

# **CD24 in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Deborah Christina Schubert**

aus Duisburg

2024

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Glen Ole Kristiansen
2. Gutachter: PD Dr. med. Benjamin Philipp Ernst

Tag der Mündlichen Prüfung: 06.02.2024

Aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. Glen Ole Kristiansen

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	5
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	7
1.1	Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches	7
1.1.1	Lokalisationen, Risikofaktoren und Prognose der HNSCC	7
1.1.2	Aktuelle Therapie der HNSCC	8
1.1.3	Tumorbiologie von HNSCC	9
1.1.4	Programmed cell death protein 1 und HNSCC	11
1.2	Makrophagen	14
1.2.1	Übersicht Makrophagen	14
1.2.2	Makrophagen in Tumoren	15
1.2.3	CD68 Aufbau und Lokalisation	17
1.3	CD24	18
1.3.1	Grundlagen CD24	18
1.3.2	Interaktion von CD24 mit dem Immunsystem	19
1.3.3	Interaktion von CD24 und Siglec-10	19
1.3.4	CD24 und Metastasierung	21
1.3.5	CD24 in Tumoren	22
1.3.6	CD24 in HNSCC	22
1.4	Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit	23
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	24
2.1	Immunhistochemische Färbungen	24
2.2	Das Auswertungsprogramm QuPath	24
2.2.1	Allgemeines zu QuPath	24
2.2.2	Die Arbeit mit QuPath	25
2.3	Statistische Auswertungen	27
2.4	Das Patientenkollektiv	27
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	29
3.1	Immunhistochemische Analysen	29
3.2	Auswertung CD24 Färbung	32
3.3	Auswertung CD68 Färbung	34

3.4	Auswertung Siglec-10 Färbung	35
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>36</b>
4.1	CD24 Expression in HNSCC	36
4.2	Rolle CD68 positiver Zellen in HNSCC	39
4.3	Rolle Siglec-10 positiver Zellen in HNSCC	41
4.4	Ausblick	42
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>43</b>
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>46</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>47</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b>	<b>56</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>64</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

CCL2	CC-Chemokinligand 2
CCR2	CC-Chemokinrezeptor 2
CD	Cluster of differentiation
CPS	Combined positive score
CSF	Colony stimulating factor
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DRMs	Detergent-resistant membrane domains
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FDA	Food and drug administration
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
HLA-DR	Humanes Leukozyten-Antigen Isotyp DR
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humane Papillomviren
HSA	Heat stable antigen
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
LAMP	Lysosomal/endosomal associated membrane glycoprotein

NK-Zellen	Natural Killer-Zellen
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PD-1	Programmed cell death protein-1
PD-L1/2	Programmed cell death ligand 1/2
pSTAT	Phosphorylated signal transducer and activator of transcription
SD	Standard deviation
SHP1/2	Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatases 1/2
Siglec-10	Sialic-acid-binding Ig-like lectin 10
Sox2	SRY-box transcription factor 2
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAMs	Tumor-associated macrophages
TCR	T-cell receptor
TGF- $\alpha$	Transforming growth factor $\alpha$
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TLR	Toll-like receptor
TMA	Tissue microarray
TNM-Klassifikation	Tumor-, Node-, Metastasis-Klassifikation
TPS	Tumor proportion score
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor

# 1. Einleitung

## 1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches

### 1.1.1 Lokalisationen, Risikofaktoren und Prognose der HNSCC

Zu den Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC)) gehören Plattenepithelkarzinome der Lippe, der Mundhöhle, des Oropharynx, Nasopharynx und Hypopharynx, des Larynx, der großen Speicheldrüsen, der Nase und Nasennebenhöhlen sowie Primärtumoren mit zervikalen Lymphknotenmetastasen (Wittekind, 2020). Die häufigste Lokalisation der HNSCC ist dabei die Mundhöhle mit rund 28,2 % gefolgt von Manifestationen im Zungenbereich mit 23,5 % (Pulte und Brenner, 2010). Weltweit gesehen repräsentieren HNSCC die sechst häufigste Tumorart (Hardisson, 2003). In Deutschland erkranken jedes Jahr circa 17 000 Menschen an HNSCC, wobei Männer (2016: 12 992) fast dreimal so häufig erkranken wie Frauen (2016: 4 532) (Barnes et al., 2016). Die 5-Jahres-Überlebensrate lag dabei 2016 für Frauen bei 61 % und für Männer bei 51 % (Barnes et al., 2016). Die Überlebensrate ist allerdings stark davon abhängig, in welchem Stadium HNSCC diagnostiziert werden. Bei Patienten mit einem frühen Tumorstadium bei Diagnose liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 82 %, während HNSCC Patienten mit regionalen Lymphknotenmetastasen eine 5-Jahres-Überlebensrate von 56 % haben und diese bei HNSCC Patienten im späten Stadium mit Fernmetastasen zumeist in der Lunge bei 34 % liegt (Siegel et al., 2012). Klinische Gründe für schlechte Prognosen von HNSCC in höheren Tumorstadien können hohe Rezidivraten insbesondere von Lokal- oder Lymphknotenrezidiven sein (Alsahafi et al., 2019).

Zu den Risikofaktoren gehören vor allem Tabak- und Alkoholkonsum sowie eine chronische Infektion mit Humanen Papillomviren (HPV) insbesondere der Subtypen 16 und nachfolgend 18 (Economopoulou et al., 2019). Dabei stieg in den letzten Jahren der Anteil HPV positiver HNSCC kontinuierlich an (Alsahafi et al., 2019). HNSCC gelten als heterogene Tumorentitäten, die abhängig von bestehenden Risikofaktoren unterschiedliche Prognose und Therapieerfolge zu verzeichnen haben. So ist zu beobachten, dass Patienten mit HPV positiven HNSCC eine günstigere Prognose haben als Patienten mit HPV

negativen HNSCC (Alsahafi et al., 2019). Das klinisch-pathologische Bild der HNSCC äußert sich zumeist durch ein zentrales Ulkus mit einem peripheren Randwall (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2012). Zur Diagnosestellung sollte eine Probenentnahme aus dem Randbereich des Tumors, beispielsweise durch Inzisionsbiopsie, erfolgen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2021). Des Weiteren sollte zur Detektion des Primarius und möglicher Lymphknotenmetastasen eine Computertomografie (CT) oder Magnetresonanztomografie (MRT) des Halses sowie ebenfalls bei fortgeschrittenen Karzinomen ein CT des Thorax zur Detektion möglicher Lungenmetastasen oder Zweitkarzinome durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2021). Die Klassifikation des Tumorstadiums erfolgt nach der Union internationale contre le cancer (UICC) Tumor-, Node-, Metastasis- (TNM) Klassifikation. In das Tumorstadium (T-Stadium) fließen die Tumorgöße, die Infiltrationstiefe und je nach Lokalisation die Infiltration wichtiger anatomischer Bezirke ein (Wittekind, 2020). Relevant für den Nodalstatus (N-Stadium) sind die Größe, Anzahl und Seitenlokalisierung der Lymphknotenmetastasen sowie eine Infiltration des perinodalen Weichgewebes (Wittekind, 2020). Dabei variiert die Klassifikation ebenfalls je nach Primarius. Bei den Oropharynx Tumoren erfolgt abweichend aktuell je nach p16-Status eine andere T- und N-Stadieneinteilung. Weiter können die Tumoren anhand ihres Differenzierungsgrades eingeteilt werden (Wittekind, 2020). Allerdings gibt es für Plattenepithelkarzinome kein allgemein etabliertes Graduierungssystem (Almangush et al., 2020).

### 1.1.2 Aktuelle Therapie der HNSCC

Es gibt verschiedene kurative Behandlungsansätze, zu denen die chirurgische Resektion mit oder ohne adjuvante Radio-/Chemotherapie oder eine definierte Radiochemotherapie zählen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2019). Die Therapiewahl orientiert sich an der Lage, Größe und möglicher Resektabilität des Primärtumors, dem Allgemeinzustand des Patienten und der voraussichtlichen behandlungsbedingten Morbidität sowie funktioneller Beeinträchtigungen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe,



AWMF), 2012). In vielen Fällen erfolgt allerdings erst eine späte HNSCC Diagnosestellung in weiter fortgeschrittenen Tumorstadien, die zu schlechteren Überlebensraten und geringeren Therapieerfolgen führt (Economopoulou et al., 2019). So werden nur rund ein Drittel der Patienten in einem frühen Tumorstadium (T1-2, N0) diagnostiziert und mit einer unimodalen Therapie behandelt, die aus einer chirurgischen Resektion oder Strahlentherapie besteht (UICC, 2014). Bei rund 46 % der Patienten werden HNSCC in einem Stadium mit regionalen Metastasen diagnostiziert und rund 21 % der Patienten haben zum Diagnosezeitpunkt bereits Fernmetastasen (Siegel et al., 2012). In diesen weiter fortgeschrittenen Stadien wird vor allem eine auf Cisplatin basierende Chemotherapie eingesetzt und diese gegebenenfalls mit einer Resektion kombiniert (Modur et al., 2016). Allerdings sprechen nur rund 10-35 % der Tumoren auf die Chemotherapie an und die mediane Überlebenszeit liegt bei rund 6-12 Monaten (Modur et al., 2016). Die Cisplatin basierte Chemotherapie sollte bei Patienten mit fortgeschrittenem, nicht operablem und nicht metastasiertem Stadium als primäre Radiochemotherapie stattfinden und einer alleinigen Strahlentherapie vorgezogen werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2021). Dabei sollte bei postoperativ fortgeschrittenen T-Stadien (T3/T4), positiven Resektionsrändern, perineuraler Invasion, Gefäßinvasion und/oder Lymphknotenbefall eine postoperative Radio- oder Radiochemotherapie erfolgen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2021). Als gezielte Therapie konnte bislang vor allem Cetuximab etabliert werden, ein monoklonaler Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (Englisch: Epidermal growth factor receptor (EGFR)), sowie Antikörper gegen das programmierte Zelltodprotein 1 (Englisch: Programmed cell death protein 1 (PD-1)) (siehe Abschnitte 1.1.3 und 1.1.4). Aufgrund der häufig bereits fortgeschrittenen Stadien sowie der hohen Rezidivraten ist es wichtig, neue validierte klinische Biomarker sowie neue Therapiemöglichkeiten für HNSCC zu finden, die mithilfe einer genaueren Charakterisierung der Tumoreigenschaften spezifischer eingesetzt werden können (Economopoulou et al., 2019).

### 1.1.3 Tumorbilogie von HNSCC

HNSCC sind molekular heterogene Tumoren. Tumorzellen der HNSCC zeigen häufig eine vermehrte Expression der Rezeptortyrosinkinase EGFR (Tweardy und Grandis, 1993).

EGFR gehört zur ErbB Familie und ist ein transmembranäres Glykoprotein (Liu et al., 2018). Der EGFR ist ein Zellwachstumsrezeptor, der nach Rezeptorbindung seiner Liganden Zellproliferation, Differenzierung und Zellmigration der Tumorzellen fördert (Liu et al., 2018). Verschiedene Liganden binden an den EGFR, darunter der epidermale Wachstumsfaktor (Englisch: Epidermal growth factor (EGF)), der transformierende Wachstumsfaktor  $\alpha$  (Englisch: Transforming growth factor  $\alpha$  (TGF-  $\alpha$ )) und Epiregulin (Liu et al., 2018). Für Tumoren mit starker EGFR-Expression kommen Tyrosinkinaseinhibitoren und monoklonale Antikörper gegen EGFR wie Cetuximab als Therapiemöglichkeit in Frage. Tyrosinkinaseinhibitoren binden an die intrazelluläre Tyrosinasedomäne und unterbinden so Autophosphorylierungsprozesse (Liu et al., 2018). Für HNSCC wurde 2006 die Therapie mit dem monoklonalen Anti-EGFR Antikörper Cetuximab eingeführt (Dietz, 2017). Insbesondere die Kombination von Cetuximab und Cisplatin oder Carboplatin/5-Fluorouracil zeigte dabei deutliche Überlebenszeitverbesserungen (Dietz, 2017). Zur palliativen Therapie von Patienten mit gutem Allgemeinzustand kann die Kombination einer platinbasierten Chemotherapie mit Cetuximab eingesetzt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2012). Ebenfalls sollte in einer palliativen Situation bei Patienten in gutem Allgemeinzustand ohne PD-L1 exprimierende Tumor- oder Immunzellen Cetuximab bei fehlender Qualifikation zur Lokalthherapie in Kombination mit Platin und 5-Fluorouracil eingesetzt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2021). Zudem bietet sich bei weit fortgeschrittenen HNSCC auch die Kombination einer Radiotherapie mit Cetuximab an, mit verbesserten Überlebensraten von 10 % und einer besseren lokalen Tumorkontrolle im Vergleich zur alleinigen Strahlentherapie (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2012).

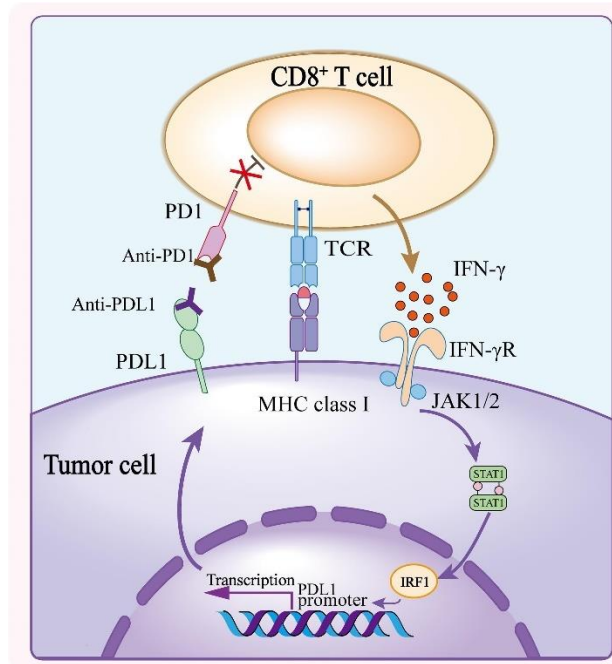
Außerdem zeigen HNSCC häufig inaktivierende Mutationen des Tumorsuppressorgens *TP53* (Ragos et al., 2018). Das Protein p53 spielt in der Zelle physiologisch eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase und der Aktivierung von Reparaturenzymen nach DNA-Schäden mit Stopp des Zellzyklus (Ragos et al., 2018). Mutationen im *TP53* Gen führen zu einer reduzierten Apoptoserate mit Akkumulation von DNA-Schäden und in Kombination mit weiteren Mutationen in der Zelle zu einer unkontrollierten Zellteilung mit Gewebeinvasion (Ragos et al., 2018). Zudem verschlechtern *TP53* Mutationen durch ihre antiapoptotische Wirkung das Ansprechen auf Chemotherapien und so

die Prognose (Ragos et al., 2018). In Studien erwies sich eine *TP53* Mutation bei HNSCC Patienten mit HPV+ Tumoren als prognostisch ungünstig (Ragos et al., 2018). Zudem zeigten Patienten mit Hochrisiko-*TP53*-Mutationen ein schlechteres Gesamtüberleben sowie ein erhöhtes Risiko für Metastasen als Patienten mit *TP53* Wildtyp oder mit Niedrigrisiko-Mutationen (Zhou et al., 2016).

#### 1.1.4 Programmed cell death protein 1 und HNSCC

PD-1 ist ein immunmodulatorisches Transmembranglykoprotein, das überwiegend von zytotoxischen T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Natural Killer (NK)-Zellen exprimiert wird (Ahmadzadeh et al., 2009; Han et al., 2020). Es besitzt eine immunmodulatorische Wirkung, indem es die Aktivierung von T-Zellen nach Bindung der programmierten Zelltodliganden 1/2 (Englisch: Programmed cell death ligands 1/2 (PD-L1/2)) auf antigenpräsentierenden Zellen verhindert und so weitere Zellproliferation sowie Cytokinproduktion inhibiert. Damit werden inflammatorische Reaktionen bei Infektionen reguliert und der Körper vor überschießenden Immunreaktionen geschützt (Müller et al., 2017). Wenn Tumorzellen PD-L1/2 auf ihrer Oberfläche exprimieren, können sie ebenfalls die Aktivierung von T-Zellen verhindern und so eine immunmodulatorische und immunsuppressive Wirkung ausüben (Müller et al., 2017). Mit der Verwendung von Immuncheckpoint-Inhibitoren wie den Anti-PD-1 Antikörpern Nivolumab oder Pembrolizumab wird versucht, diese Signalkaskade zu unterbrechen und eine Antitumorreaktion des Immunsystems zu fördern (Abb. 1, Lei et al., 2020). Anti-PD-1 Antikörper finden unter anderem Anwendung in der Therapie von malignen Melanomen. So zeigte sich in Studien mit Pembrolizumab versus Placebo in der adjuvanten Therapie der fortgeschrittenen Melanomstadien eine Risikoreduktion für Tumorrezidive oder Versterben um 43 % (Eggermont et al., 2018). Auch bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen werden Anti-PD-1 Antikörper zur Therapie eingesetzt. Dabei zeigten insbesondere Patienten mit hohen PD-L1 Expressionswerten im Tumor in der KEYNOTE-001 Studie ein gutes Ansprechen nach einer Anti-PD-1 Therapie mit einer medianen Überlebenszeit von 15,4 Monaten im Gegensatz zu Patienten mit niedrigen PD-L1 Expressionswerten mit einer medianen Überlebenszeit von circa 8,5 Monaten (Niu et al., 2021). Des Weiteren werden Anti-PD-1-basierte Therapieansätze erfolgreich für die Behandlung des metastasierten Urothelkarzinom der Blase angewendet. So zeigte sich unter einer Therapie mit Pembrolizumab eine Verbesserung des medianen Überlebens

mit einer Überlebenszeit von 10,3 Monaten im Vergleich zu einer platinbasierten Chemotherapie mit einer medianen Überlebenszeit von 7,4 Monaten (Lopez-Beltran et al., 2021). Bei HNSCC Patienten mit hohen Raten an PD-L1 positiven Tumorzellen konnten geringere Überlebensraten und ein schlechterer Ausgang (Englisch: Outcome) im Vergleich zu keiner oder nur geringer PD-L1 Positivität nachgewiesen werden (Müller et al., 2017).



**Abb. 1: Mechanismus der Anti-PD-1 Therapie.**

Tumorzellen mit PD-L1 Expression können über die Bindung an PD-1 Rezeptoren auf CD8+ zytotoxischen T-Zellen diese inaktivieren und führen damit zu einer Herunterregulation der immunspezifischen Antitumorantwort. Unter dem Einsatz von Anti-PD-1 Antikörpern kann diese Signalkaskade unterbrochen werden und die immunvermittelte Antitumorantwort gesteigert werden. (TCR, T-cell receptor; MHC, Major histocompatibility complex; IFN- $\gamma$ , Interferon- $\gamma$ ; JAK1/2, Januskinase 1/2; STAT1, Signal transducer and activator of transcription 1; PD-1, Programmed cell death protein-1). Aus Lei et al., 2020, Figure 1

In Studien zeigte sich eine signifikante Überlebensverbesserung durch eine Anti-PD-1/PD-L1 Monotherapie in der metastasierten, rezidierten Situation bei HNSCC im Vergleich zur Standardtherapie mit Cetuximab, einer platinbasierten Chemotherapie und 5-Fluorouracil (Zhu et al., 2021). Zudem zeigten sich weniger Therapienebenwirkungen unter Anti-PD-1/PD-L1 Therapie im Vergleich zur Standardtherapie (Zhu et al., 2021).

2017 wurde der monoklonale Antikörper Nivolumab als PD-1 Inhibitor bei HNSCC mit einer Progression während oder nach einer platinbasierten Therapie in Deutschland zugelassen (Dietz, 2017). 2019 folgte die Zulassung des humanisierten monoklonalen Antikörpers Anti-PD-1 Pembrolizumab in Deutschland zur Monotherapie oder in Kombination mit einer Platin- und 5-Fluorouracil-Chemotherapie der metastasierten oder nicht resezierbaren rezidivierten HNSCC mit PD-L1 exprimierenden Tumorzellen mit kombiniertem Positivscore (Englisch: Combined positive score (CPS))  $\geq 1$  (Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft (Fachausschuss der Bundesärztekammer), 2020). Außerdem ist der Einsatz von Pembrolizumab als Monotherapie bei rezidivierten oder metastasierten HNSCC mit PD-L1 exprimierenden Tumoren mit einem Score für den Tumoranteil (Englisch: Tumor proportion score (TPS))  $\geq 50\%$  und einem Fortschreiten der Krebserkrankung während oder nach vorheriger platinbasierter Therapie zugelassen (Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft (Fachausschuss der Bundesärztekammer), 2020).

Ein neuer Ansatz zur weiteren Therapie von HNSCC ist die Kombination von Immuncheckpoint-Inhibitoren mit einer Radiotherapie. Hintergrund dieser Kombination sind die Effekte einer Radiotherapie auf das Immunsystem, die zu einer vermehrten Antigenpräsentation durch Hochregulation tumoraler Hauptgewebeverträglichkeitskomplexe (Englisch: Major histocompatibility complexes (MHC)), zu T-Zell Rekrutierung, aber auch zu einer immunsuppressiven Tumormikroumgebung (Englisch: Tumor microenvironment) und Expression von Immuncheckpoint-Rezeptoren führen (Manukian et al., 2019). Die T-Zell Rekrutierung wird insbesondere durch eine erhöhte Sekretion von Cytokinen und Chemokinen während einer Radiotherapie gefördert, die zur Anlockung und Aktivierung von T-Zellen führen (Manukian et al., 2019). Allerdings kann eine Radiotherapie sowohl über die Ausschüttung von Kolonie-stimulierendem Faktor (Englisch: Colony stimulating factor (CSF)) zur Anlockung Tumor-assoziiertes Makrophagen führen, die eine immunsuppressive Wirkung ausüben, als auch zu einer vermehrten Expression von PD-1 auf T-Zellen und PD-L1 auf Tumorzellen führen (Manukian et al., 2019). Um diese unerwünschten Effekte der Radiotherapie zu minimieren, bietet sich eine Kombination der Radiotherapie mit Anti-PD-1 Inhibitoren an, die zu einer Verbesserung der antitumoralen Antwort durch Hemmung der immunsuppressiven Achse ausgelöst durch die Bindung von PD-L1

an PD-1 Rezeptoren der T-Zellen führen. Darunter zeigt sich ein besseres Therapieansprechen sowie verbesserte Überlebensraten (Manukian et al., 2019).

Diese Vielzahl an neuen Möglichkeiten im Bereich der Immuntherapie eröffnen vielversprechende Therapiemöglichkeiten. Da bisher allerdings nicht alle HNSCC Patienten von der Anti-PD-1 Therapie profitieren, ist die Erforschung neuer Zielstrukturen und Therapieansätze für weitere Anti-Tumorthérapien wesentlich.

## 1.2 Makrophagen

### 1.2.1 Übersicht Makrophagen

Makrophagen gehören zum angeborenen Immunsystem. Sie entwickeln sich im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen der myeloischen Reihe zu Monozyten. Nach Einwanderung aus dem Blut in Gewebe können sich Monozyten in einem Maturations-schritt zu Makrophagen ausdifferenzieren (Smigiel und Parks, 2018). Im Gewebe können sich Makrophagen amöboid fortbewegen. Auf ihrer Zelloberfläche besitzen Makrophagen Rezeptoren für die Erkennung von Mustern (Englisch: Pattern recognition receptors), über die Pathogene gebunden werden können (Wynn und Vannella, 2016). Pathogene können auf diesem Weg von Makrophagen phagozytiert werden und Antigenfragmente anschließend Lymphozyten präsentiert werden. Zur Antigenpräsentation besitzen Makrophagen MHC II und MHC I auf ihrer Zelloberfläche und können darüber körperfremde Antigene anderen Immunzellen, beispielsweise zytotoxischen T-Zellen, präsentieren und diese dadurch aktivieren (Mohammadi et al., 2019). Zudem besitzen Makrophagen eine sekretorische Funktion, indem sie sowohl pro- und antiinflammatorische Cytokine zur Regulation von Entzündungsreaktionen als auch Wachstumsfaktoren und Chemokine zur Anlockung weiterer Immunzellen ausschütten (Mohammadi et al., 2019). Da Makrophagen auf unterschiedliche Stimuli wie Cytokine, Pathogen-assoziierte molekulare Muster (Englisch: Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)) und Schäden-assoziierte molekulare Muster (Englisch: Damage-associated molecular patterns (DAMPs)) unterschiedlich reagieren, werden sie in einen eher proinflammatorischen M1 und einen eher antiinflammatorischen M2 Subtyp unterteilt (Petty und Yang, 2017). Der M1 Phänotyp wird dabei vor allem durch Interferon- $\gamma$  sowie mikrobielle Peptide induziert. M1 Makrophagen sezernie-

ren vornehmlich proinflammatorische Cytokine wie Interleukine-1, -6, -12 und den Tumornekrosefaktor als Reaktion auf einen Erreger oder eine Gewebeverletzung (Petty und Yang, 2017). Zudem produzieren sie reaktive Sauerstoffspezies, die zytotoxisch auf umliegende Zellen wirken, und haben eine hohe Antigenpräsentationskapazität und damit einhergehend eine ausgeprägte Aktivierung von T-Helferzellen (Petty und Yang, 2017). Im Gegensatz dazu werden M2 Makrophagen durch Interleukine-4, -13, -10 und den Monozytenkolonien-stimulierenden Faktor (Englisch: Macrophage colony stimulating factor) induziert, wodurch sie antiinflammatorische Cytokine wie Interleukin-10 und Prostaglandin E2 sezernieren (Petty und Yang, 2017). Damit tragen Makrophagen zur Regulation und zu einem Gleichgewicht von pro- und antiinflammatorischen Faktoren bei.

### 1.2.2 Makrophagen in Tumoren

In vielen Tumoren können Makrophagen als Bestandteile der sogenannten „Tumormikro-umgebung“ vorkommen. Dieses setzt sich aus diversen Zelltypen zusammen, zu denen unter anderem Stromazellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Zellen des Immunsystems und Thrombozyten zählen (Kim und Bae, 2016). Dabei wird Tumor-assoziierten Makrophagen vor allem eine protumorale Funktion zugeschrieben mit einer Unterstützung von Zellinvasion, Angiogenese sowie Metastasierung und einer Unterdrückung der antitumoralen Immunantwort (Kim und Bae, 2016). Sie werden dabei aber nicht dem M2 Subtyp zugeordnet, sondern gehören zur Gruppe der Tumor-assoziierten Makrophagen (Englisch: Tumor-associated macrophages (TAMs)) (Biswas et al., 2006). TAMs werden vor allem durch chemotaktische Botenstoffe wie beispielsweise dem gefäßendothelialen Wachstumsfaktor (Englisch: Vascular endothelial growth factor (VEGF)) angezogen und akkumulieren im Tumorgewebe (Petty und Yang, 2017). Andere Cytokine wie Interleukin-4, -13, die von CD4<sup>+</sup> T-Zellen sezerniert werden, sowie der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (Englisch: Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )) aktivieren TAMs (Linde et al., 2012; Petty und Yang, 2017). TAMs tragen durch Ausschüttung von Matrix-Metalloproteinasen zur Zerstörung der Basalmembran bei und somit zu einem invasiven Wachstum von Tumoren. TAMs spielen außerdem eine Rolle in der Tumorangiogenese. Durch die Ausschüttung von pro-angiogenetischen Wachstumsfaktoren wie VEGF und dem von Blutplättchen abgeleiteten Wachstumsfaktor (Englisch: Platelet-derived growth factor

(PDGF)) kommt es zu Gefäßneubildungen mit einem konsekutiv erhöhten Metastasierungsrisiko (Petty und Yang, 2017). So wird ein Auswandern der Tumorzellen über die Blutgefäße auch durch die Ausschüttung von TGF- $\beta$  unterstützt (Petty und Yang, 2017). Zudem scheinen TAMs die Bildung von Tumorstammzellen zu ermöglichen. Tumorstammzellen sind unter anderem durch die Hochregulation von EGFR, den signalweiterleitenden und Transkriptionsaktivator 3 (Englisch: Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)) Signalwegen und den SRY-Box Transkriptionsfaktor 2 (Englisch: SRY-box transcription factor 2 (Sox2)) Signalwegen mit einer erhöhten Chemotherapieresistenz assoziiert (Petty und Yang, 2017; Yang et al., 2013). Außerdem verhindern TAMs antitumorale Immunreaktionen des erworbenen Immunsystems. So werden insbesondere CD8+ zytotoxische T-Zellen durch TAMs gehemmt, indem antiinflammatorische Cytokine wie Interleukin-10 oder Prostaglandin E2 produziert werden und wichtige Stoffwechselmetaboliten der T-Zellen entfernt werden (Petty und Yang, 2017). Eine weitere Inhibition von tumorinfiltrierenden Lymphozyten erfolgt durch die Expression von Liganden wie PD-1 und dem zytotoxischem T-Lymphozyten Antigen 4 (Englisch: Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4)) auf TAMs mit einer einhergehenden Hemmung der weiteren B-/T-Zellsignalkaskaden (Kuang et al., 2009; Petty und Yang, 2017). Insgesamt ist das Vorhandensein von TAMs in Tumoren durch die Vielzahl an protumoralen Faktoren mit einem schlechteren klinischen Outcome verbunden. Dies konnte insbesondere bei Gliomen, cholangiozellulären Karzinomen, Ovarial- und Mammakarzinomen sowie bei Hodgkin Lymphomen festgestellt werden (Heusinkveld und van der Burg, 2011). In HNSCC ist eine hohe Dichte an TAMs mit höheren T-, N- und M-Stadien mit einem damit verbundenen schlechteren klinischen Outcome assoziiert (Kumar et al., 2019).

Aufgrund dessen gelten TAMs als attraktive Zellstruktur für eine gezielte Immuntherapie. Eine mögliche Therapiestrategie ist hier die Inhibition der sogenannten CCL2-CCR2 Achse. TAMs produzieren häufig das Cytokin CC-Chemokinligand 2 (CCL2) und locken damit CC-Chemokinrezeptor 2 (CCR2) positive monozytäre myeloide Suppressorzellen aus dem Knochenmark an (Petty und Yang, 2017). Myeloide Suppressorzellen gehören zur Gruppe der immunsuppressiven Zellen, die beispielsweise T-Zell Immunantworten unterdrücken können und selbst zu TAMs differenzieren können (Petty und Yang, 2017). Diese Achse kann mithilfe des PF-04136309 Moleküls unterbrochen werden, indem CCR2 spezifisch gehemmt wird (Petty und Yang, 2017). Weiter gibt es therapeutische



Ansätze mit Trabectedin, welches in die kleinen DNA Furchen bindet und sich in Studien als potenter Inhibitor von CCL2 erwies (Germano et al., 2013).

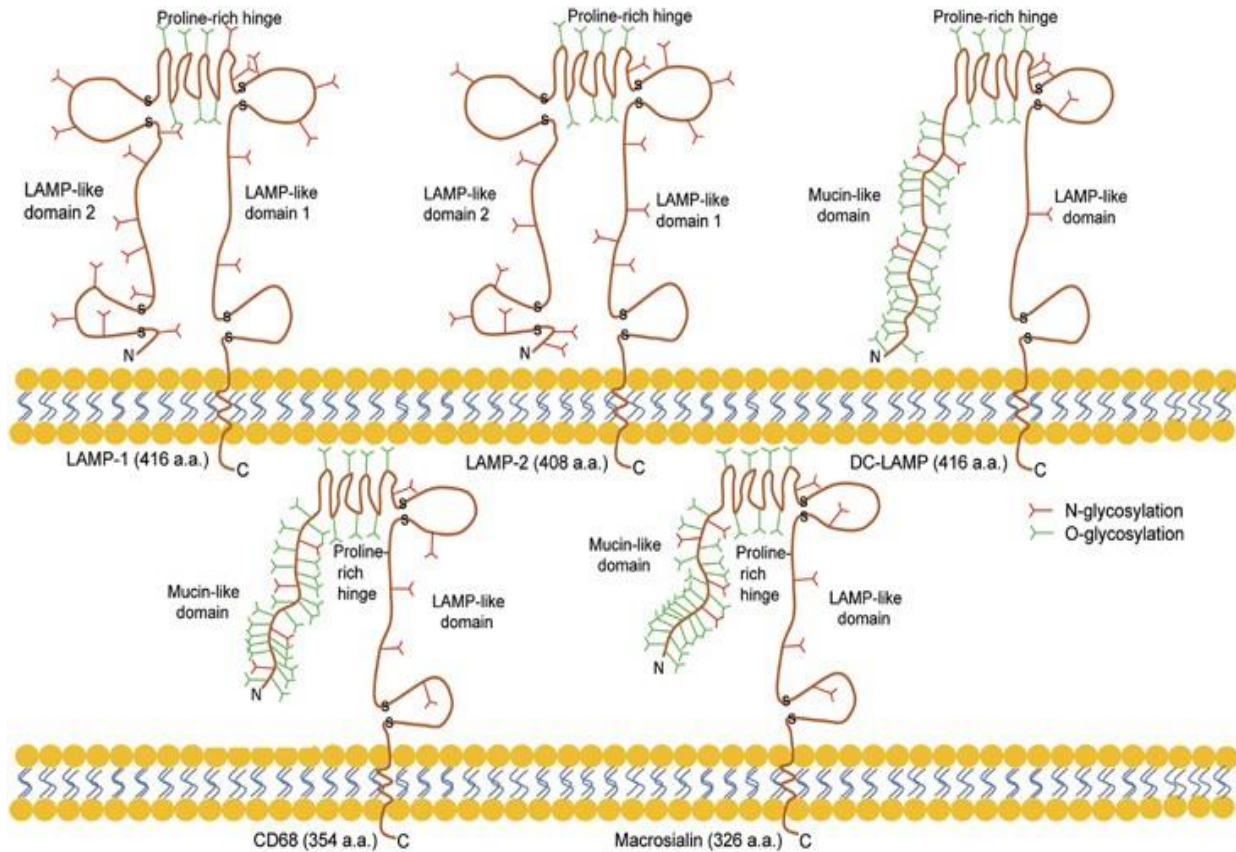
### 1.2.3 CD68 Aufbau und Lokalisation

Das Cluster of Differentiation (CD) 68 wird vor allem in Makrophagen, Monozyten und weiteren Phagozyten exprimiert (Chistiakov et al., 2017; Holness und Simmons, 1993). Bei CD-Molekülen handelt es sich um zellspezifische immunphänotypische Oberflächenmembranglykoproteine. In der Immunhistochemie (IHC) wird das Glykoprotein CD68 als Marker für die Detektion von Gewebemakrophagen und Monozyten verwendet und zur Analyse von entzündetem Gewebe oder Tumorgewebe verwendet (Chistiakov et al., 2017).

CD68 gehört zur Familie der lysosomal/endosomal-assoziierten Membranglykoproteinen (Englisch: Lysosomal/endosomal associated membrane glycoproteins (LAMPs)) und ist damit überwiegend an die lysosomale und endosomale Membran im Zellinneren gebunden und nur zu einem geringen Anteil auf der äußeren Zellmembran exprimiert, wobei es aus intrazellulären Speichern an die Zellmembran transportiert werden kann (Chistiakov et al., 2017; Holness und Simmons, 1993). Aus diesem Grund wird CD68 auch als LAMP-4 bezeichnet. Es enthält strukturell eine Mucin- und eine LAMP-ähnliche Domäne, die zwei Disulfidbrücken aufweist (Abb. 2, Chistiakov et al., 2017). CD68 bindet oxidierte Lipoproteine mit niedriger Dichte an der Zelloberfläche (Chistiakov et al., 2017). Allerdings ist die genaue Funktion von CD68 noch unbekannt. Durch die hauptsächliche Lokalisation von CD68 in Endosomen wird eine Rolle von CD68 in der Antigenprozessierung diskutiert (Chistiakov et al., 2017).

Eine IHC der CD68 Expression kann zur Abschätzung des tumorassoziierten Immunstatus angewendet werden, um die Anzahl der Zellen des angeborenen Immunsystems im Tumor und im angrenzenden Stroma abzuschätzen und so Aussagen über die Prognose und einem möglichen Therapieerfolg treffen zu können (Kumar et al., 2019). Allerdings gilt CD68 als allgemeiner Makrophagen-Marker und kann diese nicht in die unterschiedlichen Subtypen M1, M2 oder Tumor-assoziierte Makrophagen unterscheiden. Da der Übergang zwischen den Makrophagensubtypen M1/M2 in einem dynamischen Konti-

neum steht, bietet sich CD68 als allgemeiner Makrophagen-Marker zur genaueren Betrachtung der Anzahl, Lokalisation und Verteilung von Makrophagen insgesamt an (Sica und Mantovani, 2012).



**Abb. 2: Aufbau/Struktur von CD68 (LAMP-4) im Vergleich mit anderen LAMPs.**

Der Aufbau von CD68 gliedert sich in eine Mucin- und LAMP-ähnliche Domäne, eine prolinreiche Region, eine Transmembrandomäne und einen cytosolischen C-Terminus. Andere LAMP-Moleküle besitzen zwei LAMP-ähnliche Domänen oder ebenfalls eine LAMP-ähnliche und eine Mucin-ähnliche Domäne, bei sonst gleichem Aufbau. (LAMP, Lysosomal associated membrane glycoproteins; CD68, Cluster of differentiation 68). Aus Chistakov et al., 2017, Figure 1

### 1.3 CD24

#### 1.3.1 Grundlagen CD24

CD24 ist ein Oberflächensignalprotein und wird von einer Vielzahl an Zellen des Immunsystems physiologisch in ihrer Entwicklung exprimiert. Weitere Namen für das Molekül

sind hitzestabiles Antigen (Englisch: Heat stable antigen (HSA)) oder kleinzelliges Bronchialkarzinom Cluster Antigen 4 (Englisch: Small-cell lung carcinoma cluster 4 antigen). Als HSA wurde CD24 zuerst in Mäusen als glykosyliertes Membranprotein in Subpopulationen von hämatopoetischen Zelllinien entdeckt (Kay et al., 1990; Kristiansen et al., 2004). Nach der Entdeckung dieses Membranproteins als Antigen auf B-Lymphozyten in menschlichen Zellen erhielt es den Namen CD24 (Reinherz et al., 1986). Charakterisiert wird es durch ein kleines Kernprotein, bestehend aus 31-34 Aminosäuren, das stark N- und O-terminal glykosyliert ist und mithilfe eines Glykosylphosphatidylinositol-Ankers (GPI-Anker) in der Zellmembran verankert ist (Altevogt et al., 2020; Kay et al., 1991). Die besondere Zusammensetzung als Glykomembranprotein mit einem GPI-Anker sorgt dafür, dass CD24 an der Zellmembran in Lipid Rafts exprimiert wird. Lipid Rafts gelten als Tensid-resistente Membrandomänen (Englisch: Detergent-resistant membrane domains (DRMs)), die insbesondere in der Signaltransduktion einer Zelle eine wichtige Rolle spielen (Suzuki et al., 2001).

### 1.3.2 Interaktion von CD24 mit dem Immunsystem

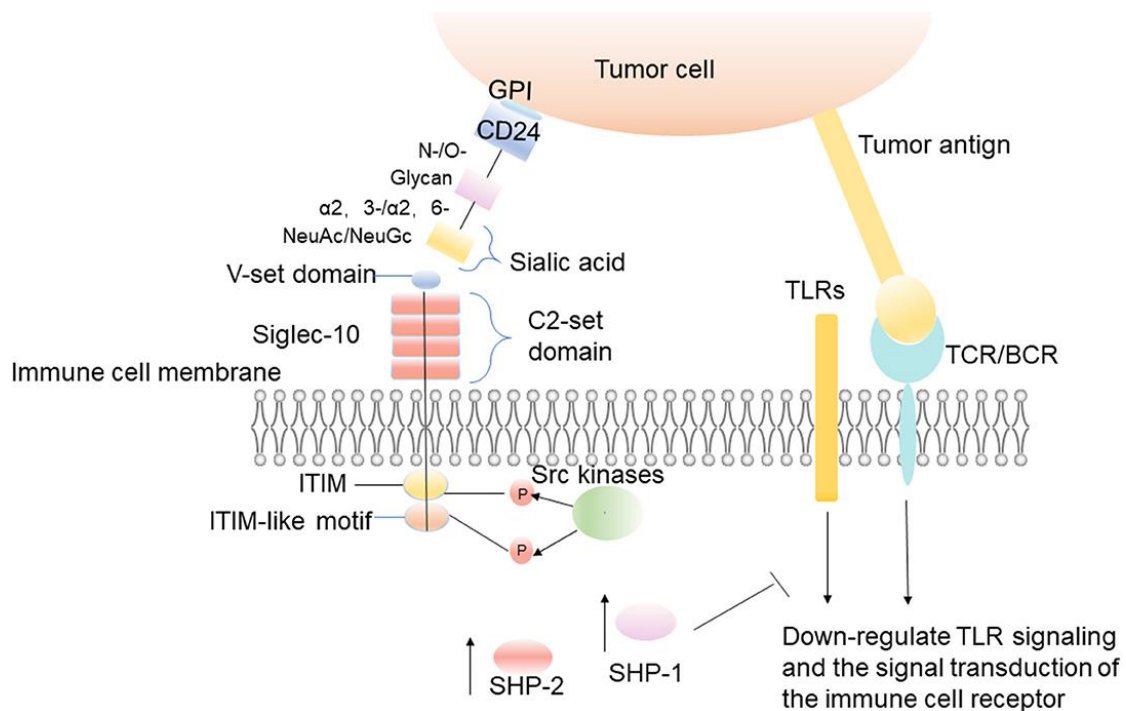
CD24 wird überwiegend von Zellen des Immunsystems exprimiert, insbesondere von Leukozyten. Im Immunsystem übernimmt CD24 physiologisch eine Rolle in der Regulation von Zellproliferation, Apoptose und Zelldifferenzierung sowie als co-stimulierendes Molekül für die T-Lymphozyten Antwort (Altevogt et al., 2020).

Zudem wird es besonders häufig auch auf Tumorzellen überexprimiert und gilt hier als Phagozytoseinhibitor („don't eat me signal“) (Barkal et al., 2019). In Tumorzellen reguliert CD24 überwiegend die Zellmigration, Invasion und Proliferation und besitzt eine immunsuppressive Komponente (Altevogt et al., 2020). CD24 hat verschiedene Bindungspartner, zu denen unter anderem als Rezeptor das Sialinsäure-bindende Immunglobulin-ähnliche Lektin 10 (Englisch: Sialic-acid-binding Ig-like lectin 10 (Siglec-10)) gehört (Yin und Gao, 2020).

### 1.3.3 Interaktion von CD24 und Siglec-10

Siglec-10 ist verbunden mit CD33 und wird von Immunzellen wie B-Zellen, Monozyten, dendritischen Zellen und T-Zellen exprimiert (Whitney et al., 2001; Yin und Gao, 2020). Zudem finden sich physiologisch CD24 und Siglec-10 Expressionen in Plazentagewebe

(Sammar et al., 2021). Als Transmembranprotein wird Siglec-10 auch von Makrophagen in Tumornähe exprimiert (Barkal et al., 2019). Siglec-10 besitzt Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domänen, auch C2 setting Domänen genannt, sowie IgV-ähnliche Domänen, die das N-terminale Ende von Liganden erkennen. Außerdem besitzt Siglec-10 intrazellulär zwei Immunrezeptor Tyrosin-enthaltene inhibitorische Motive (Englisch: Immune receptor tyrosine inhibitory motifs (ITIMs)) zur Bindung von SH<sub>2</sub> Domänen auf anderen Proteinen (Yin und Gao, 2020). Sobald CD24 über endständige Sialinsäuren (N-Acetyl-Neuraminsäure, N-Glykolylnneuraminsäure) an IgV Domänen von Siglec-10 auf den Makrophagen bindet, werden die ITIMs durch Src-Kinasen phosphoryliert. Dabei werden die zwei Domänen besitzende Src homologe Tyrosinphosphatasen 1 und 2 (Englisch: Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatases (SHP1&SHP2)) aktiviert und eine inhibitorische Kaskade in Gang gesetzt (Yin und Gao, 2020). Durch die Phosphorylierung der ITIMs wird eine vom Toll-ähnlichen Rezeptor (Englisch: Toll-like receptor (TLR)) gesteuerte Entzündungsreaktion blockiert sowie verschiedene immunsuppressive Signalwege aktiviert. So wird auch die Signaltransduktion des T-Zell Rezeptors (TCR) herunterreguliert (Yin und Gao, 2020). Dadurch können CD24 exprimierende Tumoren durch eine Interaktion mit Tumor-assoziierten Makrophagen über Siglec-10 immunsuppressiv wirken und auch das erworbene Immunsystem in Tumoren inhibieren (Barkal et al., 2019) (Abb. 3, Yin und Gao, 2020). Physiologisch wird die Interaktion zwischen CD24/Siglec-10 als wichtiger Regulator der immunsuppressiven Antwort in Plazentagewebe zur Immuntoleranz angesehen (Sammar et al., 2021).



**Abb. 3: Interaktion zwischen CD24 und Siglec-10.**

Aktivierung von Siglec-10 auf einer Immunzelle über Bindung von CD24 auf einer Tumorzelle, wodurch über eine Signalkaskade TLRs und TCRs herunterreguliert werden. (GPI, Glykosylphosphatidylinositol-Anker; CD24, Cluster of differentiation 24; Siglec-10, Sialic-acid-binding Ig-like lectin 10; ITIM, Immune receptor tyrosine inhibitory motif; SHP-1/2, Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatases; TLR, Toll-like receptor; TCR, T-cell receptor). Aus Yin und Gao, 2020, Figure 1

#### 1.3.4 CD24 und Metastasierung

Eine entscheidende Rolle bezüglich des Metastasierungsrisikos von CD24 exprimierenden Tumoren scheint P-Selectin als Bindungspartner von CD24 zu spielen. Physiologisch ist P-Selectin als Zelladhäsionsmolekül auf aktivierten Endothelzellen und Thrombozyten bei der Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut bei Entzündungsreaktionen wichtig (Perkins et al., 2019). Im inaktiven Zustand der Endothelzellen wird P-Selectin in Granula intrazellulär gespeichert und infolge einer Ausschüttung entzündlicher Cytokine aus den Granula auf die Plasmamembran übertragen (Perkins et al., 2019). Da auch zirkulierende Tumorzellen Cytokine sezernieren, tragen diese zur Expression von P-Selectin auf Endothelzellen bei. So können CD24+ Tumorzellen über eine CD24-P-Selectin Interaktion

an Endothelzellen im Gefäßsystem binden, was eine hämatogene Metastasierung begünstigt (Friederichs et al., 2000).

### 1.3.5 CD24 in Tumoren

CD24 wird in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert und spielt eine wichtige tumorbilologische und prognostische Rolle. So wurde in Ovarial- und Mammakarzinomen festgestellt, dass eine erhöhte Expression von CD24 mit einem schlechteren Gesamt- sowie krankheitsfreien Überleben verbunden war (Kristiansen et al., 2002; Kristiansen et al., 2003b). Zudem wurden im Mausmodell humane Mammakarzinomzellen in immundefiziente Mäuse eingebracht und es konnten Stammzeleigenschaften bei CD44+/CD24- Zellen festgestellt werden (Al-Hajj et al., 2003). Auch in nicht-kleinzelligen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen der Lunge zeigten sich verstärkte CD24 Expressionen, wobei CD24 Überexpressionen häufiger und höher in der Untergruppe der Adenokarzinome zu beobachten waren (Kristiansen et al., 2003a). In beiden Subgruppen der Lungenkarzinome war eine erhöhte CD24 Expression ebenfalls mit einem schlechteren medianen Überleben verbunden (Kristiansen et al., 2003a). In kolorektalen Karzinomen wurden kontroverse Ergebnisse bezüglich des Überlebens der Patienten und einer erhöhten CD24 Expression in Tumorzellen festgestellt. In der Studie von Weichert et al. (2005) zeigten Patienten mit hohen CD24 Expressionen in Tumorzellen ein verschlechtertes medianes Überleben, während in der Studie von Yeo et al. (2016) Patienten mit hohen CD24 Expressionen sogar ein verbessertes Gesamt- und krankheitsfreies Überleben zeigten. Demgegenüberstehend zeigte sich in Adenokarzinomen des Pankreas zwar ebenfalls eine Überexpression von CD24 allerdings ohne Auswirkungen auf das Gesamtüberleben der Patienten (Kristiansen et al., 2004). Weiter konnte in klarzelligen Nierenzellkarzinomen gezeigt werden, dass hohe CD24 Expressionen zu einem niedrigeren Gesamt- sowie krankheitsfreien Überleben führten (Arik et al., 2017). In Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle in T1-T2 Stadien konnte bislang kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer CD24 Expression und krankheitsfreiem Überleben nachgewiesen werden (Tamatani et al., 2018).

### 1.3.6 CD24 in HNSCC

In HNSCC konnte CD24 mit Chemotherapieresistenz in Verbindung gebracht werden. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass CD24 exprimierende HNSCC Zellen eine erhöhte Chemotherapieresistenz zeigen (Modur et al., 2016). Insbesondere bei CD44+/CD24+ Zellen konnte in HNSCC ein Stammzellcharakter festgestellt werden, der es den Zellen ermöglicht, sich selbst zu erneuern und zu differenzieren (Han et al., 2014). Damit schaffen CD24-positive Tumorzellen nicht nur eine Inhibition des angeborenen Immunsystems mittels Siglec-10 Interaktion, sondern auch eine Therapieresistenz mithilfe von Selbsterneuerung und Differenzierung gegenüber Chemotherapeutika. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte sind CD24-positive Tumorzellen in HNSCC mit einer besonders schlechten Prognose verbunden (Modur et al., 2016). Aus diesen Gründen ist eine genauere Charakterisierung der CD24 Expression auf HNSCC Tumorzellen sowie dessen Interaktionspartner Siglec-10 interessant und soll in dieser Arbeit näher beleuchtet werden.

#### 1.4 Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit

HNSCC sind häufige Tumoren, die meist in späten Stadien diagnostiziert werden und mit einer schlechten Prognose verbunden sind. Neben der chirurgischen Resektion gibt es wenige Therapiemöglichkeiten. Die Immuntherapie gegen PD-1 konnte für HNSCC etabliert werden, wobei nicht alle Patienten hiervon profitieren. Makrophagen als protumorale Zellen der Tumormikroumgebung könnten ein weiteres Ziel für eine Immuntherapie sein. Ein tumortoleranter Phänotyp wird in Makrophagen und anderen Immunzellen unter anderem durch CD24 exprimierende Tumorzellen über eine Interaktion mit Siglec-10 induziert. Neben dieser immunsuppressiven Komponente reguliert CD24 in Tumorzellen Zellmigration, Invasion und Proliferation. CD24 kann Stammzeleigenschaften und eine Chemotherapieresistenz induzieren und ist am Metastasierungsprozess beteiligt. Dies macht auch CD24 zu einem attraktiven Ziel für eine Anti-Tumor-Therapie. In dieser Arbeit soll die Expression von CD24 und Siglec-10 sowie die Infiltrationsdichte CD68 positiver Zellen als Marker für eine Makrophageninfiltration und ihre Expression an der Tumor-Stromagrenze in HNSCC-Kohorten (n=156) analysiert werden und mit klinisch pathologischen Daten korreliert werden. Damit soll die Rolle von CD24 in HNSCC und die Interaktion von CD24 mit Siglec-10 und Makrophagen untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden auf Tissue-Microarrays (TMAs) der Bonner HNSCC Kohorte (vgl. Müller et al., 2017) von Frau Steiner, medizinisch-technische Assistentin des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn, auf Immunhistochemieautomaten (Leica, Ventana, MEDAC) angefertigt (Tab. 1). Die gefärbten Gewebeschnitte der TMAs wurden hochauflösend mit dem Panoramic MIDI 1.14 3D Histotech (2010) Scanner digitalisiert.

**Tab. 1: Angaben zu den verwendeten Antikörpern und den Färbeprotokollen.**

	<b>Antikörpername</b>	<b>Herstellerfirma</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Vorbehandlung/ Puffer</b>
<b>CD68</b>	M 0876	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	1:100	pH6 Citratpuffer
<b>Siglec-10</b>	MAB 2130	R&D Systems, Minneapolis, USA	1:50	pH8 CC1
<b>CD24</b>	Clone SWA11, Serum (Glen Kristiansen et al., 2010)	Bereitstellung durch Prof. Dr. Peter Altevogt	1:25	keine

### 2.2 Das Auswertungsprogramm QuPath

#### 2.2.1 Allgemeines zu QuPath

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem zur semiquantitativen Analyse dienenden Bildanalyseprogramm QuPath ausgewertet. QuPath ist ein frei zugängliches, nicht kommerzielles Programm (Englisch: Open source software), das am Center for Cancer Research & Cell Biology der Queen's University Belfast kreiert und an der University of Edinburgh weiterentwickelt wurde. Das Programm wurde als Java Applikation betriebssystemübergreifend basierend auf Java 8 mit JavaFX als Benutzerinterface geschrieben (Bankhead et al., 2017). QuPath ermöglicht, über Algorithmen Tumorzellen automatisiert zu erkennen und positive Zellen einer immunhistochemischen Färbung zu de-



tektieren. Außerdem ist mit QuPath unter anderem möglich, die absolute und relative Anzahl an positiven Zellen sowie weitere wichtige pathologische Größen wie beispielsweise den H-Score zu bestimmen, welcher sich aus den Prozentsätzen von Färbeintensitätsstufen multipliziert mit den jeweiligen Intensitätsstufen (niedrig = 1, mittel = 2, hoch = 3) errechnet (Fedchenko und Reifenrath, 2014). Mithilfe dieser Möglichkeiten werden insbesondere großskalierte pathologische Projekte möglich, um große Kohorten zeiteffizient, objektiv und ressourcensparend zu analysieren. Im Hinblick auf die Analyseergebnisse bietet QuPath eine gute Reproduzierbarkeit und Reliabilität, hervorgerufen durch die Objektivität des Analyseprogrammes (Bankhead et al., 2017). Für diese Arbeit wurde die QuPath Version 0.2.0-m8 verwendet.

### 2.2.2 Die Arbeit mit QuPath

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte in zwei Schritten. Als Erstes erfolgte die Detektion positiver Zellen und danach eine Unterscheidung zwischen Tumor und Stroma, welche mittels künstlicher Intelligenz erfolgte. Die Detektion positiver Zellen erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Entwicklers Dr. Peter Bankhead, wobei für die einzelnen Färbungen einzelne Anpassungen durchgeführt wurden. Die Gewebe-Cores wurden manuell markiert und die Pixelgröße wurde auf 0,2325  $\mu\text{m}$  festgelegt, da die Pixelhöhe und -breite für die eingescannten Färbungen bei 0,2325  $\mu\text{m}$  lagen. Obwohl CD68 zytoplasmatisch exprimiert wird, wurde als Target Struktur der Auswertung der IHC der Nukleus ausgewählt (Anhang 1). Dadurch wurde eine Fehlklassifikation der Makrophagen mit ihren länglichen Zellausläufern in mehrere Unterzellen, die häufig in der zytoplasma-gestützten Erkennung der Makrophagen auftrat, verhindert. Da die Zellzahl/Infiltrationsdichte der Makrophagen untersucht werden sollte und nicht die Färbeintensität, ergab sich hieraus keine Fehlauswertung. Bei den membranären und zytoplasmatischen CD24 und Siglec-10 Färbungen wurden als Target Struktur der Auswertung der IHC ebenfalls der Nukleus gewählt, um ebenfalls eine Fehlklassifikation von lang ausgezogenen Zellen in Unterzellen zu verhindern (Anhang 2, 3). Dieses Vorgehen entspricht auch den Empfehlungen des Entwicklers als Optimierungsmöglichkeit zur Verbesserung der Bildanalyse (Bankhead, 2018).

Nach der Darstellung der mittleren Färbeintensitäten in sogenannten Schwellenwertdiagrammen (Englisch: „Thresholdmaps“) sowie der Verteilungsbreite wurde sich in der

CD68 Färbung für den Schwellenwert der Färbeintensität (Englisch: „Cut-Off“) bei 0,3 entschieden (Anhang 1, 8). Grund für diese Entscheidung war die Problematik, dass sehr längliche ausgezogene Zellen in niedrigeren Cut-Off Stufen oftmals in mehrere Zellen unterteilt wurden. Anders wurde bei der CD24 Färbung verfahren. Hier wurde die untere Thresholdgrenze auf 0,2 festgelegt, da hier bei einer niedrigeren Färbeintensität bessere positive Zelldetektionen festgestellt werden konnten (Anhang 2). Bei der Siglec-10 IHC wurde die untere Thresholdgrenze auf 0,15 eingestellt, da hier die Färbeintensität der IHC insgesamt schwächer ausgefallen ist und somit die positiven Zellen bereits in niedrigeren Intensitätsstufen als positiv gelten (Anhang 3).

Nach der Etablierung der Erkennung positiver Zellen folgte der Algorithmus (Englisch: „Classifier“) für die Unterscheidung zwischen Tumor- und Stromabereichen. Dafür wurden aus verschiedenen Cores Beispielareale für Tumor- und für Stromabereiche ausgewählt und in die Kategorien „Tumor“ oder „Stroma“ eingeordnet, an welchen das Programm mittels künstlicher Intelligenz eine Unterscheidung zwischen Tumor und Stroma erlernte. Darauf basierend wurde ein Algorithmus mit verschiedenen Merkmalen ausgewählt, unter anderem als Classifier Typ „Random Trees“, der für verschiedene Zelltypen geeignet ist. Außerdem wurden die Zellmerkmale festgelegt, anhand derer das Programm die Unterscheidung zwischen Tumor- und Stromazellen vornehmen sollte. Der Classifier für die CD24, Siglec-10 und CD68 Färbung ist bis auf zwei Unterschiede identisch. So gibt es bei der CD68 Färbung zusätzlich zu den beiden Einteilungsklassen Tumor und Stroma noch eine weitere Klasse für Nekrosen. Außerdem enthält der Classifier bei der CD68 und Siglec-10 Färbung zusätzlich zu den miteinbezogenen grundlegenden Zellmerkmalen sogenannte „Smoothed 25  $\mu\text{m}$ “ Merkmale. „Smoothed 25  $\mu\text{m}$ “ bezieht sich auf das Vorgehen, einen gewichteten Durchschnitt der Messungen der Zellen im Umkreis von 25  $\mu\text{m}$  in die Beurteilung miteinzubeziehen (Anhang 5, 6). Sowohl im späteren Algorithmusskript der CD24 Färbung als auch im Skript der CD68 und Siglec-10 Färbung ist dieser Glättungsschritt vor dem Classifier eingebaut. Im Classifier taucht dieser Schritt daher nicht mehr bei der später bearbeiteten CD24 Färbung auf (Anhang 4, 7, 8, 9).

Nach dem Fertigstellen des Classifiers wurden alle Schritte zu einem Algorithmusskript zusammengefügt (Anhang 7, 8, 9).

Mit diesen Skripten wurden alle Gewebe-Cores der drei Färbungen bearbeitet. Im Anschluss daran wurden bei der CD68 IHC die berechneten Daten der relativen Häufigkeiten

der positiv detektierten Zellen im Tumor, im Stroma und im gesamten Core aus QuPath entnommen für die weitere statistische Auswertung. Zudem erfolgte eine visuelle Beurteilung des Anteils CD68 positiver Zellen im Tumor, im Stroma und an der Tumor-Stromagrenze zur Abschätzung der tumorassoziierten Makrophagen. Des Weiteren wurde für die CD68 Färbung händisch die Anzahl der positiven Zellen pro  $\mu\text{m}^2$  berechnet. Dafür wurden die absoluten Zahlen der positiven Zellen aus dem Tumor, dem Stroma und aus den Nekrosearealen für jedes Core aus QuPath ermittelt und zusammengerechnet sowie anschließend durch die Fläche des jeweiligen Cores geteilt. Für die Charakterisierung der CD24 Färbung wurde zusätzlich zu den relativen Häufigkeiten der positiven Zellen im Tumor aus QuPath auch für jedes Core der von QuPath berechnete H-Score entnommen. Ähnlich wurde auch bei der Siglec-10 Färbung verfahren. Hier wurde ebenfalls zusätzlich zu den relativen Häufigkeiten der positiven Zellen im Tumor der Tumor H-Score aus QuPath entnommen.

### 2.3 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm IBM SPSS Statistics 26. Die Untersuchungen auf Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test beziehungsweise mit dem Kruskal-Wallis-H-Test durchgeführt. Die Unterschiede in Überlebenszeiten wurden mithilfe des Log-Rank-Tests und Kaplan-Meier-Schätzers dargestellt. Dabei wurde das Gesamtüberleben als Zeit zwischen Erstdiagnose und Versterben beziehungsweise letzter klinischer Nachuntersuchung definiert. Weiter wurde das Überleben auch anhand von Cox-Regressionsmodellen unter Angleichen von klinischen Kovariablen auf Unterschiede getestet. Außerdem wurden Korrelationen mithilfe des Spearman-Rho untersucht. Alle statistischen Tests waren zweiseitig und eine statistische Signifikanz wurde bei P-Werten  $<0,05$  angenommen.

### 2.4 Das Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv setzt sich aus einer Kohorte von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches zusammen. Die Kohorte besteht aus Patienten mit Tumoren der Mundhöhle, des Oropharynx, des Hypopharynx oder des Larynx, die am Universitätsklinikum Bonn zwischen 2011 und 2016 behandelt wurden (Tab. 2). Dabei wurden Patienten mit lokalisierten oder lokal fortgeschrittenen Stadien in die Studie

eingeschlossen. Alle Patienten wurden kurativ intendierend operiert mit optionaler adjuvanter Radiochemotherapie oder definitiver Radiochemotherapie. Die Studie wurde anonym durchgeführt und von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Bonn genehmigt (#148/11).

**Tab. 2: Patientenkollektiv.**

Übersicht über die klinisch-pathologischen Merkmale der Patientenkohorte. Für den HPV-Status der Gewebeproben wurde eine p16-Färbung am TMA durchgeführt und der molekular nachgewiesene HPV-Status und p16-Nachweis verwendet. (SD, Standard Deviation).

	<b>CD68</b> n=156	<b>CD24</b> n=151	<b>Siglec-10</b> n=140
<b>Gesamtzahl der Patienten</b>			
<b>Geschlecht</b>			
Männlich	90	78	74
Weiblich	18	17	17
<b>Alter Mittelwert [SD]</b>	64,5 [9,4]	64,3 [9,3]	62,8 [9,4]
<b>Lokalisation Primarius</b>			
Mundhöhle	8	7	7
Oropharynx	62	55	52
Hypopharynx	8	7	6
Larynx	30	26	26
Unbekannt	48	56	49
<b>Rauchen</b>			
Nichtraucher	6	6	5
Raucher	45	39	40
Unbekannt	105	106	95
<b>Alkohol</b>			
Kein Alkohol	2	2	2
Wenig Alkohol	5	5	5
Mäßig Alkohol	25	21	20
Viel Alkohol	15	14	14
Unbekannt	109	109	99
<b>HPV-Status/p16</b>			
Positiv	37	40	37
Negativ	105	108	101
Unbekannt	14	3	2
<b>pT-Stadium</b>			
pTis	1	1	1
pT1	27	25	23
pT2	55	50	47
pT3	33	34	33

pT4	19	22	20
Unbekannt	21	19	16
<b>pN-Stadium</b>			
pN0	52	50	49
pN1	20	19	15
pN2	50	51	50
pN3	2	3	3
Unbekannt	32	28	23
<b>M-Stadium</b>			
M0	75	65	63
M1	1	1	1
Unbekannt	80	85	76
<b>Graduierung</b>			
G0	0	0	0
G1	2	3	3
G2	78	76	72
G3	55	52	48
Unbekannt	21	20	17

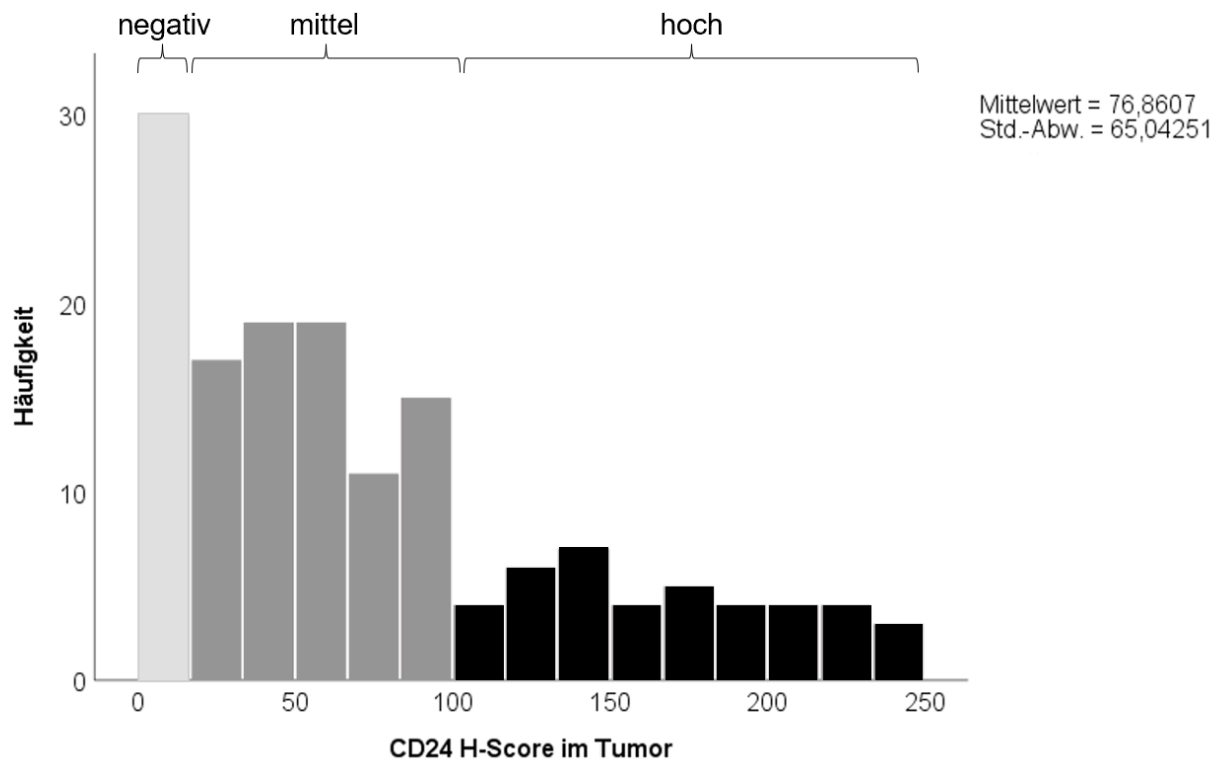
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Immunhistochemische Analysen

In dieser Arbeit wurden in den Bonner HNSCC-Kohorten die Färbeintensität und Expression von CD68, CD24 und Siglec-10 untersucht. Für die CD68 Färbung standen Gewebeproben von 156 Patienten zur Verfügung, für die CD24 Färbung wurden 151 Gewebeproben analysiert und die Siglec-10 Expression wurde an Gewebeproben von 140 Patienten untersucht (Tab. 2).

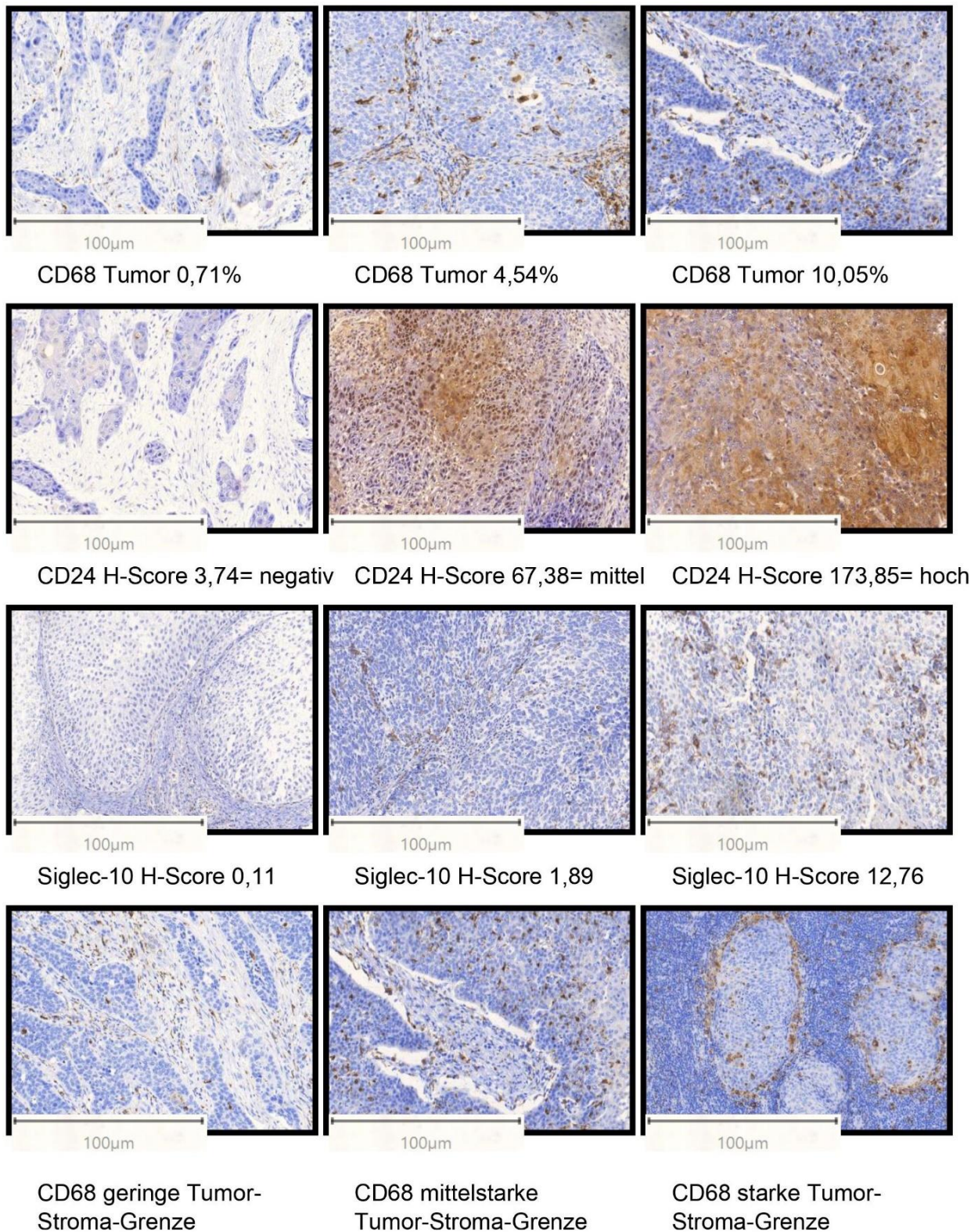
In der Kohorte zeigte sich mit rund 37 % am häufigsten Tumorstadium pT2 und in circa 58 % der Fälle fanden sich Lymphknotenmetastasen (Tab. 2). Der Mittelwert der Infiltrationsdichte CD68 positiver Zellen lag im Tumor bei 1,39 % mit einem maximalen Wert von 8,2 % sowie einem minimalen Wert von 0 %. Die mittlere Färbeintensität für CD24, die mithilfe des H-Scores bestimmt wurde, lag bei 76,86 mit einem maximalen Wert von 246,72 sowie einem minimalen Wert von 1,24. In tumorfreien Gewebeproben lag die mittlere CD24 Färbeintensität gemessen am H-Score bei 69,54. Anhand der Häufigkeitsverteilung der CD24 Expression wurde diese in die Kategorien negative Expression (H-Score kleiner 16), CD24 Expression mittlerer Intensität (H-Score zwischen 16 und 100) und hohe CD24 Expression (H-Score größer 100) eingeteilt (Abb. 4). Dabei zeigten sich in dieser

Kohorte CD24 negative Tumoren in 18,4 % und eine besonders hohe CD24 Expression in 27 % der Fälle. Am häufigsten zeigte sich mit 54,6 % der Fälle eine mittlere CD24 Expression. Die Bestimmung des H-Scores der Siglec-10 Färbung zeigte einen Mittelwert von 3,63 mit einem Maximum bei 20,62 und einem Minimum bei 0. In einigen Fällen konnte eine Akzentuierung CD68 positiver Zellen im Bereich der Tumor-Stroma-Grenze beobachtet werden (Abb. 5). In der überwiegenden Zahl der Fälle war eine solche klare Grenzlinie von CD68 positiver Zellen allerdings nicht zu erkennen.



**Abb. 4: CD24 Expression im Tumor: Histogramm H-Score.**

Häufigkeitsverteilung der CD24 Expression im Tumor (H-Score). Visuelle Einteilung in die Kategorien negative (H-Score < 16), mittlere (H-Score 16-100) und hohe CD24 Expressionen (H-Score > 100).



**Abb. 5: Repräsentative Beispielbilder der immunhistochemischen Färbungen für CD68, CD24 und Siglec-10. 123x Vergrößerung.**

1. Zeile: Infiltrationsdichte CD68+ Zellen im Tumor.

2. Zeile: CD24 Expression: H-Score im Tumor.
3. Zeile: Siglec-10 Intensität (H-Score) im Tumor.
4. Zeile: Dichte CD68+ Zellen im Bereich der Tumor-Stroma-Grenze.

### 3.2 Auswertung CD24 Färbung

CD24 wurde in der Bonner HNSCC Kohorte zumeist mit mittlerer Intensität exprimiert (Abb. 4). Es fanden sich weder in der Auswertung mittels visueller Klassifizierung noch mittels nicht parametrischer Tests signifikante Unterschiede der CD24 Expression zwischen den Tumorstadien, den Nodalstadien, der Fernmetastasierung sowie dem Alkoholkonsum. HPV positive HNSCC zeigten eine signifikant niedrigere CD24 Expression als HPV negative HNSCC ( $p=0,001$ ; Tab. 3). Zudem wiesen schlechter differenzierte Tumoren eine signifikant niedrigere CD24 Expression auf ( $p=0,025$ ; Tab. 3). Die CD24 Expression korrelierte invers mit der Infiltrationsdichte CD68 positiver und CD8 positiver Zellen (CD68:  $r=-0,330$ ,  $p=0,01$ ; CD8:  $r=-0,322$ ,  $p=0,01$ ). Die Daten zur CD8 Expression wurden freundlicherweise von Herrn Marvin Hürther zur Verfügung gestellt, der eine parallele Dissertationsarbeit zu anderen Kontrollpunkt-molekülen in HNSCC durchführt.

Die CD24 Expression war kein prognostischer Marker für das Gesamtüberleben nach Einteilung der CD24 Expression anhand des Medians in hohe und niedrige CD24 H-Scores im Tumor (Log-Rank-Test  $p=0,443$ ; Abb. 6). Auch in der multivariaten Cox-Analyse mit einer Angleichung der klinischen Kovariablen pT-Stadium, pN-Stadium und HPV-Status war CD24 kein prognostischer Marker und zeigte keine erhöhte Hazardrate für Patienten mit hoher oder niedriger CD24 Expression ( $p=0,709$ ; Hazardrate 1,215; Anhang 11, Tab. 5).

**Tab. 3: Assoziation von CD68, CD24 und Siglec-10 mit klinisch-pathologischen Daten.**

Ergebnisse der nicht parametrischen Tests der Mittelwerte der CD68 Zelldichte im Tumor, der Mittelwerte des CD24 Tumor H-Scores und der Mittelwerte des Siglec-10 Tumor H-Scores in Bezug auf klinisch-pathologische Charakteristika mit zugehörigen p-Werten.

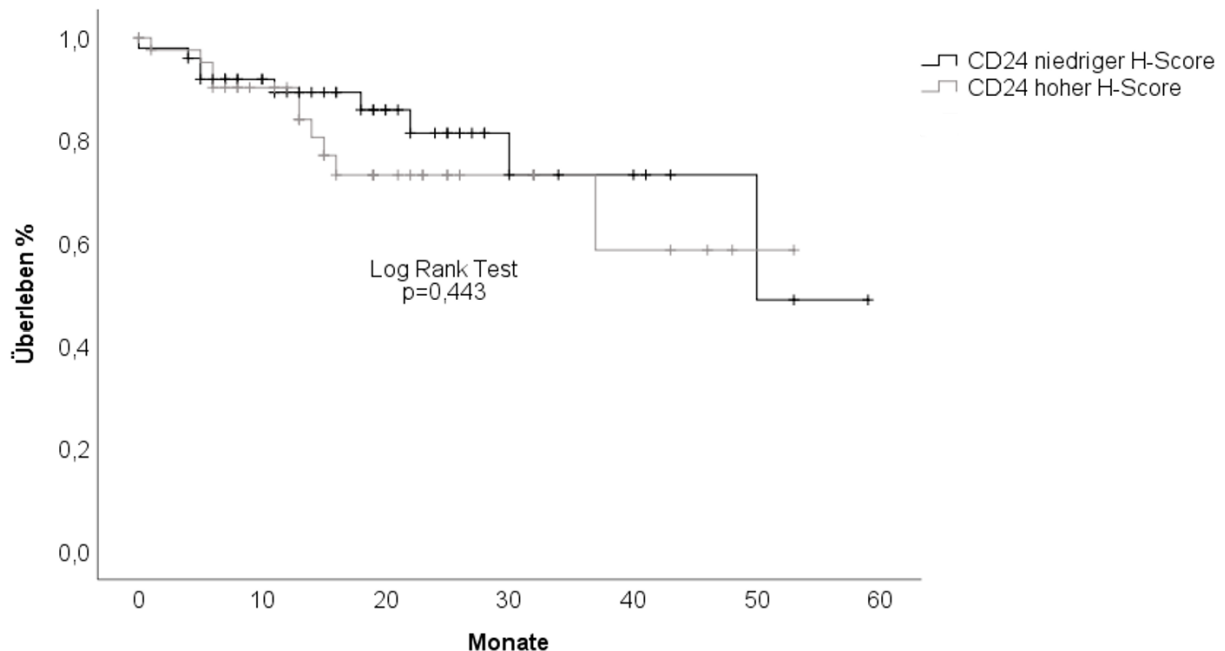
	Mittelwert CD68 Zell- dichte (% positive im Tumor)	p-Wert	Mittelwert CD24 Ex- pression (H-Score Tumor)	p-Wert	Mittelwert Siglec-10 Expression (H-Score Tumor)	p-Wert
<b>Geschlecht</b>						



Männlich	0,016	p=0,378 (1)	71,852	p=0,741 (1)	2,713	p=0,521 (1)
Weiblich	0,016		64,829		3,358	
<b>Lokalisation</b>						
Mundhöhle	0,014	p=0,116 (2)	69,404	p=0,867 (2)	2,127	p=0,447 (2)
Oropharynx	0,016		68,639		3,073	
Hypopharynx	0,016		67,058		1,298	
Larynx	0,016		76,301		2,9	
<b>Rauchen</b>						
Nicht-raucher	0,014	p=0,151 (1)	41,43	p=0,124 (1)	2,36	p=0,773 (1)
Raucher	0,016		67,089		2,783	
<b>Alkohol</b>						
Kein Alkohol	0,003	p=0,389 (2)	70,812	p=0,827 (2)	4,207	<b>p=0,038</b> (2)
Wenig Alkohol	0,02		40,486		4,02	
Mäßig Alkohol	0,016		81,898		1,636	
Viel Alkohol	0,016		56,703		3,39	
<b>HPV-Status/p16</b>						
Positiv	0,014	<b>p&lt;0,001</b> (1)	56,094	<b>p=0,001</b> (1)	3,047	p=0,91 (1)
Negativ	0,014		86,219		3,879	
<b>pT-Stadium</b>						
pTis	0,002	p=0,095 (2)	47,63	p=0,224 (2)	4,037	p=0,772 (2)
pT1	0,014		86,237		3,251	
pT2	0,014		64,556		4,044	
pT3	0,014		91,064		3,1	
pT4	0,014		59,073		3,585	
<b>pN-Stadium</b>						
pN0	0,014	p=0,364 (2)	73,135	p=0,615 (2)	3,33	p=0,202 (2)
pN1	0,014		69,544		3,8	
pN2	0,014		73,553		3,441	
pN3	0,017		28,719		5,558	
<b>M-Stadium</b>						
M0	0,016	p=0,177 (1)	70,173	p=0,512 (1)	3,086	p=0,850 (1)
M1	0,039		86,52		2,567	
<b>Graduierung</b>						
G0	-	p=0,124 (2)	-	<b>p=0,025</b> (2)	-	p=0,182 (2)
G1	0,02		142,104		2,108	
G2	0,014		83,375		3,545	
G3	0,014		58,052		3,414	

(1) Mann-Whitney-U-Test asymptotischer Signifikanz

(2) Kruskal-Wallis-H-Test asymptotischer Signifikanz



**Abb. 6: Überlebensfunktion CD24 H-Score.**

Kaplan-Meier-Schätzer für das Gesamtüberleben. Einteilung in hohe und niedrige H-Scores im Tumor anhand der 50 %-Perzentile.

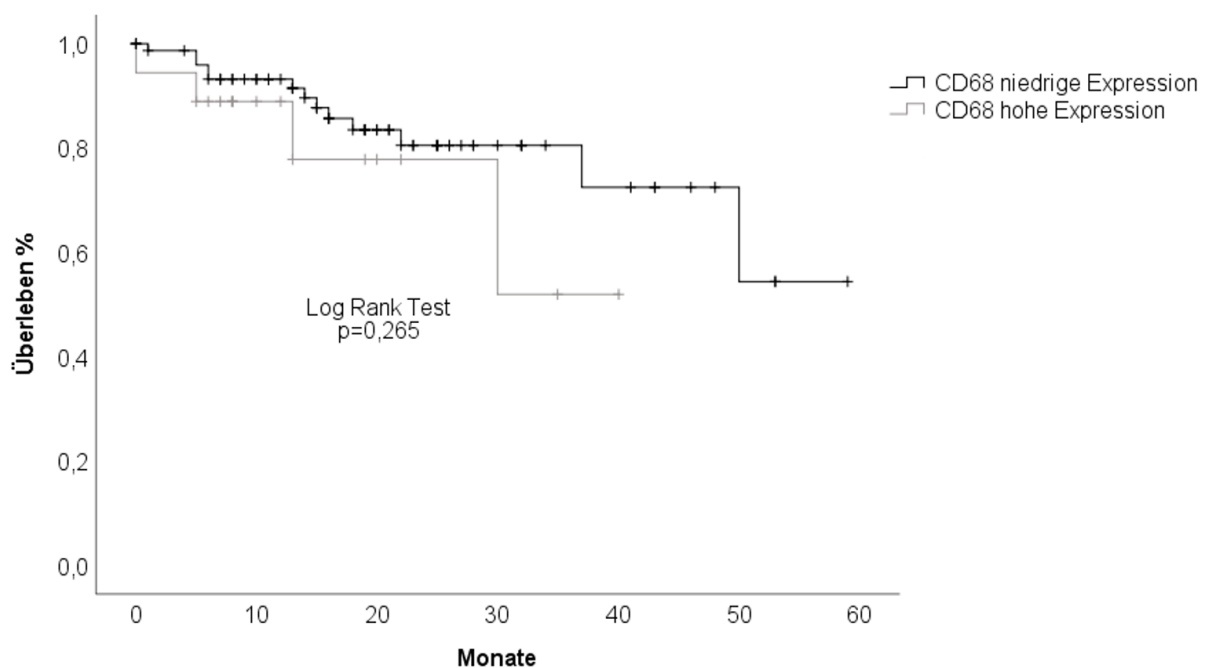
### 3.3 Auswertung CD68 Färbung

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Infiltrationsdichte CD68 positiver Zellen im Tumor bezüglich des Tumorstadiums, des Nodalstatus, der Graduierung, des Vorhandenseins von Fernmetastasen sowie des Alkoholkonsums der Patienten (Tab. 3). Es fand sich allerdings bei HPV/p16 positiven Tumoren eine signifikant vermehrte Infiltration CD68 positiver Zellen im Tumor ( $p < 0,001$ ; Tab. 3).

Die Infiltrationsdichte CD68 positiver Zellen im Tumor korrelierte signifikant mit der CD8 Infiltrationsdichte ( $r = 0,227$ ,  $p = 0,01$ ). Es fanden sich weitere Korrelationen der Akzentuierung der CD68 Infiltration an der Tumor-Stroma-Grenze und des Nodalstatus der Patienten ( $r = 0,218$ ,  $p < 0,05$ ) sowie der CD68 Infiltrationsdichte im Tumor und der Siglec-10 Expression im Tumor ( $r = 0,290$ ,  $p = 0,01$ ). Auch zeigte sich eine Korrelation der CD68 Infiltrationsdichte im Tumor mit dem HPV-Status ( $r = 0,291$ ,  $p = 0,01$ ). Antiproportional verhielt sich

allerdings die Korrelation der CD68 Expression im Tumor zu der CD24 Expression im Tumor ( $r=-0,330$ ,  $p=0,01$ ).

Bei der Überlebensanalyse stellte sich kein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen HNSCC Patienten mit einer hohen Infiltrationsdichte CD68 positiver Zellen im Vergleich zu Patienten mit einer niedrigen Infiltrationsdichte CD68 positiver Zellen dar (Log-Rank-Test  $p=0,265$ ; Abb. 7). Auch in der multivariaten Cox-Analyse mit einer Angleichung der klinischen Kovariablen pT-Stadium, pN-Stadium und HPV-Status war CD68 kein prognostischer Marker und zeigte keine erhöhte Hazardrate für Patienten mit einer hohen Infiltrationsdichte CD68 positiver Zellen ( $p=0,218$ ; Hazardrate 2,091; Anhang 10, Tab. 4).



**Abb. 7: Überlebensfunktion CD68 Expression.**

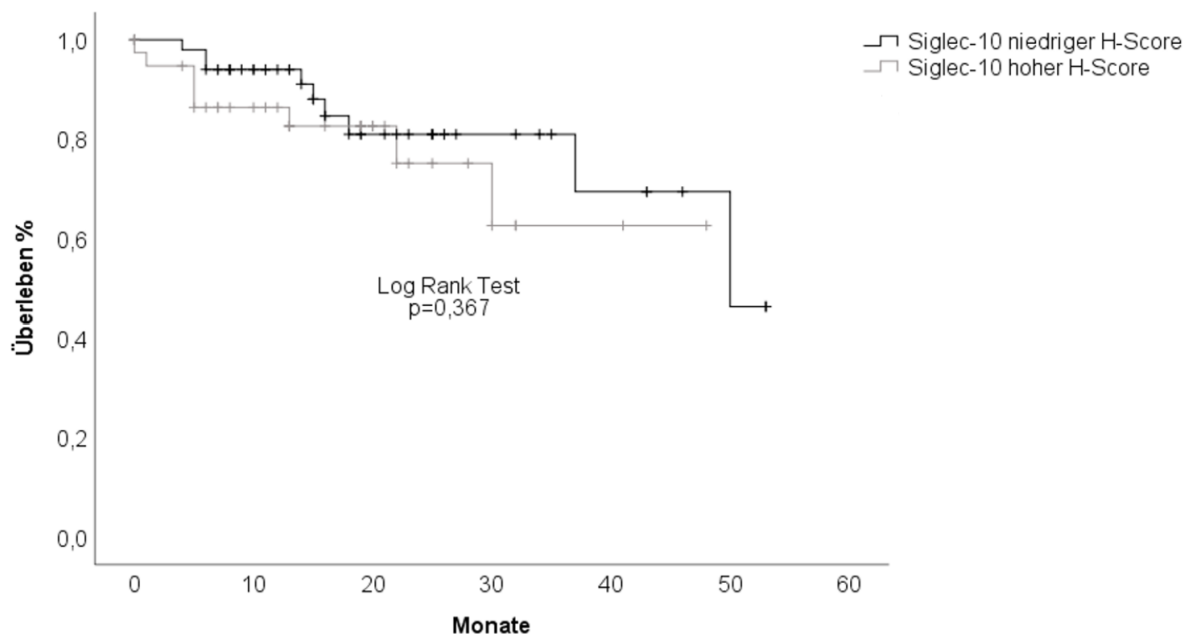
Kaplan-Meier-Schätzer für das Gesamtüberleben. Einteilung in hohe und niedrige CD68 Expressionswerte anhand der 75 %-Perzentile.

### 3.4 Auswertung Siglec-10 Färbung

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Siglec-10 Expression zwischen den verschiedenen Tumorstadien, bezüglich der Graduierung, des Nodalstadiums sowie der Fernmetastasen (Tab. 3). Patienten mit einem höheren Alkoholkonsum wiesen eine signifikant niedrigere Siglec-10 Expression auf ( $p=0,038$ ; Tab. 3).

In der Überlebenszeitanalyse fiel kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit von HNSCC Patienten mit einem niedrigen Siglec-10 H-Score im Vergleich zu Patienten mit einem hohen Siglec-10 H-Score auf (Log-Rank-Test  $p=0,367$ ; Abb. 8). Auch in der multivariaten Cox-Analyse mit einer Angleichung der klinischen Kovariablen pT-Stadium, pN-Stadium und HPV-Status war Siglec-10 kein prognostischer Marker und zeigte keine erhöhte Hazardrate für Patienten mit hoher oder niedriger Siglec-10 Expression ( $p=0,396$ ; Hazardrate 1,573; Anhang 12, Tab. 6).

Allerdings fiel die positive Korrelation zwischen der Siglec-10 Expression im Tumor und der Infiltrationsdichte CD68 positiver Zellen im Tumor auf ( $r=0,290$ ,  $p=0,01$ ). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Siglec-10 und CD24 Expression festgestellt werden.



**Abb. 8: Überlebensfunktion Siglec-10 H-Score.**

Kaplan-Meier-Schätzer für das Gesamtüberleben. Einteilung in hohe und niedrige H-Scores im Tumor anhand der 50 %-Perzentile.

## 4. Diskussion

### 4.1 CD24 Expression in HNSCC

CD24 wird in vielen Tumorentitäten überexprimiert und ist mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert. Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von CD24 und seinen

Interaktionspartnern Siglec-10 und Makrophagen in HNSCC zu untersuchen und mit klinisch-pathologischen Daten zu korrelieren. CD24 wurde in der Bonner HNSCC-Kohorte überwiegend mit mittlerer Intensität exprimiert (H-Scores zwischen 16 und 100).

Schlechter differenzierte HNSCC zeigten eine signifikant niedrigere CD24 Expression. Dies unterscheidet sich von anderen Tumorentitäten wie beispielsweise dem klarzelligem Nierenzellkarzinom oder dem Urothelkarzinom der Blase, in welchen eine schlechtere Differenzierung mit einer höheren CD24 Expression assoziiert war (Arik et al., 2017; Choi et al., 2007). Dies könnte damit zusammenhängen, dass insbesondere bei HNSCC die WHO-Graduierung der Plattenepithelkarzinome kein gutes Prognosekriterium darstellt, da Plattenepithelkarzinome histologisch sehr heterogen wachsen (Almangush et al., 2020). Neuere Erkenntnisse zur Tumorbilogie, wie beispielsweise die inflammatorische Tumoreaktion, werden in der aktuellen Graduierung nicht miteinbezogen (Almangush et al., 2020).

Es fand sich keine Assoziation der CD24 Expression mit dem Tumorstadium und Lymphknotenmetastasen. Dies zeigte sich auch in der Studie von Tamatani et al. (2018) in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, in der eine CD24 Expression ebenfalls keine Assoziation mit der Tumorgöße und Lymphknotenmetastasen zeigte. Anders als in dieser Arbeit zeigte sich dort allerdings auch keine Assoziation mit der histologischen Differenzierung (Tamatani et al., 2018). Zudem zeigte sich keine Assoziation zwischen einer CD24 Expression und dem T- und N-Stadium in Nierenzellkarzinomen und kolorektalen Karzinomen (Arik et al., 2017; Weichert et al., 2005). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Urothelkarzinomen der Blase eine signifikante Assoziation zwischen einer CD24 Überexpression und höheren T-Stadien und höheren Graduierungen, während es keine Assoziation zu höheren N-Stadien gab (Choi et al., 2007). In dieser Arbeit zeigten HPV negative HNSCC eine signifikant höhere CD24 Expression als HPV positive HNSCC. In HNSCC ist ein positiver HPV-Status mit einer besseren Prognose assoziiert (Alsahafi et al., 2019). Dies kann unter anderem daran liegen, dass HPV+ HNSCC Patienten besser auf Radiotherapie und Chemotherapie ansprechen als HPV- HNSCC Patienten (Alsahafi et al., 2019). Eine CD24 Expression hingegen wird mit einer erhöhten Chemotherapieresistenz assoziiert (Modur et al., 2016). Dies könnte daraufhin deuten, dass CD24 insbesondere bei HPV- HNSCC Teil eines eher Radiochemotherapie resistenten Subtyps ist.

Des Weiteren zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der CD24 Expression in den Tumorzellen und der Dichte CD68 positiver Makrophagen. Diese negative und statistisch hochsignifikante Korrelation kann durch die protumoralen und antiinflammatorischen Eigenschaften von CD24 erklärt werden, da es durch Interaktion mit Siglec-10 auf Tumormakrophagen zu inhibitorischen, immunsuppressiven Signalkaskaden und letztendlich zu einer fehlenden Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen und weiteren Immunzellen durch die CD24 Expression kommt (Yin und Gao, 2020). In diesem Zusammenhang kann vermutlich ebenfalls die negative Korrelation zwischen der tumoralen CD24 Expression und der Dichte CD8 positiver Lymphozyten gesehen werden, da über CD24 gesteuerte Signalwege ebenfalls eine Herabregulierung des T-Zell Rezeptors und konsekutiv auch der CD8 positiven T-Zellen realisiert wird (Yin und Gao, 2020). Dieser letztere Zusammenhang ist bisher nicht beschrieben worden und stellt ein wichtiges und unerwartetes Ergebnis dieser Dissertation dar. Barkal et al. (2019) konnte die immunsuppressive Funktion von CD24 in Ovarial- und Mammakarzinomen bereits *in vitro* und *in vivo* zeigen. In ihrer Studie war eine hohe CD24 Expression mit einem schlechteren rezidivfreien Überleben bzw. Gesamtüberleben in Ovarial- und Mammakarzinomen assoziiert (Barkal et al., 2019). In klarzelligen Nierenkarzinomen zeigte sich ebenfalls ein niedrigeres Gesamt- sowie krankheitsfreies Überleben bei hohen CD24 Expressionen (Arik et al., 2017). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit kein Unterschied im Gesamtüberleben in HNSCC bezogen auf die CD24 Expressionen nachgewiesen werden. Mögliche Gründe für die Unterschiede in den Überlebenszeiten können neben den morphologisch unterschiedlichen Tumorarten auch die Verwendung unterschiedlicher Anti-CD24 Antikörper für die IHC sein. Während in dieser Arbeit Antikörper des Clones SWA11 verwendet wurden, waren es bei Barkal et al. (2019) Antikörper des Clones SN3 beziehungsweise SN3b bei Arik et al. (2017). Mit Hinblick auf die Antikörperspezifität konnte insbesondere für den Anti-CD24 Antikörper des Clones SWA11 durch Bindung des CD24 Kernproteins eine höhere Spezifität im Vergleich zu den Clones SN3 beziehungsweise SN3b mit Bindung an Glykanepitope festgestellt werden (Kristiansen et al., 2010). In der Studie von Tamatani et al. (2018) konnten in Bezug auf HNSCC ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Überlebenszeit durch CD24 Expression in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle nachgewiesen werden. Dort wurden Gewebeproben von 70 Patienten in T1 und T2 Stadien mit CD24 Antikörpern des Clons 8.B.76 untersucht. Die IHC Färbungen wurden

dabei in die Kategorien CD24 positiv, wenn mehr als 10 % der Tumorzellen positiv waren, und CD24 negativ unterschieden. Im Gegensatz dazu möchte diese Arbeit CD24 in HNSCC von 156 Patienten mit Tis-T4 Tumorstadien mit den CD24 Antikörpern des Clons SWA11 untersuchen. Weiter erfolgte die Auswertung der CD24 Expression semiquantitativ anhand des Tumor H-Scores, der mithilfe des Bildanalyseprogrammes QuPath bestimmt wurde. Bei Pankreaskarzinomen zeigten sich ebenfalls keine signifikanten CD24 abhängigen Unterschiede in der Überlebenszeitanalyse (Kristiansen et al., 2004). Bei kolorektalen Karzinomen wurden in Studien kontroverse Ergebnisse festgestellt. Auf der einen Seite konnte in der Studie von Weichert et al. (2005) eine Verschlechterung des Gesamtüberlebens bei starken CD24 Expressionen in kolorektalen Karzinomen festgestellt werden. Die Studie von Yeo et al. (2016) zeigte auf der anderen Seite eine Assoziation von höheren CD24 Expressionen mit einem verlängerten Gesamt- und krankheitsfreien Überleben. Die CD24 Expression hat je nach Tumorentität unterschiedliche Effekte auf das Überleben, wobei CD24 insbesondere bei Adenokarzinomen eine besondere Rolle zu spielen scheint. Dafür könnte beispielsweise auch die häufigere und höhere Expression von CD24 in Adenokarzinomen der Lunge im Vergleich zu Plattenepithelkarzinomen sprechen, wobei beide Untergruppen bei einer erhöhten CD24 Expression ein schlechteres medianes Überleben zeigten (Kristiansen et al., 2003a). Bei Plattenepithelkarzinomen scheint die Expression von CD24 in Tumorzellen allerdings von geringerer prognostischer Relevanz zu sein.

#### 4.2 Rolle CD68 positiver Zellen in HNSCC

Der Anteil CD68 positiver Zellen an der Tumor-Stroma-Grenze in HNSCC korreliert mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, was sich mit Ergebnissen bereits veröffentlichter Studien deckt, die ebenfalls zeigen konnten, dass eine höhere Dichte CD68 positiver Zellen mit vermehrten Lymphknotenmetastasen assoziiert ist (Kumar et al., 2019). Insbesondere TAMs stehen dabei im Vordergrund und werden in Verbindung mit protumoralen Funktionen und einem schlechteren klinischen Outcome gesetzt (Petty und Yang, 2017). Allerdings ist zu bedenken, dass CD68 ein allgemeiner Marker für Makrophagen ist und nicht spezifisch zwischen TAMs, M1 oder M2 Makrophagen unterscheidet. Des Weiteren zeigte sich eine Korrelation der Infiltrationsdichte CD68 positiver Zellen mit der Infiltrationsdichte CD8 positiver Zellen in HNSCC Patienten. Dies erscheint zunächst

widersprüchlich, da CD68+ TAMs die Aktivierung und Funktion von CD8+ Zellen hemmen (Petty und Yang, 2017). Neuere Erkenntnisse bei Plattenepithelkarzinomen der Lunge zeigen allerdings, dass Makrophagen feste Interaktionen mit CD8+ Zellen eingehen und damit die Funktion von CD8+ Zellen gehemmt wird (Peranzoni et al., 2018). Da CD68 ein genereller Marker für Makrophagen ist und der Übergang zwischen den Makrophagen-subtypen M1/M2 in einem dynamischen Kontinuum steht, kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass auch M1 Makrophagen im Zuge einer generellen Immunreaktion zusammen mit CD8+ Zellen in HNSCC vorkommen und eine Korrelation der beiden Zelltypen hervorrufen (Kumar et al., 2019).

Eine vermehrte Infiltration CD68 positiver Zellen war mit einem positiven HPV/p16-Status assoziiert. Dies zeigten auch andere Studien, die bei HPV+ HNSCC ebenfalls eine höhere Dichte an CD68 positiver Makrophagen feststellen konnten (Seminerio et al., 2018). HPV/p16 positive Tumoren haben häufig eine vermehrte Immunantwort. Für HPV assoziierte zervikale Tumoren konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der Tumorprogression vermehrt TAMs auftreten (Song et al., 2015).

Anders als in dieser Studie war in anderen Untersuchungen die Infiltrationsdichte CD68 positiver Zellen ein prognostischer Marker, wobei unterschiedliche Ergebnisse für das intratumorale Kompartiment und das stromale Kompartiment vorliegen: So war in einer Studie von Seminerio et al. (2018) eine vermehrte Infiltrationsdichte CD68 positiver Zellen im intratumoralen Kompartiment von HNSCC mit einem kürzeren Gesamt- und rezidivfreien Überleben assoziiert, nicht aber im stromalen Kompartiment. Demgegenüber zeigte sich in der Studie von Ni et al. (2015) ein signifikant schlechteres Gesamt- und krankheitsfreies Überleben bei hohen Zelldichten CD68 positiver Zellen im Tumorstroma von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, nicht aber für das intratumorale Kompartiment. In der Studie von Troiano et al. (2019) hingegen zeigte sich wie in dieser Studie in HNSCC kein Unterschied im Gesamt- oder krankheitsfreiem Überleben in Bezug auf CD68+ TAMs in HNSCC. Mögliche Gründe für diese Unterschiede und die schwierige Reproduzierbarkeit könnten unterschiedliche Quantifizierungsmethoden und Kohortengrößen (n=110 bei Seminerio et al. (2018) beziehungsweise n=91 bei Ni et al. (2015) und n=156 in dieser Studie) sein. Problematisch bei der Auswertung von CD68 IHCs kann auch sein, dass CD68 auch in anderen mononukleären Phagozyten sowie in geringer Konzentration auch in B-/T-Lymphozyten und außerhalb der hämatopoetischen Zelltypen in Fibroblasten und



Endothelzellen exprimiert wird und dies bei der Auswertung berücksichtigt werden sollte (Chistiakov et al., 2017). In anderen Tumorentitäten wie Ösophagus- und Magenkarzinomen war die Infiltrationsdichte CD68 positiver Zellen mit einem schlechteren Überleben assoziiert (Jeremiasen et al., 2020; Wang et al., 2017). Im Gegensatz dazu konnte in fortgeschrittenen malignen Melanomen ähnlich wie in dieser Studie kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben für Patienten mit oder ohne einer Infiltration CD68+ Makrophagen festgestellt werden (Tremble et al., 2020). Auch in nicht metastasierten Mammakarzinomen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben bei Patienten mit einer hohen Anzahl an CD68+ Zellen (Ni et al., 2019).

#### 4.3 Rolle Siglec-10 positiver Zellen in HNSCC

HNSCC Patienten mit niedrigen Siglec-10 Expressionen zeigten eine Assoziation mit einem höheren Alkoholkonsum. Bei Betrachtung der Auffächerung der Siglec-10 Expression entsprechend der unterschiedlichen Häufigkeitskategorien für den Alkoholkonsum fällt allerdings eine unerwartet niedrige Siglec-10 Expression in der Kategorie „mäßig Alkohol“ mit einem H-Score von 1,636 auf (Tab. 3). Dieser Trend zu abnehmenden H-Scores mit steigendem Alkoholkonsum setzt sich hingegen nicht in der Kategorie „viel Alkohol“ mit einem H-Score von 3,39 fort, sodass bei diesem signifikanten Unterschied am ehesten von einem statistischen Artefakt ausgegangen werden kann (Tab. 3).

Des Weiteren fiel eine positive Korrelation zwischen der Siglec-10 Expression und der Zelldichte CD68 positiver Zellen bei HNSCC Patienten auf. Dies passt zur biologischen Funktion von Siglec-10, welches auf der Zelloberfläche von Tumormakrophagen exprimiert wird und unter anderem mit CD24 interagiert (Yin und Gao, 2020). In Ovarial- und Mammakarzinomen konnten ebenfalls hohe Siglec-10 Expressionen auf tumorassoziierten Makrophagen nachgewiesen werden (Barkal et al., 2019).

In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben bezogen auf die Siglec-10 Expression in HNSCC festgestellt werden. Im Unterschied dazu wurde in hepatozellulären Karzinomen ein schlechteres Überleben bei vermehrter Expression von Siglec-10 beschrieben (Yin und Gao, 2020). Dies könnte daran liegen, dass Siglec-10 physiologisch von Immunzellen wie beispielsweise Makrophagen exprimiert wird und somit nicht spezifisch der Tumorimmunsysteminteraktion zuzuordnen ist (Yin und Gao, 2020). Lediglich die Interaktion von Siglec-10 mit auf Tumorzellen exprimierten Liganden

wie CD24 führt schließlich zu immunsupprimierenden Signalkaskaden mit Auswirkungen auf das Gesamtüberleben der Patienten. Außerdem wurde bei der Untersuchung in HNSCC nicht unterschieden, ob die Expression von Siglec-10 auf Makrophagen oder anderen Immunzellen erfolgt, was die Aussagekraft der Untersuchung einschränkt.

#### 4.4 Ausblick

Makrophagen spielen in der Tumormikroumgebung eine wichtige Rolle und sind in vielen Tumorentitäten mit einer schlechten Prognose assoziiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD68 in HNSCC mit dem Nodalstatus und dem HPV-Status korreliert. Da CD68 nur ein allgemeiner Marker für Makrophagen ist, wären weitere Untersuchungen interessant, die zwischen M1, M2 und TAMs differenzieren. Zur genaueren Charakterisierung des vorrangigen Makrophagensubtypens im Tumor wäre in der Folge eine weitere Differenzierung der Subtypen notwendig, um Tumoren mit einer besonders hohen Dichte an protumoral agierenden TAMs herauszustellen und deren spezifische Auswirkung in HNSCC zu untersuchen und in Zusammenhang mit der CD24 Expression und Siglec-10 Expression zu stellen. Momentan existiert allerdings noch keine einheitliche Vorgehensweise, welche Marker zur Makrophagensubtypisierung Verwendung finden sollten. Da der Übergang zwischen den Makrophagensubtypen in einem dynamischen Kontinuum steht, gestaltet sich die genaue Charakterisierung von TAMs schwierig. Es werden verschiedene Marker wie beispielsweise die Kombination aus CD68 als allgemeiner Makrophagenmarker mit CD163, CD206 oder CD204 als Marker für M2 Makrophagen beziehungsweise humanes Leukozyten-Antigen Isotyp DR (HLA-DR), phosphorylierter Signalweiterleiter und Transkriptionsaktivator 1 (Englisch: Phosphorylated signal transducer and activator of transcription 1 (pSTAT1)) oder induzierbare NO Synthase (Englisch: Inducible nitric oxide synthase (iNOS)) als Marker für M1 Makrophagen angewendet (Jayasingam et al., 2020). Darüber können Rückschlüsse auf TAMs gezogen werden, da CD163 beispielsweise als Marker für Makrophagen vom M2-Phänotyp aufgrund funktioneller Ähnlichkeiten auch auf TAMs exprimiert wird (Kumar et al., 2019). In der Studie von Troiano et al. (2019) konnte bereits ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben durch CD163+ TAMs in HNSCC festgestellt werden. Insbesondere vor dem Hintergrund der Vergleichbarkeit von Studienergebnissen sowie zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit

sollte an einheitlichen Vorgehensweisen zur Detektion tumorassoziierter Makrophagen gearbeitet werden.

CD24 könnte eine Rolle in Bezug auf das Metastasierungsrisiko, die Chemotherapieresistenz und Immunsuppression in HNSCC spielen und daher möglicherweise als geeignetes Therapieziel dienen. In HNSCC sprechen dafür die negativen Korrelationen von CD24 mit CD8 und CD68 als Hinweis auf immunsuppressive Eigenschaften CD24 positiver Tumoren. Allerdings konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben von HNSCC mit hohen CD24 Expressionen festgestellt werden. Außerdem fehlen bislang *in vivo* Daten zur Chemotherapieresistenz in CD24 positiven HNSCC, sodass weitere klinische Studien zur Chemotherapieresistenz in CD24 positiven HNSCC durchgeführt werden sollten.

Des Weiteren erhöht CD24 über eine Interaktion mit P-Selectin das Metastasierungsrisiko. Daher wäre es interessant, die Expression von P-Selectin in HNSCC zu untersuchen und mit der CD24 Expression und klinisch-pathologischen Daten zu korrelieren.

Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass Siglec-10 in HNSCC wahrscheinlich keinen prognostischen Biomarker darstellt. Da Siglec-10 auf CD68+ Makrophagen in Tumornähe exprimiert wird, fehlt bislang die Charakterisierung des genauen Einflusses von Siglec-10 auf die Tumorummunsysteminteraktion. Daher sollte zur genaueren Differenzierung die Siglec-10 Expression in Verbindung mit der Makrophagensubtypisierung untersucht werden. Außerdem sollten weitere Immunzellen auf eine Siglec-10 Expression und die Verbindung mit CD24 untersucht werden, um in diesem Zusammenhang mögliche prognostische Rückschlüsse treffen zu können.

## **5. Zusammenfassung**

Diese Arbeit beabsichtigte, CD24 im Zusammenspiel mit CD68 und Siglec-10 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma zu untersuchen. HNSCC sind immunogene Tumoren mit einem heterogenen Ansprechen auf aktuelle Therapieoptionen wie der Immuncheckpoint-Therapie. Da ein tumortoleranter Phänotyp in Makrophagen und anderen Immunzellen unter anderem durch CD24 exprimierende Tumorzellen über eine Interaktion mit Siglec-10 induziert wird, stellen diese Marker mögliche neue Therapieansätze dar. Die

Expression von CD24 und Siglec-10 sowie die Infiltrationsdichte CD68 positiver Zellen/Makrophagen wurden in einer großen HNSCC-Kohorte (n=156) untersucht und mit klinisch-pathologischen Daten korreliert.

CD24 zeigte vermehrte Expressionsintensitäten bei Patienten mit negativem HPV-Status. Da HPV negative HNSCC insgesamt mit einer schlechteren Prognose verbunden sind, stützt die vermehrte CD24 Expression in HPV negativen HNSCC die möglichen protumoralen Eigenschaften von CD24. Zudem weisen die inversen Korrelationen zwischen der CD24 und CD68 Expression sowie zwischen der CD24 und CD8 Expression in HNSCC auf die immunsuppressiven Eigenschaften von CD24 hin. Jedoch konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens in der Kaplan-Meier-Kurve durch eine verstärkte CD24 Expression in HNSCC festgestellt werden.

Ein höherer Nodalstatus korrelierte signifikant mit einer vermehrten Infiltration CD68 positiver Zellen an der Tumor-Stroma-Grenze. Des Weiteren war die Zelldichte CD68 positiver Zellen mit HPV/p16 positiven HNSCC assoziiert. Allerdings konnte kein signifikanter Einfluss von vermehrten CD68 positiven Zellen in HNSCC auf das Gesamtüberleben der Patienten nachgewiesen werden.

Die Expression von Siglec-10 zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben bei HNSCC Patienten. Die positive Korrelation von Siglec-10 mit CD68 verdeutlicht den Expressionsort von Siglec-10 auf tumorassoziierten Makrophagen. Es konnte allerdings keine Korrelation von Siglec-10 mit seinem Liganden CD24 in dieser HNSCC Kohorte nachgewiesen werden.

## 6. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Mechanismus der Anti-PD-1 Therapie.	12
<b>Abbildung 2:</b> Aufbau/Struktur von CD68 (LAMP-4) im Vergleich mit anderen LAMPs.	18
<b>Abbildung 3:</b> Interaktion zwischen CD24 und Siglec-10.	21
<b>Abbildung 4:</b> CD24 Expression im Tumor: Histogramm H-Score.	30
<b>Abbildung 5:</b> Repräsentative Beispielbilder der immunhistochemischen Färbungen für CD68, CD24 und Siglec-10. 123x Vergrößerung.	31
<b>Abbildung 6:</b> Überlebensfunktion CD24 H-Score.	34
<b>Abbildung 7:</b> Überlebensfunktion CD68 Expression.	35
<b>Abbildung 8:</b> Überlebensfunktion Siglec-10 H-Score.	36

## 7. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Angaben zu den verwendeten Antikörpern und den Färbeprotokollen.	24
<b>Tabelle 2:</b> Patientenkollektiv.	28
<b>Tabelle 3:</b> Assoziation von CD68, CD24 und Siglec-10 mit klinisch-pathologischen Daten.	32
<b>Tabelle 4:</b> Cox-Regressionsmodell CD68 Expression.	62
<b>Tabelle 5:</b> Cox-Regressionsmodell CD24 Expression.	62
<b>Tabelle 6:</b> Cox-Regressionsmodell Siglec-10 Expression.	62

## 8. Literaturverzeichnis

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3983–3988

Almangush A, Mäkitie AA, Triantafyllou A, de Bree R, Strojjan P, Rinaldo A, Hernandez-Prera JC, Suárez C, Kowalski LP, Ferlito A, Leivo I. Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. *Oral Oncol* 2020; 107: 104799

Alsahafi E, Begg K, Amelio I, Raulf N, Lucarelli P, Sauter T, Tavassoli M. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death Dis* 2019; 10: 540

Altevogt P, Sammar M, Hüser L, Kristiansen G. Novel insights into the function of CD24: a driving force in cancer. *Int J Cancer* 2020; 148: 546–559

Arik D, Can C, DüNDAR E, Kabukçuoğlu S, Paşaoğlu Ö. Prognostic Significance of CD24 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2017; 23: 409–416

Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft (Fachausschuss der Bundesärztekammer), 2020: Stellungnahme der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft zur frühen Nutzenbewertung gemäß § 35a SGB V: Pembrolizumab. <https://www.akdae.de/Stellungnahmen/AMNOG/A-Z/Pembrolizumab/> (Zugriffsdatum: 23.12.2020)

Bankhead P, 2018: Pete's blog: Detecting positive cells. <https://petebankhead.github.io/qupath/tips/2018/03/22/setting-positive.html> (Zugriff am 23.03.2022)

Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, James JA, Salto-Tellez M, Hamilton PW. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 2017; 7: 16878

Barkal AA, Brewer RE, Markovic M, Kowarsky M, Barkal SA, Zaro BW, Krishnan V,

Hatakeyama J, Dorigo O, Barkal LJ, Weissman IL. CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy. *Nature* 2019; 572: 392–396

Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, Wolf U. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. *RKI* 2016; 1-274

Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Sacconi A, Sironi M, Bottazzi B, Doni A, Vincenzo B, Pasqualini F, Vago L, Nebuloni M, Mantovani A, Sica A. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF- $\kappa$ B and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* 2006; 107: 2112–2122

Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev Y V. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest* 2017; 97: 4–13

Choi Y-L, Lee S-H, Kwon G-Y, Park C-K, Han J-J, Choi JS, Choi HY, Kim S-H, Shin YK. Overexpression of CD24: Association With Invasiveness in Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 275–281

Dietz A. Neue Strategien in der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren. 51. Fortbildungsveranstaltung für Hals-Nasen-Ohrenärzte 2017; 1–7

Economopoulou P, de Bree R, Kotsantis I, Psyrri A. Diagnostic Tumor Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) in the Clinical Setting. *Front Oncol* 2019; 9: 827

Eggermont AMM, Blank CU, Mandala M, Long GV, Atkinson V, Dalle S, Haydon A, Lichinitser M, Khattak A, Carlino MS, Sandhu S, Larkin J, Puig S, Ascierto PA, Rutkowski P, Schadendorf D, Koornstra R, Hernandez-Aya L, Maio M, van den Eertwegh AJM, Grob J-J, Gutzmer R, Jamal R, Lorigan P, Ibrahim N, Marreaud S, van Akkooi ACJ, Suci S, Robert C. Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. *N Engl J Med* 2018; 378: 1789–1801

Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. *Diagn Pathol* 2014; 9: 221



Friederichs J, Zeller Y, Hafezi-Moghadam A, Gröne H-J, Ley K, Altevogt P. The CD24/P-selectin binding pathway initiates lung arrest of human A125 adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60: 6714–6722

Germano G, Frapolli R, Belgiovine C, Anselmo A, Pesce S, Liguori M, Erba E, Uboldi S, Zucchetti M, Pasqualini F, Nebuloni M, van Rooijen N, Mortarini R, Beltrame L, Marchini S, Fuso Nerini I, Sanfilippo R, Casali PG, Pilotti S, Galmarini CM, Anichini A, Mantovani A, D'Incalci M, Allavena P. Role of Macrophage Targeting in the Antitumor Activity of Trabectedin. *Cancer Cell* 2013; 23: 249–262

Han J, Fujisawa T, Husain SR, Puri RK. Identification and characterization of cancer stem cells in human head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2014; 14: 173

Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* 2020; 10: 727–742

Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003; 260: 502–508

Heusinkveld M, van der Burg SH. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med* 2011; 9: 216

Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 1993; 81: 1607–1613

Jayasingam SD, Citartan M, Thang TH, Mat Zin AA, Ang KC, Ch'ng ES. Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Front Oncol* 2020; 9: 1512

Jeremiasen M, Borg D, Hedner C, Svensson M, Nodin B, Leandersson K, Johansson J, Jirström K. Tumor-Associated CD68+, CD163+, and MARCO+ Macrophages as Prognostic Biomarkers in Patients With Treatment-Naïve Gastroesophageal Adenocarcinoma. *Front Oncol* 2020; 10: 534761

Kay R, Rosten PM, Humphries RK. CD24, a signal transducer modulating B cell activation

responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. *J Immunol* 1991; 147: 1412–1416

Kay R, Takei F, Humphries RK. Expression cloning of a cDNA encoding M1/69-J11d heat-stable antigens. *J Immunol* 1990; 145: 1952–1959

Kim J, Bae J-S. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. *Mediators Inflamm* 2016; 2016: 6058147

Kristiansen G, Denkert C, Schlüns K, Dahl E, Pilarsky C, Hauptmann S. CD24 Is Expressed in Ovarian Cancer and Is a New Independent Prognostic Marker of Patient Survival. *Am J Pathol* 2002; 161: 1215–1221

Kristiansen G, MacHado E, Bretz N, Rupp C, Winzer KJ, König AK, Moldenhauer G, Marmé F, Costa J, Altevogt P. Molecular and clinical dissection of CD24 antibody specificity by a comprehensive comparative analysis. *Lab Invest* 2010; 90: 1102–1116

Kristiansen G, Sammar M, Altevogt P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol* 2004; 35: 255–262

Kristiansen G, Schlüns K, Yongwei Y, Denkert C, Dietel M, Petersen I. CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 2003a; 88: 231–236

Kristiansen G, Winzer K-J, Mayordomo E, Bellach J, Schlüns K, Denkert C, Dahl E, Pilarsky C, Altevogt P, Guski H, Dietel M. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003b; 9: 4906–4913

Kuang D-M, Zhao Q, Peng C, Xu J, Zhang J-P, Wu C, Zheng L. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med* 2009; 206: 1327–1337

Kumar AT, Knops A, Swendseid B, Martinez-Outschoom U, Harshyne L, Philp N, Rodeck U, Luginbuhl A, Cognetti D, Johnson J, Curry J. Prognostic Significance of Tumor-Associated Macrophage Content in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. *Front Oncol* 2019; 9: 656

Lei Q, Wang D, Sun K, Wang L, Zhang Y. Resistance Mechanisms of Anti-PD1/PDL1 Therapy in Solid Tumors. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 672

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2012: Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mundhöhlenkarzinoms, Langversion 2.0, AWMF-Registernummer: 007-100OL. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mundhoehlenkarzinom/> (Zugriffsdatum: 10.10.2020)

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2019: S3 Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Larynxkarzinoms, Langversion 1.1, AWMF-Registernummer: 017/076OL. <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/larynxkarzinom/> (Zugriffsdatum: 18.10.2020)

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2021: S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, Langversion 3.0, AWMF-Registernummer: 007-100OL. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mundhoehlenkarzinom/> (Zugriffsdatum: 11.11.2021)

Linde N, Lederle W, Depner S, van Rooijen N, Gutschalk CM, Mueller MM. Vascular endothelial growth factor-induced skin carcinogenesis depends on recruitment and alternative activation of macrophages. *J Pathol* 2012; 227: 17–28

Liu Q, Yu S, Zhao W, Qin S, Chu Q, Wu K. EGFR-TKIs resistance via EGFR-independent signaling pathways. *Mol Cancer* 2018; 17: 53

Lopez-Beltran A, Cimadamore A, Blanca A, Massari F, Vau N, Scarpelli M, Cheng L, Montironi R. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Bladder Cancer. *Cancers* 2021; 13: 131

Manukian G, Bar-Ad V, Lu B, Argiris A, Johnson JM. Combining Radiation and Immune Checkpoint Blockade in the Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol* 2019; 9: 122

Modur V, Joshi P, Nie D, Robbins KT, Khan AU, Rao K. CD24 Expression May Play a Role as a Predictive Indicator and a Modulator of Cisplatin Treatment Response in Head

and Neck Squamous Cellular Carcinoma. *PLOS ONE* 2016; 11: e0156651

Mohammadi A, Blesso CN, Barreto GE, Banach M, Majeed M, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization and function in response to curcumin, a diet-derived polyphenol, as an immunomodulatory agent. *J Nutr Biochem* 2019; 66: 1–16

Müller T, Braun M, Dietrich D, Aktekin S, Höft S, Kristiansen G, Göke F, Schröck A, Brägelmann J, Held SAE, Bootz F, Brossart P. PD-L1: a novel prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2017; 8: 52889–52900

Ni C, Yang L, Xu Q, Yuan H, Wang W, Xia W, Gong D, Zhang W, Yu K. CD68- and CD163-positive tumor infiltrating macrophages in non-metastatic breast cancer: a retrospective study and meta-analysis. *J Cancer* 2019; 10: 4463–4472

Ni Y-H, Ding L, Huang X-F, Dong Y, Hu Q-G, Hou Y-Y. Microlocalization of CD68+ tumor-associated macrophages in tumor stroma correlated with poor clinical outcomes in oral squamous cell carcinoma patients. *Tumor Biol* 2015; 36: 5291–5298

Niu M, Yi M, Li N, Luo S, Wu K. Predictive biomarkers of anti-PD-1/PD-L1 therapy in NSCLC. *Exp Hematol Oncol* 2021; 10: 18

Peranzoni E, Lemoine J, Vimeux L, Feuillet V, Barrin S, Kantari-Mimoun C, Bercovici N, Guérin M, Biton J, Ouakrim H, Régnier F, Lupo A, Alifano M, Damotte D, Donnadiou E. Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; 115: E4041–E4050

Perkins LA, Anderson CJ, Novelli EM. Targeting P-selectin adhesion molecule in molecular imaging: P-selectin expression as a valuable imaging biomarker of inflammation in cardiovascular disease. *J Nucl Med* 2019; 60: 1691–1697

Petty AJ, Yang Y. Tumor-associated macrophages: Implications in cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 2017; 9: 289–302

Pulte D, Brenner H. Changes in Survival in Head and Neck Cancers in the Late 20th and Early 21st Century: A Period Analysis. *Oncologist* 2010; 15: 994–1001

Ragos V, Mastronikolis NS, Tsiambas E, Baliou E, Mastronikolis SN, Tsoukalas N, Patsouri EE, Fotiades PP. p53 mutations in oral cavity carcinoma. *J BUON* 2018; 23: 1569–1572

Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, Hrsg. *Leukocyte Typing II*. New York: Springer Verlag, 1986

Sammar M, Siwetz M, Meiri H, Sharabi-Nov A, Altevogt P, Huppertz B. Reduced Placental CD24 in Preterm Preeclampsia Is an Indicator for a Failure of Immune Tolerance. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 8045

Seminario I, Kindt N, Descamps G, Bellier J, Lechien JR, Mat Q, Pottier C, Journé F, Saussez S. High infiltration of CD68+ macrophages is associated with poor prognoses of head and neck squamous cell carcinoma patients and is influenced by human papillomavirus. *Oncotarget* 2018; 9: 11046–11059

Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012; 122: 787–795

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 10–29

Smigiel KS, Parks WC. Macrophages, Wound Healing, and Fibrosis: Recent Insights. *Curr Rheumatol Rep* 2018; 20: 17

Song D, Li H, Li H, Dai J. Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer. *Oncol Lett* 2015; 10: 600–606

Suzuki T, Kiyokawa N, Taguchi T, Sekino T, Katagiri YU, Fujimoto J. CD24 Induces Apoptosis in Human B Cells Via the Glycolipid-Enriched Membrane Domains/Rafts-Mediated Signaling System. *J Immunol* 2001; 166: 5567–5577

Tamatani T, Takamaru N, Ohe G, Akita K, Nakagawa T, Miyamoto Y. Expression of CD44, CD44V9, ABCG2, CD24, Bmi-1 and ALDH1 in stage I and II oral squamous cell carcinoma and their association with clinicopathological factors. *Oncol Lett* 2018; 16: 1133–1140

Tremble LF, McCabe M, Walker SP, McCarthy S, Tynan RF, Beecher S, Werner R, Clover AJP, Power XDG, Forde PF, Heffron CCBB. Differential association of CD68+ and CD163+ macrophages with macrophage enzymes, whole tumour gene expression and overall survival in advanced melanoma. *Br J Cancer* 2020; 123: 1553–1561

Troiano G, Caponio VCA, Adipietro I, Tepedino M, Santoro R, Laino L, Lo Russo L, Cirillo N, Lo Muzio L. Prognostic significance of CD68+ and CD163+ tumor associated macrophages in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2019; 93: 66–75

Tweardy DJ, Grandis JR. Elevated Levels of Transforming Growth Factor alpha and Epidermal Growth Factor Receptor Messenger RNA Are Early Markers of Carcinogenesis in Head and Neck Cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 3579–3584

UICC. 2014 Review of Cancer Medicines on the WHO List of Essential Medicines: Locally advanced squamous carcinoma of the head and neck. 2014; 1–8

Wang XL, Liu K, Liu JH, Jiang XL, Qi LW, Xie YF, Li JF, Yang L, Chen YZ, Liu CX, Li SG, Cui XB, Zou H, Pang LJ, Zhao J, Qi Y, Cao YW, Liang WH, Jiang JF, Shen XH, Yuan XL, Hu JM, Li F. High infiltration of CD68-tumor associated macrophages, predict poor prognosis in Kazakh esophageal cancer patients. *Int J Clin Exp Pathol* 2017; 10: 10282–10292

Weichert W, Denkert C, Burkhardt M, Gansukh T, Bellach J, Altevogt P, Dietel M, Kristiansen G. Cytoplasmic CD24 Expression in Colorectal Cancer Independently Correlates with Shortened Patient Survival. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6574–6581

Whitney G, Wang S, Chang H, Cheng K-Y, Lu P, Zhou XD, Yang W-P, McKinnon M, Longphre M. A new siglec family member, siglec-10, is expressed in cells of the immune system and has signaling properties similar to CD33. *Eur J Biochem* 2001; 268: 6083–6096

Wittekind C, Hrsg. TNM Klassifikation maligner Tumoren (Achte Aufl). Weinheim: WILEY-VCH, 2020

Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 2016; 44: 450–462

Yang J, Liao D, Chen C, Liu Y, Chuang T-H, Xiang R, Markowitz D, Reisfeld RA, Luo Y. Tumor-Associated Macrophages Regulate Murine Breast Cancer Stem Cells Through a Novel Paracrine EGFR/Stat3/Sox-2 Signaling Pathway. *Stem Cells* 2013; 31: 248–258

Yeo M-K, Lee Y-M, Seong I-O, Choi S-Y, Suh K-S, Song KS, Lee C-S, Kim JM, Kim K-H. Up-regulation of cytoplasmic CD24 expression is associated with malignant transformation but favorable prognosis of colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2016; 36: 6593–6598

Yin S-S, Gao F-H. Molecular Mechanism of Tumor Cell Immune Escape Mediated by CD24/Siglec-10. *Front Immunol* 2020; 11: 1324

Zhou G, Liu Z, Myers JN. TP53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Impact on Disease Progression and Treatment Response. *J Cell Biochem* 2016; 117: 2682–2692

Zhu P, Wang Y, Zhang W, Liu X. Anti-PD1/PD-L1 monotherapy vs standard of care in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine* 2021; 100: e24339

## 9. Anhang

**Anhang 1:** Für die CD68 immunhistochemischen Färbungen wurden die BTMAs 92A, 92B, 92C, 92D, 92E, 92F, 92G, 92H der Bonner HNSCC Kohorte verwendet.

### **Positive cell detection CD68 IHC:**

```
runPlugin('qupath.imagej.detect.cells.PositiveCellDetection', '{"detectionImageBright-field": "Optical density sum", "requestedPixelSizeMicrons": 0.2325, "backgroundRadiusMicrons": 8.0, "medianRadiusMicrons": 0.0, "sigmaMicrons": 1.5, "minAreaMicrons": 10.0, "maxAreaMicrons": 400.0, "threshold": 0.1, "maxBackground": 2.0, "watershedPostProcess": true, "excludeDAB": false, "cellExpansionMicrons": 5.0, "includeNuclei": true, "smoothBoundaries": true, "makeMeasurements": true, "thresholdCompartment": "Nucleus: DAB OD mean", "thresholdPositive1": 0.2, "thresholdPositive2": 0.4, "thresholdPositive3": 0.6000000000000001, "singleThreshold": true})
```

**Anhang 2:** Für die CD24 immunhistochemischen Färbungen wurden die BTMAs 92A, 92B, 92C, 92D, 92E, 92F, 92G, 92H der Bonner HNSCC Kohorte analysiert.

### **Positive cell detection CD24 IHC:**

```
runPlugin('qupath.imagej.detect.cells.PositiveCellDetection', '{"detectionImageBright-field": "Optical density sum", "requestedPixelSizeMicrons": 0.233, "backgroundRadiusMicrons": 8.0, "medianRadiusMicrons": 0.0, "sigmaMicrons": 1.5, "minAreaMicrons": 10.0, "maxAreaMicrons": 400.0, "threshold": 0.1, "maxBackground": 2.0, "watershedPostProcess": true, "excludeDAB": false, "cellExpansionMicrons": 5.0, "includeNuclei": true, "smoothBoundaries": true, "makeMeasurements": true, "thresholdCompartment": "Nucleus: DAB OD mean", "thresholdPositive1": 0.2, "thresholdPositive2": 0.4, "thresholdPositive3": 0.6000000000000001, "singleThreshold": true});
```

**Anhang 3:** Für die Siglec-10 immunhistochemischen Färbungen wurden die BTMAs 92A, 92B, 92C, 92D, 92E, 92F, 92G, 92H der Bonner HNSCC Kohorte analysiert.

### **Positive cell detection Siglec-10 IHC:**

```
runPlugin('qupath.imagej.detect.cells.PositiveCellDetection', '{"detectionImageBright-field": "Optical density sum", "requestedPixelSizeMicrons": 0.233, "backgroundRadiusMicrons": 8.0, "medianRadiusMicrons": 0.0, "sigmaMicrons": 1.5, "minAreaMicrons": 10.0,
```



"maxAreaMicrons": 400.0, "threshold": 0.1, "maxBackground": 2.0, "watershedPostProcess": true, "excludeDAB": false, "cellExpansionMicrons": 5.0, "includeNuclei": true, "smoothBoundaries": true, "makeMeasurements": true, "thresholdCompartment": "Nucleus: DAB OD mean", "thresholdPositive1": 0.15, "thresholdPositive2": 0.4, "thresholdPositive3": 0.6000000000000001, "singleThreshold": true});

#### **Anhang 4: Classifier CD24 Färbung:**

Classifier: Random Trees Classes: [Stroma, Tumor] Normalization: None Main parameters: {"maxDepth": 0, "minSamples": 10, "use1SE": true, "termCritMaxTrees": 50, "termCritEPS": 0.0} Required measurements (41): Nucleus: Area Nucleus: Perimeter Nucleus: Circularity Nucleus: Max caliper Nucleus: Min caliper Nucleus: Eccentricity Nucleus: Hematoxylin OD mean Nucleus: Hematoxylin OD sum Nucleus: Hematoxylin OD std dev Nucleus: Hematoxylin OD max Nucleus: Hematoxylin OD min Nucleus: Hematoxylin OD range Nucleus: DAB OD mean Nucleus: DAB OD sum Nucleus: DAB OD std dev Nucleus: DAB OD max Nucleus: DAB OD min Nucleus: DAB OD range Cell: Area Cell: Perimeter Cell: Circularity Cell: Max caliper Cell: Min caliper Cell: Eccentricity Cell: Hematoxylin OD mean Cell: Hematoxylin OD std dev Cell: Hematoxylin OD max Cell: Hematoxylin OD min Cell: DAB OD mean Cell: DAB OD std dev Cell: DAB OD max Cell: DAB OD min Cytoplasm: Hematoxylin OD mean Cytoplasm: Hematoxylin OD std dev Cytoplasm: Hematoxylin OD max Cytoplasm: Hematoxylin OD min Cytoplasm: DAB OD mean Cytoplasm: DAB OD std dev Cytoplasm: DAB OD max Cytoplasm: DAB OD min Nucleus/Cell area ratio Intensity classifier Input class: All Thresholded measurement: Nucleus: DAB OD mean Thresholded values: 0.2, 0.4, 0.6

#### **Anhang 5: Classifier CD68 Färbung:**

Classifier: Random Trees Classes: [Necrosis, Stroma, Tumor] Normalization: None Main parameters: {"maxDepth": 0, "minSamples": 10, "use1SE": true, "termCritMaxTrees": 50, "termCritEPS": 0.0} Required measurements (83): Nucleus: Area Nucleus: Perimeter Nucleus: Circularity Nucleus: Max caliper Nucleus: Min caliper Nucleus: Eccentricity Nucleus: Hematoxylin OD mean Nucleus: Hematoxylin OD sum Nucleus: Hematoxylin OD std dev Nucleus: Hematoxylin OD max Nucleus: Hematoxylin OD min Nucleus: Hematoxylin OD range Nucleus: DAB OD mean Nucleus: DAB OD sum Nucleus: DAB OD std dev Nucleus:

DAB OD max Nucleus: DAB OD min Nucleus: DAB OD range Cell: Area Cell: Perimeter  
 Cell: Circularity Cell: Max caliper Cell: Min caliper Cell: Eccentricity Cell: Hematoxylin OD  
 mean Cell: Hematoxylin OD std dev Cell: Hematoxylin OD max Cell: Hematoxylin OD min  
 Cell: DAB OD mean Cell: DAB OD std dev Cell: DAB OD max Cell: DAB OD min Cyto-  
 plasm: Hematoxylin OD mean Cytoplasm: Hematoxylin OD std dev Cytoplasm: Hematox-  
 ylin OD max Cytoplasm: Hematoxylin OD min Cytoplasm: DAB OD mean Cytoplasm: DAB  
 OD std dev Cytoplasm: DAB OD max Cytoplasm: DAB OD min Nucleus/Cell area ratio  
 Smoothed: 25 µm: Nucleus: Area Smoothed: 25 µm: Nucleus: Perimeter Smoothed: 25  
 µm: Nucleus: Circularity Smoothed: 25 µm: Nucleus: Max caliper Smoothed: 25 µm: Nu-  
 cleus: Min caliper Smoothed: 25 µm: Nucleus: Eccentricity Smoothed: 25 µm: Nucleus:  
 Hematoxylin OD mean Smoothed: 25 µm: Nucleus: Hematoxylin OD sum Smoothed: 25  
 µm: Nucleus: Hematoxylin OD std dev Smoothed: 25 µm: Nucleus: Hematoxylin OD max  
 Smoothed: 25 µm: Nucleus: Hematoxylin OD min Smoothed: 25 µm: Nucleus: Hematox-  
 ylin OD range Smoothed: 25 µm: Nucleus: DAB OD mean Smoothed: 25 µm: Nucleus:  
 DAB OD sum Smoothed: 25 µm: Nucleus: DAB OD std dev Smoothed: 25 µm: Nucleus:  
 DAB OD max Smoothed: 25 µm: Nucleus: DAB OD min Smoothed: 25 µm: Nucleus: DAB  
 OD range Smoothed: 25 µm: Cell: Area Smoothed: 25 µm: Cell: Perimeter Smoothed: 25  
 µm: Cell: Circularity Smoothed: 25 µm: Cell: Max caliper Smoothed: 25 µm: Cell: Min  
 caliper Smoothed: 25 µm: Cell: Eccentricity Smoothed: 25 µm: Cell: Hematoxylin OD  
 mean Smoothed: 25 µm: Cell: Hematoxylin OD std dev Smoothed: 25 µm: Cell: Hema-  
 toxylin OD max Smoothed: 25 µm: Cell: Hematoxylin OD min Smoothed: 25 µm: Cell:  
 DAB OD mean Smoothed: 25 µm: Cell: DAB OD std dev Smoothed: 25 µm: Cell: DAB OD  
 max Smoothed: 25 µm: Cell: DAB OD min Smoothed: 25 µm: Cytoplasm: Hematoxylin  
 OD mean Smoothed: 25 µm: Cytoplasm: Hematoxylin OD std dev Smoothed: 25 µm: Cy-  
 toplasm: Hematoxylin OD max Smoothed: 25 µm: Cytoplasm: Hematoxylin OD min  
 Smoothed: 25 µm: Cytoplasm: DAB OD mean Smoothed: 25 µm: Cytoplasm: DAB OD  
 std dev Smoothed: 25 µm: Cytoplasm: DAB OD max Smoothed: 25 µm: Cytoplasm: DAB  
 OD min Smoothed: 25 µm: Nucleus/Cell area ratio Smoothed: 25 µm: Nearby detection  
 counts Intensity classifier Input class: All Thresholded measurement: Nucleus: DAB OD  
 mean Thresholded values: 0.2, 0.4, 0.6

## Anhang 6: Classifier Siglec-10 Färbung

Classifier: Random Trees Classes: [Stroma, Tumor] Normalization: None Main parameters: {"maxDepth": 0, "minSamples": 10, "use1SE": true, "termCritMaxTrees": 50, "termCritEPS": 0.0} Required measurements (83): Nucleus: Area Nucleus: Perimeter Nucleus: Circularity Nucleus: Max caliper Nucleus: Min caliper Nucleus: Eccentricity Nucleus: Hematoxylin OD mean Nucleus: Hematoxylin OD sum Nucleus: Hematoxylin OD std dev Nucleus: Hematoxylin OD max Nucleus: Hematoxylin OD min Nucleus: Hematoxylin OD range Nucleus: DAB OD mean Nucleus: DAB OD sum Nucleus: DAB OD std dev Nucleus: DAB OD max Nucleus: DAB OD min Nucleus: DAB OD range Cell: Area Cell: Perimeter Cell: Circularity Cell: Max caliper Cell: Min caliper Cell: Eccentricity Cell: Hematoxylin OD mean Cell: Hematoxylin OD std dev Cell: Hematoxylin OD max Cell: Hematoxylin OD min Cell: DAB OD mean Cell: DAB OD std dev Cell: DAB OD max Cell: DAB OD min Cytoplasm: Hematoxylin OD mean Cytoplasm: Hematoxylin OD std dev Cytoplasm: Hematoxylin OD max Cytoplasm: Hematoxylin OD min Cytoplasm: DAB OD mean Cytoplasm: DAB OD std dev Cytoplasm: DAB OD max Cytoplasm: DAB OD min Nucleus/Cell area ratio Smoothed: 25  $\mu$ m: Nucleus: Area Smoothed: 25  $\mu$ m: Nucleus: Perimeter Smoothed: 25  $\mu$ m: Nucleus: Circularity Smoothed: 25  $\mu$ m: Nucleus: Max caliper Smoothed: 25  $\mu$ m: Nucleus: Min caliper Smoothed: 25  $\mu$ m: Nucleus: Eccentricity Smoothed: 25  $\mu$ m: Nucleus: Hematoxylin OD mean Smoothed: 25  $\mu$ m: Nucleus: Hematoxylin OD sum Smoothed: 25  $\mu$ m: Nucleus: Hematoxylin OD std dev Smoothed: 25  $\mu$ m: Nucleus: Hematoxylin OD max Smoothed: 25  $\mu$ m: Nucleus: Hematoxylin OD min Smoothed: 25  $\mu$ m: Nucleus: Hematoxylin OD range Smoothed: 25  $\mu$ m: Nucleus: DAB OD mean Smoothed: 25  $\mu$ m: Nucleus: DAB OD sum Smoothed: 25  $\mu$ m: Nucleus: DAB OD std dev Smoothed: 25  $\mu$ m: Nucleus: DAB OD max Smoothed: 25  $\mu$ m: Nucleus: DAB OD min Smoothed: 25  $\mu$ m: Nucleus: DAB OD range Smoothed: 25  $\mu$ m: Cell: Area Smoothed: 25  $\mu$ m: Cell: Perimeter Smoothed: 25  $\mu$ m: Cell: Circularity Smoothed: 25  $\mu$ m: Cell: Max caliper Smoothed: 25  $\mu$ m: Cell: Min caliper Smoothed: 25  $\mu$ m: Cell: Eccentricity Smoothed: 25  $\mu$ m: Cell: Hematoxylin OD mean Smoothed: 25  $\mu$ m: Cell: Hematoxylin OD std dev Smoothed: 25  $\mu$ m: Cell: Hematoxylin OD max Smoothed: 25  $\mu$ m: Cell: Hematoxylin OD min Smoothed: 25  $\mu$ m: Cell: DAB OD mean Smoothed: 25  $\mu$ m: Cell: DAB OD std dev Smoothed: 25  $\mu$ m: Cell: DAB OD max Smoothed: 25  $\mu$ m: Cell: DAB OD min Smoothed: 25  $\mu$ m: Cytoplasm: Hematoxylin OD mean Smoothed: 25  $\mu$ m: Cytoplasm: Hematoxylin OD std dev Smoothed: 25  $\mu$ m: Cytoplasm: Hematoxylin OD max Smoothed: 25  $\mu$ m: Cytoplasm: Hematoxylin OD min

Smoothed: 25 µm: Cytoplasm: DAB OD mean Smoothed: 25 µm: Cytoplasm: DAB OD  
 std dev Smoothed: 25 µm: Cytoplasm: DAB OD max Smoothed: 25 µm: Cytoplasm: DAB  
 OD min Smoothed: 25 µm: Nucleus/Cell area ratio Smoothed: 25 µm: Nearby detection  
 counts Intensity classifier Input class: All Thresholded measurement: Nucleus: DAB OD  
 mean Thresholded values: 0.2, 0.4, 0.6

### Anhang 7: Skript CD24 Färbung:

1. `setImageType('BRIGHTFIELD_H_DAB');`
2. `setColorDeconvolutionStains({'Name': "H-DAB default", "Stain 1": "Hematoxylin", "Values 1": "0.65111 0.70119 0.29049 ", "Stain 2": "DAB", "Values 2": "0.26917 0.56824 0.77759 ", "Background": " 255 255 255 "});`
3. `runPlugin('qupath.imagej.detect.cells.PositiveCellDetection', '{"detectionImageBrightfield": "Optical density sum", "requestedPixelSizeMicrons": 0.233, "backgroundRadiusMicrons": 8.0, "medianRadiusMicrons": 0.0, "sigmaMicrons": 1.5, "minAreaMicrons": 10.0, "maxAreaMicrons": 400.0, "threshold": 0.1, "maxBackground": 2.0, "watershedPostProcess": true, "excludeDAB": false, "cellExpansionMicrons": 5.0, "includeNuclei": true, "smoothBoundaries": true, "makeMeasurements": true, "thresholdCompartment": "Nucleus: DAB OD mean", "thresholdPositive1": 0.2, "thresholdPositive2": 0.4, "thresholdPositive3": 0.6000000000000001, "singleThreshold": true});`
4. `runPlugin('qupath.lib.plugins.objects.SmoothFeaturesPlugin', '{"fwhmMicrons": 25.0, "smoothWithinClasses": false, "useLegacyNames": false});`
5. `runClassifier('C:\\Documents\\CD24\\Classifier.qpclassifier')`

### Anhang 8: Skript CD68 Färbung:

1. `setImageType('BRIGHTFIELD_H_DAB');`
2. `setColorDeconvolutionStains({'Name': "H-DAB default", "Stain 1": "Hematoxylin", "Values 1": "0.65111 0.70119 0.29049 ", "Stain 2": "DAB", "Values 2": "0.26917 0.56824 0.77759 ", "Background": " 255 255 255 "});`
3. `runPlugin('qupath.imagej.detect.cells.PositiveCellDetection', '{"detectionImageBrightfield": "Optical density sum", "requestedPixelSizeMicrons": 0.2325,`

- ```
"backgroundRadiusMicrons": 8.0, "medianRadiusMicrons": 0.0, "sigma-
Microns": 1.5, "minAreaMicrons": 10.0, "maxAreaMicrons": 400.0, "threshold":
0.1, "maxBackground": 2.0, "watershedPostProcess": true, "excludeDAB":
false, "cellExpansionMicrons": 5.0, "includeNuclei": true, "smoothBoundaries":
true, "makeMeasurements": true, "thresholdCompartment": "Nucleus: DAB OD
mean", "thresholdPositive1": 0.2, "thresholdPositive2": 0.4, "thresholdPosi-
tive3": 0.6000000000000001, "singleThreshold": true}');
4. runPlugin('qupath.lib.plugins.objects.SmoothFeaturesPlugin', '{"fwhmMicrons":
25.0, "smoothWithinClasses": false, "useLegacyNames": false}');
5. runClassifier('C:\\Documents\\Classifier.qpclassifier');
6. setCellIntensityClassifications('Nucleus: DAB OD mean', 0.3)
```

### Anhang 9: Skript Siglec-10 Färbung

1. setImageType('BRIGHTFIELD\_H\_DAB');
2. setColorDeconvolutionStains({'Name' : "H-DAB default", "Stain 1" : "Hematoxy-  
lin", "Values 1" : "0.65111 0.70119 0.29049 ", "Stain 2" : "DAB", "Values 2" :  
"0.26917 0.56824 0.77759 ", "Background" : " 255 255 255 "});
3. runPlugin('qupath.imagej.detect.cells.PositiveCellDetection', '{"detectionImage-  
Brightfield": "Optical density sum", "requestedPixelSizeMicrons": 0.233, "back-  
groundRadiusMicrons": 8.0, "medianRadiusMicrons": 0.0, "sigmaMicrons": 1.5,  
"minAreaMicrons": 10.0, "maxAreaMicrons": 400.0, "threshold": 0.1, "maxBack-  
ground": 2.0, "watershedPostProcess": true, "excludeDAB": false, "cellExpansion-  
Microns": 5.0, "includeNuclei": true, "smoothBoundaries": true, "makeMeasure-  
ments": true, "thresholdCompartment": "Nucleus: DAB OD mean", "thresholdPosi-  
tive1": 0.15, "thresholdPositive2": 0.4, "thresholdPositive3": 0.6000000000000001,  
"singleThreshold": true}');
4. runPlugin('qupath.lib.plugins.objects.SmoothFeaturesPlugin', '{"fwhmMicrons":  
25.0, "smoothWithinClasses": false, "useLegacyNames": false}');
5. runClassifier('C:\\Documents\\Classifier.qpclassifier')

**Anhang 10:****Tab. 4: Cox-Regressionsmodell CD68 Expression.**

Analyse der Auswirkungen der CD68 Zelldichte für Patienten mit hoher CD68 Expression oberhalb der 75 %-Perzentile oder niedriger CD68 Expression unterhalb der 75 %-Perzentile angeglichen für prognostisch relevante klinische Parameter für HNSCC. Signifikanz insgesamt  $p=0,002$ .

| Kovariablen      |                           | Hazardrate | 95 % Konfidenzintervall | p-Wert       |
|------------------|---------------------------|------------|-------------------------|--------------|
| CD68 Expression  | [75% Perzentile vs. Rest] | 2,091      | 0,646-6,768             | 0,218        |
| pT-Stadium       | [pTis-pT4]                | 1,834      | 1,077-3,124             | <b>0,026</b> |
| pN-Stadium       | [pN0-pN3]                 | 1,922      | 1,117-3,307             | <b>0,018</b> |
| HPV-Status (p16) | [positiv vs. negativ]     | 0,244      | 0,055-1,087             | 0,064        |

**Anhang 11:****Tab. 5: Cox-Regressionsmodell CD24 Expression.**

Analyse der Auswirkungen der CD24 Expression im Tumor für Patienten mit hohem CD24 H-Score oberhalb der 50 %-Perzentile oder niedrigem CD24 H-Score unterhalb der 50 %-Perzentile angeglichen für prognostisch relevante klinische Parameter für HNSCC. Signifikanz insgesamt  $p=0,002$ .

| Kovariablen      |                                | Hazardrate | 95 % Konfidenzintervall | p-Wert       |
|------------------|--------------------------------|------------|-------------------------|--------------|
| CD24 Expression  | [niedrige vs. hohe Expression] | 1,215      | 0,438-3,374             | 0,709        |
| pT-Stadium       | [pT0-pT4]                      | 1,89       | 1,138-3,138             | <b>0,014</b> |
| pN-Stadium       | [pN0-pN3]                      | 1,621      | 0,969-2,714             | 0,066        |
| HPV-Status (p16) | [positiv vs. negativ]          | 0,247      | 0,052-1,170             | 0,078        |

**Anhang 12:****Tab. 6: Cox-Regressionsmodell Siglec-10 Expression.**

Analyse der Siglec-10 Expression im Tumor für Patienten mit hohem Siglec-10 H-Score oberhalb der 50 %-Perzentile oder niedrigem Siglec-10 H-Score unterhalb der 50 %-Perzentile angeglichen für prognostisch relevante klinische Parameter für HNSCC. Signifikanz insgesamt  $p=0,006$ .

| Kovariablen          |                                | Hazardrate | 95 % Konfidenzintervall | p-Wert      |
|----------------------|--------------------------------|------------|-------------------------|-------------|
| Siglec-10 Expression | [niedrige vs. hohe Expression] | 1,573      | 0,553-4,474             | 0,396       |
| pT-Stadium           | [pTis-pT4]                     | 1,789      | 1,059-3,021             | <b>0,03</b> |
| pN-Stadium           | [pN0-pN3]                      | 1,694      | 0,997-2,876             | 0,051       |
| HPV-Status (p16)     | [positiv vs. negativ]          | 0,248      | 0,055-1,115             | 0,069       |

## 10. Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich während der Zeit meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Professor Dr. Glen Kristiansen für die Überlassung des Promotionsthemas und für seine wertvollen Anregungen und Ratschläge.

Insbesondere danken möchte ich Dr. Christine Sanders für die hervorragende Betreuung und Unterstützung während meiner Promotion. Ihr großes Engagement und ihre Hilfsbereitschaft haben sehr zum Erfolg der Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Susanne Steiner für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen bedanken.

Ganz besonders möchte ich außerdem meinen Eltern und Geschwistern sowie meinem Partner für ihren fortwährenden Beistand und ihre Unterstützung danken.