelson E. Checkers Shadow Illusion 2005. Available from: [http://web.mit.edu/persci/people/adelson/Checkers Shadow description.html](http://web.mit.edu/persci/people/adelson/Checkers_Shadow_description.html) MIT Website.
144. Ljungkvist AS, Bussink J, Kaanders JH, van der Kogel AJ. Dynamics of tumor hypoxia measured with bioreductive hypoxic cell markers. *Radiat Res.* 2007;167(2):127-45.
145. Mayer A, Hockel M, Vaupel P. Carbonic anhydrase IX expression and tumor oxygenation status do not correlate at the microregional level in locally advanced cancers of the uterine cervix. *Clin Cancer Res.* 2005;11(20):7220-5.
146. Bartlett MS. 207. Note: A Note on Spatial Pattern. *Biometrics.* 1964;20(4):891.
147. Mayer A, Haist M, Loquai C, Grabbe S, Rapp M, Roth W, et al. Role of Hypoxia and the Adenosine System in Immune Evasion and Prognosis of Patients with Brain

Metastases of Melanoma: A Multiplex Whole Slide Immunofluorescence Study. LID - 10.3390/cancers12123753 [doi] LID - 3753. (2072-6694 (Print)).

148. Buckle CE, Udawatta V, Straus CM. Now you see it, now you don't: visual illusions in radiology. *Radiographics*. 2013;33(7):2087-102.

149. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of neural science*. 3rd ed. Norwalk, Conn.: Appleton & Lange; 1991. xlv, 1135 p. p.

## 8. Anhang

### 8.1 R-Skript

```
#Import von benötigten R-Paketen
library(spatstat)

#Auswahl des zu analysierenden Schnittes
i <- "image_name"

#Import der QuPath-Daten, hier für die Microarray-Spots
QuPath_Data <-read.delim(paste0("Data ", i, ".txt"),
na.strings ="NaN",
quote ="\"")

#Erstellung des Beobachtungsfensters für Microarray-Spots
#In Annotation_Data ist unter anderem der Mittelpunkt des in QuPath gesetz
ten Beobachtungsfensters enthalten. Es wurde ein Kreis mit einem Radius vo
n 1000 µm gewählt, da dies am ehesten der Größe der Spots entspricht.
Annotation_Data <-read.delim(paste0("Annotation ", i, ".txt"),
header =FALSE,
skip =1,
comment.char ="#"
)
Observation_window <- disc(1000,
  c(Annotation_Data[1, 4], Annotation_Data[1, 5]))
#Erstellung des Beobachtungsfensters für "whole slide"-Präparate
#Die Beobachtungsfenster der "whole-slide"-Schnitte wurden dabei händisch
in QuPath eingezeichnet und die Eckpunkte als ".txt"-Datei exportiert. Da z
um Teil mehrere Fenster nötig waren um einen Schnitt sinnvoll auszuwerten,
wurde die Erstellung der point pattern in "R" individuell entsprechend an
gepasst.

#Import der Eckpunkte des Beobachtungsfenster aus QuPath. Zusätzlich Wech
sel von Zeilen zu Spalten und umgekehrt. Dies wird - mit aufsteigender Num
merierung für alle Fenster wiederholt.
w1 <-t(read.csv("Eckpunkte Fenster 1.txt", header=FALSE))
w2 <-t(read.csv("Eckpunkte Fenster 2.txt", header=FALSE))
"....."

#Entweder Kombination der Beobachtungsfenster
Observation_window <-owin(poly =list(w1, w2))

#Oder, wenn nur ein Fenster nötig war, Erstellung des Beobachtungsfenster
in R
Observation_window <-owin(poly = w1)
```

```

#Erstellung des "planar point pattern" und Differenzierung in die Subpopulationen
#QuPath_Data[,1] enthält die Marks der Zellen,
#QuPath_Data[,4] enthält die X-Koordinaten,
#QuPath_Data[,5] enthält die Y-Koordinaten
pp <- ppp(QuPath_Data[, 4],
          QuPath_Data[, 5],
          Observation_window,
marks = QuPath_Data[, 1])
sp <- split(pp)

#Erstellung der für die zu untersuchenden Fragestellungen benötigten überlagerten ppp
si1 <- superimpose("1" = sp$`Immune cells`,
"2" = superimpose(sp$`Tumor: CD73`,
                  sp$`Tumor: double neg`))
si2 <- superimpose("1" = sp$`Immune cells`,
"2" = superimpose(sp$`Tumor: CA IX+`,
                  sp$`Tumor: double pos`))
si3 <- superimpose("1" = sp$`Immune cells`,
"2" = superimpose(sp$`Tumor: CA IX+`,
                  sp$`Tumor: double neg`))
si4 <- superimpose("1" = sp$`Immune cells`,
"2" = superimpose(sp$`Tumor: CD73+`,
                  sp$`Tumor: double pos`))
si5 <- superimpose("1" = sp$`Immune cells`, "2" = sp$`Stroma: neg`)
si6 <- superimpose("1" = sp$`Immune cells`, "2" = sp$`Stroma: CD73`)

#Benennung der jeweiligen überlagerten ppp
S1 <- "Immune cells and normoxic tumor"
S2 <- "Immune cells and hypoxic tumor"
S3 <- "Immune cells and CD73-negative tumor"
S4 <- "Immune cells and CD73-positive tumor"
S5 <- "Immune cells and CD73-negative stroma"
S6 <- "Immune cells and CD73-positive stroma"

superimposed_Images <- solist(si1, si2, si3, si4, si5, si6)

#Vorbereitung für die Ausgabe von ".tiff" und ".pdf"-Dateien
my_plots <- vector(23, mode = 'list')

#Plot des ppp und des gesplitteten ppp zur Überprüfung des korrekten Datenimportes
tiff(paste0("Analysis Spot ", i, " whole slide.tif"),
width =960,
height =960,
res =144

```

```

)
dev.control("enable")
print(plot(pp,
cols =c("#ffff4d",
"#4d804d",
"#661a33",
"#96c896",
"#000000",
"#21fe09",
"#b36680",
"#c80000",
"#999999"),
pch =20,
cex =0.25,
legend =TRUE,
leg.args =list(cex =2),
main =paste0("Spot ", i)
))
my_plots[[1]] <-recordPlot()

tiff(paste0("Analysis Spot ", i, " whole slide split.tif"),
width =960,
height =960,
res =144
)
dev.control("enable")

print(plot(sp,
pch =".",
cex =1.5,
cex.main =0.45,
main =paste0("Split view Spot ", i)
))
my_plots[[2]] <-recordPlot()

#Berechnung der inhomogenen K-Funktion mit 99%-igem Konfidenzband durch die "Lohboot"Funktion
tiff(paste0("Analysis Spot ", i, " K-function CTL.tif"))
dev.control("enable")
print(plot(lohboot(sp$`Immune cells`,
Kinhom,
confidence =0.99,
global =TRUE,
rmax =150),
main ="K-function of CD8-positive T-Lymphocytes"
))

```

```

my_plots[[3]] <-recordPlot()

#Berechnung der pcf mit 99%-igem Konfidenzintervall
tiff(paste0("Analysis Spot ", i, " pcf CTL.tif"))
dev.control("enable")
print(plot(lohboot(sp$`Immune cells`,
                  pcfinhom,
confidence =0.99),
main ="pcf of CD8-positive T-Lymphocytes"))

my_plots[[4]] <-recordPlot()

#Berechnung der G-Funktion
tiff(paste0("Analysis Spot ", i, " G-function CTL.tif"))
dev.control("enable")
print(plot(Gest(sp$`Immune cells`),
main ="G-function of CD8-positive T-Lymphocytes"))

my_plots[[5]] <-recordPlot()

#Zähler für den folgenden Loop
a <-0
b <-5

#Der folgende Loop berechnet für jedes "pattern" in der Liste von "superim
posed_Images" die inhomogene Kcross-Funktion, deren pcf, sowie die Gcross-
Funktion.
for (pattern in superimposed_Images) {
tryCatch({
  a <-a +1
  b <-b +1

#Berechnung der benötigten Blockzahl, 10 Zellen pro Block scheinen dabei e
ine gute Mitte zwischen statistischer Validität und einem möglichst kleine
n Konfidenzintervall zu sein.
  nblocks <-floor(sqrt((npoints.ppp(pattern) /10)))

tiff(paste0("Analysis Spot ", i, " Gcross ",
eval(parse(text = (paste0("S", a))))),
".tif"))
dev.control("enable")
print(plot.fv(Gcross(pattern),
main =paste0("Gcross ", eval(parse(text = (paste0("S", a)))))))

  my_plots[[b]] <-recordPlot()

  b <-b +1

```

```

tiff(paste0("Analysis Spot ", i, " Kcross.inhom ",
eval(parse(text = (paste0("S", a)))),
".tif"))
dev.control("enable")
print(plot.fv(lohboot(pattern,
                    Kcross.inhom,
                    block =TRUE,
                    global =TRUE,
                    confidence =sqrt(0.99),
                    rmax =150,
                    nx = nblocks,
                    ny = nblocks),
main =paste0("Kcross.inhom ",
eval(parse(text = (paste0("S", a))))
))

my_plots[[b]] <-recordPlot()

b <-b +1

```

```

tiff(paste0("Analysis Spot ",i," pcfcross.inhom ",
eval(parse(text = (paste0("S", a))),
".tif"))
dev.control("enable")
print(plot.fv(pcf(lohboot(pattern,
                    Kcross.inhom,
block =TRUE,
                    global =TRUE,
                    confidence =sqrt(0.99),
                    rmax =150,
                    nx = nblocks,
                    ny = nblocks)),
main =paste0("pcfcross.inhom ",
eval(parse(text = (paste0("S", a))))
))

my_plots[[b]] <-recordPlot()

```

*#Falls ein Fehler auftritt, bspw. keine hypoxischen Zellen vorhanden sind, so wird der Loop aufgrund der "tryCatch"-Funktion nicht abgebrochen, sondern der Fehler wird abgespeichert und nach Abschluß aller Berechnungen angezeigt.*

```

}, error =function(err) {
cat("ERROR in run", b, ":", conditionMessage(err), "\n")
})

```



```
}  
  
graphics.off(  
)  
  
#Zur besseren Übersicht werden alle berechneten Kurven nicht nur als ".tif  
"-Datei sondern auch als ".pdf"-Datei gespeichert. Dafür werden alle berei  
ts berechneten Plots noch einmal abgespielt und diesmal in ein ".pdf"-Doku  
ment gespeichert.  
pdf(paste("Analysis Spot ", i, ".pdf", sep = ""))  
for (plot in my_plots) {  
  print(replayPlot(plot))  
}  
graphics.off()
```



## 10. Tabellarischer Lebenslauf

09/2004 – 06/2012	<b>Abitur</b> Europagymnasium der Stadt Kerpen Abschluss: 2,0
10/2012 – 05/2013	<b>Ausbildung zum Rettungsassistenten</b> Medakademie Köln Staatsexamen: 1,0
10/2013 – 11/2019	<b>Studium der Humanmedizin</b> Johannes-Gutenberg-Universität Mainz Regelstudienzeit 1. Staatsexamen 09/2015, Note 2,0 2. Staatsexamen 10/2018, Note 2,0 3. Staatsexamen 11/2019, Note 2,0
01/2020 – 03/2022	<b>Assistenzarzt Innere Medizin</b> Krankenhaus St. Marienwörth Bad Kreuznach
04/2022 – jetzt	<b>Assistenzarzt Strahlentherapie und Radioonkologie</b> Universitätsmedizin Mainz